

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORLİSTAT UYGULANAN BT-474 KANSER HÜCRELERİNDE TÜMÖR
BASKILAYICI FOXO3A İLE İLİSKİLİ MİKRORNA PROFİLLERİNİN
ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ONUR IRMAK

1109412001

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi PELİN ÖZFİLİZ KILBAŞ

OCAK 2023

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORLİSTAT UYGULANAN BT-474 KANSER HÜCRELERİNDE TÜMÖR
BASKILAYICI FOXO3A İLE İLİSKİLİ MİKRORNA PROFİLLERİNİN
ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ONUR IRMAK

1109412001

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi PELİN ÖZFİLİZ KILBAŞ

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ayhan ŞAHİN

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER

OCAK 2023

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında bana katlanan ve yardımcı olan tez danışmanım Sayın Dr.Öğretim Üyesi PELİN ÖZFİLİZ KILBAŞ teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Yiğit Efe Aydın tesekkürlerimi borç bilirim.

Onur IRMAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Meme Kanseri	2
2.1.1 Meme Kanserinin Histolojisi ve Sınıflandırılması	2
2.1.2 Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	3
2.1.3 Meme Kanseri Risk Faktörleri	4
2.1.4 Meme Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Adayları	5
2.1.5 Meme Kanseri Tedavileri	5
2.1.6 Meme kanseri hücre hatlarının isimlendirilmesi	7
2.1.7 Meme kanseri hücre hatlarının moleküler sınıflandırılması	6
2.2 Lipid Metabolizması Ve Kanser	7
2.2.1 Obezite ve meme kanseri ilişkisi	8
2.2.2 Hormon Reseptörü Pozitif Premenopozal Meme Kanseri	8
2.2.3 Hormon Reseptörü Negatif Premenopozal Meme Kanseri	8
2.2.4 Metabolik yollar	11
2.3 Orlistat ve Meme Kanseri İlişkisi	12
2.4 Foxo Ailesi ve Meme Kanseri	13
2.4.1 FOXO işlevi	14
2.5 MikroRNA'lar ve Meme Kanseri	14
2.5.1 MikroRNA biyogenezi	14
3 Materyal-metodlar	16
3.1 Kullanılan Cihazların Listesi	16
3.2 Kullanılan Kimyasallar	16

3.3	Metodlar	16
3.3.1	Plazmiti Eldesi ve Büyütülmesi	16
3.3.2	Plazmit izolasyonu	18
3.3.3	Hücre Kültürü.....	18
3.3.4	FT ve FF plazmit vektörlerinin BT-474 meme kanseri hücrelerine tranfeksiyonu	19
3.3.5	Immunoblotlama Yöntemi	19
3.3.6	Protein konsantrasyonu belirleme-Bradford yöntemi	20
3.3.7	RNA izolasyonu	20
3.3.8	cDNA çevrimi	21
3.3.9	QRT-PCR Analizi	21
3.3.10	MTT Canlılık testi	21
3.3.11	Floresans boyama	22
	Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DioC6) Boyama.....	22
3.3.12	miRNA İzolasyonu, CDNA'ya çevrilmesi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
3.3.13	qRT-PCR analizi için kullanılan PFAFFL metodu	22
3.3.14	İstatiksel Analiz	23
4	SONUÇLAR.....	24
4.1	FLAG etiketli boş vektörün ve FLAG etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörlerinin izolasyonu, spektral ve agaroz jel elektroforezi analizi.....	24
4.2	FLAG etiketli boş vektörün (FT) ve FLAG etiketli ve FoxO3a geni içeren plazmit vektörlerinin (FF) BT-474 meme kanseri hücrelerine transfeksiyonu sonrası FoxO3a ifade seviyesinin kontrolü	25
4.3	Orlistat uygulamasının BT-474 meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi	26
4.4	FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin incelenmesi	27
4.5	FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi	28
4.6	FoxO3a artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-27a ifadesine etkisinin qRT-PCR İle analizi	29
4.7	FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-200a-5p ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi.....	30

4.8	FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-429 ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi.....	31
4.9	FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-767-5p ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi	32
4.10	FoxO3a Artışının ve Orlistat Uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-130b-3p İfadesine Etkisinin qRT-PCR İle Analizi	33
4.11	Foxo3a Artışının ve Orlistat Uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-887-3p İfadesine Etkisinin qRT-PCR İle Analizi	34
4.12	Elde Edilen Mirna Sonuçlarının Diana-Mirpath V4.0 Web Sunucusu İle Fonksiyonel Analizi	36
4.12.1	miR-27a, miR-200a-5p, miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yolları ve genlerin belirlenmesi	36
4.12.2	miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin ortak hedeflediği sinyal yolları ve genlerin belirlenmesi	41
5	TARTIŞMA	47
6	REFERANSLAR	54
7	EKLER.....	62
7.1	Ek A: Kullanılan Cihazların Listesi	62
7.2	EK B: KULLANILAN Kimyasalların Listesi	64

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1 Meme kanseri	3
Şekil 2-2 Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki mevcut alt tiplene şemalarının karşılaştırılması.	7
Şekil 2-3 Lipid metabolizması	10
Şekil 2-4 Orlistat aracılı tümör hücreleri apoptozunun potansiyel moleküler mekanizmaları.	13
Şekil 2-5 FOXO'lar, hücre apoptozunu ve yaşlanmasını teşvik ederek tümör oluşumunu inhibe etmede tümör baskılayıcı roller sergiler.	14
Şekil 2-6 Kanonik miRNA biyogenezi ve miRNA aracılı gen susturma.....	15
Şekil 3-1. FLAG-FOXO3a-wt vektörün tüm sekans haritası.....	17
Şekil 3-2 FLAG-işaretli boş plazmit vektörün tüm sekans haritası	18
Şekil 4-1 FLAG etiketli boş vektörün ve FLAG etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörlerinin spektral analiz sonucu	24
Şekil 4-2. Markır olarak GeneRuler 1kb Plus Ladder (Thermo Fisher, SM0311) ve 6x yükleme tamponu olarak da DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher, R0611) kullanılmıştır. M: Markır, FT: Flag-Tag boş plazmit vektörü, FF: Flag-etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörü.....	25
Şekil 4-3: Transfeksiyon sonrası BT-474 hücrelerinde FoxO3a protein seviyelerinin immünoiblotlama yöntemi ile incelenmesi (wt: wild type, FF: FLAG etiketli ve FoxO3a geni içeren plazmid vektörü transfekte edilmiş).	25
Şekil 4-4 BT-474 hücrelerinde Foxo3a ekspresyon seviyesinin qRT-PCR ile gösterilmesi	26
Şekil 4-5: Orlistat uygulanmasının BT-474 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT Hücre Canlılığı Testi ile incelenmesi.	27
Şekil 4-6 BT-474 hücrelerinde Foxo3a artışı ile ilişkili olarak orlistatin mitokondri membran potansiyeline etkisinin incelenmesi.	28
Şekil 4-7.BT-474 hücrelerinde Foxo3a artışı ile ilişkili olarak orlistatin mitokondri membran potansiyeline etkisinin incelenmesi	29

Şekil 4-8 BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-27a ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.	30
Şekil 4-9: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-200a-5p ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.....	31
Şekil 4-10 BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-429'un ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.	32
Şekil 4-11: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-767-5p'nın ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.....	33
Şekil 4-12: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-130b-3p'nın ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.....	34
Şekil 4-13 :BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-887-3p'nın ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.....	35
Şekil 4-14 DIANA-miRPath v.4.0 web sunucu kullanılarak miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak etkili sinyal yollarının belirlenmesi için kullanılan veriler.	37

TABLO LİSTESİ

Tablo 4-1 miR-27a, miR-200a ve miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yolları	38
Tablo 4-2 miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yollarında görev alan genler	39
Tablo 4-3 miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p ortak hedeflediği sinyal yolları	42
Tablo 4-4 Çalışmamızda ifade seviyesi azalan miRNA'lerden miR-130b-3p, miR-767-5p ve miR-887-5p için kanser sinyal yollarında hedeflenen mRNA'ların tablosu	45

KISALTMALAR

MK/BC	: Meme Kanseri/Breast Cancer
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	:Ekstraselüler matriks
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
EMT	:Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FBS	:Fetal Sığır Serumumu
FDA	:Food and Drug Administration
FOXO3a	:Forkhead Box 3a
IGFR	:İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
KRAS	:Kirsten Sıçan Sarkoma Virüsü
miRNA	:MikroRNA
MMP	:Matriks Metalloproteinaz
mTOR	:Mammalian Target of Rapamycin/ Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
PBS	:Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltilisi
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi
TP53	: Tumor Protein p53
WT	:Wild Type/Doğal Tip
FT	:FLAG etiketli, FoxO3a genini içermeyen plazmit vektör
FF	:FLAG etiketli, FoxO3a genini içeren plazmit vektör

FA	: Fatty Acid/Yağ Asidi
FASN	: Yağ Asit Sentaz enzimi
PI	: Propidyum Iyodür
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
PI3K	: Fosfatidilinositol-3 kinaz
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
ER	: Estrogen Receptor/Östrojen reseptörü
ER α	: Estrogen Receptor/Östrojen reseptörü-alfa
ER β	: Estrogen Receptor/Östrojen reseptörü beta
PR	: Progesterone Receptor/Progesteron reseptörü
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetraolyum bromür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
QRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
ACLY	: Açılgliserol
GPCRR	: G proteinine bağlı reseptörler
mTORC2	: mTOR kompleksi 2
AKT	: protein kinaz B veya PKB
DCIS	: Duktal karsinoma in situ/
BMI	: Body Mass Index/Vücut kitle endeksi

ÖZET

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir. Meme kanserinin heterojenik yapısı ve tümör mikro çevresi göz önüne alındığında, tümör hücrelerinin komşu hücrelerden çeşitli hormonlar ve sitokinler salgılanması yoluyla etkilendiği ve kanser gelişiminin tetiklendiği bilinmektedir. Bu kapsamda meme tümörleri ve en bilinen komşu dokularından olan adipositler, salgıladıkları adipokinler ve büyüme faktörleri aracılığı ile karşılıklı olarak birbirleriyle etkileşimde bulunmakta ve meme kanserinin agresivitesinin artmasında teşvik edici rol oynamaktadırlar. Bu kapsamda yağ asidi metabolizması inhibitörü olarak kullanılan orlistat, obezite karşıtı bir ilaçtır ve antiproliferatif, proapoptotik, antianjiyogenik ve anti metastatik etkiler göstererek kanser hücrelerinin metabolizmasını engeller. Orlistatin meme kanserinde kullanımı ile EMT (epitel-mezenkimal dönüşüm) baskılanması ile apoptoz mekanizmasının aktiflendiği belirlenmiştir.

Birçok kanser tipinde sıklıkla çalışılmış olan FoxO3a transkripsiyon faktörünün, otofaji, apoptoz, endoplazmik retikulum stresi gibi hücresel mekanizmalar ile ilişkide olduğu ve bu mekanizmalarda görevli olan genlerin regülasyonunda rol oynarak tümör baskılayıcı karakter gösterdiği bilinmektedir. Ancak FoxO3a'nın meme kanseri gelişiminde tetikleyici rol oynayan yağ asidi sentez metabolizmasındaki fonksiyonu net olarak bilinmemektedir. Bu kapsamda tez çalışmasında, FoxO3a artışı ve yağ asidi metabolizması inhibitörü olan orlistat ilacı uygulamasını takiben BT-474 meme kanseri hücrelerinde miRNA (microRNA)'ların ifade seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, BT-474 meme kanseri hücrelerinde FoxO3a'nın ifadesi plazmit vektörler aracılığı ile arttırılmış ve artan FoxO3a ifadesi immunoblotlama ve qRT-PCR teknikleri ile doğrulanmıştır. Ardından, MTT ve DioC6 floresans boyama yöntemleri ile FoxO3a'nın artışının ve orlistat uygulamasının hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığındaki değişikliğin incelenmesinden sonra, FoxO3a arttırılmış ve orlistat uygulanmış BT-474 hücrelerinde miR-27a-3p, miR-200a-5p, miR-429, miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin ifade seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. miR-27a ,miR-200a-5p ve miR-429'un wt (doğal tip) hücrelere kıyasla FoxO3a'nın ekspresyonu arttırılmış ve orlistat uygulanmış BT-474 hücrelerinde arttığı, miR-130b-3p, miR-887-3p, miR-767-5p ise azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kapsamında ifade

seviyesi artan ve azalan miRNA'lar gruplanarak ortak hedef genleri ve etkili oldukları sinyal yolları *in silico* olarak belirlenerek fonksiyonel analizleri yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler yağ asidi metabolizması aracılı olarak FoxO3a artışının meme kanseri gelişimindeki etkilerinin anlaşılması açısından literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, Foxo3a, BT-474, orlistat, miR-27a, miR-130b-3p, miR-429, miR-767-5p, miR-200a-5p, miR-887-3p



SUMMARY

Considering the variability of breast cancer and FoxO3a-mediated cell development, it has become important to determine the occurrence of miRNA (microRNA) expression depending on FoxO3a expression level during breast cancer progression. Although it is known that FoxO3a disrupts cell viability and suppresses cancer due to its tumor suppressor role in breast cancer, there is no detailed information in the literature about genetic miRNAs due to the increase in FoxO3a. Orlistat is an anti-obesity drug and inhibits cancer healing metabolism, treating hypolipidemic, antiproliferative, proapoptotic, antiangiogenic and anti-metastatic effects. This drug promotes the apoptosis of tumor cells by obscuring the NF- κ B, caspase3/caspase9 and AKT/m signaling pathways in breast cancer. With the use of orlistat, a suppressor of fatty acid stability, in breast cancer, apoptosis rates are actively adjusted by suppressing EMT (epithelial-mesenchymal transformation). However, there are no sufficient studies on the effect of orlistat on breast cancer mediated by FoxO3a. As this active mediator of fatty acid metabolism and with increased FoxO3a, miRNA levels were investigated in the BT-474 breast cancer spectrum. This ability was primarily demonstrated by increased expression of FoxO3a in BT-474 breast cancer. Additionally, cell viability tests were performed with MTT, dioc6, PI staining and it was determined that the increase in FoxO3a caused a decrease in cell viability and that cell viability decreased significantly with orlistat application.. After examining the change in cell viability, the expression levels of miR-27a-3p, miR-130b-5p and miR-429 in BT-474 cells with increased FoxO3a and orlistat application were determined by qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) method. miR-27-3p, miR-200a-5p, miR-429, miR-130b-3p, miR-887-3p, miR767 were increased in FoxO3a expression increased and orlistat-treated BT-474 cells compared to wt (wild type) cells It was determined that miR-130b-3p, miR-887-3p, miR767-5p decreased. The data obtained from this study contribute to the literature in terms of understanding the effects of FoxO3a increase, mediated by fatty acid metabolism, on the development of breast cancer.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

FoxO3a, apoptoz, proliferasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA hasarı ve tümör oluşumu dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlere aracılık eden çatal başlı transkripsiyon faktörlerinin FOXO alt ailesinin bir üyesidir [1]. Tümör baskılayıcı rolü ile meme kanserinde hücre canlılığını azaltıcı ve apoptozu tetikleyici etkisi bilinen FoxO3a'nın yağ asidi metabolizması aracılı olarak meme kanserindeki etkisini açıklayan yeterli çalışma bulunmamaktadır. Meme kanserinin heterojen yapısı göz önüne alındığında yağ asidi metabolizması aracılı olarak değişen miRNA profillerinin belirlenmesi meme kanseri sağ kalımında ve gelişiminde etkili hedef genlerin ve sinyal yollarının aydınlatılması açısından önem kazanmaktadır.

Bu kapsamda yapılan tez çalışmasının amacı, orlistat uygulaması ile yağ asidi baskılanan BT-474 meme kanseri hücrelerinde FoxO3a artışı ile birlikte değişen miRNA ifadelerinin, hedef genlerinin ve sinyal yollarının belirlenmesidir.

2 GENEL BİLGİLER

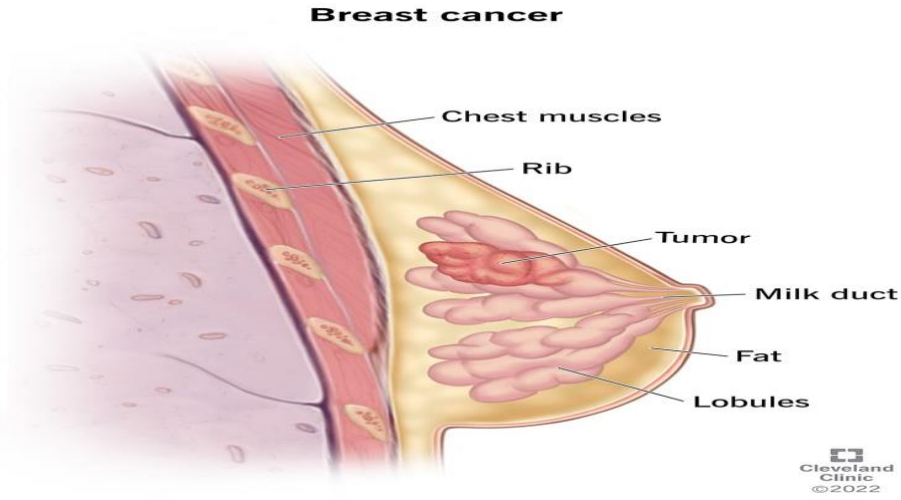
2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri (MK), meme dokusundaki hücrelerin normal yaşam döngüsünden daha hızlı çoğalmaları veya anormal büyümelerinden kaynaklanmaktadır. Meme dokusu lenf, yağ ve bağ dokuları ile bağlantılı kanal sisteminde oluşmaktadır. Meme kanserinde metabolik yeniden programlanma ve immün kaçınma, malignant dönüşüm süreçlerini tetiklemektedir [2].

2.1.1 Meme Kanserin Histolojisi ve Sınıflandırılması

Meme, göğüs duvarına bağlı gelişmiş modifiye tübüler alveolar apokrin ter bezi olarak adlandırılmaktadır. Meme dokusu yapısal olarak değişken sayıda loblara ayrılmış meme bezlerini sarmalayan yağ ve bağ dokusundan oluşmaktadır ve temel işlevi laktasyondur [3].

Meme kanseri ise meme bezlerinden kaynaklanan kanser türlerine verilen genel isimdir. Meme kanserlerinin büyük bir bölümü meme bezindeki epitel hücrelerinden oluşur. Meme bezi epitelleri incelendiğinde süt salgısının gerçekleştiği loblar ve üretilen sütün taşındığı duktal kanallar olmak temel olarak iki yapı bulunur. Meme kanserlerinin hem morfolojik hem de moleküler düzeyde ciddi farklılıklar göstermesi sınıflandırılmasını oldukça zorlaştırmaktadır [4].



