



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI
ÜZERİNE MALİGN MEME DOKUSU STROMAL
HÜCRELERİNİN ETKİSİ VE miRNA İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

ÖZLEM SAĞLAM

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İRFAN DEĞİRMENCİ
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. ERDAL KARAÖZ**

2014



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI
ÜZERİNE MALİGN MEME DOKUSU STROMAL
HÜCRELERİNİN ETKİSİ VE miRNA İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

ÖZLEM SAĞLAM

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İRFAN DEĞİRMENCİ
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. ERDAL KARAÖZ**

Proje No: ESOĞÜ BAP 2013-147

KABUL VE ONAY SAYFASI

Özlem SAĞLAM'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "MDA-MB-231 Kanseri Hücrelerinin Çoğalması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi ve miRNA İlişkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
21/11/2014

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ (Danışman)



Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE



Üye: Doç. Dr. Miriş DİK MEN



Üye: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25 / 11 / 2014 tarih ve 1029 / 4792 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

Özet

RNA interferans (RNAi) mekanizması aracılığıyla gen ve protein ekspresyonunu düzenleyen mikroRNA'lar (miRNA) protein kodlamayan endojen RNA'lardır. miRNA'lar hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptozu da içeren çeşitli biyolojik fonksiyonlarla ilişkilidirler. Bu nedenle kanseri de içine alan çeşitli hastalıklarda önemli rol oynarlar. Onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak işlev görebilen miRNA'ların karsinogenezde de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda, tümör mikroçevresinde bulunan stromal hücrelerin tümörle ilişkili hücelere benzer özellik kazandıkları bildirilmiştir. Ayrıca, tümör mikroçevresinden salgılanan inflamatuvar sinyallerin tümör büyümesini ve sürekliliğini teşvik ettiği düşünülmektedir.

Kanserlerin moleküler temelini daha iyi anlaşılması ile yeni belirteçlerin keşfedilmesini sağlamak, prognozunu belirlemek ve sonuç olarak yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek amacıyla miRNA'ların fonksiyonlarının ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenlerle, gerçekleştirilen çalışmada kanser hücreleri ile sağlıklı ve malign meme dokusundan elde edilen stromal hücrelerin ortak kültürlerinde birbirleri üzerine gösterdiği etkiler ve bu olası etkilerde miRNA'ların rolünü araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla, sağlıklı ve malign meme dokularından enzimatik sindirme yöntemiyle stromal hücreler izole edildikten sonra uygun koşullarda kültüre edildi. Sonrasında bu hücrelerin akım sitometri aygıtı ve farklılaştırma çalışmaları ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. İmmunofenotipik özellikleri belirlenen sağlıklı ve malign meme dokusundan elde edilen stromal hücreler kanser hücre hattı ile yarı geçirgen membranlar (insert; ara bölüm) aracılığıyla ortak-kültüre edildi. Ortak-kültür sonrası deney gruplarının çoğalım kapasiteleri WST-1 testi ile değerlendirildi, ek olarak hücrelerin miRNA'ları izole edilip cDNA'ları sentezlendi ve meme kanserine özel miRNA'lar (miR-27, miR-17-5p, miR-21, miR-10b, miR-373, miR-520c, let7, mir-200) ve bu miRNA'lar ile ilişkilendirilen genlerin ifade seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile kantitatif olarak belirlendi. Ayrıca kültür sonrasında süpernatantlara salınan bazı sitokin ve kemokinlerin (IL-6, IL-1 β , IL-8) seviyelerini belirlemek amacıyla ELISA yöntemi uygulandı.

Gerçekleştirilen deneyler neticesinde malign stromal hücrelerin ortak kültür sonrasında kanser hücrelerinin çoğalım kapasitelerini arttırdığını saptadık. Ayrıca meme kanseri ile ilişkili olarak onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikte oldukları bilinen bir takım miRNA (miR-21, miR-17, let-7 vb.) ve onların hedefledikleri genlerin (HMGA2, AIB1, PDCD4 vb.) ifade seviyelerinde malign hücrelerle ortak kültür sonrasında mikroçevrenin kanser oluşumunda önemli olduğunu destekler nitelikte değişimler saptadık.

Sonuç olarak, sağlıklı ve malign meme dokusu stromal hücrelerinin parakrin mekanizmalar ile kanser hücrelerinde meydana getireceği değişimlerde miRNA'lar ve onlarla ilişkilendirilen yollara özgü genlerin olası rolleri gsterilmeye ve bu bağlamda tümör mikroçevresinin tmroenezdeki etkileri ayrıntılı şekilde ortaya konulmaya alışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, mezenkimal stromal hücre, mikroçevre, miRNA.

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs which regulate gene and protein expression through the RNA interference (RNAi) mechanism. miRNAs are related to different biological functions including cellular proliferation, differentiation and apoptosis. Therefore, they play crucial roles in different diseases including cancer. Oncogene or tumor suppressor miRNAs play an important role in tumorigenesis. It has been reported that stromal cells in tumor microenvironment gained similar features of tumor-associated cells. Additionally, it is considered that inflammatory signals secreted from tumor microenvironment support tumor growth and survivability.

Detailed analysis of miRNA functions should be investigated to discover novel markers and to determine the prognosis through better understanding of molecular basis of cancer concept, and to develop new treatment approach consequently. Thus in the current study, we aimed to investigate the effects of co-culture of cancer cells and stromal cells, isolated from normal and malign breast tissues, on each others, and the possible effects of miRNAs in these cross-effects.

Subsequently after isolation of stromal cells tissue by enzymatic digestion method, appropriate culture condition will be maintained, and flow-cytometry will be applied for the characterization. Characterized stromal cells that are derived from normal and malign breast tissue will co-cultured with MDA-MB-231 cancer cell line in the presence of semi-permeable membranes. After the co-culture, proliferation capacity of the experimental groups were evaluated with WST-1 assay. Additionally RNAs and miRNAs of the cancer and stromal cells will isolate and cDNAs will synthesized. Expression levels of breast cancer specific miRNAs and related genes will be evaluated by real-time PCR. Additionally after the co-culture, ELISA test will be performed to determine some of cytokine and chemokine (IL-6,IL-1 β ,IL-8) levels secreted to supernatants.

As a result of experiments we found that increased proliferation capacity of the cancer cells after co-culture with malignant stromal cells. Also we found that microenvironment is important in the formation of cancer in support of the changes in the expression levels of oncogenic and tumor suppressor miRNA and their targeted genes after the co-culture with malignant stromal cells.

As a conclusion, the possible roles of miRNAs on the alterations in cancer cells by paracrine mechanisms of both normal and malign breast tissues stromal cells are attempt to reveal. In the result of the performed studies with this aim, specific gene expressions of related pathways are

going to be detected correlated with miRNA changes, and the effects of the tumor microenvironment in tumorigenesis will be revealed in detail.

Keywords: Breast cancer, mesenchymal stromal cell, microenvironment, miRNA.

İçindekiler

Özet.....	iii
Summary.....	v
Tablo Dizini.....	x
Şekil Dizini.....	xii
Grafik Dizini.....	xiv
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	xvi
1-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2- GENEL BİLGİLER.....	3
2.1- Kanser ve Oluşum Mekanizmaları.....	3
2.2- Meme Kanseri.....	5
2.2.1- Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması.....	6
2.2.1.1- <i>İn situ</i> karsinomlar (Noninvaziv).....	7
2.2.1.2- <i>İnvaziv</i> karsinomlar.....	7
2.3-Tümör Mikroçevresi ve Mezenkimal Stromal (Kök) Hücreler.....	8
2.3.1-Kök hücreler.....	10
2.3.1.1-Mezenkimal kök hücreler (Mezenkimal stromal hücreler).....	11
2.4-MikroRNA'lar.....	13
2.4.1-MikroRNA'ların keşfi ve yapısı.....	14
2.4.2-MikroRNA'ların biyogenezi (oluşumu).....	14
2.4.3-miRNA'ların işlev bozukluğu ve kanser.....	16
3- GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	18
3.1-Gereç.....	18
3.1.1-Stromal hücrelerin izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.....	18
3.1.2-Stromal hücrelerin besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar.....	18
3.1.3-Alt-Kültür (pasajlama), hücrelerin sayımı ve dondurulması işlemlerinde kullanılan gereçler ve solüsyonlar.....	18
3.1.4-Akım sitometrik analizlerde kullanılan antikor, solüsyon ve kimyasallar.....	19
3.1.5-Gerçek zamanlı PCR'da kullanılan malzemeler.....	20