Şekil 2-1 Meme kanseri

Kanser gelişiminde oluşan tümör dokularının metastatik davranışları incelendiğinde, meme kanserleri adenom veya karsinomlar olarak ikiye ayrılırlar. Sınıflandırılması yapılırken ilk olarak kanserin kaynak aldığı bölge kullanılmaktadır. Kanser hücreleri duktal kanal hücrelerinden köken almış duktal karsinomlar ve lobüler hücrelerden oluşan lobüler karsinomlar olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Duktal karsinomlar meme kanserlerinin %80-90'lık kısmını oluştururken, lobüler karsinomlar ise %10-20'lik kısmını oluşturur [2].

Bununla birlikte meme kanserleri invaziv karakterlerine göre de sınıflandırılmaktadır. Kanser hücreleri invazyon özelliği gösteriyorsa invaziv karsinoma, invazyon özelliği göstermiyor ise in situ karsinoma olarak sınıflandırılır. Ancak histopatolojik sınıflandırma adeno, medüler, tübüler, apokrin, kribriform, musinöz, papiller karsinomlar gibi pek çok farklı alt tiplere ayrılmaktadır.

2.1.2 Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri insidansı, bir popülasyonun belirli bir zaman aralığında ortaya çıkan yeni vaka sayısı ile ölçülürken, insidans oranı, bu aralıktaki yeni vaka sayısının, o zaman aralığında MK riski taşıyan kişi sayısına bölünmesiyle ölçülür. Kanser insidans oranlarının karşılaştırılması, kanser risk faktörlerinin daha iyi anlaşılmasına yol açabilir, kanser kontrol girişimlerinin planlanmasını ve önceliklendirilmesini kolaylaştırabilir ve spesifik birincil önleme programlarının değerlendirilmesine yardımcı olabilir.

2020 yılından bu yana cilt kanserleri dışında dünya genelinde en çok tanı konulan kanserdir. 2020'de MK, dünya çapında 7,8 milyon kadında teşhis edilen tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık %12'sini oluşturuyordu Genel olarak, meme kanseri insidansı son birkaç on yılda iki katına çıkmıştır [5].

2.1.3 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Multifaktöriyel bir hastalık olan meme kanserinde ön plana çıkan nedenler arasında; östrojen ve progesteron yollarındaki bozulmalar, genlerdeki mutasyonlar ve düzenlenme kusurları, yaş, cinsiyet, çevresel faktörler ve alışkanlıklar yer almaktadır [6]. Yaş, tüm kanserler de olduğu gibi meme kanseri riskini ciddi anlamda artıran önemli bir faktördür. Yaşlanma ile birlikte hücrelerde biriken mutasyon, azalan immün sistem aktivitesi ve hormonal değişiklikler kanser oluşumunun önünü açmaktadır. Meme kanserlerinde önemli faktörlerden biri olan hormonal değişimler ise yaş ile birlikte oluşan menopoza, hamilelik ve çocuk doğum sayısı, kullanılan doğum kontrol yöntemleri ve ilaçlardan doğrudan etkilenmektedir. Premenopozal ve postmenopozal dönemlerde artış gösteren östrodiol ve kolesterol seviyeleri, azalan östrojen ve progesteron hormon düzeyleri meme kanseri riskini önemli derecede artırmaktadır. Doğum sayısının ve ilk doğumun gerçekleştiği yaşı meme kanserinden korunma anlamında önemli olduğu yapılan araştırmalar ile gösterilmiş, aynı zamanda kullanılan doğum kontrol ilaçlarının ise meme kanseri riskini %20-30 oranında artırdığı belirlenmiştir. Genetik ve ailesel yatkınlık açısından meme kanserleri incelendiğinde ise özellikle; ATM, pTEN, HER2, BRCA1, BRCA2, p53, CHEK2 ve PALB2 gibi bazı genlerdeki mutasyonların ya da kusurların meme kanseri ile doğrudan ilişkili olduğu ve kanser riskini ciddi oranda artırdığı bilinmektedir [7]. Birinci derece yakınlarından birinde meme kanseri öyküsü bulunan bireylerde kanser oluşma riski yaklaşık iki kat artarken, bu sayının 2 veya üzeri olduğu kişilerde risk 3-4 katına çıkmaktadır. Yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları meme kanseri ile ilişkili diğer etmenlerdir. Fiziksel aktivitenin düşük olması, gece çalışma veya düzensiz uyku kanser riskinin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte alkol ve sigara kullanımı, düzensiz beslenme ve vitamin D eksikliği, obezite ve meme kitlesinin büyüklüğü gibi pek çok faktör meme kanseri oluşumu ile ilişkili olan etmenlerdir [8].

2.1.4 Meme Kanserinde Kullanılan Biyobelirteç Adayları

Meme kanserinin erken dönemde tanısı için kullanılabilecek ideal biyobelirteçlerin tespit edilememiş olması erken tanının koyulabilmesi, hastalığın tedavi ve takibinin şekillendirilmesi için aşılması gereken en önemli sorunlardan biridir. Yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda meme kanseri için biyobelirteç özelliği gösteren çeşitli moleküller belirlenmiştir. Ancak bu belirteçler ideallikten uzaktır ve genellikle hastalığın; tanısı, tiplendirilmesi, tedavinin belirlenmesi ve sürecin izlenmesi amacı ile kullanılmaktadır [9].

Meme kanserinde hedeflenmiş terapi çalışmaları için kullanılan HER2 onkogeni bir reseptör tirozin kinazdır ve meme kanseri vakalarının %10-30'unda artmış düzeyde bulunur. Ancak HER2 sadece Meme kanserine özgül bir biyobelirteç değildir. HER2 aynı zamanda mide, özefagus, ovaryum ve endometriyal kanserler gibi farklı kanser türlerinde de benzer şekilde artmış anlatım gösterir. Ayrıca Trastuzumab ve Lapatinib gibi farklı HER2 inhibitörleri ile yapılan tedavilerde hücreler bu ilaçlara direnç geliştirebilmektedir. Bu Nedenler HER2'yi meme kanseri için ideal bir biyobelirteç olmaktan uzaklaştırmaktadır. Bu nedenle meme kanserinin erken tanısında kullanılabilecek özgün biyomoleküllerin belirlenmesi, bu moleküllerin etkili bir şekilde hedeflenebilmesi ve tedavi verimliliğinin artırılması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir [10].

2.1.5 Meme Kanseri Tedavileri

Meme kanserinde tedavi ve sağ kalım kanserin erken evrede belirlenmesi ile doğrudan ilişkilidir. Erken evrede belirlenen meme kanseri vakalarının ilk beş yıl sağ kalım süreçleri evre 0-1 arasında %99'a yakınken, bu oran ileri evrelerde %15-20'lere kadar düşmektedir. Aynı zamanda sağ kalım oranları Luminal A ve B tiplerinde yüksek iken negatif meme kanserlerinde daha düşüktür [11]. Bu nedenle hem kanserin erken evrelerde belirlenmesi karakteristiğinin doğru analiz edilmesi sağ kalım ve tedavi için oldukça önemlidir. Özellikle belirli yaş üzerindeki bireyler ve ailesel meme kanseri öyküsü olan kişilerin rutin tarama testlerini yaptırması erken tanı için oldukça önemlidir. Teşhis için en çok kullanılan teknik mamografi olmakla birlikte, ultrasonografi, manyetik rezonans (MR) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme yöntemleri ve ER, PR, HER2 karakterizasyonu ve gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi meme kanseri teşhisi ve tiplendirilmesinde kullanılan

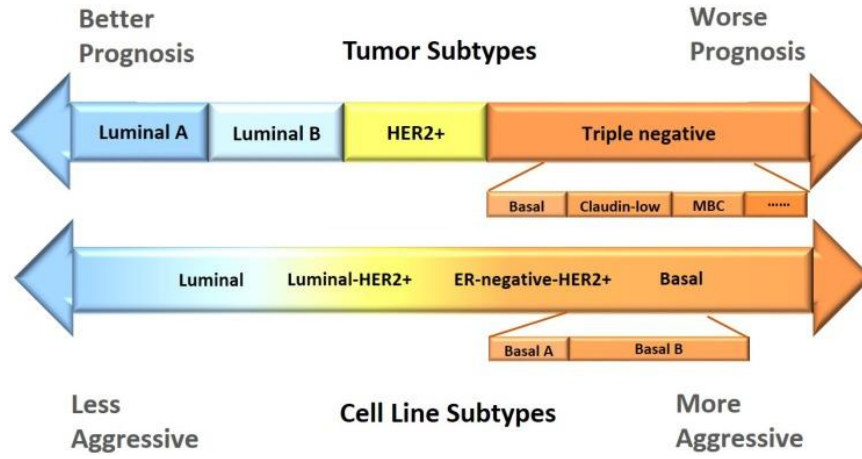
araçların başında gelmektedir [12]. Meme kanseri tedavisinde cerrahi ya da terapötik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Cerrahi yaklaşımlar özellikle erken evrede belirlenen meme kanserlerinde tedavi için yeterli olabilmektedir.

Meme kanserinin tedavisi için yapılan terapi uygulamaları ise endokrin terapiler, radyoterapiler, kemoterapiler ve immünterapiler olarak sıralanabilir. Endokrin terapilerde, östrojen ve progesteron hormon yolları hedef alınır. Letrozol, ve Anastrozol gibi aromataz inhibitörleri ve Tamoxifen gibi reseptör modülatörleri kullanılır [13]. Meme kanserinde sıklıkla kullanılan kemoterapik ajanlar ise Adriamisin, Siklofosfamid, Paklitaksel, Trastuzumab, Dosetaksel ve Karboplatin'dir. İmmün terapilerde ise genellikle HER2, programmed death-1 (PD-1) ve programmed death ligand-1 (PD-L1) için antikorlar ve hedeflenmiş T hücreleri, kanser aşılı, hücrel terapiler ve onkolitik virüsler gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır [14].

2.1.6 Meme kanseri hücre hatlarının moleküler sınıflandırılması

Meme kanseri alt tiplmesi için geleneksel olarak kullanılan üç önemli reseptörün, yani östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epitel reseptörü 2'nin (HER2) durumuna göre karakterize edilmiştir [15].

ER, PR, HER2 durumuna göre meme kanseri luminal A, luminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif olarak sınıflandırılır, burada üçlü negatif tümörler en azından bazal, claudin-düşük, MBC (metaplastik meme kanseri) ve interferon açısından zengin olarak ayırt edilebilir. Mevcut literatürler, genel olarak, luminal hücre hatlarını ayırt etmemektedir; HER2 pozitif hücre hatları, luminal B ve üçlü negatif hücrelere yayılır ve sırasıyla luminal-HER2+ ve ER-negatif-HER2+ olarak adlandırılır ve üçlü negatif hücreler 'Bazal' alt tip olarak adlandırılır, bazal A ve bazal B, sırasıyla bazal tümörleri ve claudin-düşük ve/veya MBC tümörlerini temsil edecek şekilde farklılaşır.



Şekil 2-2 Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki mevcut alt tiplere şemalarının karşılaştırılması.

2.2 Lipid Metabolizması Ve Kanser

Lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle birlikte, biyolojik zarların temel bileşenleridir ve hücreleri oluşturan yapı taşlarıdır. Ek olarak, lipitler enerji depolama ve metabolizmada kullanılır ve birçok hücrel aktivite için sinyal molekülleri olarak önemli rollere sahiptir [16]. Lipid alımı, sentezi ve hidroliz gibi lipid metabolizmasının düzenlenmesi, hücrel homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. Tümör ilerlemesi sırasında besin mevcudiyetinin sürekli olarak değiştiği tümör mikro ortamlarındaki kanser hücreleri, hızlı çoğalmalarını, hayatta kalmalarını, göçlerini, istilalarını ve metastazlarını desteklemek için lipid metabolizmasından yararlanır. Glikolipidler ve fosfolipitler (fosfogliseritler ve sfingolipidler olarak alt kategorilere ayrılır), kolesterol ile birlikte biyolojik zarların ana bileşenlerini temsil eder. Kolesterol ayrıca yağda çözünen vitaminlerin ve steroid hormonlarının sentezi için bir substrattır. Glikolipidlerin ve fosfolipidlerin ana bileşenleri olarak, yağ asitleri (FA'lar), yüksek besin mevcudiyeti sırasında lipid damlacıklarında sentezlenen ve depolanan polar olmayan lipitler olan trigliseritler oluşturmak için bir gliserol kısmı ile esterleştirilebilir ve FA oksidasyonu (FAO, β -oksidasyon olarak da adlandırılır) enerji stresi koşulları altında enerji metabolizması ve zar oluşumunun yanı sıra, lipitler, zar lipidlerinin fosfolipaza bağlı hidrolizinden ve mevcudiyeti büyük ölçüde diyetdeki lipitler tarafından belirlenen temel FA'lardan sentezinden türetilen ikinci habercileri oluşturur [17]. Fosfolipazlar (PLC, PLD ve PLA), diasilgliserol, fosfatidik

asit, lizofosfatidik asit ve araşidonik asit gibi birçok biyoaktif ikinci haberci üretebilir. Bu moleküller RAS, fosfoinositid 3-kinazlar (PI3K), protein kinaz C, RAC, RHO ve tümör oluşumunu destekleyebilen diğer birkaç sinyal ekseninin aktivasyonunu tetikler. Ek olarak, oksisterol ve kolesterol dahil olmak üzere steroller, aşağı akış gen ekspresyonu için sterol düzenleyici element (SRE) – bağlayıcı protein (SREBP) aktivasyonunun kritik düzenleyicileridir ve bu nedenle seviyeleri kanserde lipogenezi etkiler. Kolesterol, sinyalleme için lipid sallarının bir bileşenidir ve ayrıca Hedgehog sinyal aktivasyonu için düzleştirilmiş proteinleri kovalent olarak değiştirebilir [17].

2.2.1 Obezite ve meme kanseri ilişkisi

Obezite vücut kitle endeksi olarak tanımlanmaktadır. Dünya çapında 600 milyondan fazla yetiskini ya da dünya nüfusunun %13 etkilemektedir. Son yapılan araştırmalar, aşırı kilo ve obezitenin, mide kardiyası, tiroid, pankreas, kolon, rektum, prostat, safra kesesi, yumurtalık ve meme adenokarsinomu risklerinin daha yüksek olmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Obez bireylerin yağ dokusu, inflamatuvar sitokinler ve aracılar üreterek kanser istilasını ve metastazı teşvik eden bir ortam yaratır [18].

2.2.2 Hormon Reseptörü Pozitif Premenopozal Meme Kanseri

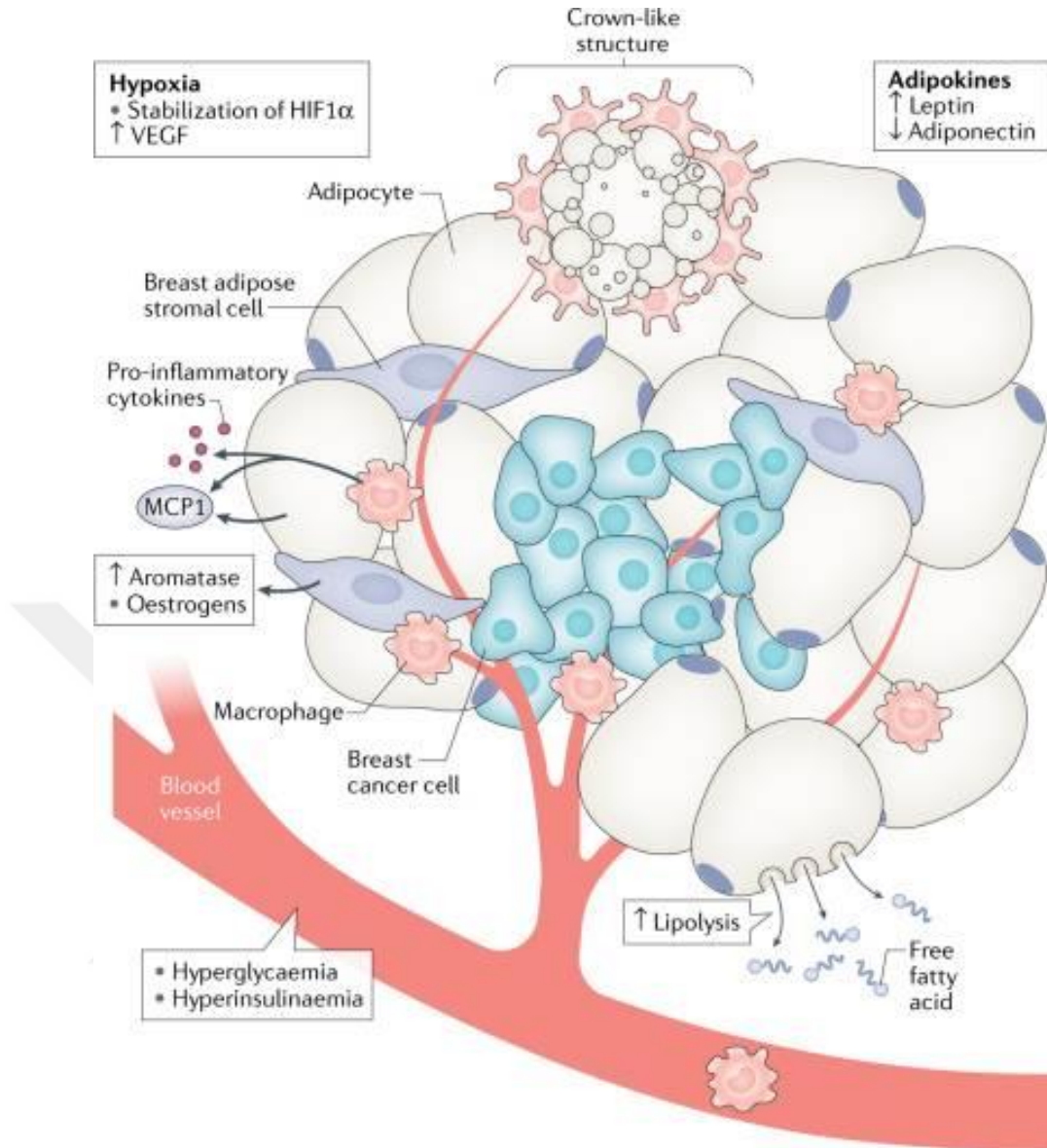
Obezitenin meme kanseri riski üzerindeki etkisi hastalık alt tiplerine göre farklılık göstermektedir. Çoğu çalışmada, obezitenin menopozdan önce düşük östrojen reseptöründe (ER) pozitif meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu bilinmektedir.

2.2.3 Hormon Reseptörü Negatif Premenopozal Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanserleri ER ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonundan yoksundur ve çok agresif bir hastalık seyrine sahiptir. ER-pozitif meme kanserlerinin aksine, obezite çoğu çalışmada daha yüksek premenopozal ER-negatif meme kanseri riski ile ilişkilidir [19].

Obezite menopoz sonrası kadınlarda östrojen reseptörü pozitif meme kanseri de dahil olmak üzere 13 farklı kanser türünün gelişimi ile ilişkilendirmektedir. Dolaşımdaki insülin ve glukoz seviyelerinin artması, yağ dokusu kaynaklı östrojenler, inflamatuvar mediatörler de dahil olmak üzere bu ilişkiyi desteklemek için bir dizi lokal ve sistemik değişiklik olduğu varsayılmaktadır. Kanser hücrelerinde enerji üretimi ve kullanımı metabolik yolları düzensizdir. Obezite gelişimi ile ilişkili aşırı enerji alımı, hiperglisemi ayrıca yağ kütlelerinde artışa yol açabilir. Yağ dokusunun genişlemesi,

çoğalan adiposit öncüllerine ve genişleyen adipositlere besin ve oksijen sağlayan yeni kan damarlarının oluşumunu sağlamaktadır [20]. Anjiyogenez, doku gelişiminin normal bir fonksiyonudur ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere pro-anjiyojenik faktörlerin salınmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte, adipositler lipid depolamak için sınırlı bir kapasiteye sahiptir ve büyük lipid damlacık boyutlarında hipoksik hale gelir. Hücre içi hipoksi, çoğu dokuda VEGF ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olan HIF1 α 'nın stabilizasyonuna yol açar. Obezitede yağ dokusunun genişlemesi ve adipositlerde HIF1 α 'nın stabilizasyonu, pro-anjiyojenik yanıttan ziyade fibrotik ve enflamatuar yanıtlarla ilişkilidir, bu da yağ dokusunda VEGF'nin kontrolünün HIF1 α 'dan bağımsız olduğunu düşünülmektedir [21].



Şekil 2-3 Lipid metabolizması

Meme tümörleri, adipositler, bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere meme yağ hücreleri tarafından çevrelenir. Obezite, yağ dokusunun büyümesi ve adipokinlerin salınımının artması, bağışıklık hücrelerinin toplanmasına ve inflamatuvar mediatörlerin salınmasına yol açan adiposit disfonksiyonu ve hücre ölümü ile ilişkilidir [22]. Östrojen üreten adipoz stromal hücreler, aromataz ekspresyonlarını artırarak tümör çevresinde değişikliklere yanıt verir ve östrojen üretiminin artmasına neden olur. Artan doku biyokütlesi de hem hipoksi hem de anjiyogenez ile ilişkilidir. Obezite ile ilişkili hiperglisemi ve hiperinsülinemi, meme kanseri hücre büyümesi için ek uyarılar sağlar. Obezitesi olan bireylerde, merkezi sinir sisteminde leptin direncinin gelişmesi nedeniyle leptin bu işlevi yerine getirememektedir. Meme kanserinin büyümesi, yalnızca obezite ile ilişkili faktörlerin artan seviyeleri değil, aynı zamanda adiposit kaynaklı hormon adiponektin ve bağırsak kaynaklı peptid hormonları ghrelin ve asillenmemiş ghrelin dahil olmak üzere obezite-meme kanseri bağlantısını hafifletmek için önerilen faktörlerin kaybıyla da uyarılır [23].

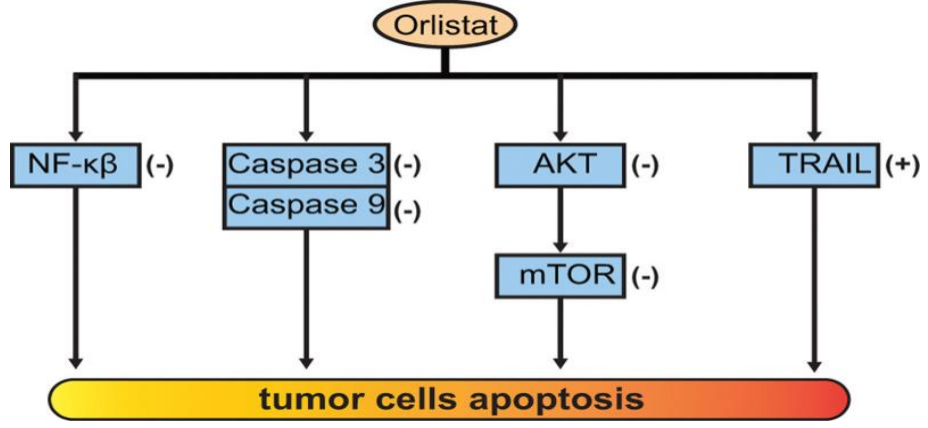
2.2.4 Metabolik yollar

Obezite, sürekli bir enerji kullanılabilirliği bolluğu içerirken, artan enerji talebi kontrolsüz hücre çoğalması ilişkilidir. Hücresel enerji homeostazının korunmasında önemli rolleri olan metabolik yollar bu nedenle bu iki durumda sıklıkla düzensizdir. Bazı hücrelerin enerji üretim biçimlerini mitokondriyal solunumdan ve oksijenden bağımsız olan glikolize doğru nasıl ve neden değiştirdiğini anlamak da dahil olmak üzere, kanserde meydana gelen metabolik değişikliklerin karakterize edilmesine çok dikkat edilmiştir. Glikoliz, ATP üretiminde solunumdan az verimli olmasına rağmen, genellikle gerekli olandan fazla olan glikoz alımının artması, kanser hücrelerinin sadece yeterli düzeyde ATP üretmesini değil, hücre bölünmesi için gerekli olan nükleotidlerin, amino asitlerin ve yağ asitlerinin biyosentezi için kullanılabilecek metabolik ara ürünleri sağlar [20]. Büyüme faktörleri aracılı olarak PI3K-AKT sinyal yolağının aktivasyonu sadece hücresel enerji üretimi için değil, aynı zamanda amino asitler, nükleotidler ve yağ asitleri gibi makromoleküllerin biyosentezi için de gerekli olan glikoz-6-fosfat alımını ve metabolizmasını uyarır [24]. Yüksek ATP seviyeleri, enerji sensörü AMPK'yi baskılayarak, yağ asitlerinin β -oksidasyonunun azalmasına ve kolesterol, protein ve yağ asitlerinin sentezinin artmasına neden olur [25].

İnsülin, hipoksi, leptin ve inflamatuvar mediatörler prostaglandin E dahil olmak üzere çeşitli faktörler² (PGE₂), tümör nekroz faktörü (TNF) ve IL-6, meme kanseri hücrelerinde veya tümör mikroçevresinin hücrelerinde metabolik yolları etkiler. Meme kanseri hücrelerinde insülin, leptin ve östradiol (E₂) PI3K-AKT sinyalini uyarırken, leptin ve E₂ AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) sinyalini baskılar. Hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α 'nın (HIF1 α) stabilizasyonunu indükler, obezite ile ilişkili araçlarla birlikte aerobik glikolizi artırır, artan glikoz alımı, protein ve nükleotid sentezinin uyarılması ile hücre proliferasyonunu artırır. Adipoz stromal hücrelerde, leptin, PGE₂, TNF ve IL-6 ve glikoz alımını uyarır. PGE ve leptin ayrıca HIF1 α 'yı uyarır, LKB1-AMPK sinyalini ile p53'ü baskılayarak östrojen biyosentezinde çok önemli bir enzim olan aromataz ekspresyonunu uyarır [26]. Bu değişikliklerin net etkisi, obezitesi olan kişilerde gözlenen desmoplaziyi açıklayabilen adipoz stromal hücrelerden türetilen hücre soylarının çoğalmasını desteklemektedir. Bu çoğalan adipoz stromal hücre türevli hücreler, daha fazla tümör hücresi büyümesini destekleyen laktat ve östrojenler sağlar. Obezitenin bağışıklık hücrelerindeki metabolik yollar üzerindeki etkileri hala zayıf bir şekilde karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, hipoksi, HIF2 α üzerindeki etkiler yoluyla aerobik glikolize geçiş tetikler ve klinik öncesi fare modellerinde yüksek yağlı beslenme, AMPK sinyalinin baskılanması ile ilişkilidir. Bu bulgular, obezitenin, bağışıklık hücrelerinin hızlı çoğalmasını destekleyen ve tümör büyümesini destekleyen sitokinlerin artan üretimini destekleyen metabolik bir değişime neden olduğunu göstermektedir [20].

2.3 Orlistat ve Meme Kanseri İlişkisi

Bir gastrointestinal lipaz inhibitörü olarak orlistat lipid metabolizması enzimlerini inhibe ederek triaçilgliserolün emilebilir yağ asitlerine ve nitro-gliseride hidrolizini önleyerek zayıf bağırsak emilimine neden olur. Klinik çalışmalar orlistatın tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde anti-tümör tedavisi için kullanılabileceğini göstermektedir [27]. Orlistatın, rapamisin (mTOR)/AKT sinyal yolları aracılığı ile hepatoselüler karsinom hücrelerinin canlılığını azaltmaktadır [28].



Şekil 2-4 Orlistat aracılı tümör hücreleri apoptozunun potansiyel moleküler mekanizmaları.

Nükleer faktör kappa-B'nin (NF-κB) sinyal yolunun aktivasyonu genellikle kanser teşviki ve ilerlemesi ile ilişkilidir. NF-κB sinyal yolu kanser hücrelerinde aktive edildiğinde genellikle tümör hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını metastazını ve anjiyogenezi etkiler. Ayrıca, aktive edilmiş NF-κB sinyal yolu ilgili genlerin ekspresyonunu etkileyerek anti-tümör tedavisine direnç yol açar ve konakçı homeostazı ve anti-tümör tedavisinde bir düzenleyicidir [28]. Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve inflamasyonda önemli bir rol oynayan ve hücrelerin apoptoz sinyal yolları için çok önemli olan korunmuş bir sistein proteaz ailesidir. İyi bilinen bir ölüm proteazı olan kaspaz-3, spesifik bir lizis ile ilişkili sinyal yollarını katalize ederek ve hücrelerin apoptozuna yol açar. Ayrıca, bir kaspaz başlatıcısı olan kaspaz-9, hasarlı hücrelerin temizlenmesi için gerekli olan hücre apoptozunun başlatılmasında önemli bir rol oynar [29]. AKT, cAMP'ye bağımlı protein kinaz 1 (PKA)/cGMP'ye bağımlı protein kinaz (PKG)/protein kinaz C (PKC) (AGC) ailesinin bir protein kinaz üyesidir. AKT/mTOR sinyal yolağı tümör oluşumunda önemli rol oynar [30]. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), çeşitli malign hücrelerde apoptozu indükleyebilir ve normal hücreler ve dokular için çok az toksisiteye sahiptir. strese girdiğinde, TRAIL, hücrelerin içsel yolları tarafından doğru bir şekilde aktive edilebilir ve geliştirilebilir, bu da hızlandırılmış apoptoza yol açmaktadır [31].

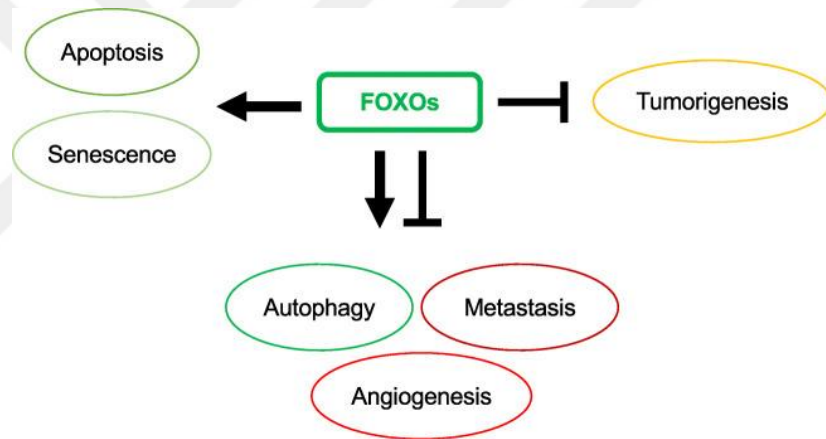
2.4 FoxO Ailesi ve Meme Kanseri

Forkhead box O (FOXO) transkripsiyon faktörleri hücre ölümü, yaşlanma, anjiyogenez ve metastaz için gerekli olan genleri düzenleme rolleri olan tümör

baskılayıcılar olarak kabul görmektedirler. FOXO ekspresyonunun ve fonksiyonunun deregülasyonu, genetik bozuklukları, metabolik hastalıkları, düzensiz yaşlanmayı ve kanseri teşvik edebilir [32].

2.4.1 FOXO işlevi

Memelilerde, FOXO alt ailesi dört üyeden oluşur FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6. Bu dört FOXO transkripsiyon faktörü farklı koşullar altında hücre kaderini kontrol etmek için hedef genlerine monomerler veya heterodimerler olarak bağlanır. FOXO proteinleri kanatlı sarmal DNA bağlanma alanı nükleer lokalizasyon dizisi ve transaktivasyon alanı olmak üzere 4 farklı çekirdek fonksiyonel alana sahiptir. FOXO-DNA bağlanma alanı genomdaki konsensüs dizilerini (5'-GTAAA(C/T)A-3') tanır ve bunlara bağlanır. FOXO ailesi proteinlerini, hayatta kalma, otofaji, metastaz ve anjiyogenezde, ilaç direnci gibi çeşitli hücresel yollarda görev almaktadırlar [32].



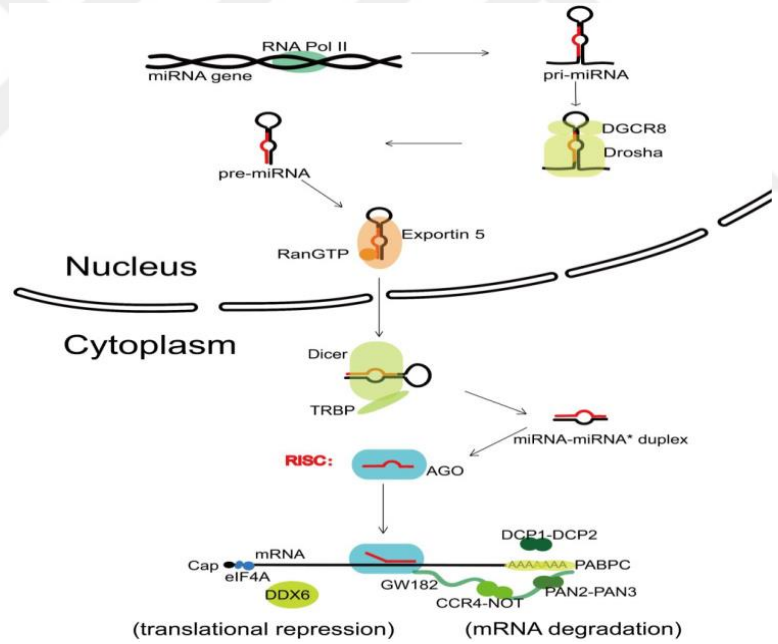
Şekil 2-5 FOXO'lar, hücre apoptozunu ve yaşlanmasını teşvik ederek tümör oluşumunu inhibe etmede tümör baskılayıcı roller sergiler.

2.5 MikroRNA'lar ve Meme Kanseri

2.5.1 MikroRNA biyogenezi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen regülasyonunda önemli roller üstlenen yaklaşık 22 nükleotid boyutunda küçük, evrimsel olarak korunmuş, kodlamayan RNA'lardır [33]. miRNA'nın kanonik biyogenezi, hem nükleer hem de sitoplazmik adımları olan karmaşık bir yoldur. Nükleer miRNA geni, RNA polimeraz II (Pol II) tarafından bir "pri-miRNA" adı verilen ara maddesi üretir. Daha sonra temel olarak bir Drosha molekülü (iki RNaz III alanına sahip bir tür RNase III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8'i (DGCR8) tarafından tanınır. Daha sonra Drosha, pri-

miRNA saç tokasında sapın iki telini ayırır ve "pre-miRNA" adlı bir gövde halkası oluşturur. Bunu takiben, çekirdekte oluşan pre-miRNA, Exportin 5 ve Ran guanozin trifosfat (RanGTP) yoluyla sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, pre-miRNA, iki RNaz III alanına sahip bir endonükleaz olan Dicer tarafından daha fazla tanınır ve TRBP (TARBP2 olarak da adlandırılan HIV-1 TAR RNA bağlayıcı protein) adı verilen bir ortak protein ile ilişkilidir. Dicer, saç tokasından terminal halkasını keser ve "miRNA"nın miRNA ile eşleştirilmiş bir yolcu ipliği olduğu miRNA-miRNA* dupleksini oluşturur. miRNA-miRNA* dupleksi daha sonra bir Argonaute (Ago) ailesi proteinine yüklenir ve Ago'nun N-terminal alanı tarafından tahrik edilerek çözülür. Özellikle, Ago kompleksleri arasında sıralama sürecinde, miRNA-miRNA* dupleksinin nükleotid bileşimi de iplik seçimini etkiler. Son olarak, miRNA* ipliği yaygın olarak bozunurken, kılavuz iplik (miRNA'nın olgun formu olmak üzere) olarak da bilinen diğer iplik tutulur ve sonunda fonksiyonel RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) oluştur [34].



Şekil 2-6 Kanonik miRNA biyogenezi ve miRNA aracılı gen susturma

3 MATERYAL-METODLAR

3.1 Kullanılan Cihazların Listesi

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Ekler bölümünde EK A’da yer almaktadır.

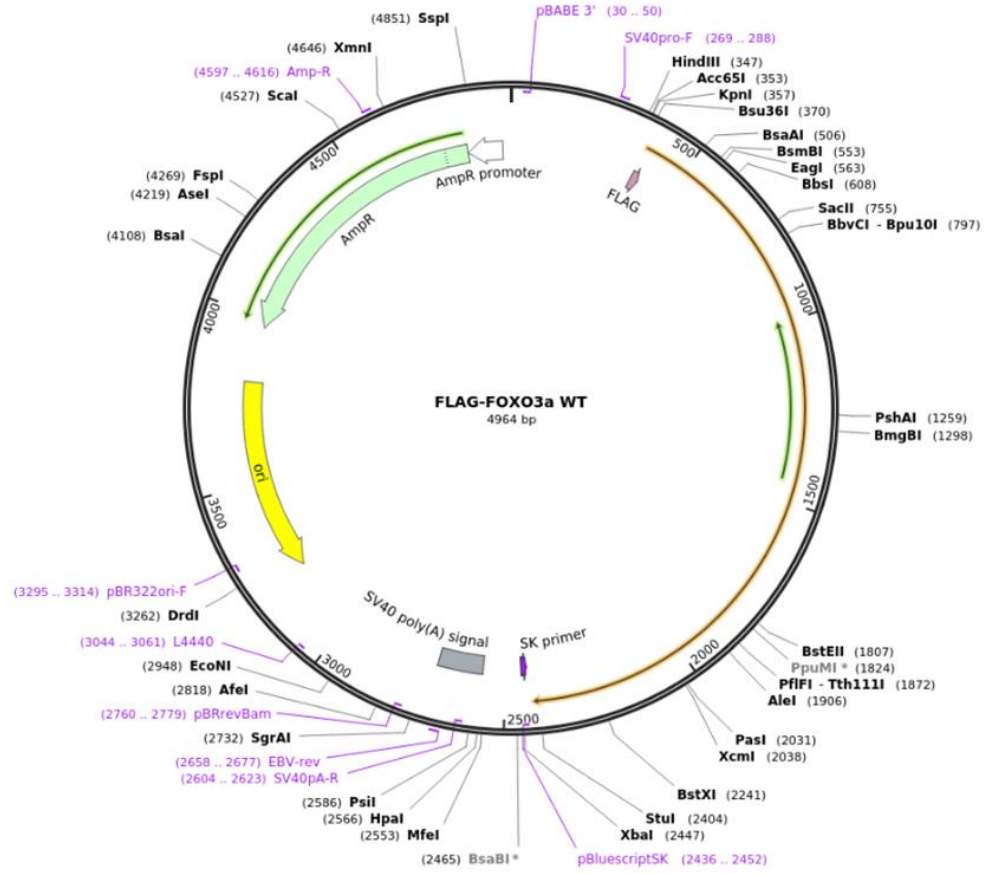
3.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi Ekler bölümünde EK B’de yer almaktadır.