3.1.6- <i>In vitro</i> osteojenik ve adipojenik farklılaştırma çalışmalarında kullanılan solüsyon ve kimyasallar.....	20
3.1.7-Çalışmada kullanılan diğer plastik ve sarf malzemeler	20
3.1.8-Çalışmada kullanılan cihazlar	21
3.2-Yöntem.....	22
3.2.1-Stromal hücrelerin izolasyonu	22
3.2.2-Stromal hücrelerin kültürü.....	23
3.2.3-Stromal hücrelerin karakterizasyon işlemleri	23
3.2.3.1-Stromal hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu	23
3.2.3.2-Stromal Hücrelerin <i>in vitro</i> farklılaştırma çalışmaları.....	25
3.2.3.2.1-Osteojenik farklılaştırma	25
3.2.3.2.2-Adipojenik farklılaştırma	25
3.2.3.2.3-Nörojenik farklılaştırma	25
3.2.3.2.3.1-İmmunofloresan İşaretleme	26
3.2.4-Ortak-kültür çalışmaları.....	26
3.2.5-WST-1 (Water-Soluble Tetrazoliummonosodium salt-1) hücre canlılığı ve çoğalma testi.....	28
3.2.6-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi.....	28
3.2.7-RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	29
3.2.8-Gerçek-zamanlı (Real-time) PCR ile gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	30
3.2.9-miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	31
3.2.10-İstatistiksel yöntem	32
4- BULGULAR.....	33
4.1. Mezenkimal Stromal Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü	33
4.2-Mezenkimal Stromal Hücrelerin Karakterizasyonu.....	35
4.2.1-Mezenkimal stromal hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu	35
4.2.2-Mezenkimal stromal hücrelerin <i>in vitro</i> farklılaştırma çalışmaları ...	36
4.2.2.1-Osteojenik farklılaştırma.....	36
4.2.2.2-Adipojenik farklılaştırma	38
4.2.2.3-Nörojenik farklılaştırma	40
4.3-Ortak Kültür Çalışmalarının Değerlendirilmesi	43

4.4-WST-1 Testi Değerlendirmesi.....	43
4.5-ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	44
4.6-Gen ve miRNA Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	47
4.7-İfade Seviyeleri Belirlenen Gen ve miRNA'ların Tanısal Değerinin ROC Analiziyle Belirlenmesi	61
5- TARTIŞMA.....	66
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	83
Özgeçmiş.....	94

Tablo Dizini

Tablo 3.1: İfade seviyeleri belirlenen genlere ait primer dizileri ile prob numaraları ve referans genleri.....	30
Tablo 3.2: Çalışılan miRNA'ları gösteren panel düzeni.....	31
Tablo 3.3: Revers transkripsiyon reaksiyon koşulları	32
Tablo 3.4: Gerçek-zamanlı PCR koşulları.....	32
Tablo 4.1: WST-1 testi sonrası deney gruplarının çoğalım kapasitelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve <i>p</i> değerleri.	43
Tablo 4.2: ELISA testi ile belirlenen IL-8 seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve <i>p</i> değerleri.....	45
Tablo 4.3: ELISA testi ile belirlenen IL-6 seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve <i>p</i> değerleri.....	46
Tablo 4.4: ELISA testi ile belirlenen IL-1 β seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve <i>p</i> değerleri.	47
Tablo 4.5: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen HMGA2 geni ve let-7a ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	48
Tablo 4.6: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen AIB1 geni ve miR-17-5p ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	50
Tablo 4.7: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen PDCD4 geni ve miR-21 ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	51
Tablo 4.8: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-373 ve miR-520c ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	52
Tablo 4.9: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-200b ve miR-200a ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	53
Tablo 4.10: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen RhoC ve HoxD10 genlerinin ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.....	54
Tablo 4.11: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-10b ve miR-27b ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	56

Tablo 4.12: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen BRCA1 ve CD44 ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	57
Tablo 4.13: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen PPAR α ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.	60
Tablo 4.14: MDA-MB-231 kanser hücre hattında gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri	61
Tablo 4.15: Malign meme dokusu kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri	62
Tablo 4.16: MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile malign stromal hücrelerin ortak kültürleri sonrası gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri.....	62

Şekil Dizini

Şekil 2.1: Normal meme kanal ve lobül yapısının şematik görünümü.	6
Şekil 2.2: Tümör gelişimi süresince mikroçevresel değişimler.	8
Şekil 2.3: Tümör mikroçevresi ve onun tümör büyümesindeki rolü	9
Şekil 2.4: miRNA'ların oluşumu.	16
Şekil 3.1: Stromal hücrelerin izolasyon basamakları.	24
Şekil 3.2: Ara bölüm ve indirekt ortak-kültür ortamının şematize hali ...	26
Şekil 3.3: MDA-MB-231 meme kanseri hattı hücrelerinin 6 kuyucuklu kültür kaplarına; eş zamanlı olarak stromal hücrelerin de arabölüm üzerine ekildiğini gösteren şekil izlenmektedir.....	27
Şekil 3.4: 24 saatin sonunda üzerine stromal hücrelerin ekildiği ara bölümlerin kanser hücreleri ile aynı ortama alındığını gösteren şekil.	28
Şekil 3.5: miRNA PCR panelleri için çalışma akışı	31
Şekil 4.1: iSMD-MKH'lerin P3, 2.günde faz-kontrast mikroskopik görüntüleri izlenmektedir	33
Şekil 4.2: iMMD-MKH'lerin (A, B) pasaj 0 - 6.gün; (C,D) pasaj 3 - 2.gün; faz-kontrast mikroskopik görüntüleri izlenmektedir.	34
Şekil 4.3: MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının faz-kontrast mikroskopik görüntüleri izlenmektedir.....	34
Şekil 4.4: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi.	35
Şekil 4.5: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi.	36
Şekil 4.6: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin kemik yönde farklılaşması.....	37
Şekil 4.7: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin kemik yönde farklılaşması.	38
Şekil 4.8: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin adipojenik farklılaştırmasının faz kontrast mikroskopi ve Oil Red O boyaması sonrasında immünofluoresan mikroskopisi ile görüntülenmesi. 39	
Şekil 4.9: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin adipojenik farklılaştırmasının faz kontrast mikroskopi ve Oil Red O boyaması sonrasında immünfloresan mikroskopisi ile görüntülenmesi....	39

Şekil 4.10: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaşma besi yerinde 72 saat inkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.....	40
Şekil 4.11: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaşma besi yerinde 72 saat inkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.....	41
Şekil 4.12: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaştırma koşulları altında inkübasyonundan sonra BDNF, GFAP, MAP2ab ve β 3-TUBULIN antikorları ile immün boyamasının fluoresan mikroskopi ile görüntülenmesi.	42
Şekil 4.13: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaştırma koşulları altında inkübasyonundan sonra nestin, c-Fos, BDNF, GFAP, MAP2ab ve β 3-TUBULIN antikorları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi.	42
Şekil 4.14: MDA-MB-231 kanser hücre hattında gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri sonuçları ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.	63
Şekil 4.15: Malign meme dokusu kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.....	64
Şekil 4.16: MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile malign stromal hücrelerin ortak kültürleri sonrası gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.	65

Grafik Dizini

Grafik 4.1: WST-1 testi ile, 4 günlük ortak kültür sonrası deney gruplarının çoğalım kapasitelerinin değişim oranları.....	44
Grafik 4.2: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-8 seviyelerinin gösterilmesi	45
Grafik 4.3: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-6 seviyelerinin gösterilmesi	46
Grafik 4.4: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-1 β seviyelerinin gösterilmesi.	47
Grafik 4.5: HMGA2 geni ve let-7a ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları	49
Grafik 4.6: AIB1 geni ve miR-17-5p ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları	50
Grafik 4.7: PDCD4 ve miR-21 ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	52
Grafik 4.8: miR-373 ve miR-520c ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları	53
Grafik 4.9: miR-200b, miR-200c ve miR-200a ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları	54
Grafik 4.10: RhoC geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	55
Grafik 4.11: HoxD10 ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	55
Grafik 4.12: miR-10b ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	56
Grafik 4.13: miR-27b ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	57
Grafik 4.14: BRCA1 geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	58
Grafik 4.15: CD44 geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	58
Grafik 4.16: KRAS geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	59
Grafik 4.17: RYBP geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları.....	59

Grafik 4.18: PPAR α geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları..... 60