3.3 Metodlar

3.3.1 Plazmiti Eldesi ve Büyütülmesi

BT474 meme kanseri hücrelerinde FoxO3a’nın ifade seviyesinin artması amacıyla FLAG-FoxO3a WT (Katalog no:8360, <https://www.addgene.org/8360/>, Addgene) ve FLAG-tag (Katalog no:55180, <https://www.addgene.org/55180/>, Addgene) plazmidleri hazır olarak satın alınmıştır. FLAG etiketi bir proteine eklenebilen, DYKDDDDK dizisine sahip bir peptit. FLAG etiketli boş vektörün büyütülmesi amacıyla Luria-Bertani (LB) Broth sıvı besiyerine, vektörün seleksiyon markırı olan kloramfenikol eklenir (stok konsantrasyonu 25 mg/mL, final konsantrasyonu 25 µg/mL’dir). FLAG etiketli FoxO3a geni içeren plazmidler de ampisilin içeren LB Broth sıvı besiyerinde büyütülür (stok konsantrasyonu 100 mg /mL, final konsantrasyonu 100 µg/mL’dir). Her iki vektöre ait plazmit haritaları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterilmektedir.



Şekil 3-1. FLAG-FOXO3a-wt vektörün tüm sekans haritası

büyütülmüşlerdir. Bu hücreler, kültür ortamında %70-80 yoğunluğa geldiğinde pasajlama yapılarak yeni kültür kaplarına geçirilerek büyütülmüş ve böylelikle deneyler yapılmıştır. Pasajlama işlerine başlarken öncelikle eski besiyeri kültür kabından dikkatlice çıkarılır ve 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelere tripsin-EDTA çözeltisi eklenir ve hücreler kalkana kadar inkübatörde bekletilir (Ortalama 3-4 dakika). Mikroskopta hücrelerin kalktığına emin olduktan sonra eklenilen tripsin-EDTA miktarı kadar besiyeri eklenmiştir ve 15 ml'lik falkona bu hücreler toplanmıştır. Falkon tüp, 2500 rpm x 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittiğinde ise üst faz atılır ve pellet 1 ml besiyeri içerisinde iyice çözülene kadar pipetaj yapılmıştır.

3.3.4 FT ve FF plazmit vektörlerinin BT-474 meme kanseri hücrelerine tranfeksiyonu

Plazmitlerin BT-474 hücrelerine transfeksiyonu bir lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı (iN-fectTM in vitro Transfection Reagent cat no:15081) kullanılarak gerçekleştirildi. FBS içermeyen besiyerine 1:3 oranında transfeksiyon ajanı eklenip, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilecek, ardından 1000 ng olacak şekilde plazmitler eklenip 25 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 6-well'de ekili ve %80 yoğunluğa ulaşmış olan hücrelerin taze besiyerleri üzerine damla damla ilave edildi. 48 saatlik transfeksiyondan sonra plazmitlerin haritalarında belirtilen antibiyotiklerin uygulaması gerçekleştirilecek ve plazmitleri alan hücre gruplarının seçilimi yapıldı. FLAG etiketli boş vektör ile FLAG etiketli ve FoxO3a geni içeren plazmit vektörlerinin aktarımının kontrolü çalışması için izole edilen plazmitlerin hücrelere transfekte edilmesini takiben antibiyotik seleksiyonu gerçekleştirildi. Antibiyotik seçilimi sonrasında canlılığı devam eden hücrelerde FoxO3a ifade seviyesinin artışının belirlenmesi için immunoblotlama yöntemi ile FLAG antikoru (Cat No: 86861) ve FoxO3a antikoru (Cat No: 12829) ile ilgili proteinlerin ifade seviyeleri belirlenmiştir.

3.3.5 Immunoblotlama Yöntemi

Immunoblotlama yöntemi için BT-474 wt, Flag-Tag ve Flag-FoxO3a hücre modellerinin ekimlerini takiben üzerindeki medya atılmış ve üzerlerine soğuk 1XPBS ekledikten sonra hücreler mekanik olarak kazıma yöntemi ile kaldırılmıştır. Ardından hücrelerin mikrofüj tüpünde toplanması gerçekleştirilerek ve 2 dakika 13.200 rpm' de

santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Üzerine Thermo Fisher Scientific firmasından alınmış olan M-PER (%10 proteaz inhibitörü ile), pellet yoğunluğuna göre değişkenlik gösterebilecek şekilde yaklaşık 50 µl eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında, 15 dakika çalkalayıcının üstünde bekletildikten sonra 16400 rpm’ de, 15 dakika +4C’de santrifüjlenerek ayrıştırılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir mikrofüj tüpüne alınarak protein özütü olarak -20°C’ de saklanmıştır. Elde edilen protein özütünün konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.6 Protein konsantrasyonu belirleme-Bradford yöntemi

Bradford Ajanı analizi için 96 kuyucuklu petrilere, 3 tekrar olmak üzere 1 µl’den 5 µl’ye kadar protein standardı (1,5 µg/µl), diğer kuyucuklara ise örneklerden 1 µl eklenmiştir. Standartların ve örneklerin üzerine 200 µl Bradford ajanı eklenmiştir. 96 kuyucuklu petri 5 dakika karanlıkta bekletildikten sonra örnekler Bio-Rad 96 kuyucuklu petri okuyucu cihazında 595 nm’de absorbans değerleri elde edilmiş ve bu değerler kullanılarak örnek protein yoğunluk değerleri hesaplanmıştır. Protein örnekleri immunoblotlama yöntemi için 5x Laemmli tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C’ de 5 dakika denatüre edilmiştir. %12 sodyum dodesil sülfat içeren poliakrilamid jel (SDS-PAGE) hazırlanarak, örnekler protein belirteçler ile birlikte 90 V’de 3 saat SDS içeren yürütme tamponunda yürütülmüştür. Örnekler daha sonra 0,22 µm PVDF membrana transfer edilerek, %5’ lik yağsız süt ile 1 saat oda sıcaklığında sallayıcıda bekletilmiştir. Seçili primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Primer antikor uygulamasını takiben 10 dakikalık, 3 kez TBS-T yıkamasının ardından 1:3000-1:5000, HRP-etiketli anti-tavşan/fare ikincil antikorlar (Cell Signaling Technology) ile 2 saat oda sıcaklığında ya da gece boyu bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 10 dakikalık, 3 kez TBS-T ile ve 10 dakikalık 1 kez TBS yıkama sonrasında, örnekler oda sıcaklığına getirilmiş kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca muamele edilmiştir. Kemiluminesans ölçen (Bio-Rad) cihaz yardımı ile band profilleri incelenecek ve ImageLab analiz programı ile bantların densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.7 RNA izolasyonu

RNA İzolasyonu için Purezol (BIORAD) kiti kullanıldı ve üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Öncelikle, petri kabındaki (60mm) besiyeri atıldı ve 1cm²’ye 1 mL olacak şekilde kitin içindeki Purezol solüsyonu eklendi ters-düz edildi. 5 dakika

oda sıcaklığında inkübe edildi. 1,6 mL kloroform eklenerek 15 saniye ters-düz edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücre lizati, 12,000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra 3 faz oluştu. Üst faz renksiz (RNA'nın olduğu), ortadaki beyaz ve alttaki kırmızı renkte (DNA'nın olduğu) görüldü. Ara fazı bozmadan üstteki fazı yeni RNAaz içermeyen bir tüpe alındı. 4 mL İzopropil alkol eklenip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12,000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi üstfaz dikkatli bir şekilde atıldı. RNA pelletini yıkamak için 4 ml %70'lik Etanol kullanıldı. 7.500 x g'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı. RNA pelleti yaklaşık 5 dakika kurutulduktan sonra RNase içermeyen Dietilpropiyonat (DEPC) su ile pellet ters- düz edilerek 55-60°C'de 10 dakika inkübe edildi.

3.3.8 cDNA çevrimi

BIORAD iScript™ cDNA Sentez kiti kullanıldı izole edilen RNA'nın spektrofotometre ile ölçümü gerçekleştirilmiş Daha sonra kitin talimatlarına göre; 5x iScript reaksiyon karışımı: 4µl, iScript ters transkriptaz :1µl ve RNA'nın miktarına göre RNAaz içermeyen su hesaplanıp total hacim 20µl olacak şekilde deney protokolü kuruldu. Thermal siklus PCR'in döngüsü ise priming: 25°C'de 5 dakika, ters transkripsiyon: 46°C'de 20 dakika, RT inaktivasyonu: 90°C'de 1 dakika oluştu ve elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.3.9 QRT-PCR Analizi

iQ™ SYBR® Green Supermix kullanılmış cDNA'lardan RT-qPCR analizi üretici firmanın talimatına göre gerçekleştirildi. iQ SYBR Green supermix'i ve diğer dondurulmuş reaksiyon bileşenleri, cDNA ve su miktarına göre üreticinin verdiği tabloya göre hesaplanıp hazırlandı. PCR tüplerine reaksiyon bileşenleri eklendi. Termal döngü, verilen verilere göre CFX Connect Real-Time PCR Detection System cihazında girildi.

3.3.10 MTT Canlılık testi

FoxO3a ifadesi arttırılan (FLAG-FOXO3a) ve kontrol grubu (FLAG-tag)) hücreleri 1x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petriye ekilmiştir. Hücrelerinin adherent özelliklerini göstermelerini takiben 0-75 mikromolar doz aralığında orlistat uygulaması gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu petriye ekilen ve doza ve zamana bağlı

olarak gerçekleştirilen orlistat uygulamalarını takiben 10 µl MTT ajanı (5 mg/ml; Sigma) uygulaması yapılmıştır. 4 saat sonra 100 µl DMSO (Sigma) ile oluşan formazan kristalleri çözündürüldü. Örneklerin 5 dakika karanlık ortamda bekletilmesini takiben 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Bio-Rad Microplate Absorbance Reader).

3.3.11 Floresans boyama

Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DioC6) Boyama

6 kuyucuklu petrilere ekilen 1×10^5 (hücre/kuyu) hücrenin yapışması için gece boyunca 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre sağ kalım testi sonuçlarına göre orlistat uygulanan örnekler, 4 nM DiOC6 içeren medya ile değiştirildi ve 15 dakika inkübe edilecektir. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler eksitasyon 488 nm, emisyon 525 nm’de floresan mikroskopunda gözlemlendi.

3.3.12 miRNA İzolasyonu, CDNA’ya çevrilmesi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

miRNA hücrelerden, dokulardan ve serum, plazma, gözyaşı veya idrar gibi vücut sıvılarından izole edilebilir. Geleneksel fenol-kloroform ekstraksiyonunun ardından RNA çöktürmesini yaygın olarak kullanılır. Ancak, düşük GC içeriğine sahip miRNA’ların, az sayıda hücreden fenol-kloroform ekstraksiyonu sırasında seçici olarak kaybolduğu ve bunun nedeninin, uzun nükleik asitlere kıyasla küçük nükleik asitleri çöktürmenin verimsizliğinden kaynaklandığı bulunmuştur. Çalışmamızda Qiagen RNEasy toplam RNA izolasyon kitinde kullanılmıştır.

3.3.13 qRT-PCR analizi için kullanılan PFAFFL metodu

Pfaffl metodu, gen ifadesindeki değişiklikleri araştırmak için bir referansa karşı bir hedef genin göreceli ifadesine dayalı olarak gerçekleştirilen tekniktir. Çalışmamızda RNU6 geni referans olarak alınarak hedef miRNA’ların ifade seviyeleri belirlenmiştir.

3.3.14 İstatiksel Analiz

Üçlü biyolojik ve teknik tekrarlar ile gerçekleştirilen deneylerin analizleri GraphPad Prism version 8, (<https://www.graphpad.com/>) ile gerçekleştirilecek ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (standart deviation, SD) olarak ifade edilecektir. Birden fazla grup arasındaki verilen karşılaştırılması için deney gruplarına uygun olarak ANOVA testleri kullanılacak ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.



4 SONUÇLAR

4.1 FLAG etiketli boş vektörün ve FLAG etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörlerinin izolasyonu, spektral ve agaroz jel elektroforezi analizi

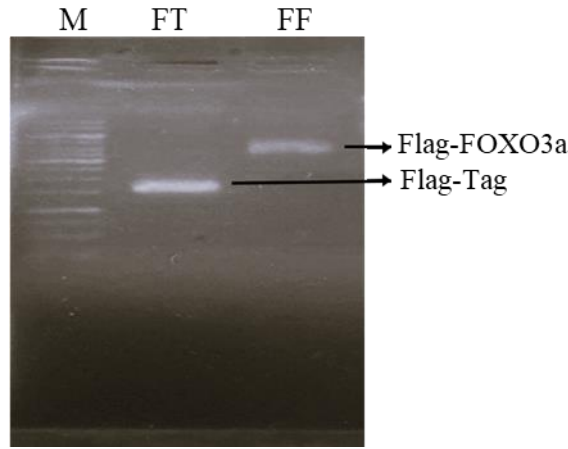
FoxO3a'nın ifade seviyesinin artışının belirlenmesi için, FLAG etiketli boş vektör ve FoxO3a gen dizisini içeren plazmit ekspresyon vektörleri Addgene'den hazır olarak satın alınmıştır. Ardından, FLAG etiketli boş vektör kloramfenikol antibiyotiği içeren, FLAG etiketli FoxO3a genini içeren vektör amfisilin içeren besiyeri ortamında 37 C'de ODC'de OD (optik densite) 0.6 olana kadar büyütülmüştür. ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Katalog no: D4212) ile plazmit izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin spektral analiz ile saflık ve konsantrasyonları belirlenmiştir. FLAG etiketli plazmit örneğinin konsantrasyonu 3206 ng/μl çıkmıştır ve saflık değeri ise 1,9'dur. FLAG etiketli Foxo3a genini içeren plazmit örneğinin konsantrasyonu 1963,3 ng/μl çıkmıştır ve saflık değeri 1,9'dur (Şekil 4.1). Elde edilen bu plazmitler hücrelerde FoxO3a artışının gerçekleştirilmesi için transfeksiyon basamağında kullanılmışlardır. Ayrıca, Şekil 4.1'de elde edilen sonuçların dışında tez çalışmaları süresince plazmit izolasyonları yapılmaya devam etmiştir.

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/280
Flag-Tag	3206	1,90
Flag-FOXO3a	1963,3	1,90

Şekil 4-1 FLAG etiketli boş vektörün ve FLAG etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörlerinin spektral analiz sonucu

Yapılan plazmit izolasyonunun niceliksel analizinin yapılabilmesi için örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülerek ayrımı sağlanmıştır. Plazmit haritalarına göre FLAG etiketli boş vektörün baz çifti 2170, FLAG etiketli Foxo3a genini içeren vektörün baz çiftinin 4964 olması gerekmektedir. Elde edilen agaroz jel

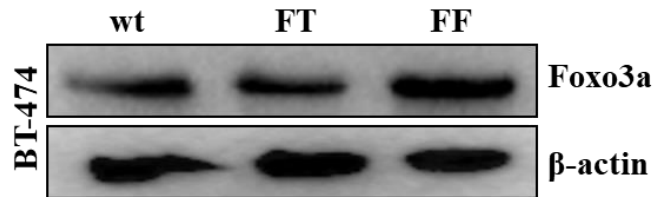
sonuçlarında markıra kıyaslandığında baz çiflerinin uygun uzunluklarda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4-2. Markır olarak GeneRuler 1kb Plus Ladder (Thermo Fisher, SM0311) ve 6x yükleme tamponu olarak da DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher, R0611) kullanılmıştır. M: Markır, FT: Flag-Tag boş plazmit vektörü, FF: Flag-etiketli FoxO3a genini içeren plazmit vektörü

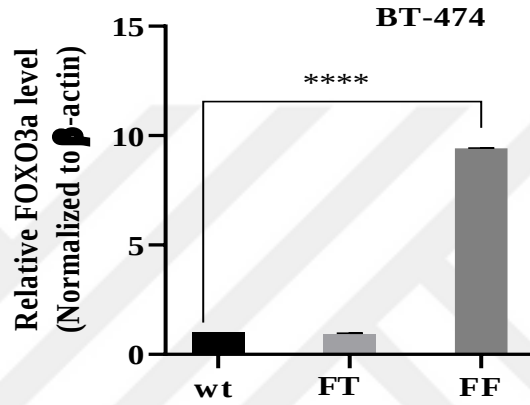
4.2 FLAG etiketli boş vektörün (FT) ve FLAG etiketli ve FoxO3a geni içeren plazmit vektörlerinin (FF) BT-474 meme kanseri hücrelerine transfeksiyonu sonrası FoxO3a ifade seviyesinin kontrolü

FT ve FF plazmitleri BT-474 meme kanseri hücrelerine transfekte edildikten 48 saat sonra total protein izolasyonu yapılmış ve transfeksiyon yapılmamış WT (wild type) grubuna göre FoxO3a seviyelerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE jel elektroforezinde ayrımları sağlanmıştır. Membrana transferin ardından spesifik primer ve sekonder antikorlar ile 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra görüntülenme işlemi gerçekleştirilmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. BT-474 hücrelerinde FoxO3a'nın ifade seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4-3: Transfeksiyon sonrası BT-474 hücrelerinde FoxO3a protein seviyelerinin immüno blotlama yöntemi ile incelenmesi (wt: wild type, FF: FLAG etiketli ve FoxO3a geni içeren plazmid vektörü transfekte edilmiş).

FoxO3a'nın protein ifadesinin kontrolüne ek olarak mRNA seviyesinin de belirlenmesi amacıyla qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. FT ve FF vektörlerinin BT-474 hücrelerine transfeksiyonu sonrasında belirtilen hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, cDNA çevrimini takiben, qRT-PCR yöntemi ile FoxO3a geninin ifadesi gerçek zamanlı olarak belirlenmiştir. BT-474 hücrelerinde wt ve FT gruplarına kıyasla FF gruplarında FoxO3a'nın ifade seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-4.).