Simge ve Kısaltmalar Dizini

AIB1	Amplified in breast cancer, Nuclear receptor coactivator 3 (NCOA3)
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (Beyin türevli nörotropik faktör)
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır serum albumini)
Ca	Kalsiyum
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming unit (Koloni oluşturan birim)
CFU-F	Colony forming unit-fibroblast (Koloni oluşturan birim-fibroblast)
C _p	Crossing point
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose (Dulbecco modifiye Eagle medium- Düşük glikoz)
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Deoksiribonükleotid trifosfat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGF	Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı)
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Floresan izotiosiyanat)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz)

GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution (Hank'ın tampon tuz solüsyonu)
HGF	Hepatocyte growth factor (Hepatosit büyüme faktörü)
HLA	Human leukocyte antigen (İnsan lökosit antijeni)
HMGA2	High Mobility Group AT-hook 2 (Yüksek hareketli grup AT-2)
HOX	Homeobox
HoxD10	Homeobox D10
HPRT1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase-1 (Hipoksantin fosforibosiltransferaz -1)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine (3-İzobutil-1-metilksantin)
Ig	Immunglobulin
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
iSMD-MKH	İnsan Sağlıklı Meme Dokusu-Mezenkimal Kök Hücreleri
iMMD-MKH	İnsan Malign Meme Dokusu-Mezenkimal Kök Hücreleri
KRAS	Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Map2ab	Microtubule Associated Protein 2ab
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor (Makrofaj koloni uyarıcı faktör)
miRNA	mikroRNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP-14	Matriks metalloproteinaz-14
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat tampon solüsyonu)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PDCD4	Programmed Cell Death 4 (neoplastic transformation inhibitör) (Programlanmış hücre ölümü 4, neoplastik transformasyon inhibitörü)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Platelet türevli büyüme faktörü)
PE	Phycoerythrin
pH	Power of hydrogen

PPAR α	Peroxisome proliferators-activated receptor α
PPAR γ	Peroxisome proliferators-activated receptor γ
RhoC	Ras homolog gene family, member C (Ras homoloji gen ailesi üyesi C)
RNA	Ribonükleik asit
RT PCR	Real-Time Polimerase Chain Reaction (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
RT	Reverse Transcriptase (Ters transkriptaz)
RYBP	RING1 and YY1 binding protein (RING1 ve YY1 bağlayıcı protein)
SD	Standart Deviation (Standart sapma)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal bilimler için istatistik paketi)
TGF- β	Transforming growth factor beta (Dönüştürücü büyüme faktörü beta)
TNF α	Tumor necrosis factor alpha (Tümör nekroz faktör alfa)
TR	Texas Red
TUBB3	Tubulin beta 3
uPAR	Ürokinaz-tip plazminojen aktivatör reseptörü
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotelial büyüme faktörü)

1-GİRİŞ VE AMAÇ

RNA interferans (RNAi) mekanizması aracılığıyla gen ve protein ekspresyonunu düzenleyen mikroRNA'lar (miRNA) protein kodlamayan, 18-24 nükleotid uzunluğunda tek iplikli endojen RNA'lardır. İlk kez 1993 yılında keşfedilmiş olmalarına rağmen, miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından DNA'dan sentezlenirler. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmek yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Pre-miRNA'lar sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz ile etkileşerek olgun miRNA'lara dönüşürler. Dicer aynı zamanda RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Bu kompleks miRNA ifadesi ve gen susturmasından sorumludur. Sonuç olarak, olgun miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katkıda bulunurlar (Alberts et al., 2013; Arnold et al., 2011; Asirvatham, Magner, & Tomasi, 2009; Gaur et al., 2007; Hagan & Croce, 2007; Hatfield & Ruohola-Baker, 2008; Heneghan, Miller, Lowery, Sweeney, & Kerin, 2009; Ji, Karnak, Hao, Wang, & Xu, 2010; Murchison & Hannon, 2004; Pucci & Mazzearelli, 2011; Saydam, Değirmenci, & Güneş, 2011; Winter & Diederichs, 2011).

miRNA'lar hücrel çoğalma, farklılaşma ve apoptozu da içeren çeşitli biyolojik fonksiyonlarla ilişkilidirler. Bu nedenle, kanseri de içine alan çeşitli hastalıklarda önemli rol oynarlar. miRNA genlerinin yaklaşık olarak yarısından fazlasının kanser ile ilişkilendirilen ya da daha hassas (kırılgan) gen bölgelerinde yerleşim gösterdiği gözlenmiş ve bu yerleşim özellikleri ile neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğu düşünülmüştür (P.-S. Chen, Su, & Hung, 2012; Çelik Aşçı, Koşar Aslan, & Özçelik, 2013; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Sassen, Miska, & Caldas, 2008; Saydam et al., 2011; Tuğ, Erol, & Yüce, 2008; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

Onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak işlev görebilen bazı miRNA'ların çoğunun karsinogenezde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında gerçekleştirilen çalışmayla bu konudaki ilk kanıtlar ortaya konulmuştur. Sonraki yıllarda ise, meme kanserini de içeren çeşitli kanser türlerinde değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri belirlenmiş ayrıca kanser hücrelerindeki seviyelerinin normal hücrelerle karşılaştırılması kanserin tanı ve tedavisinde önem kazanmıştır (P.-S. Chen et al., 2012; Farazi, Hoell, Morozov, & Tuschl, 2013; Gaur et al., 2007; Heneghan et al., 2009; Mattiske, Suetani, Neilsen, & Callen, 2012; Negrini & Calin, 2008; Pucci & Mazzearelli, 2011; Saydam et al., 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, karsinogenez sürecinde miRNA'ların düzenleyici rollerinin yalnızca kanser hücreleri ile sınırlı olmayıp aynı zamanda tümör stroması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Soon & Kiaris, 2013). Solid tümör kitlesi, tümör mikroçevresini içine alan kompleks bir karışımdan oluşur. Tümör mikroçevresi fibroblastlar, makrofajlar, endotelial hücreler, lökositler ve ekstrasellüler matriks ile çözünebilir faktörlerden oluşmaktadır (Cuiffo & Karnoub, 2012; Esquivel-Chirino et al., 2013; Nery et al., 2013; Sullivan, 2011). Ayrıca inflamatuvar hücreler, tümörle ilişkili fibroblastlar (TAF) ve tümörle ilişkili stromal hücreleri içeren normal hücreler de inflamatuvar tümör mikroçevresinde bulunmaktadır (Mbeunkui & Johann Jr, 2009; Sun, Wang, & Zhao, 2014; X. Yang et al., 2013). Yapılan çalışmalar tümör hücreleriyle birlikte tümör mikroçevresinde bulunan bu hücrelerin de tümörün davranışlarını etkilediğini göstermiştir (Asadi, Lazennec, & Jorgensen, 2011; Sun et al., 2014; X. Yang et al., 2013). Bununla birlikte, tümör mikroçevresinden salgılanan inflamatuvar sinyal moleküllerinin tümör büyümesini ve sürekliliğini desteklediği düşünülmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmalarda, tümör mikroçevresindeki stromal hücrelerden kaynaklanan bazı proinflamatuvar sitokinlerin birtakım sinyal yolları üzerinden etki göstererek tümör hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir (Cuiffo & Karnoub, 2012; Mbeunkui & Johann Jr, 2009; Polyak & Kalluri, 2010; Sun et al., 2014).

Tümör mikroçevresinde bulunduğu belirtilen Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), kuvvetli olarak kendi kendini yenileme kapasitesine sahip olan ayrıca kaynaklandığı dokunun hücrelerinden başka hücelere farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanırlar. Bu hücreler sıklıkla stromal hücreler olarak da isimlendirilirler. Hasar ve inflamasyonlu alanlarda rejeneratif özellikte olmalarının yanında, gerçekleştirilen bazı çalışmalarda tümör mikroçevresinde bulunan stromal hücrelerin tümörle ilişkili hücelere benzer özellik kazandıkları bildirilmiştir (D.-R. Chen, Lu, Lin, & Yeh, 2014; Cuiffo & Karnoub, 2012; Lim et al., 2011; Sun et al., 2014).