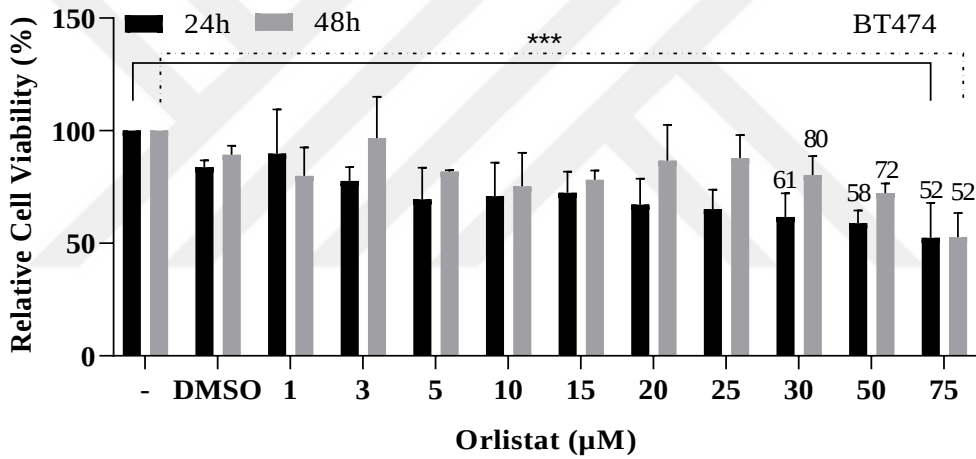


Şekil 4-4 BT-474 hücrelerinde Foxo3a ekspresyon seviyesinin qRT-PCR ile gösterilmesi

4.3 Orlistat uygulamasının BT-474 meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Orlistat'ın BT-474 hücrelerinin canlılığına olan etkisinin araştırılması için MTT Hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiştir. 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petriye ekilen BT-474 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1-3-5-10-15-20-25-30-50-75 μ M) orlistat uygulaması yapılmıştır. MTT hücre canlılığı analizleri 4 teknik ve 3 biyolojik tekrarlı deneyin sonuçları alınarak yapılmıştır. Bağlı hücre canlılığı analizi için hiç ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerini %100 canlı olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar bu yönde yapılmıştır (Şekil 4-5). 24 ve 48 saatlik sürelerde doza bağlı olarak uygulanan orlistatın kontrol grubu hücrelerine kıyasla hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. 1-30 μ M orlistatın 24 saat süre ile uygulanması sonucunda BT-474 hücrelerinin bağlı hücre canlılığının %61'e düştüğü,

48 saat uygulanması sonucunda %80'e düştüğü gözlemlenmiştir. 50 ve 75 μ M dozlarında 24 saat uygulanan orlistat, hücre canlılığını sırasıyla %58 ve %52 hücre canlılığına düşürmüştür. 48 saat uygulanan 50 μ M orlistatın hücre canlılığını %72'ye, 75 μ M orlistatın ise hücre canlılığını %52'ye düşürdüğü gözlemlenmiştir. MTT Canlılık Testi'nden elde edilen sonuca göre 24 saat 75 μ M orlistat uygulaması %50 oranında canlılığı azaltan doz olarak belirlenmiş ve ilerleyen deneylerde 75 μ M orlistat uygulaması üzerinden sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4-5). MTT hücre canlılığı analizleri 4 teknik ve 3 biyolojik tekrarlı deneyin sonuçları alınarak yapılmıştır. Bağlı hücre canlılığı analizi için ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar bu yönde yapılmıştır. İstatistiksel analizler Two-Way Anova Tukey's çoklu karşılaştırma analizi ile gerçekleştirilmiştir ($p < 0.0001$).



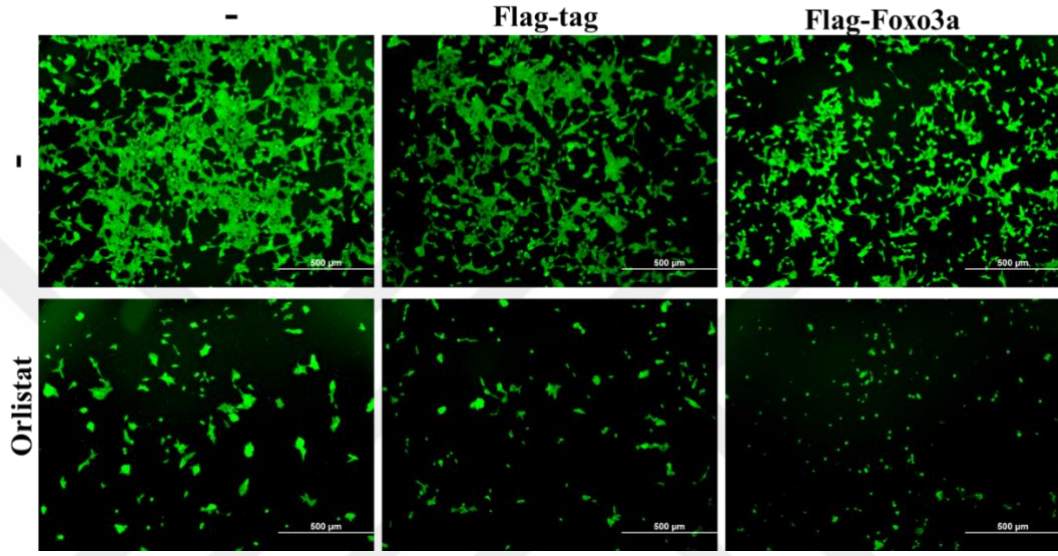
Şekil 4-5: Orlistat uygulanmasının BT-474 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT Hücre Canlılığı Testi ile incelenmesi.

4.4 FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin incelenmesi

BT-474 hücrelerine FF ve FT plazmitlerinin transfeksiyonunun ve 24 saat orlistat uygulanmasını takiben DioC6 boyamaları gerçekleştirilmiştir.

DiOc6 mitokondrinin kalsiyum, NO ve reaktif oksijen türleri tarafından hücre sinyal iletiminde ve hücre ölümüne yol açan yollarda rol oynadığını göstermektedir. Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi_m$), mitokondri ve hücrenin enerji durumu için hassas bir göstergedir ve mitokondriyal proton pompalarının, elektrojenik taşıma

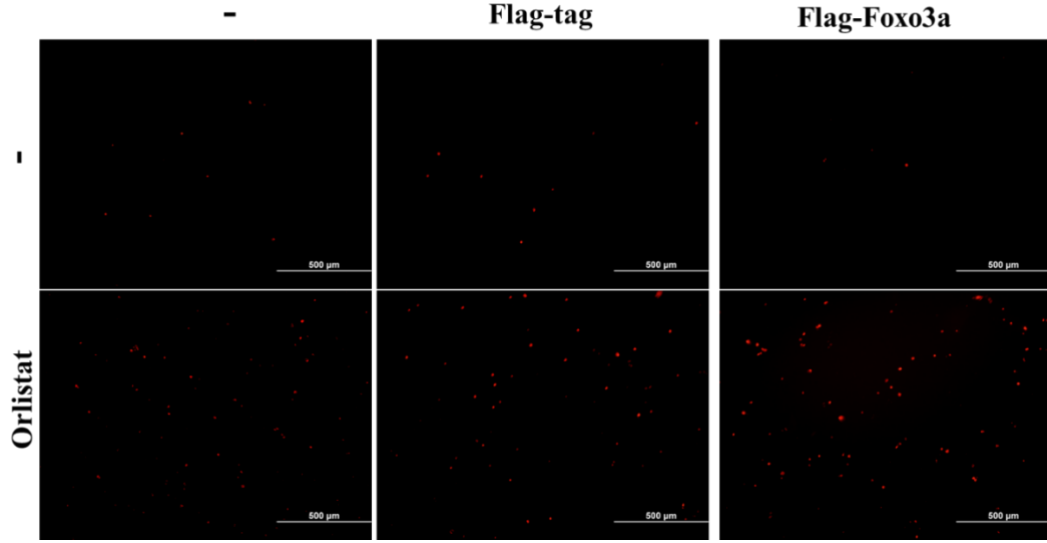
sistemlerinin ve mitokondriyal geçirgenlik geçişinin aktivasyonunu değerlendirmek için kullanılabilir (12). Sağlam hücrelerin mitokondri membranlarından geçebilen DiO6 floresan boyası canlı hücreleri yeşil boyalı olarak belirtmektedir. Orlistat uygulamasının wt, FT ve FF hücrelerinin canlılığında azalmaya sebep olduğu, Foxo3a ifadesinin artışı ve orlistat uygulamasının hücre canlılığında daha fazla azalmaya sebep olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6 BT-474 hücrelerinde Foxo3a artışı ile ilişkili olarak orlistatin mitokondri membran potansiyeline etkisinin incelenmesi.

4.5 FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi

BT-474 hücrelerinde FF ve FT plazmitlerinin transfeksiyonunun ve 24 saat orlistat uygulanmasını takiben PI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Orlistat uygulamasının wt, FT ve FF hücrelerinde ölümü arttırdığı ve Foxo3a ifadesinin artışı ile orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin ölümünü daha fazla arttırdığı gözlemlenmektedir (Şekil 4-7).

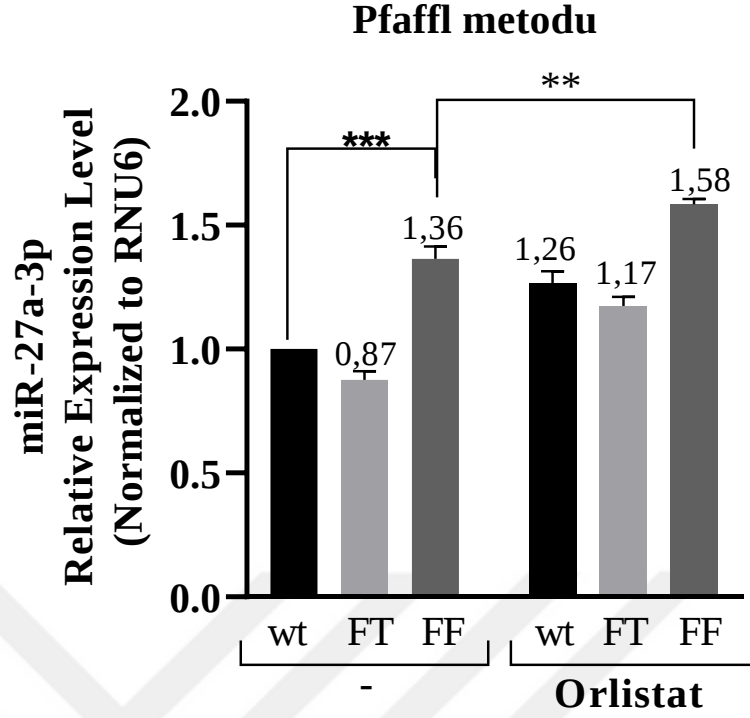


Şekil 4-7. BT-474 hücrelerinde *Foxo3a* artışı ile ilişkili olarak orlistatın hücre ölümüne etkisinin incelenmesi

4.6 FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-27a ifadesine etkisinin qRT-PCR ile analizi

miR-27a, kolon, pankreas, meme, mesane kanseri ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde bir onkogen veya tümör baskılayıcı olabilmektedir. Bu kapsamda, FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-27a'nın ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75μM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR-27a'nın ifade seviyesi belirlenmiştir. miR-27a ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır. PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR-27a'nın ifade seviyesi wt'a kıyasla 0,85 ve 1,36 olarak elde edilmiştir. Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-27a seviyesi önemli derecede artmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 1,26 kat bağıl ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 1,17 ve 1,58 kat bağıl miR-27a ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak miR-429'un ifade seviyesi 1,36 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-429 ifadesi 1,58 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4-8).



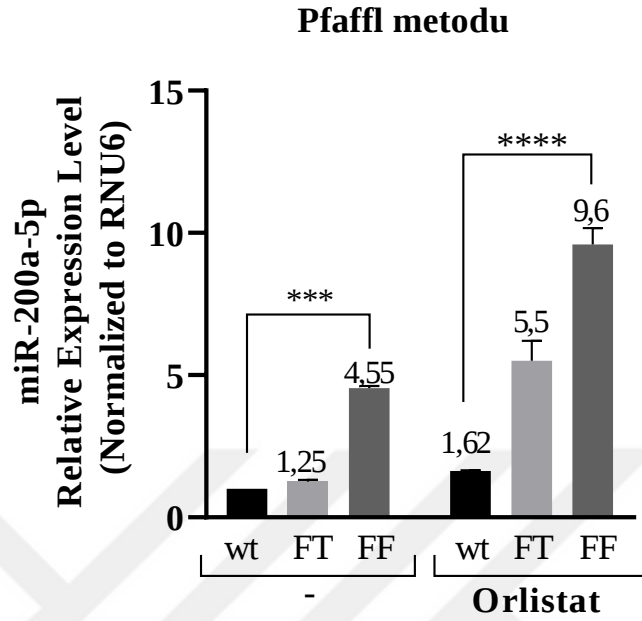
Şekil 4-8 BT-474 hücrelerinde *FoxO3a* artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-27a ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.

4.7 FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-200a-5p ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi

FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-200a-5p'nin ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75µM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR--200a-5p'nin ifade seviyesi belirlenmiştir. miR--200a-5p ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır. PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR-200a-5p'nin ifade seviyesi wt'a kıyasla 1,25 ve 4,55 olarak elde edilmiştir. Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-200a-5p seviyesi önemli derecede artmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 1,62 kat bağlı ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 5,5 ve 9,6 kat bağlı miR-200a-5p ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak

miR-200a-5p'nın ifade seviyesi 4,55 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-200a-5p ifadesi 9,6 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4-9).



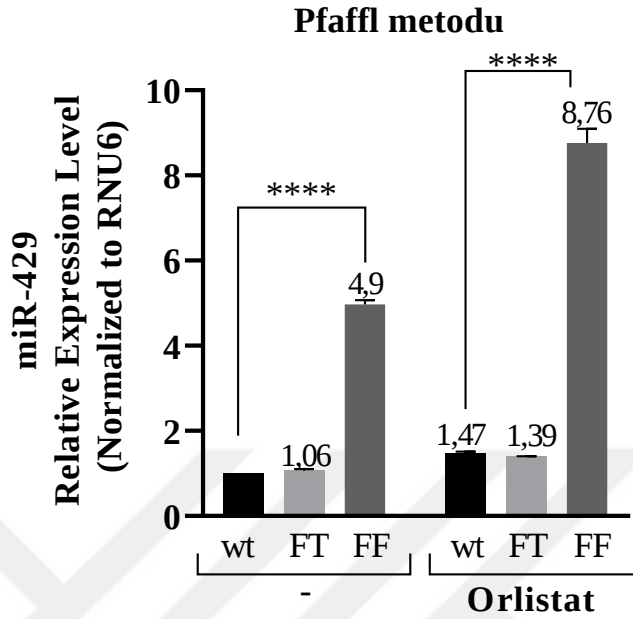
Şekil 4-9: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-200a-5p ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir

4.8 FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-429 ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi

FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-429'un ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75µM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR-429'un ifade seviyesi belirlenmiştir. miR-429 ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır. PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR-429'un ifade seviyesi wt'a kıyasla 1,06 ve 4,9 olarak elde edilmiştir. Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-429'un seviyesi önemli derecede artmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 1,47 kat bağlı ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 1,39 ve 8,7 kat bağlı miR-429 ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak miR-429'un ifade

seviyesi 4,9 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-429 ifadesi 8,7 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



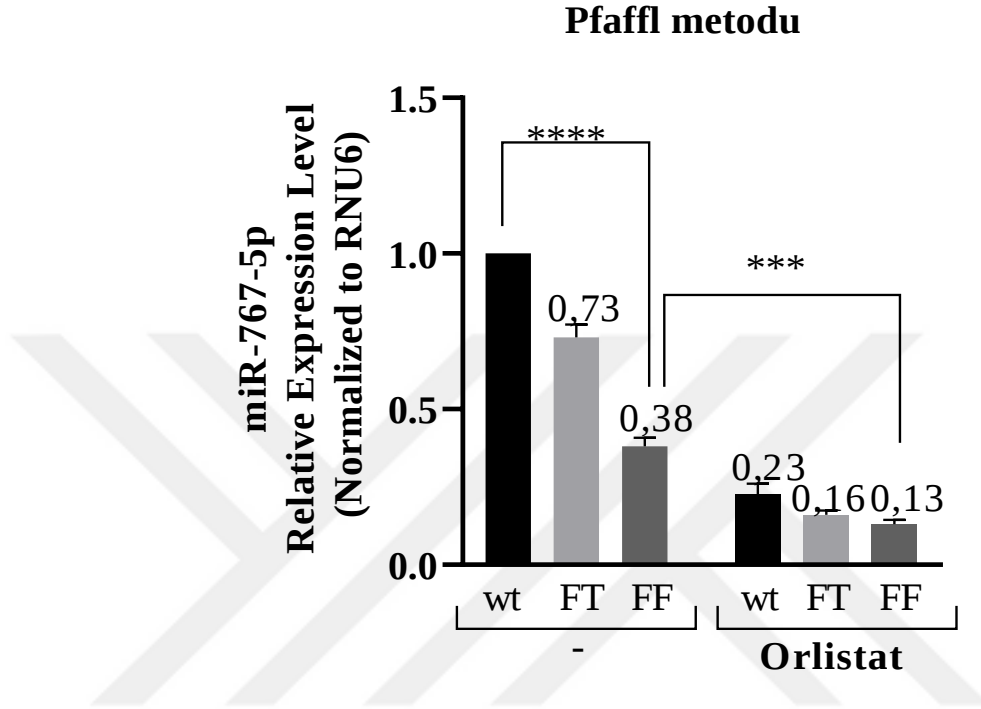
Şekil 4-10 BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-429'un ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.

4.9 FoxO3a Artışının ve orlistat uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-767-5p ifadesine etkisinin qRT-PCR İle Analizi

FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-767-5p'nin ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75µM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR-767-5p'nin ifade seviyesi belirlenmiştir. miR-767-5p ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır. PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR-767-5p'nin ifade seviyesi wt'a kıyasla 0,73 ve 0,38 olarak elde edilmiştir. Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-767-5p'nin seviyesi önemli derecede azalmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 0,23 kat bağlı ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 0,16 ve 0,13 kat bağlı miR-767-5p ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak

miR-767-5p ifade seviyesi 0,38 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-767-5p ifadesi 0,13 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). Sonuç olarak, Foxo3a'nın artışı ile birlikte miR-767-5p'nin ifade seviyesi azalırken, orlistat uygulaması ile miR-767-5p'nin ifade seviyesi daha fazla oranda azalmıştır.



Şekil 4-11: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-767-5p'nin ifadesinin belirlenmesi için qRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.