Kanserin moleküler temelini daha iyi anlaşılması ile yeni belirteçlerin keşfedilmesini sağlamak, prognozunu belirlemek ve sonuç olarak yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek amacıyla miRNA'ların fonksiyonlarının ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, gerçekleştirilen çalışmada kanser hücreleri ile sağlıklı ve malign meme dokusundan elde edilen stromal hücrelerin ortak kültürlerinde birbirleri üzerine nasıl etkiler gösterdiğini ve bu olası etkilerde miRNA'ların rolünü araştırmayı amaçladık.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- Kanser ve Oluşum Mekanizmaları

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilen kanserin en eski tanımına Mısır papirüslerinde rastlanılmıştır. Hipokrat (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni oluşumları için yunanca yengeç anlamına gelen 'karkinos' ya da "karkinoma", terimlerini kullanmış bu terimler İngilizceye çevrilirken de 'cancer' veya 'carcinoma' olarak geçmiş ve günümüzdeki terminolojiyi oluşturmuştur (Atıcı, 2007)

Kanser, genel bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilen, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine değişkenlik gösteren karmaşık bir hastalıktır. Kanseler iki kalıtsal özellik ile tanımlanırlar. Bu özelliklerden biri kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki kontrol mekanizmalarına karşı koyarak çoğalmaları, diğeri ise başka hücreler için ayrılmış alanlara yayılıp ve yerleşebilmeleridir. Hücre çoğalmasındaki denetim kayboluyorsa bir tümör ya da neoplazmaya, yani anormal hücreler kitlesinin oluşumuna neden olur. Neoplastik hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durdukları sürece bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. İyi huylu tümörler genellikle etrafındaki normal dokuyu işgal etmez, eğer ederse de bu işgal sınırlıdır. Ancak bir tümör kötü huylu ise, yani hücreleri etrafındaki dokulara doğru yayılım özelliği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir. Bu yayılma veya istila genellikle bütünlüğü bozma, kan dolaşımına ya da lenf damarlarına girme ve vücudun diğeri bölgelerinde, metastaz olarak adlandırılan ikincil tümörler oluşturma yeteneğini ifade etmektedir (Alberts et al., 2008; Cooper & Hausman, 2000; Esquivel-Chirino et al., 2013; Hanahan & Weinberg, 2011; Pazarbaşı & Kasap, 2003).

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda, çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. Bu aşamaların ilki olan tümör başlangıcı bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişikliğin sonucudur. Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. Tümör ilerlemesi bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesi ile devam eder (Alberts et al., 2008; Cooper & Hausman, 2000).

Kontrolsüz hücre çoğalmasının yanında, kanser hücrelerinin başka karakteristik özellikleri de vardır. Bu özellikler arasında büyüme sinyallerinde kendine olan yeterlilik (onkogenler), büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, sınırsız çoğalabilme, anjiyogenezi uyarabilme ile invazyon ve metastaz yapabilme sayılabilir (Cooper & Hausman, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011; Pazarbaşı & Kasap, 2003).

Kanser oluşumu genetik değişiklikler üzerinden gelişen çok basamaklı bir süreçtir. Malign neoplazmda hızlı büyüme, invazyon ve metastaz yapma yeteneği gibi özellikler vardır. Bu karakteristik işlemler aşamalı bir şekilde edinilir ve tümör ilerleyişi olarak tanımlanır. Tümör oluşumunun moleküler temelinde genetik değişiklikler ya da hasarlar söz konusudur ve bu hasarların hedefi olarak dört gen üzerinde durulabilir.

- a)** Hücrelerde çoğalmayı hızlandıran genlerin (protoonkogen) aktivasyonu (onkogen) olabilir.
- b)** Büyümeyi baskılayan (tümör supresor) genlerde inaktivasyon görülebilir.
- c)** DNA hasarlarının onarımını düzenleyen genlerde bozukluklar söz konusudur.
- d)** Programlı hücre ölümünü düzenleyen genlerde hasarlar söz konudur (Cooper & Hausman, 2000; Hannahan & Weinberg, 2011).

Protoonkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlerinin sinyal ileti mekanizmalarında işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumlu olan genlerdir. Büyümenin düzenlenmesini kontrol eden bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir ve onkogen haline dönüşümleri söz konusu olur. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurlar (Alberts et al., 2008; Aliustaoğlu, 2009; Cooper & Hausman, 2000; Hannahan & Weinberg, 2011; Yokuş & Çakır, 2012).

Tümör baskılayıcı genler ise hücre çoğalmasının kontrolünde onkogenlerin tam tersi yönünde hareket ederek normal şartlarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Çoğu tümörde bu genlerin hasar görmesi ya da aktivitelerinin bozulmasıyla tümör hücreleri anormal çoğalabilirler (Alberts et al., 2008; Aliustaoğlu, 2009; Cooper & Hausman, 2000; Hannahan & Weinberg, 2011; Yokuş & Çakır, 2012).

Kansere yol açan genlerdeki mutasyonların DNA tamir mekanizmalarındaki düzensizlik ya da yetersizlik neticesinde oluştuğu düşünülmektedir. DNA tamir sisteminde ki bozukluk ile meydana gelen genetik dengesizlik, kanserin karakteristik özelliklerini kontrol eden genlerde mutasyonların oluşumuna zemin hazırlar. Genlerde oluşan hasarlar ise, kanser oluşumu için başlıca hedef noktaları olup, sonuçta neoplastik hücrelerin geliştiği düşünülmektedir (Cooper & Hausman, 2000; Pazarbaşı & Kasap, 2003; Solakoğlu, 2009)

Hücre çoğalmasının dengelenmesi ve hücre sayısının sabit tutulmasıyla ilişkili olan programlı hücre ölümü aynı zamanda hasarlı ve tehlike potansiyeli olan hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla bir savunma mekanizması sağlar. Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan özellik kazanmaları kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da

proapoptotik proteinlerin azalmasıyla apoptoza dirençli bir özellik kazanırlar. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi tümör gelişimini hızlandırır (Alberts et al., 2008; Cooper & Hausman, 2000; Güneş, 2013; Solakoğlu, 2009).

2.2- Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır. Meme kanserinin 30 yaşından önce görülmesi nadir olup, yaşla birlikte insidansı artmaktadır (Akdeniz, 2010; Pekmez, 2010). Meme kanserinin sık görülmesi, günümüz koşullarında erken evrede tanınma olanağı olması, hastalığın önemini daha da artırmaktadır (Pekmez, 2010).

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan heterojen özellikler göstermektedir. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastanın tümörünün özelliklerinin belirlenmesi ve buna en uygun tedavi yönteminin uygulanması büyük önem taşımaktadır (Çayırıcı, 2007).

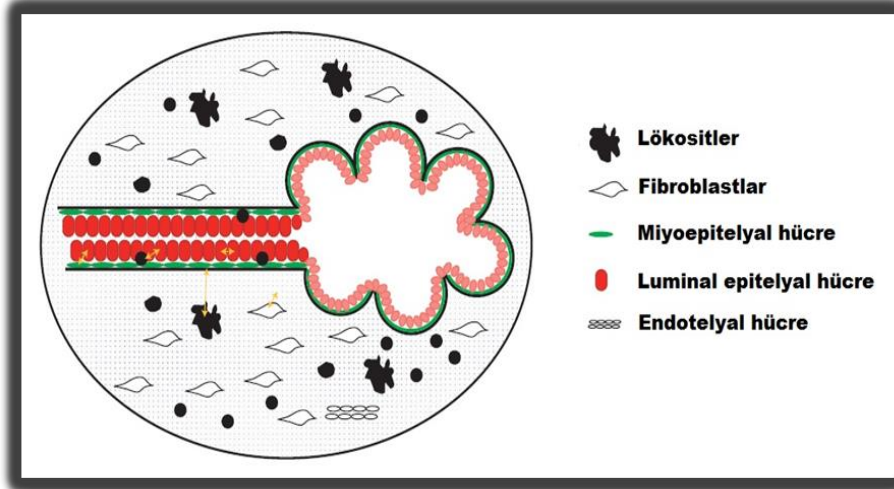
Meme kanserini sınıflandırmadan önce normal meme dokusu hakkında kısa bir bilgi vermek gerekirse;

Histolojisi

Meme dokusu 6-10 ana kanal sisteminin dallanması ve bunların her birinin lobüllere ayrılmasından oluşan tubuloalveoler bez yapısındadır. Arada fibröz bağ dokusu, yağ dokusu, kan ve lenf damarları, periferik sinirler ile üzerinde deri ve meme başı bulunur. Meme 10-20 lob içerir ve her bir lob, ana duktus ile meme ucuna açılır (Çayırıcı, 2007).