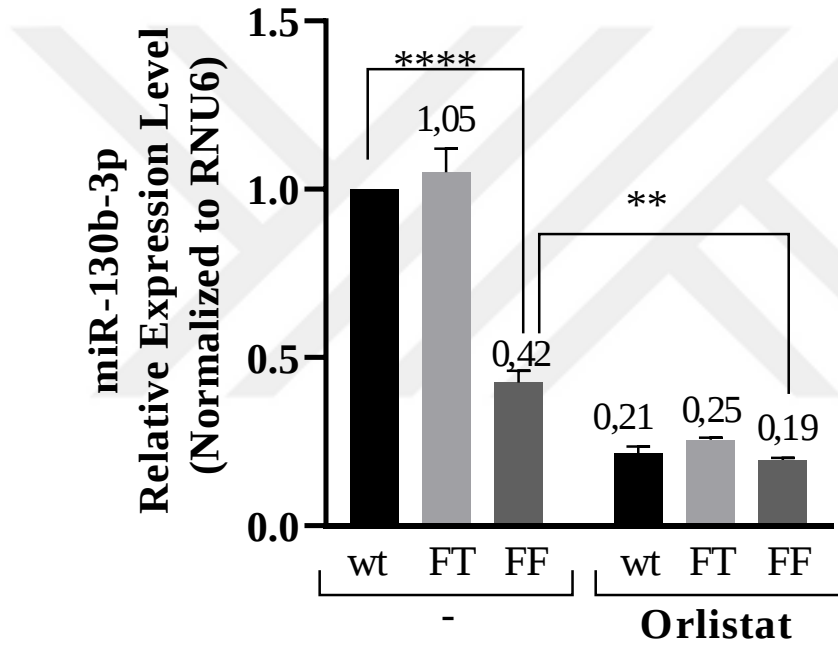
4.10 FoxO3a Artışının ve Orlistat Uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-130b-3p İfadesine Etkisinin qRT-PCR İle Analizi

FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-130b-3p'nin ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75µM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR-130b-3p'nin ifade seviyesi belirlenmiştir. miR-130b-3p ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır. PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR-767-5p'nin ifade seviyesi wt'a kıyasla 1,05 ve 0,42 olarak elde edilmiştir.

Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-130b-3p'nin seviyesi önemli derecede azalmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 0,21 kat bağıl ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 0,25 ve 0,19 kat bağıl miR-130b-3p ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak miR-130b-3p ifade seviyesi 0,38 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-130b-3p ifadesi 0,13 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4-12). Sonuç olarak, Foxo3a'nın artışı ile birlikte miR-130b-3p'nin ifade seviyesi azalırken, orlistat uygulaması ile miR-130b-3p'nin ifade seviyesi daha fazla oranda azalmıştır.

Pfaffl metodu



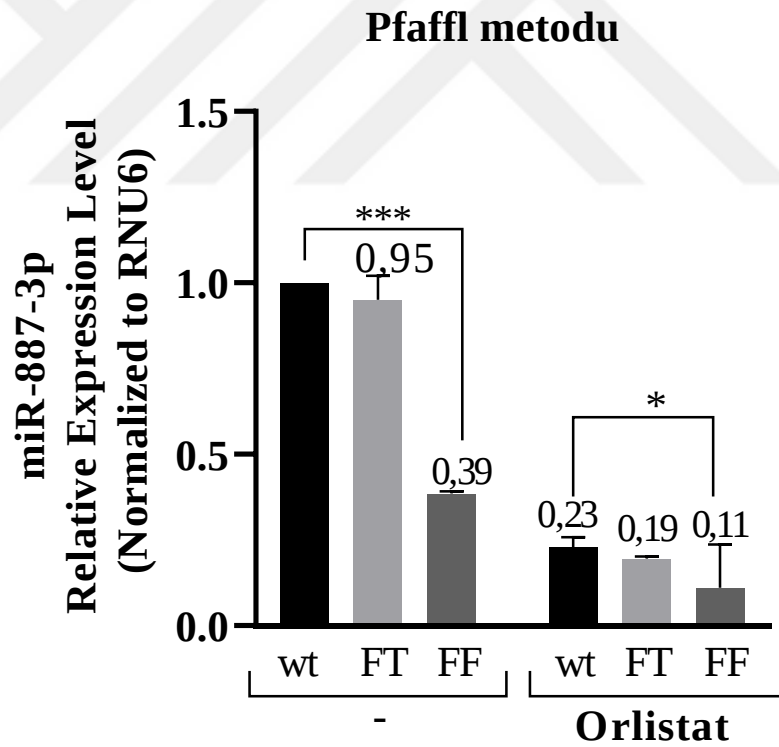
Şekil 4-12: BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-130b-3p'nin ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.

4.11 Foxo3a Artışının ve Orlistat Uygulamasının BT-474 wt, FT ve FF Hücre Modellerinde miR-887-3p İfadesine Etkisinin qRT-PCR İle Analizi

FoxO3a artışına bağlı olarak orlistat uygulamasının miR-887-3p'nin ifadesine olan etkisinin incelenmesi için, BT-474 WT, FT ve FF meme kanseri hücre modellerine 24 saat 75µM orlistat uygulaması gerçekleştirilerek miR-887-3p'nin ifade seviyesi belirlenmiştir. miR-887-3p ifade seviyesinin tespiti PFAFFL analizi kullanılmıştır.

PCR efficiency (verimlilik) değeri %93 olarak hesaplanmış ve etki değeri 1,93 olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlarda orlistat uygulanmamış BT-474 wt, FT ve FF hücre gruplarında miR887-3p'nin ifade seviyesi wt'a kıyasla 0,95 ve 0,39 olarak elde edilmiştir. Hücrelerde sadece FoxO3a'nın artışı ile miR-887-3p'nin seviyesi önemli derecede azalmıştır. Orlistat uygulaması ile wt hücre gruplarında 0,23 kat bağıl ifade seviyesi elde edilirken, FT ve FF hücre gruplarında orlistat uygulaması ile birlikte 0,16 ve 0,13 kat bağıl miR-767-5p ifade seviyesi elde edildi. Sadece FoxO3a artışına bağlı olarak miR-767-5p ifade seviyesi 0,38 kat iken, Orlistat uygulaması ile birlikte miR-767-5p ifadesi 0,13 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13). Sonuç olarak, Foxo3a'nın artışı ile birlikte miR-767-5p'nin ifade seviyesi azalırken, orlistat uygulaması ile miR-767-5p'nin ifade seviyesi daha fazla oranda azalmıştır.



Şekil 4-13 :BT-474 hücrelerinde FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması sonucunda miR-887-3p'nin ifadesinin belirlenmesi için QRT-PCR yapılmıştır. Deneyde etkinlik %93 olarak elde edilmiştir.

4.12 Elde Edilen Mirna Sonuçlarının Diana-Mirpath V4.0 Web Sunucusu İle Fonksiyonel Analizi

DIANA-miRPath v4.0 hedefe dayalı olarak miRNA'ların fonksiyonel analizini sağlayan web sunucusudur. miRNA'ların potansiyel mRNA hedeflerinin sayısının belirlenmesi ve kimliklendirilmesi için deneysel olarak elde edilen veriler, DIANA-TarBase v8.0, DIANA-LncBase v3.0, miRTarBase v8.0, DIANA-microT-CDS ya da TargetScan platformlarında analiz edilir (13).

Elde edilen mRNA hedeflerinin etkili oldukları sinyal yollarının belirlenmesi amacıyla KEGG platformu kullanıldı.

4.12.1 miR-27a, miR-200a-5p, miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yolları ve genlerin belirlenmesi

FoxO3a'nın artışı ve orlistat uygulaması ile birlikte ifade seviyesi artan miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un DIANA-miRPath v4.0 web sunucusunda mRNA hedefleri için ilk olarak TargetScan v8.0 veritabanında tüm potansiyel hedeflerin (ALL) belirlenmesi seçimi yapıldı. Ardından insan genomunda arama yapılması için Homo sapiens seçimi gerçekleştirildi. miRNA dizilerinin karşılaştırılması için güncel miRBase-v22.1 anotasyonu kullanıldı. Hedef miRNA'ların görev aldıkları sinyal yollarının belirlenmesi için "KEGG pathway" ve "genes intersection" seçilerek miR-27a, mir-200a-5p ve miR-429'un ortak olarak etkili olduğu sinyal yollarının belirlenmesi gerçekleştirildi (Şekil 4-14.).

miRPath v4.0 Home **miRNA-centric analysis** Term-centric analysis CRISPR analysis Upload data

Select targets:
TargetScan v8.0

TargetScan targets:
☐ Conserved ☒ All
☐ Use secondary target annotation source when no significant interactions are found for certain miRNAs
☐ Include lncRNA Targets (Human & Mouse only)

Select species:
Homo sapiens

Select miRNAs annotation:
miRBase-v22.1

Select miRNAs:
hsa-miR-27a-3p hsa-miR-27a-5p hsa-miR-200a-5p hsa-miR-429

Upload miRNAs:
Browse... One miRNA name per line.

Select terms/pathways:
KEGG

Select merging method:
☐ Genes union
☒ Genes intersection
☐ Pathways union

Select testing method:
Classic analysis

Intersection of miRNAs:
4

P-value threshold:
0.05

☒ FDR correction
☐ Enable post-enrichment analysis

Şekil 4-14 DIANA-miRPath v.4.0 web sunucu kullanılarak miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak etkili sinyal yollarının belirlenmesi için kullanılan veriler.

p değerinin ve FDR (false discovery rate) değerinin <0.05 olarak belirlendiği analizde miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak hedef sinyal yolları Kanserde proteoglikanlar (Proteoglycans in cancer), Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolları (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), ErbB, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance), TGF- β sinyal yolu, akut miyeloid lösemi (acute myeloid leukemia), pankreas (pancreatic), kolorektal (colorectal) ve mide (gastric) kanserde etkili sinyal yolları olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1’de belirtilen ortak sinyal yolları içerisinde hedeflenen gen sayısına göre sıralama yapıldığında Kanserde proteoglikanlar (Proteoglycans in cancer) sinyal yolunda 9 geni, Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yollarında (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells) 8 geni, ErbB sinyal yolunda 6 geni, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) sinyal yolunda 5 geni, TGF- β sinyal yolunda 5 geni, akut miyeloid lösemi, pankreas ve kolorektal kanser sinyal yollarında 4 geni ve mide kanserinde 5 geni ortak olarak hedefledikleri gözükmemektedir (Tablo 1).

Tablo 4-1 miR-27a, miR-200a ve miR-429’un ortak hedeflediği sinyal yolları

Term Name	Term Genes	Target Genes (n)	P-value	FDR
Proteoglycans in cancer	220	9	1,0387E-06	0,0001771
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	156	8	8,1325E-07	0,0001771
ErbB signaling pathway	86	6	3,7127E-06	0,00042201
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	82	5	4,9318E-05	0,00420436
TGF-beta signaling pathway	103	5	0,00014644	0,00998719
Acute myeloid leukemia	69	4	0,00036204	0,0205759
Pancreatic cancer	78	4	0,00057824	0,02816874
Colorectal cancer	88	4	0,00091177	0,03886405
Gastric cancer	162	5	0,00117597	0,04455615

miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yollarında ERBB4, KRAS, PIK3CA, RPS6KB1, SMAD2 genlerinin de ortak olarak hedeflendiği belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 4-2 miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak hedeflediği sinyal yollarında görev alan genler

Proteoglycans in cancer		
Genin numarası (Ensembl)	Genin Adı	
ENSG00000151150	ANK3	Ankyrin 3
ENSG00000178568	ERBB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
ENSG00000115414	FN1	Fibronectin 1
ENSG00000109458	GAB1	GRB2 Associated Binding Protein 1
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000169439	SDC2	Syndecan 2
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells		
ENSG00000123612	ACVR1C	Activin A Receptor Type 1C
ENSG00000114739	ACVR2B	Activin A Receptor Type 2B
ENSG00000134352	IL6ST	Interleukin 6 Cytokine Family Signal Transducer
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000185619	PCGF3	Polycomb Group Ring Finger 3
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
ENSG00000120693	SMAD9	SMAD Family Member 9

ErbB signaling pathway		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000109458	GAB1	GRB2 Associated Binding Protein 1
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
ENSG00000157168	NRG1	Neuregulin 1
ENSG00000178568	ERBB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000109458	GAB1	GRB2 Associated Binding Protein 1
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
ENSG00000157168	NRG1	Neuregulin 1
TGF-beta signaling pathway		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000123612	ACVR1C	Activin A Receptor Type 1C
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
ENSG00000114739	ACVR2B	Activin A Receptor Type 2B
ENSG00000120693	SMAD9	SMAD Family Member 9
Acute myeloid leukemia		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
ENSG00000079102	RUNX1T1	RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1
Pancreatic cancer		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B

ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
Colorectal cancer		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
Gastric cancer		
ENSG00000108443	RPS6KB1	Ribosomal Protein S6 Kinase B
ENSG00000133703	KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
ENSG00000175387	SMAD2	SMAD Family Member 2
ENSG00000109458	GAB1	GRB2 Associated Binding Protein 1
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

4.12.2 miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin ortak hedeflediği sinyal yolları ve genlerin belirlenmesi

FoxO3a'nın artışı ve orlistat uygulaması ile birlikte ifade seviyesi azalan miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin DIANA-miRPath v4.0 web sunucusunda mRNA hedefleri için ilk olarak TargetScan v8.0 veritabanında tüm potansiyel hedeflerin (ALL) belirlenmesi seçimi yapıldı. Ardından insan genomunda arama yapılması için Homo sapiens seçimi gerçekleştirildi. miRNA dizilerinin karşılaştırılması için güncel miRBase-v22.1 anotasyonu kullanıldı. Hedef miRNA'ların görev aldıkları sinyal yollarının belirlenmesi için "KEGG pathway" ve "genes intersection" seçilerek miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin etkili olduğu sinyal yollarının belirlenmesi gerçekleştirildi. Belirtilen veri girişleri kapsamında üç miRNA'nın ortak hedeflediği sinyal yolu ve hedef gen bulunmamıştır.

Bu nedenle analizde değişiklik yapılarak “genes union” seçimi gerçekleştirilerek her bir miRNA’nın hedeflediği sinyal yolları ve genler belirlendi. Tablo 3’de miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p tarafından hedeflenen sinyal yolları hedeflenen gen sayılarına göre sıralanarak gösterilmektedir. Belirtilen miRNA’lar tarafından hedeflenen sinyal yolları arasında kanser sinyal yolu, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance), PI3K-AKT sinyal yolu (PI3K-Akt signaling pathway), Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolları (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), kolorektal kanser (colorectal cancer), Ubiquitin aracılı proteoliz (Ubiquitin mediated proteolysis) ve FoxO sinyal yolu bulunmaktadır.

Tablo 4-3 miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p ortak hedeflediği sinyal yolları

Term Name	Term Genes	Target Genes (n)	P-value	FDR
Pathways in cancer	555	203	7,66362E-13	2,61329E-10
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	82	43	1,25372E-08	2,1376E-06
PI3K-Akt signaling pathway	372	133	4,25247E-08	4,66276E-06
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	156	67	5,46952E-08	4,66276E-06
Ubiquitin mediated proteolysis	142	62	8,25514E-08	5,63001E-06
Colorectal cancer	88	43	1,79676E-07	6,80771E-06
Proteoglycans in cancer	220	86	1,4367E-07	6,80771E-06
Regulation of actin cytoskeleton	224	87	1,70646E-07	6,80771E-06
Glioma	79	40	1,41603E-07	6,80771E-06
Focal adhesion	213	83	2,77674E-07	9,46868E-06
Hepatocellular carcinoma	177	71	5,60249E-07	1,59204E-05
FoxO signaling pathway	139	59	5,47819E-07	1,59204E-05
ErbB signaling pathway	86	41	7,95578E-07	2,08686E-05
Breast cancer	163	66	9,38741E-07	2,13407E-05
Phosphatidylinositol signaling system	101	46	8,98741E-07	2,13407E-05
Axon guidance	186	73	1,04716E-06	2,23177E-05

Melanoma	76	37	1,43622E-06	2,88089E-05
Choline metabolism in cancer	106	47	1,76397E-06	3,34174E-05
Calcium signaling pathway	246	90	2,23722E-06	4,01522E-05
Pancreatic cancer	78	37	3,1609E-06	5,38933E-05
Hippo signaling pathway	164	64	5,96245E-06	9,68188E-05
Melanogenesis	107	46	6,31088E-06	9,78186E-05
Gastric cancer	162	63	8,02787E-06	0,000119022
Autophagy - animal	146	58	8,51296E-06	0,000120955
AMPK signaling pathway	130	52	1,9583E-05	0,000267113
Wnt signaling pathway	173	65	2,14242E-05	0,000280986
Basal cell carcinoma	66	31	2,50799E-05	0,000305438
mTOR signaling pathway	177	66	2,46142E-05	0,000305438
Spinocerebellar ataxia	145	56	3,17376E-05	0,000373191
Non-small cell lung cancer	81	35	6,93306E-05	0,000788058
Insulin signaling pathway	153	57	8,85366E-05	0,000943468
Sphingolipid signaling pathway	133	51	8,73779E-05	0,000943468
Endometrial cancer	61	28	0,000101688	0,001022672
MAPK signaling pathway	329	107	0,000101967	0,001022672
Neurotrophin signaling pathway	124	48	0,000106379	0,001036439
Oxytocin signaling pathway	161	59	0,000114625	0,001085752
Rap1 signaling pathway	214	74	0,0001476	0,001360309
Human papillomavirus infection	406	127	0,000165729	0,001487202
Ras signaling pathway	241	81	0,00021438	0,001874448
Renal cell carcinoma	70	30	0,000266707	0,002260059
Endocytosis	311	100	0,000271737	0,002260059
cAMP signaling pathway	226	76	0,000325315	0,002641247
TGF-beta signaling pathway	103	40	0,000358292	0,002841342

Circadian entrainment	100	39	0,000381807	0,002959004
Phospholipase D signaling pathway	158	56	0,000452737	0,003430742
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	79	32	0,000573016	0,00424779
Prolactin signaling pathway	73	30	0,000632291	0,004587473
Bacterial invasion of epithelial cells	80	32	0,000742567	0,005275323
Long-term potentiation	71	29	0,000870165	0,005948511
GnRH signaling pathway	97	37	0,000872216	0,005948511
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	29	15	0,000909854	0,006083533
Longevity regulating pathway	105	39	0,001164349	0,00763544
Gap junction	99	37	0,001350699	0,008690346
Small cell lung cancer	100	37	0,001666119	0,010521235
Relaxin signaling pathway	138	48	0,001761536	0,01092152
Inositol phosphate metabolism	78	30	0,002225779	0,013125431
Circadian rhythm	31	15	0,002169123	0,013125431
Cholinergic synapse	122	43	0,002232478	0,013125431
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	37	17	0,002274651	0,013146709
Cholesterol metabolism	51	21	0,003842212	0,021836571
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	115	40	0,004073708	0,022772694
VEGF signaling pathway	61	24	0,004205445	0,023129948
Hepatitis C	173	56	0,004796559	0,02596233
Platinum drug resistance	75	28	0,005020016	0,026747275
Chronic myeloid leukemia	79	29	0,005729288	0,028750902
Adherens junction	79	29	0,005729288	0,028750902
Fluid shear stress and atherosclerosis	149	49	0,005708155	0,028750902
Hedgehog signaling pathway	59	23	0,005733318	0,028750902
Shigellosis	268	81	0,006541602	0,032328787
Dopaminergic synapse	143	47	0,006769303	0,032976174