Meme bezi, organın uygun gelişimi ve fonksiyon göstermesi için gerekli kompleks iletişim ağları oluşturan birçok hücre tipinin kombinasyonundan oluşmaktadır. Dallanan süt kanalları bazal membranı oluşturan dış mioepitel hücre tabakasından ve laktasyon (süt salgılama) sürecinde süt üreten iç luminal epitel hücre tabakasından oluşmaktadır. Kanallar ekstraselüler matriks ve çeşitli stromal hücre tiplerinden (endotelyal hücreler, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve lökositler gibi) oluşan mikroçevre ile kuşatılmıştır (**Şekil 2.1**). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin çoğu, hücre-hücre ve hücre-mikroçevre etkileşimlerinin meme epitelyal hücrelerinin çoğalması, hayatta kalması, farklılaşması ve invazyon kapasitelerini değiştirdiğini göstermektedir. Ancak bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Yapılacak hücre kültürü ve hayvan modelleri çalışmalarıyla normal ve neoplastik insan meme dokularındaki her bir hücre tipinin kapsamlı karakterizasyon analizleri ile bu hücrelerin meme

kanserinde ve meme bezinin normal fonksiyonlarındaki rollerinin anlaşılması muhtemeldir (Polyak & Kalluri, 2010).



Şekil 2.1: Normal meme kanal ve lobül yapısının şematik görünümü. Siyah çizgi bazal membranı göstermektedir. Kanallarda miyoepitelyal hücreler, luminal epitelyal hücrelerin etrafında neredeyse tam bir tabaka halinde bulunurlar. Sarı oklar potansiyel hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini göstermektedir (Polyak & Kalluri, 2010).

2.2.1- Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması

Meme tümörlerinin histolojik sınıflaması 1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Çayırıcı, 2007; Organization, 1982; Pekmez, 2010; Topuz, 2007).

1. Epitelyal tümörler

A. Benign

- i.** İntraduktal papillom
- ii.** Meme başı adenomu
- iii.** Adenom
 - 1.** Tubuler
 - 2.** Laktasyon

B. Malign

- i.** Noninvaziv
 - 1.** İntraduktal (in situ duktal) karsinom
 - 2.** İn situ lobuler karsinom
- ii.** İnvaziv
 - 1.** İnvaziv duktal karsinom
 - 2.** İntraduktal komponenti baskın invaziv duktal karsinom
 - 3.** İnvaziv lobuler karsinom
 - 4.** Müsinöz karsinom
 - 5.** Medüller karsinom
 - 6.** Papiller karsinom
 - 7.** Tübüler karsinom

8. Adenoid kistik karsinom
 9. Sekretuar (Jüvenil) karsinom
 10. Apokrin karsinom
 11. Metastatik karsinom -Skuamöz tip -İğsi hücreli tip
-Kartilaginöz ve osseöz tip
- iii. Meme başının Paget karsinomu
2. Mikst konnektif doku ve epitelyal tümörler
 - A. Fibroadenom
 - B. Filloides tümör
 - C. Karsinosarkom
 3. Çeşitli tümörler
 - A. Yumuşak doku tümörleri
 - B. Deri tümörleri
 - C. Hematopoetik ve lenfoid doku tümörleri
 4. Meme displazisi/Fibrokistik hastalık
 5. Tümöre benzer lezyonlar
 - A. Duktal ektazi
 - B. İnflamatuar psödötümör
 - C. Hamartom ve jinekomasti

Kanser hücreleri kanal veya lobüle sınırlı olup bazal membranı aşmıyorlarsa **in situ karsinom**, bazal membranı aşip stromaya invazyon yapıyorlarsa **invaziv (infiltratif) karsinom** olarak değerlendirilirler (Akdeniz, 2010; Topuz, 2007).

2.2.1.1- İn situ karsinomlar (Noninvaziv)

İn situ duktal karsinom (DCIS): DCIS, küçük kanallardaki epitelin proliferasyonu ile karakterizedir (**Şekil 2.2**). Genellikle fizik muayenede ele gelen kitle saptanmaz ve mammografide mikrokalsifikasyonlar şeklinde bulgu verir. DCIS'li kadınlarda invaziv meme kanseri gelişme olasılığının 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Akdeniz, 2010; Topuz, 2007).

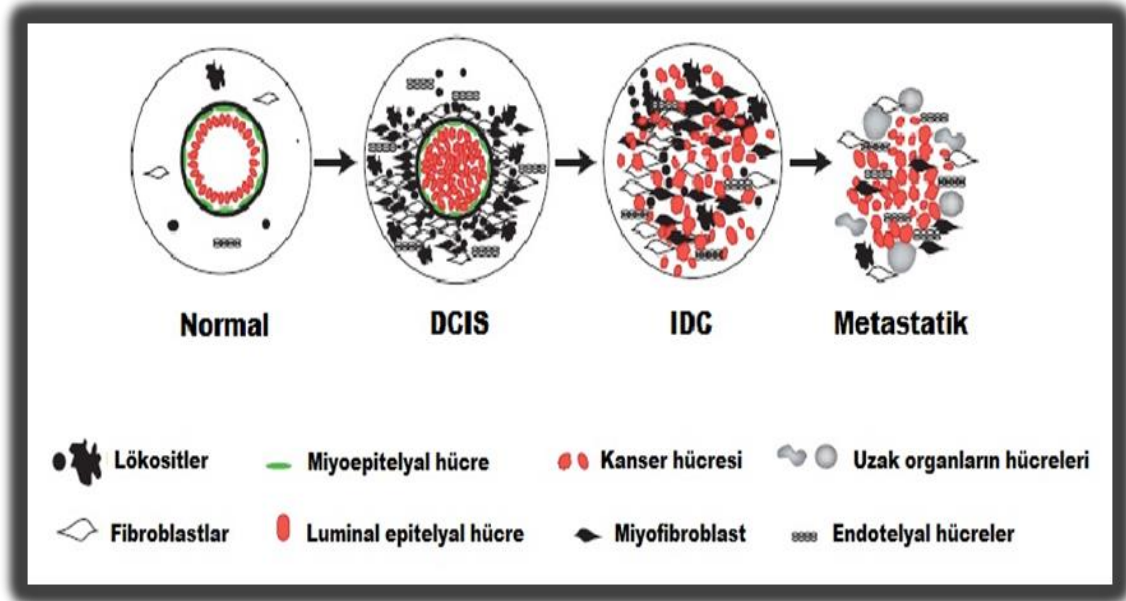
İn situ lobuler karsinom (LCIS): Memenin kanal uçlarındaki lobüler ünitelerinden kaynaklanır ve mammografide patolojik bulguya nadiren rastlanır. Tanı genellikle başka nedenlerle yapılan biyopsi sonucu tesadüfen konur. Komşu stroma içerisinde görülen mikrokalsifikasyonlar tipik bir in situ lobüler karsinom bulgusudur. %25-35 oranında invaziv meme kanserine değişim gösterdiği bildirilmiştir (Akdeniz, 2010; Topuz, 2007).

2.2.1.2- İnvaziv karsinomlar

İnvaziv duktal karsinom: Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %75'lik kısmını oluşturur ve kalsifikasyon sıktır (**Şekil 2.2**) (Akdeniz, 2010; Pekmez, 2010).

İnvaziv lobuler karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık %15'ini oluşturur. Kalsifikasyon invaziv duktal karsinoma göre daha nadirdir ve metastazlarını daha çok meningeal ve peritoneal yüzeyler gibi metastaz sıklığı düşük olan bölgelere yaparlar (Akdeniz, 2010; Pekmez, 2010).

Yapılan çalışmalarda patologlar, meme kanserlerinin lenfositik infiltrasyon, fibrozis, anjio- ve lenfanjiogenez gibi histopatolojik özelliklerinin prognostik değerini belirtmektedirler (Polyak & Kalluri, 2010).