Growth hormone synthesis, secretion and action	129	43	0,007093415	0,034017118
T cell receptor signaling pathway	115	39	0,007316612	0,034017118
Apelin signaling pathway	140	46	0,007373087	0,034017118
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	101	35	0,007382014	0,034017118
Purine metabolism	137	45	0,008031806	0,03628554
Hepatitis B	177	56	0,0080871	0,03628554
Apoptosis - multiple species	32	14	0,009205231	0,040766022
Hypertrophic cardiomyopathy	99	34	0,009534159	0,041681386
p53 signaling pathway	75	27	0,010044301	0,042813833
Glutamatergic synapse	117	39	0,010006807	0,042813833
Cushing syndrome	176	55	0,011238183	0,047311362
Yersinia infection	147	47	0,011746672	0,048848965
Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	15	8	0,01193806	0,04904673

Ortak olarak hedeflenen sinyal yolları arasında kanser sinyal yollarında farklı miRNA'lar tarafından hedeflenen mRNA'lar Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4-4 Çalışmamızda ifade seviyesi azalan miRNA'lerden miR-130b-3p, miR-767-5p ve miR-887-5p için kanser sinyal yollarında hedeflenen mRNA'ların tablosu

Pathways in cancer		
Hedefleyen miRNA	Genin numarası (Ensembl)	Genin Adı
Şekil tablosu ögesi bulunamadı.		
hsa-miR-767-5p	ENSG00000078295	ADCY2
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000196914	ARHGEF12
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-887-3p	ENSG00000198668	CALM1
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000167193	CRK
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-887-3p	ENSG00000078401	EDN1
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000136160	EDNRB
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000091831	ESR1

hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000070193	FGF10
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000115414	FN1
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000163909	HEYL
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000017427	IGF1
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000134460	IL2RA
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000134352	IL6ST
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000157404	KIT
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000070018	LRP6
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000145675	PIK3R1
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000175387	SMAD2
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000163235	TGFA
hsa-miR-130b-3p hsa-miR-767-5p	ENSG00000134245	WNT2B
hsa-miR-767-5p hsa-miR-887-3p	ENSG00000158955	WNT9B

5 TARTIŞMA

Forkhead Box O (FoxO) transkripsiyon ailesi hücre döngüsü, hücre büyümesi, apoptoz, otofaji, stres direnci, hücresel strese karşı korunma, DNA onarımı, tümör baskılanması dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlere sahiptir [35]. FoxO ailesi transkripsiyon faktörlerinden biri olan FoxO3a, meme kanserinde önemli bir tümör baskılayıcıdır [36]. FoxO3a'nın işlevi esas olarak nükleer translokasyon ile düzenlenir. Genel olarak, hayvan hücrelerindeki FoxO transkripsiyon faktörleri, korunmuş serin / treonin kalıntılarından fosforile eden Akt veya diğer kinazlar tarafından düzenlenir. Bu fosforilasyon ile FoxO transkripsiyon faktörlerinin DNA ile bağlantısı bozularak sitoplazmaya transloke olurlar, burada 14-3-3 proteini fosforile FoxO faktörlerine bağlanır ve sitoplazmada inaktive olmalarına sebep olurlar [37]. Akt aktivasyonunun inhibe olduğu durumlarda ise, FoxO transkripsiyon faktörleri nükleuse göç ederek apoptoz ve hücre döngüsünde görevli genlerin transkripsiyonunu düzenler [37]. Bu kapsamda, tez çalışmasında ilk olarak BT-474 hücrelerinde FoxO3a ifadesi arttırılmıştır. FLAG etiketli boş ve FoxO3a ifadesi arttırılmış plazmit vektörlerinin BT-474 meme kanseri hücrelerine transfeksiyonunu takiben mRNA ve protein düzeylerinde FoxO3a ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-1, 4-2, 4-3, 4-4). FoxO3a artışı ile yağ asidi metabolizması arasındaki ilişkinin araştırılması için FASN enzimi inhibitörü olan orlistat uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bir gastrointestinal lipaz inhibitörü olarak orlistat lipid metabolizması enzimlerini inhibe ederek, NF- κ B, kaspaz9 ve AKT/mTOR , TRAIL, kaspaz3 sinyal yolları aracılığı ile apoptozu indükler [38]. Orlistatın meme kanseri hücrelerinde yağ asidi sentezinin inhibisyonu ilişkili olarak apoptotik ve antianjiyojenik etkilerinin belirlendiği çalışmada, MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ve normal MRC-5 epitel hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak orlistat uygulaması gerçekleştirilerek sitotoksik etkisi araştırılmıştır. 1-100 μ g/ml orlistatın 24 ve 72 saatler süresince uygulamasının hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, ancak MRC-5 hücre hattında 50-100 μ g/ml orlistatın hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. MDA-MB-468 hücre hattının üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine kıyasla orlistat uygulamasına daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir [39]. Benzer şekilde tez

çalışmasında 1-75 μ M orlistat 24 ve 48 saat süresince BT-474 hücrelerine uygulanmıştır. Artan dozlarda uygulanan orlistatin hücre canlılığını azalttığı, 24 saat süreli olarak 75 μ M uygulanan orlistatin hücre canlılığını %52'ye düşürdüğü belirlenmiştir. MTT Canlılık Testi'nden elde edilen sonuca göre 24 saat 75 μ M orlistat uygulaması %50 oranında canlılığı azaltan doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4-5). 75 μ M orlistat uygulamasının BT-474 hücrelerinin canlılığına olan etkisi DioC6 ve PI boyamalar ile belirlenmiştir.

Floresan lipofilik bir boya olan DiOC6 düşük konsantrasyonlarda canlı hücrelerin mitokondrisini boyarken, artan konsantrasyonlarda endoplazmik retikulumu boyamaktadır [40]. Bu kapsamda wt, FT ve FF hücrelerinde orlistat uygulamasının mitokondri membran potansiyel değişikliğine bağlı olarak canlı hücrelerde meydana getirdiği etkiyi anlamak için hücrelere DiOC6 uygulaması gerçekleştirilmiştir. Orlistat uygulanmayan hücre modellerinde FoxO3a'nın artışına bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte, FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının hücre canlılığını en yüksek oranda azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4-6). Ölü hücrelerin belirlenmesi çalışmalarında öncelikli olarak kullanılan PI floresan boyası sağlam hücrelerin zarlarından verimli bir şekilde geçemezken, bozulmuş hücre membranlarından geçerek ölü hücreleri boyamaktadır [41]. Yapılan çalışmada orlistat uygulamasının wt, FT ve FF hücre modellerinde ölü hücre sayısını arttırdığı belirlenmiştir. FoxO3a artışı ile birlikte orlistat uygulamasının ölü hücre sayısının yüksek oranda arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-7). Klasik bir kemoterapi ajanı olan paklitakselin MCF-7 hücrelerinde pro-apoptotik Bim proteini ve FoxO3a ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte yapılan gen raportör çalışmaları, Bim geninin transkripsiyonunun FoxO3a'nın korunmuş FoxO bağlanma bölgesine ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. FoxO3a'nın Bim'in transkripsiyonel aktivitesinden sorumlu olduğu bulunmuştur [42]. Bu kapsamda FoxO3a artışına paralel olarak BT-474 hücrelerinde ölü hücre sayısının artışının apoptoz aracılı olduğu öne sürülmektedir. FASN inhibitörü orlistatin PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını azaltarak ve kaspaz sinyal yollarını aktifleyerek apoptozu tetiklediği belirlenmiştir [43]. Bununla birlikte meme kanserinde de orlistatin hücre döngüsüne ket vurduğu, Her2/neu (erbB-2) onkogeninin transkripsiyonunu baskılayarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı bulunmuştur [44]. Yapılan tez çalışmasında da FoxO3a artışı ile birlikte orlistat uygulamasının hücre canlılığını yalnız FoxO3a artışına kıyasla önemli

derecede arttırdığı belirlendiğinden orlistatin Foxo3a artışı ile ilişkili apoptoz artışını daha fazla tetiklediği öne sürülmektedir. Yapılan tez çalışmasında FoxO3a artışına ve yağ asidi metabolizmasının baskılanmasına bağlı olarak etkilenen genlerin ve metabolik sinyal yollarının belirlenmesi amacıyla değişen miRNA ifadelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesinin düzenlenmesinde işlev gören endojen, küçük, kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar belirli koşullar altında onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir. miRNA'ların ifadesinin düzensizliği proliferatifasyonun artışı, apoptozdan kaçış, hücre ölümüne direnç, invazyon ve metastazın aktivasyonu ve anjiyogenezin indüklemesini etkilemektedir [45]. Yapılan çalışmada, FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasını takiben miR-27a, miR-200a-5p, miR-429, miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır.

miRNA-27a kromozom 19 üzerinde yer almakta ve tümör gelişiminde, hücre proliferasyonunda, apoptozda, migrasyonda, anjiyogenezde ve ilaç duyarlılığında rol oynamaktadır. miR-27a, kolon, pankreas, meme, mesane kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde onkogen veya tümör baskılayıcı olabilir [46]. miR-27a'nın bir fonksiyonel hedefi olan transmembran protein 170B (TMEM170B), meme kanserinin proliferasyonunu, metastazını ve tümör oluşumunu baskılar. TMEM170B aşırı ekspresyonu sitoplazmik β -katenin fosforilasyonunu teşvik ederek β -katenin stabilizasyonunun inhibisyonuna, nükleer β -katenin seviyelerinin azalmasına ve aşağı akış hedeflerinin ekspresyonuna neden olur. Klinik olarak, meme kanseri hastalarında TMEM170B veya β -katenin ekspresyonu genel sağkalım oranı ile önemli ölçüde ilişkilidir [47]. Tez kapsamında yapılan elde edilen sonuçlarda sadece FoxO3a artışı ile birlikte miR-27a seviyesinin wt ve FT hücre modellerine göre daha fazla olduğu ve orlistat uygulamasının FF hücre modellerinde miR-27a seviyesinin artışını desteklediği görülmektedir. Bu kapsamda BT-474 hücrelerinde miR-27a'nın tümör baskılayıcı rolünü koruduğu öne sürülmektedir (Şekil 4-8). miR-200 ailesi, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 olmak üzere beş üyeden oluşur. Çoğu kanser türünde, miR-200 ailesi tümör baskılayıcı miRNA görevi görür [48]. miR-200a, mide kanseri, gliom, melanom, nöroblastom ve prostat kanserinin tümör büyümesini inhibe eder [48]. miRNA 200a, melanomda Siklin Bağımlı Kinaz 6'yı (CDK6) hedefler ve böylece hücre döngüsü durmasına neden olur ve kanser hücresi

proliferasyonunu azaltır [49]. miR-200 ailesi, kanser hücresi proliferasyonunu düzenleyen anahtar yolların üyelerini hedefler. PI3K/AKT yolu proliferasyon, göç, invazyon ve EMT'yi (epitelyal-mezenkimal geçiş) destekler. MiR-200a, mesane ve karaciğer kanserinde STAT4'ü inhibe ederek hücre proliferasyonunu azaltır. miR-200a, renal hücreli karsinomda TGFβ2'yi hedefler ve kanser hücrelerinin istilasını ve göçünü inhibe eder [50]. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarda FoxO3a artışı ve orlistat uygulaması ile birlikte miR-200a ifadesinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-9). miRNA-429 , miRNA-200 ailesinin bir üyesidir ve yumurtalık, akciğer ve mide kanserleri dahil olmak üzere birçok karsinomda tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde miR-429, meme kanseri hücrelerinde EMT'yi inhibe eder ve FN1'i hedefleyerek Wnt/β-katenin sinyal yolunu baskılamaktadır [51]. Çalışmamız kapsamında, FoxO3a ve orlistat uygulaması ile birlikte miR-429 ifadesinin önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4-10). miR-767-5p'nin, normal beyin dokularına ve normal insan astrositlerine kıyasla glioblastoma dokularında önemli ölçüde ifade seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR-767-5p'nin ektopik ekspresyonunun, in vitro glioblastoma hücre hatlarında proliferasyonu, koloni oluşumunu ve göçü baskıladığı ve hücre döngüsünü durdurarak apoptozu indüklediği belirlenmiştir [52]. Pan-Kanser Analiz Platformuna göre miR-767-5p ekspresyonunun meme invazif karsinomunda, normal meme dokularına kıyasla daha yüksek oranda ifadelendiği ve yüksek miR-767-5p ifadesinin meme kanseri hastalarının kötü prognozları ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak, miR-767-5p'nin aşırı ifadesinin meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu, invazyonunu, epitel-mezenkimal dönüşümün indüklediği bilinmektedir [53]. miR-767'nin insan melanom dokularında ve hücre hatlarında ifade seviyesinin arttığı ve miR-767'nin ektopik ekspresyonunu insan melanom hücre hatlarında proliferasyonu indüklemektedir [54]. Benzer şekilde, miR-767-5p ekspresyonunun, normal hepatik dokularla karşılaştırıldığında hepatosellüler karsinomada ifade seviyesinin arttığı ve bu artışın hastalığın ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir [55]. Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda FoxO3a ifadesinin artışının miR-767-5p ifadesini azalttığı ve orlistat uygulamasının miR-767-5p ifadesini daha fazla azalttığı belirlenmiştir. BT-474 hücrelerinde azalan miR-767-5p ifadesinin proliferasyonun ve migrasyonun baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. miRNA-130b'nin, mesane, akciğer, hepatosellüler karsinomda, insan gliomunda, özofagus skuamöz hücreli karsinomunda

ve endometriyal kanserde farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. miR-130b, tümör metastazında rol oynayan birkaç miRNA'dan biridir. miR-130b'nin hepatosellüler karsinomda yüksek oranda eksprese edildiği ve tümör sayısı, vasküler invazyon ve postoperatif nüks ve metastaz ile korele olduğunu gösterilmiştir. miR-130b artışının hepatosellüler karsinomda epitel-mezenkimal dönüşümü PTEN/p-Akt/HIF1 sinyal yolu ile ilişkili olarak tetiklediği belirlenmiştir [56]. Endometriyal kanserde p53 mutantlarının ektopik ekspresyonu ile miR-130b'nin baskılandığı ve buna bağlı olarak ZEB1 aracılı epitel-mezenkimal dönüşümün tetiklendiği belirlenmiştir [57]. Önemli bir invazyon ve metastaz indükleyicisi olan TGF- β 1'nin (transforming growth faktör) ile kolorektal kanser hücrelerinde miR-130b ifadesini baskılayarak migrasyonu arttırdığı belirlenmiştir [58]. miR-130b'nin kanser tipine bağlı olarak onkogenik ya da tümör baskılayıcı etki göstermesi ile ilişkili olarak meme kanserinde de miR-130b'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde de metastatik duruma göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. miR-130b-3p'nin Notch ligand DLL1'i hedefleyerek meme kanserinde invazyon ve metastazı baskıladığı belirtilmiştir [59]. Elde ettiğimiz sonuçlarda FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasının miR-130b-3p seviyesini önemli derece azalttığı sonucu elde edilmiştir (Şekil 4-12). miR-887-3p'nin kanserdeki rolü ile ilgili olarak yeterli bilgi bulunmamaktadır. Pankreas kanseri dokularında miR-887-3p'nin ifadesinin normal dokulara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Artan miR-887-3p seviyesinin, proliferasyonu, hücre döngüsü sürecini, hücre göçünü ve istilasını teşvik eden ve pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu inhibe eden STARD13'ün ekspresyonunu azalttığı sonuçları elde edilmiştir [60]. Tez çalışması kapsamında elde sonuçlarda FoxO3a artışı ile orlistat uygulamasının miR-887-3p'nin seviyesinin önemli derecede azaldığı bulunmuştur.

miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un literatür verileri ile uyumlu olarak FoxO3a'nın artışı ve orlistat uygulaması ile birlikte önemli derece ifade seviyesinin artışına ait elde edilen sonuçlar doğrultusunda ortak hedef genler ve sinyal yollarının analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, kanserde proteoglikanlar (Proteoglycans in cancer), kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolu (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), ErbB sinyal yolu, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) sinyal yolu, TGF- β sinyal yolu sinyal yollarının ortak olarak hedefledikleri gözükmektedir. Benzer şekilde miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin de onkomiRNA özelliği gösterdiği ve FoxO3a artışı

ve orlistat uygulaması ile ifade seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Belirtilen miRNA'lar tarafından hedeflenen sinyal yolları arasında kanser sinyal yolu, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance), PI3K-AKT sinyal yolu (PI3K-Akt signaling pathway), Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolları (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), kolorektal kanser (colorectal cancer), Ubiquitin aracılı proteoliz (Ubiquitin mediated proteolysis) ve FoxO sinyal yolu bulunmaktadır.

miRNA'ların rolü, insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü (IGF-IR) ile tetiklenen sinyalleme, EGFR, MEK/ERK/MAPK yolu, Wnt/b-katenin, PI3K/Akt/rapamisininin memeli hedefi (mTOR)/PTEN yolları, NF- κ B sinyali ve vasküler büyüme faktörü A (VEGFA) ve Ras/Raf aracılı sinyalleme yoluyla patofizyolojik süreçlerde rol oynayan hedef mRNA'lar yoluyla proteinlerin ekspresyonunu, hücre büyümesi, çoğalması, hayatta kalması ve hücre hareketliliğinin düzenlenmesinde değil, aynı zamanda enerji metabolizması ve glikoz homeostazisinde de önemli roller oynar [61].

Proteoglikanlar, kanserin ilerlemesinde nodal roller sergileyen başlıca hücre dışı matriks biyomolekül sınıflarından birini oluşturur. Proteoglikanlar, matriks ile dinamik etkileşimler yoluyla kanser gelişimi ve ilerlemesi için kritik sinyal yollarını düzenler. Kanser hücrelerinin epigenetik imzalarının, onların fonksiyonel özelliklerini ve metastatik potansiyelini yönlendirmede kritik bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Salgılanan mikroRNA'lar (miRNA'lar), matris proteoglikanları içeren karmaşık bir ağda bulunur, dolayısıyla hücre-hücre ve hücre-matris iletişimini etkiler [62]. EGFR ve Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK yollarına ilişkin olarak, miR-27a, miR-133a, miR-128b, miR-29b gibi onkobaskılayıcı miRNA'lar ve onkogenik miRNA'lar miR-21 ve miR-147b vardır.

Kolorektal kanserde etkili genlerin ve miRNA'ların ifade seviyelerinin araştırıldığı çalışmalarda miR-27a-3p, PCDH10, GRIN2B, FJX1, Dsc2 ve hsa-miR-375'ün kolorektal kanserin patojenik mekanizmasının anlaşılmasına yönelik potansiyel hedefler olarak tanımlandığı ve proteoglikan ekspresyonunu ile cAMP sinyallemesini düzenleyerek kolorektal kanserin patogeneğinde rol oynadıkları belirlenmiştir [63]. miRNA'ların proteoglikan ifadesinin düzenlediği bilinse de, proteoglikanların da miRNA ifadesini doğrudan modüle edebilirler. Spesifik olarak, TGF- β 1 sinyal kaskadı, pri-miR-21'i miR-21 öncesi işlemeye teşvik ederek, programlanmış hücre

ölümü proteini 4'ün (PDCP4) translasyonel bir inhibitörü olan olgun miR-21 seviyelerini artırabilir [64]. Bir onko-miRNA olan hsa-miR-130b, doğrudan NF- κ B tarafından düzenlenir. hsa-miR-130b-3p aynı zamanda PI3K ve integrin β 1 sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla çoğalmayı, göçü, istilayı ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini destekleyen PTEN ifadesini de azaltır. Ayrıca miR-130b-3p inhibitörleri apoptozu indüklediği de bilinmektedir [65].

miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p ortak hedeflediği sinyal yolları arasında yer alan PI3K/Akt sinyal yolu ile ilgili olarak hepatoselüler karsinomada yapılan çalışmalarda miR-767-5p, miR-105-5p, miR-1269a ve miR-4652-5p'nin ifade seviyelerinin düzensiz olmasının kanser gelişimde rolü olduğunu açığa çıkarmıştır. miR-767-5p'nin bir grup göçü kolaylaştırıcı miRNA arasında olduğu belirtilmiştir [66]. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlarda orlistat'ın BT-474 meme kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı ve FoxO3a artışı ile birlikte hücre canlılığının önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. FoxO3a artışının BT-474 hücrelerinde orlistat duyarlılığını arttırdığı öne sürülmektedir. BT-474 hücrelerinde değişen miRNAs seviyelerinin analizinde miR-27a, miR-200a-5p, miR-429'un ifade seviyelerinin arttığı ve miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p'nin ifade seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. miR-27a, miR-200a-5p ve miR-429'un ortak hedef sinyal yolları Kanserde proteoglikanlar (Proteoglycans in cancer), Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolları (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), ErbB, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance), TGF- β sinyal yolu, akut miyeloid lösemi (acute myeloid leukemia), pankreas (pancreatic), kolorektal (colorectal) ve mide (gastric) kanserde etkili sinyal yolları olarak bulunmuştur. miR-767-5p, miR-130b-3p ve miR-887-3p tarafından hedeflenen sinyal yolları arasında kanser sinyal yolu, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance), PI3K-AKT sinyal yolu (PI3K-Akt signaling pathway), Kök hücrelerin pluripotensini düzenleyen sinyal yolları (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells), kolorektal kanser (colorectal cancer), Ubiquitin aracılı proteoliz (Ubiquitin mediated proteolysis) ve FoxO sinyal yolu bulunmaktadır. FoxO3a artışı ve orlistat uygulamasını takiben belirlenen ortak hedef sinyal yollarında görevli proteinlerin ifade seviyelerinin karşılaştırılmasının yapılması miRNA-protein aracılı etkileşimi belirlemek için önemlidir.

REFERANSLAR

- [1] Y. Liu *et al.*, “Critical role of FOXO3a in carcinogenesis,” *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, Jul. 2018, doi: 10.1186/S12943-018-0856-3.
- [2] Y. Feng *et al.*, “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis,” *Genes Dis.*, vol. 5, no. 2, p. 77, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.GENDIS.2018.05.001.
- [3] Y. S. Khan, A. O. Fakoya, and H. Sajjad, “Anatomy, Thorax, Mammary Gland,” *StatPearls*, Dec. 2023, Accessed: Feb. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547666/>.
- [4] N. Eliyatkin, E. Yalçın, B. Zengel, S. Aktaş, and E. Vardar, “Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way,” *J. Breast Heal.*, vol. 11, no. 2, p. 59, Apr. 2015, doi: 10.5152/TJBH.2015.1669.
- [5] M. Arnold *et al.*, “Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040,” *Breast Off. J. Eur. Soc. Mastology*, vol. 66, p. 15, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.BREAST.2022.08.010.
- [6] S. Satpathi, S. S. Gaurkar, A. Potdukhe, and M. B. Wanjari, “Unveiling the Role of Hormonal Imbalance in Breast Cancer Development: A Comprehensive Review,” *Cureus*, vol. 15, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.7759/CUREUS.41737.
- [7] S. Shiovitz and L. A. Korde, “Genetics of breast cancer: a topic in evolution,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1291–1299, Jul. 2015, doi: 10.1093/ANNONC/MDV022.
- [8] A. Shin *et al.*, “Alcohol consumption, body mass index and breast cancer risk by hormone receptor status: Women’ Lifestyle and Health Study,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, Nov. 2015, doi: 10.1186/S12885-015-1896-3.

- [9] S. Yan and S. Yue, "Identification of early diagnostic biomarkers for breast cancer through bioinformatics analysis," *Medicine (Baltimore)*, vol. 102, no. 37, p. E35273, Sep. 2023, doi: 10.1097/MD.00000000000035273.
- [10] N. Iqbal and N. Iqbal, "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications," *Mol. Biol. Int.*, vol. 2014, pp. 1–9, Sep. 2014, doi: 10.1155/2014/852748.
- [11] T. M. Hanis, N. M. Yaacob, S. Mohd Hairon, and S. Abdullah, "Original research: Net survival differences of breast cancer between stages at diagnosis and age groups in the east coast region of West Malaysia: a retrospective cohort study," *BMJ Open*, vol. 11, no. 5, p. 43642, May 2021, doi: 10.1136/BMJOPEN-2020-043642.
- [12] T. Parlar, M. K. Üniversitesi, and T. Bölümü, "Meme Kanseri Teşhis ve Prognozunda Radiomics ile Yapay Zeka Yöntemleri Kullanımı Hakkında Bir İnceleme," *Eur. J. Sci. Technol. Spec. Issue*, pp. 300–306, 2019, doi: 10.31590/ejosat.780052.
- [13] R. García-Becerra, N. Santos, L. Díaz, and J. Camacho, "Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, p. 108, Jan. 2013, doi: 10.3390/IJMS14010108.
- [14] J. Anampa, D. Makower, and J. A. Sparano, "Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview," *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, Aug. 2015, doi: 10.1186/S12916-015-0439-8.
- [15] C. A. Parise, K. R. Bauer, M. M. Brown, and V. Caggiano, "Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004," *Breast J.*, vol. 15, no. 6, pp. 593–602, Nov. 2009, doi: 10.1111/J.1524-4741.2009.00822.X.
- [16] G. M. Cooper, "The Molecular Composition of Cells," 2000, Accessed: Feb. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9879/>.
- [17] X. Bian, R. Liu, Y. Meng, D. Xing, D. Xu, and Z. Lu, "Cancer Focus: Lipid

- metabolism and cancer,” *J. Exp. Med.*, vol. 218, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1084/JEM.20201606.
- [18] M. Picon-Ruiz, C. Morata-Tarifa, J. J. Valle-Goffin, E. R. Friedman, and J. M. Slingerland, “Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention,” *Ca*, vol. 67, no. 5, p. 378, Sep. 2017, doi: 10.3322/CAAC.21405.
- [19] J. Q. Chen and J. Russo, “ER α -Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1796, no. 2, p. 162, Dec. 2009, doi: 10.1016/J.BBCAN.2009.06.003.
- [20] K. A. Brown, “Metabolic pathways in obesity-related breast cancer,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 17, no. 6, p. 350, Jun. 2021, doi: 10.1038/S41574-021-00487-0.
- [21] S. Corvera and O. Gealekman, “Adipose tissue angiogenesis: Impact on obesity and type-2 diabetes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1842, no. 3, pp. 463–472, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.BBADIS.2013.06.003.
- [22] P. Bhardwaj and K. A. Brown, “Obese Adipose Tissue as a Driver of Breast Cancer Growth and Development: Update and Emerging Evidence,” *Front. Oncol.*, vol. 11, Mar. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.638918.
- [23] E. Papakonstantinou, Z. Piperigkou, N. K. Karamanos, and V. Zolota, “Altered Adipokine Expression in Tumor Microenvironment Promotes Development of Triple Negative Breast Cancer,” *Cancers 2022, Vol. 14, Page 4139*, vol. 14, no. 17, p. 4139, Aug. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14174139.
- [24] P. S. Ward and C. B. Thompson, “Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 1–15, Jul. 2012, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A006783.
- [25] R. A. K. Srivastava, S. L. Pinkosky, S. Filippov, J. C. Hanselman, C. T. Cramer, and R. S. Newton, “AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardiometabolic diseases: Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases,” *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 12, p. 2490, Dec. 2012, doi: 10.1194/JLR.R025882.

- [26] H. Zahid *et al.*, “Leptin regulation of the p53-HIF1 α /PKM2-aromatase axis in breast adipose stromal cells: a novel mechanism for the obesity-breast cancer link,” *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 42, no. 4, pp. 711–720, Apr. 2018, doi: 10.1038/IJO.2017.273.
- [27] X. Hao *et al.*, “Pharmacological effect and mechanism of orlistat in anti-tumor therapy: A review,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 102, no. 36, p. E34671, Sep. 2023, doi: 10.1097/MD.00000000000034671.
- [28] C. Zhang *et al.*, “Orlistat delays hepatocarcinogenesis in mice with hepatic co-activation of AKT and c-Met,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 392, p. 114918, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.TAAP.2020.114918.
- [29] N. Van Opdenbosch and M. Lamkanfi, “Caspases in cell death, inflammation and disease,” *Immunity*, vol. 50, no. 6, p. 1352, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2019.05.020.
- [30] C. Harsha *et al.*, “Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 9, May 2020, doi: 10.3390/IJMS21093285.
- [31] J. Gao *et al.*, “Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand induces the expression of proinflammatory cytokines in macrophages and re-educates tumor-associated macrophages to an antitumor phenotype,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 18, p. 3178, Sep. 2015, doi: 10.1091/MBC.E15-04-0209.
- [32] Y. Jiramongkol and E. W. F. Lam, “FOXO transcription factor family in cancer and metastasis,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 681–709, Sep. 2020, doi: 10.1007/S10555-020-09883-W.
- [33] N. Arrighetti and G. L. Beretta, “miRNAs as Therapeutic Tools and Biomarkers for Prostate Cancer,” *Pharm. 2021, Vol. 13, Page 380*, vol. 13, no. 3, p. 380, Mar. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13030380.
- [34] E. F. Finnegan and A. E. Pasquinelli, “MicroRNA biogenesis: Regulating the Regulators,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 48, no. 1, p. 51, Jan. 2013, doi: 10.3109/10409238.2012.738643.
- [35] Y. Zhang, B. Gan, D. Liu, and J. H. Paik, “FoxO family members in cancer,”

- Cancer Biol. Ther.*, vol. 12, no. 4, pp. 253–259, Aug. 2011, doi: 10.4161/CBT.12.4.15954.
- [36] R. K. Yadav, A. S. Chauhan, L. Zhuang, and B. Gan, “FoxO transcription factors in cancer metabolism,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 50, p. 65, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2018.01.004.
 - [37] Y. Liu *et al.*, “Critical role of FOXO3a in carcinogenesis,” *Mol. Cancer* 2018 171, vol. 17, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2018, doi: 10.1186/S12943-018-0856-3.
 - [38] X. Hao *et al.*, “Pharmacological effect and mechanism of orlistat in anti-tumor therapy: A review,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 102, no. 36, p. E34671, Sep. 2023, doi: 10.1097/MD.00000000000034671.
 - [39] J. V. Jovankić *et al.*, “Potential of Orlistat to induce apoptotic and antiangiogenic effects as well as inhibition of fatty acid synthesis in breast cancer cells,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 939, p. 175456, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2022.175456.
 - [40] A. J. Koning, P. Y. Lum, J. M. Williams, and R. Wright, “DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells,” *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 25, no. 2, pp. 111–128, 1993, doi: 10.1002/CM.970250202.
 - [41] F. Wallberg, T. Tenev, and P. Meier, “Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 4, pp. 347–352, Apr. 2016, doi: 10.1101/PDB.PROT087387.
 - [42] A. Sunters *et al.*, “FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 49795–49805, Dec. 2003, doi: 10.1074/JBC.M309523200.
 - [43] E. Sokolowska, M. Presler, E. Goyke, R. Milczarek, J. Swierczynski, and T. Sledzinski, “Orlistat Reduces Proliferation and Enhances Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells (PANC-1),” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 6321–6327, Nov. 2017, doi: 10.21873/ANTICANRES.12083.
 - [44] J. A. Menendez, L. Vellon, and R. Lupu, “Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated

- transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 16, no. 8, pp. 1253–1267, 2005, doi: 10.1093/ANNONC/MDI239.
- [45] Y. Peng and C. M. Croce, “The role of MicroRNAs in human cancer,” *Signal Transduct. Target. Ther.* 2016 11, vol. 1, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2016, doi: 10.1038/sigtrans.2015.4.
- [46] X. Li, M. Xu, L. Ding, and J. Tang, “MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors,” *J. Cancer*, vol. 10, no. 12, p. 2836, 2019, doi: 10.7150/JCA.31361.
- [47] M. Li *et al.*, “Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway,” *Cell Death Dis.* 2018 92, vol. 9, no. 2, pp. 1–15, Jan. 2018, doi: 10.1038/s41419-017-0128-y.
- [48] K. Klicka, T. M. Grzywa, A. Mielniczuk, A. Klinke, and P. K. Włodarski, “The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 12, Sep. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.965231.
- [49] M. A. Bustos *et al.*, “MiR-200a Regulates CDK4/6 Inhibitor Effect by Targeting CDK6 in Metastatic Melanoma,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 9, pp. 1955–1964, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.JID.2017.03.039.
- [50] R. Lu *et al.*, “Tumor suppressive microRNA-200a inhibits renal cell carcinoma development by directly targeting TGFB2,” *Tumour Biol.*, vol. 36, no. 9, pp. 6691–6700, Aug. 2015, doi: 10.1007/S13277-015-3355-9.
- [51] L. Zhang *et al.*, “MiR-429 suppresses proliferation and invasion of breast cancer via inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway,” *Thorac. Cancer*, vol. 11, no. 11, p. 3126, Nov. 2020, doi: 10.1111/1759-7714.13620.
- [52] J. Zhang *et al.*, “miR-767-5p inhibits glioma proliferation and metastasis by targeting SUZ12,” *Oncol. Rep.*, vol. 42, no. 1, p. 55, Jul. 2019, doi: 10.3892/OR.2019.7156.
- [53] F. Wang *et al.*, “CircNOL10 suppresses breast cancer progression by sponging miR-767-5p to regulate SOCS2/JAK/STAT signaling,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 28, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12929-020-00697-0.

- [54] K. Zhang and L. Guo, "MiR-767 promoted cell proliferation in human melanoma by suppressing CYLD expression," *Gene*, vol. 641, pp. 272–278, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.GENE.2017.10.055.
- [55] L. Zhang, Z. Geng, Y. Wan, F. Meng, X. Meng, and L. Wang, "Functional analysis of miR-767-5p during the progression of hepatocellular carcinoma and the clinical relevance of its dysregulation," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 154, no. 2, pp. 231–243, Aug. 2020, doi: 10.1007/S00418-020-01878-6.
- [56] Y. Miao *et al.*, "MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway," *Sci. Rep.*, vol. 7, Feb. 2017, doi: 10.1038/srep41942.
- [57] P. Dong *et al.*, "Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis," *Oncogene*, vol. 32, no. 27, pp. 3286–3295, Jul. 2013, doi: 10.1038/ONC.2012.334.
- [58] R. Yi *et al.*, "Transforming growth factor (TGF) β 1 acted through miR-130b to increase integrin α 5 to promote migration of colorectal cancer cells," *Tumour Biol.*, vol. 37, no. 8, pp. 10763–10773, Aug. 2016, doi: 10.1007/S13277-016-4965-6.
- [59] Y. Shui *et al.*, "miR-130b-3p inhibits cell invasion and migration by targeting the Notch ligand Delta-like 1 in breast carcinoma," *Gene*, vol. 609, pp. 80–87, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.GENE.2017.01.036.
- [60] X. Xu and S. Zheng, "MiR-887-3p Negatively Regulates STARD13 and Promotes Pancreatic Cancer Progression," *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, p. 6137, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S260542.
- [61] S. Taefehshokr *et al.*, "The pivotal role of MicroRNAs in glucose metabolism in cancer," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 217, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.PRP.2020.153314.
- [62] Z. Piperigkou, K. Tzaferi, G. Makrokanis, K. Cheli, and N. K. Karamanos, "The microRNA-cell surface proteoglycan axis in cancer progression," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 322, no. 5, pp. C825–C832, May 2022, doi: 10.1152/AJPCELL.00041.2022/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPCELL.00041.2022_F002.JPEG.

- [63] M. Cui *et al.*, “Identification of an MiRNA-mRNA Regulatory Network in Colorectal Cancer,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 24, no. 10, pp. 1736–1745, Nov. 2021, doi: 10.2174/1386207323666201110154142.
- [64] R. Merline *et al.*, “Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21,” *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 199, Nov. 2011, doi: 10.1126/SCISIGNAL.2001868.
- [65] X. Cui *et al.*, “miR-130b, an onco-miRNA in bladder cancer, is directly regulated by NF- κ B and sustains NF- κ B activation by decreasing Cylindromatosis expression,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 30, p. 48547, Jul. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.10423.
- [66] R. Zha *et al.*, “Genome-wide screening identified that miR-134 acts as a metastasis suppressor by targeting integrin β 1 in hepatocellular carcinoma,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, Feb. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0087665.

6 EKLER

6.1 Ek A: Kullanılan Cihazların Listesi

Tablo 6-1 Kullanılan Cihazların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Buz Makinası	AF80	Scotsman
CO2 inkübatörü	50116047	Thermo Fsiher Scientific
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Derin Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer (ULTF)	ARCTIKO
Dikey Jel Elektroforezi Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Distile Su Cihazı	Tank 30 Liter PE/Milipore	Labor Teknik
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific
Elektroforez Donanımları		BioRad
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
QRT-PCR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
İnvert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik
Mikropipetler 10 µl, 200 µl, 1000 µl		CAPP
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
PCR Kapakları, Stripler	AB-0783	Thermo Scientific
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad

BT-474	HTB-22	ATCC
75 cm2 Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
Eğimli Boyun 25 cm2 Hücre Büyütme Kapları	707001	NEST
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP
Kriyojenik Şişe	607001	NEST
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serumu Gelişmiş (FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
Orlistat(100 ug)	FNK-BLK-0830-100ug	Diagnocine
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Serolojik Pipet (10 ml)	SP-10-C	CAPPHarmony
Transfeksiyon Ajanı	15081	İNTRON BIOTECHNOLOGY
Trypsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone

6.2 EK B: KULLANILAN KİMYASALLARIN LİSTESİ

Tablo 6-2 Kullanılan Kimyasalların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FIRMANIN ADI
Agaroz(Tip 1)	121853	MERCK
DEPC	A0881	AppliChem
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	R0611	Thermo Scientific
DPBS (10x)	P04-53500	PAN Biotech
Etanol	TK.200650	Teksoll
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miScript II RT Kit	218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	Qiagen
Kloroform	1024452500	MERCK
PureZOL RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRad
Saf Etanol	920.026	ISOLAB
Sybr Safe	MG-SSGD-01-1000	Hibrogen