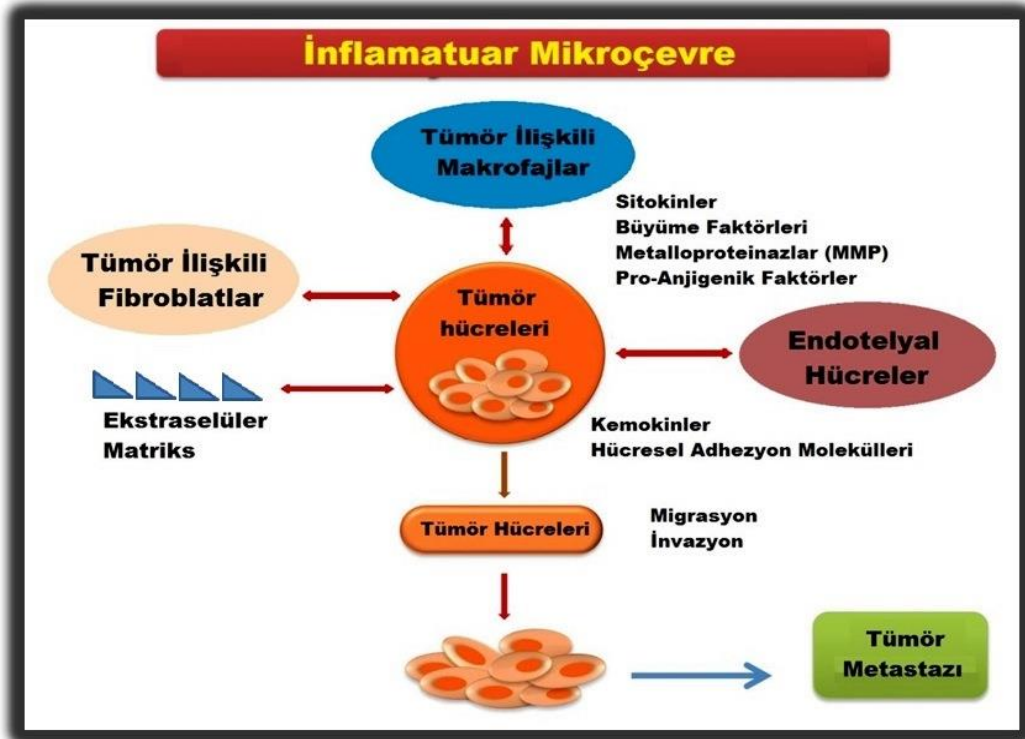


Şekil 2.2: Tümör gelişimi süresince mikroçevresel değişimler. Normal meme, Duktal Karsinoma In situ (DCIS), İnvaziv Duktal Karsinoma (IDC) ve Metastatik meme karsinoma'nın şematik görünümü. Normal meme kanalları, bazal membrandan ve miyoepitelyal hücrelerin oluşturduğu bir dış tabakanın üzerinde bulunan luminal epitelyal hücrelerin oluşturduğu bir iç tabakadan oluşmaktadır. Stromayı oluşturan hücreler arasında lökositler, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve endotelial hücreler bulunmaktadır. DCIS'da, miyoepitelyal hücreler epigenetik ve fenotipik olarak değişime uğrar ve sayıları tümör epitelyal ile çeşitli stromal hücrelerden gelen sinyaller nedeniyle potansiyel olarak azalır. Tümör ilerlerken, stromal fibroblastlar, miyofibroblastlar, lenfositler ve endotelial hücrelerin sayıları da artış göstermektedir (Polyak & Kalluri, 2010).

2.3-Tümör Mikroçevresi ve Mezenkimal Stromal (Kök) Hücreler

Tümörün davranışları tamamen tümör hücreleri tarafından belirlenmez. Yapılan çalışmalar tümör mikroçevresinde bulunan tümör hücreleri haricindeki çeşitli hücrelerin tümörün davranışlarını etkilediğini göstermiş ve böylece bu hücrelerin etkilerine dayanan yeni kanser tedavi yaklaşımları ve terapötik ajanların geliştirilebilmesi için kanser araştırmalarının ilgi odağı haline gelmiştir (Cuiffo & Karnoub, 2012; Sun et al., 2014).

Tümör mikroçevresi fibroblastlar, miyofibroblastlar, miyoepitelyal hücreler, makrofajlar, endotelial hücreler, lökositler ve ekstrasellüler matriks ile tümör hücrelerinden kaynaklanan çözünebilir faktörlerden oluşmaktadır (**Şekil 2.3**). Tümörü çevreleyen bu inflamatuvar mikroçevrenin, invazyon ve metastatik hücrelerin göçü için gerekli olan bazal membranın kırılmasını desteklediği bilinmektedir. Tümör hücrelerinin aynı zamanda, immün sistemden kaçışı kolaylaştıran ve metastazın oluşumu ile gelişimine yardımcı olan sitokin ve kemokinleri üretim kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir (Cuiffo & Karnoub, 2012; Esquivel-Chirino et al., 2013; Sullivan, 2011).



Şekil 2.3: Tümör mikroçevresi ve tümör büyümesindeki rolü (Esquivel-Chirino et al., 2013).

Tümörler artık iyileşmesi zor kronik yaralanmalar olarak kabul edilmekte ve inflamasyonun tümör oluşumunda, ilerlemesinde ve metastazında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İnflamatuvar tümör mikroçevresinde, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), interlökin-6 (IL-6), IL-8, IL-1 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi inflamatuvar sitokinleri; hepatosit büyüme faktörü (HGF), platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerini; çeşitli kemokin ve matriks metalloproteinazlar gibi diğer bazı faktörleri içeren temel sitokinler bulunmaktadır. Ayrıca lenfosit ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücreler, vasküler endotelial hücreler, tümörle ilişkili fibroblastlar (TAF) ve MKH'ler gibi tümörle ilişkili stromal hücreleri içeren tümör olmayan hücreler de inflamatuvar tümör mikroçevresinde bulunmaktadır (Cuiffo & Karnoub, 2012; Sun et al., 2014).

2.3.1-Kök hücreler

Eski çağlardan beri insanoğlunun en büyük uğraşlarından biri hastalıklara çare bulmaya çalışmak olmuştur. Kök hücrelerin araştırma alanında kullanımlarının yaygınlaşması ile hastalıkların iyileşme süreci ve patogenezlerinin açıklanmasındaki rolleri giderek önem kazanmaktadır. Kanser gibi, genlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler neticesinde ortaya çıkan hastalıklarda hastalığın kökenine yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi belki de bu hastalıkların çözümü olacaktır. Bu sebeple de hücresel tedavi bilim adamlarının ilgi odağı haline gelmiştir (Karaöz & Ovalı, 2004; Özen & Sancak, 2014).

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip hücreler olarak tanımlanabilir. Bu hücrelerin, uzun süre bölünebilme, kendini yenileyebilme, farklılaşmamış olma ve aynı zamanda özelleşmiş hücrelere dönüşebilme gibi özellikleri vardır (Karaöz & Ovalı, 2004; Özen & Sancak, 2014).

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılmak istenildiğinde **totipotent**, **pluripotent** ve **multipotent** olmak üzere üç grup altında toplanabilirler. Sperm ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek güce sahip ilk embriyonik hücredir. Tek başına organizmayı meydana getirebilecek potansiyele sahip olan bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında '**totipotent hücre**' denir. Döllenmeyi takip eden 4-5 gün içerisinde bu hücreler tek başlarına organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Fertilizasyondan sonra 5. günde oluşan blastosist evresinde, embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler '**pluripotent kök hücreler**' olarak tanımlanırlar. Bu hücreler yaklaşık 200 farklı hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler ancak tek başlarına bir organizmayı oluşturma kapasitesinden yoksundurlar. Bu aşamalardan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olarak erişkin kök hücreleri oluşturabilirler. Embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait olan bu hücreler '**multipotent kök hücreler**' olarak adlandırılırlar. Bu hücreler özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Erişkin kök hücreleri ise buldukları dokunun hücre tipini üretirler (İnan & Özbilgin, 2009; Karaöz & Ovalı, 2004; Özen & Sancak, 2014; Sağsöz, 2008; Şahin, 2013).

Kök hücreler, elde edildikleri kaynaklara göre **embriyonik kök hücreler** ve **embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler** olmak üzere iki grup altında incelenebilirler. Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler **embriyonik kök hücreler** olarak adlandırılırlar. Kendini yenileme ve çoğalma özelliğine sahip olan bu hücreler pek çok hücre tipine dönüşebilme, embriyonun tüm hücre tabakalarını ve ondan köken alacak olan organ sistemlerini oluşturma yeteneğindedirler. Bu olumlu özelliklerinin yanında klinikte kullanımları aşamasında, hastaya

uygulandıklarında immun reaksiyona ya da teratomalara sebep olabilmeleri gibi bir takım sorunlarla karşılaşılabilir. Ayrıca embriyonik kök hücre araştırmaları etik nedenlerden dolayı bazı kısıtlamalarla karşı karşıyadır (İnan & Özbilgin, 2009; Özen & Sancak, 2014; Turaç, 2013).

Embriyonik olmayan kök hücreleri de elde edildikleri kaynaklara göre; **erişkin kök hücreleri, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler** şeklinde farklı gruplarda sınıflandırabiliriz.

Bu gruplar arasındaki **erişkin kök hücrelerini**, differensiye olmuş bir dokuda farklılaşmamış halde bulunan ve erişkin dokulardaki özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyeli olan hücreler şeklinde tanımlayabiliriz. Tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlı olan erişkin kök hücreleri laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebildikleri bilinmektedir. Birincil görevleri buldukları dokuda hücre ölümü veya doku hasarı meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etmektir. En iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler olmakla birlikte, erişkin kök hücrelerin çeşitli doku ve organlarda varlığı gösterilmiştir (İnan & Özbilgin, 2009; Karaöz & Ovalı, 2004; Matur & Solmaz, 2011; Özen & Sancak, 2014; Turaç, 2013).

2.3.1.1-Mezenkimal kök hücreler (Mezenkimal stromal hücreler)

Erişkin kök hücre tipi olan, mezenkimal stromal hücreler olarak da adlandırılan mezenkimal kök hücreler bağ dokunun ana hücreleridir. Bu hücreler kendi kendini yenileyebilen ve yalnızca mezodermden köken alan kondrosit, osteosit ve adipositlere değil aynı zamanda ektodermik ve endodermik hücrelere de farklılaşma kapasitesine sahip hücreler olarak tanımlanırlar. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmıştır. Fridenstein, fetal buzağı serumu kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu göstermiş ve yapılan sonraki çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan hücreler olduğu, üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneğinde oldukları rapor edilmiştir. Dokularda çok az sayıda bulunan mezenkimal kök hücrelerin yapışma özelliklerine bağlı olarak buldukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar söz konusudur. Dolayısıyla, tedavi hatta araştırma amaçlı kullanımlarında dahi *in-vitro* kültür ortamında çoğaltılmaları gerekir (Asadi et al., 2011; İnan & Özbilgin, 2009; Karaöz & Ovalı, 2004; Matur & Solmaz, 2011; Özen & Sancak, 2014; Turaç, 2013).

MKH'ler hemen hemen tüm dokularda bulunmaktadır. Kemik iliği, adipoz doku, göbek bağı, kas gibi kaynaklardan kolayca izole edilebilen ve başarılı bir şekilde *in vitro*'da çoğaltılabilen hücrelerdir. MKH'leri tanımlamada özel belirteçlerin olmayışı nedeniyle, tanımlanmaları plastik

kültür kaplarına yapışma özelliklerine ve CD29, CD31, CD34, CD45, CD90 ve CD105'i içeren yüzey belirteçleri paneline aynı zamanda çoklu farklılaşma potansiyellerine göre yapılmaktadır. MKH'ler hasarlı dokudaki inflamasyon nedeniyle oluşan immünsüpresif özellikleriyle doku onarıcı olarak fonksiyon gösterebilirler (Asadi et al., 2011; X. Yang et al., 2013).

Kuvvetli inflamatuvar hastalıklarda, bununla birlikte kronik ve yetersiz inflamasyon durumlarında MKH-bazlı terapiden bahsedilmekte ancak bazı durumlarda MKH'lerin doku hasarını ve hastalığın kötüleşmesini önleyemediği de belirtilmektedir. İnflamasyon genellikle tümör gelişimiyle ilgilidir, doku kronik hasara uğrar. MKH'lerin özelliklerine bağlı olarak hasarlı dokularda toplanabildiği ve hücre bazlı terapilerde tümörlere doğrudan antitümör ayıraç sağlamak için kullanıldıkları da belirtilmektedir. Bununla birlikte, tümör mikroçevresinin oluşumunda ya da düzenlenmesinde MKH'lerin rolü ve potansiyel mekanizmaları hala tartışmalıdır (X. Yang et al., 2013).

Son yıllarda MKH'ler ile ilgili olarak çok sayıda yayına rastlanmaktadır. Bu durum, özellikle hücrelerin çoğalma yetenekleri, farklılaşma potansiyelleri, immün düzenleyici olma gibi bir takım özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu karakteristik özellikler ile birlikte tümör alanlarına yönelimlerinden dolayı MKH'lerin özellikle tümör içerisine terapötik ajanları vermek için genetik olarak tasarlanmış araçlar olarak kullanılabilmesi varsayılmaktadır. Bununla birlikte, MKH'lerin tümör gelişimde önemli rolü olduğu da tanımlanmıştır. Tümör alanlarına yönelim yeteneklerine ek olarak, bu hücrelerin tümör içine girebileceği ve tümörle ilişkili stromal hücrelere farklılaşacağı belirtilmektedir (Barcellos-de-Souza, Gori, Bambi, & Chiarugi, 2013).

Birçok çalışmada kemik iliği kaynaklı MKH'lerin meme, akciğer, pankreas, kolon ve over kanserleri gibi farklı solid tümör tiplerine girip (engraft) yerleşebileceği belirtilmiştir. MKH'lerin tümör alanlarına olan bu yönelimleri, dışarıda büyütülüp çeşitli tekniklerle işaretlenmiş olan hücrelerin deneysel enjeksiyonlarından sonra izlenmesi ile belirlenmiştir. Endojen kemik iliği kaynaklı MKH'lerin tümörlere olan migrasyonundaki biyolojik rolünü destekleyen raporlarda, bu hücrelerin etkili bir şekilde stromaya yerleşebileceği ve distal olarak tümör oluşturabileceği belirtilmektedir. Bu görüşler, tümör stromasının bileşeni olan kemik iliği kaynaklı hücrelerin önemli olduğunu vurgulamıştır. İnflamatuvar alanlara yönelimlerinden dolayı, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin kemotaktik yanıtları genel olarak immün hücrelerinininkine benzer olarak kabul edilmektedir. Buna benzer olarak, inflamatuvar sitokinlerin Kİ-MKH'lerin mobilizasyonu, ayrıca tümör alanlarına bu hücrelerin yerleşmesi ve oradaki hareketleriyle güçlü bir şekilde ilgili olduğu belirtilmektedir (Barcellos-de-Souza et al., 2013).

2.4-MikroRNA'lar

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki araştırmalar geniş ölçüde DNA dizisinin çözümlenmesi ile DNA dizisi tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesine odaklanmıştır. İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü, RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak % 1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem içerdiği düşünölmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşi ile ortadan kalkmış oldu (Akkaya & Dinçer, 2013; Bodur & Demirpençe, 2010; He & Hannon, 2004; Küçük hüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011).

Bu küçük RNA moleküllerinin görev aldığı RNA interference (RNAi) sistemi post-transkripsiyonel gen susturulması, mRNA molekülünün diziyeye özgü yıkıma uğraması ya da translasyona girememesiyle gerçekteşir. Sentezlenmiş olan mRNA'ya küçük ve kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. RNAi sistemi ilk olarak 1990 yılında Petunya bitkisinde keşfedilmiştir. RNAi mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda hangi genlerin aktif olduğu ve bu genlerin nasıl etkin olduklarını kontrol eden bir sistemdir.

Yaklaşık olarak 21-23 nükleotid uzunluğundaki tek zincirli küçük RNA'lar genlerin direk ürünleri olan mRNA'lara bağlanarak aktivitelerini azaltabilir (mRNA translasyonunu engelleyebilir) ya da arttırabilirler. RNAi sisteminde protein kodlamayan RNA'lar (non-coding RNA) görev almaktadır. Gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNAi mekanizmasında small interfering RNA (siRNA), piwi-interacting RNA (piRNA) ve mikro RNA (miRNA/miR) olmak üzere 3 tip RNA molekülü görev almaktadır. siRNA'lar sentetik olarak sentezlenen eksojen kaynaklı RNA molekülleridir. piRNA'lar ise embriyo gelişiminde ve spermatogenezde görev almak almaktadır (He & Hannon, 2004; Küçük hüseyin & Öztürk, 2013; B. Liu, Sun, & Song, 2013; Saydam et al., 2011; Siomi & Siomi, 2010).

mikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümu gibi süreçlerde rol oynarlar. İlk olarak bazı miRNA'ların bu süreçleri tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri belirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA'nın tek başına birden fazla hedef geni baskılayabildiği anlaşılmıştır (Çelik Aşçı et al., 2013; Saydam et al., 2011; Tuğ et al., 2008).

mikroRNA'ların büyüme, gelişme, çoğalma, hücre döngüsü gibi hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu ayrıca tümör gelişiminde onkogen veya tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdikleri da rapor

edilmiştir (Çelik Aşçı et al., 2013; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; MacFarlane & Murphy, 2010; Saydam et al., 2011; Tuğ et al., 2008).

2.4.1-MikroRNA'ların keşfi ve yapısı

MikroRNA'lar ilk olarak 1990'lı yılların başlarında, Ambros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ların gen içeriği bakımından yapılan taramalar sırasında lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir. Lin-4'ün tanımlanmasından 7 yıl sonrada let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişimini düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfetmişlerdir. Daha sonraki yıllarda birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (Federica Calore, Lovat, & Garofalo, 2013; He & Hannon, 2004; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Siomi & Siomi, 2010; Ventura & Jacks, 2009).

miRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 20-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir. miRNA'lar hedef mRNA'daki tamamlayıcı diziye göre ya hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanarak translasyonel baskılama yaparlar ya da hedef mRNA'yı keserek gen ekspresyonunu azaltarak düzenleme işlevi görürler. İnsanlarda yaklaşık 1881 prekürsör, 2588 olgun miRNA tespit edilmiş olup, genomun % 30'undan fazlasını düzenlediği tahmin edilmektedir (Federica Calore et al., 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Zhao et al., 2012).

2.4.2-MikroRNA'ların biyogenezi (oluşumu)

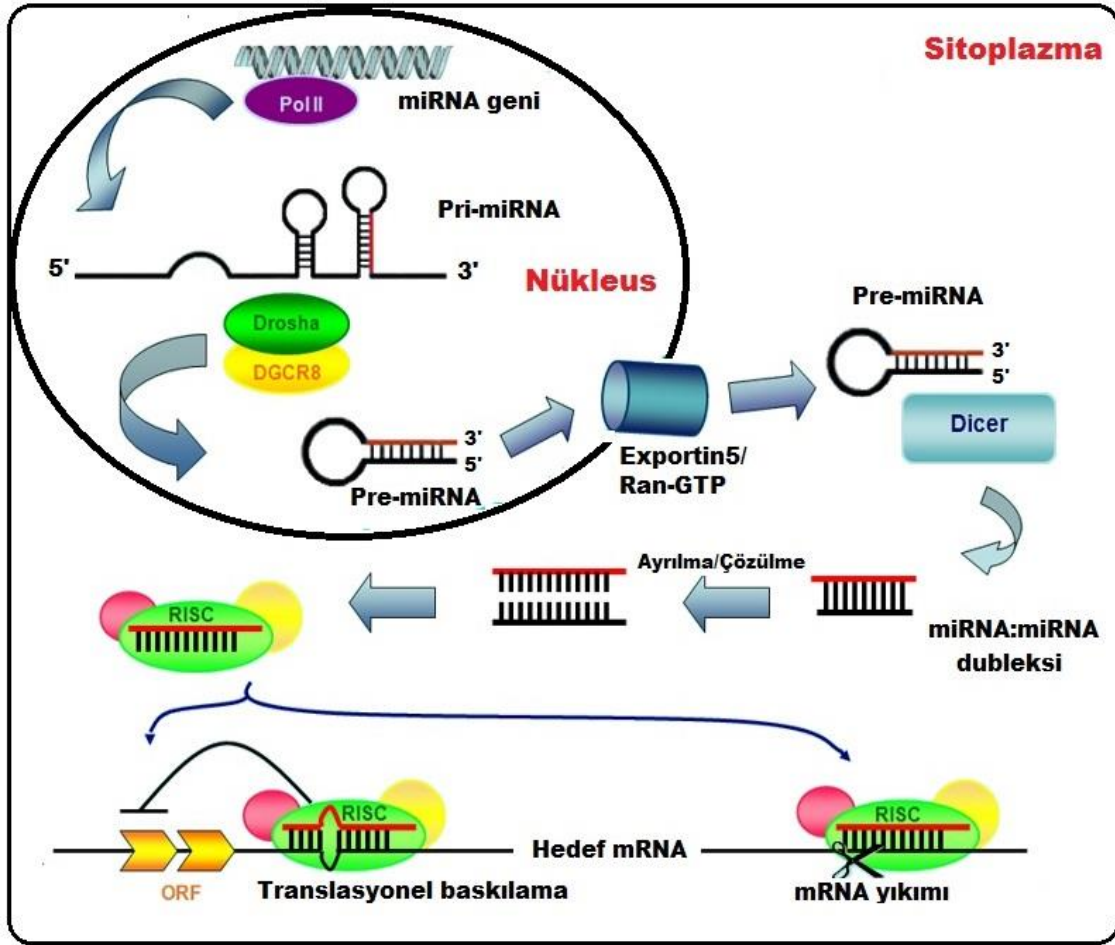
miRNA'ların biyogenezinin, büyüklüğü yüzlerce nükleotitten onlarca kilobaza kadar değişen primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan diziler halinde RNA polimeraz II tarafından transkribe edilerek başlatıldığı gösterilmiştir. pri-miRNA transkriptleri genel olarak iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelirler. İlk adımda nükleus içinde pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür, ikinci adımda ise sitoplazmada olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir (**Şekil 2.4**) (He & Hannon, 2004; Jansson & Lund, 2012; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; MacFarlane & Murphy, 2010; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tuna, 2010; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

mikroRNA'lar, pri-miRNA olarak ilgili gen bölgelerinden RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir. Sap-ilmik yapısında olan pri-miRNA çekirdekte RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha/DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)'nin oluşturduğu mikroişlemci kompleks adı verilen bir multiprotein kompleksi tarafından yaklaşık olarak 70-90 nükleotid uzunluğunda saç tokası yapısında olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Pre-miRNA molekülü bir

nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 tarafından tanınarak Ran-GTP bağımlı bir mekanizma ile sitoplazmaya taşınır (He & Hannon, 2004; Jansson & Lund, 2012; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tuna, 2010; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

Pre-miRNA'nın sitoplazmada işlenişi bir sitoplazmik ribonükleaz olan Dicer tarafından gerçekleştirilir. Dicer enzimi farklı fonksiyonel bölgelere sahiptir; bunlar, pre-miRNA'nın 3' ucuna bağlanan Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) bölgesi, helikaz bölgesi, çift dallı RNA bağlayıcı bölge (dsRBD) ve 2 adet ribonükleaz III katalitik bölgeleridir. Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, Dicer adlı endonükleaz ile 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA:miRNA çift ipliğini oluşturmak üzere kesilir. Sonrasında Dicer proteininin yardımı ile, olgun miRNA RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) olarak isimlendirilen bir multi-protein kompleksine katılır (He & Hannon, 2004; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tuna, 2010; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

RISC; Dicer, TRBP (human immunodeficiency virus (HIV)-1 trans-activating responsive element (TAR) RNA-binding protein) ve Argonaute2 (Ago2) proteinlerini içerir. Oluşan miRNA dupleksinden sadece klavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılan olgun miRNA ipliği RISC'e dahil olur. Yolcu iplik olarak adlandırılan diğer dal (antisense miRNA dalı) RISC'in substratı olarak sindirilir. Olgun miRNA'lar ise RISC kompleksine dahil olduktan sonra baz eşleşmesine dayanan kendi tamamlayıcısı olan mRNA hedefine yönlenir. Hedef mRNA ile bağlanma pozisyonu mikroRNA kompleksinin tamamlayıcılığına bağlıdır. Olgun mikroRNA'nın, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (untranslated region-UTR) bağlanması kısmi komplementerliği ifade eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. Hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanma ise tam komplementerliği ifade eder ve mRNA'nın argonaute proteinleri tarafından kesilerek yıkılması ile sonuçlanır (He & Hannon, 2004; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tuna, 2010; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).



Şekil 2.4: miRNA'ların oluşumu. miRNA'ların oluşumu nükleusta başlar, işlenmesi ve olgunlaşması sitoplazmada gerçekleşir. miRNA'lar ilk olarak, RNA polimeraz II enzimi tarafından uzun pri-miRNA'lara transkribe olurlar sonrasında Drosha ve kofaktörü Pasha tarafından kesilerek pre-miRNA haline dönüştürülürler. Daha sonra bu prekürsörler Exportin 5/Ran-GTP kompleksi tarafından sitoplazmaya taşınırlar. Pre-miRNA'lar sitoplazmada Dicer enzimi ile çift iplikli miRNA haline getirilir. Daha sonra RISC kompleksinde yer alan Argonaute proteini, daha kararlı olan ipliği seçerek RISC kompleksine dahil eder. Olgun miRNA'yı içeren RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak mRNA'nın yıkımına ya da translasyonunun baskılanmasına neden olur (Federica Calore & Fabbri, 2011).

2.4.3-miRNA'ların işlev bozukluğu ve kanser

MikroRNA'ların hücre çoğalması, farklılaşması, kök hücrenin yenilenmesi ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte düzenleyici işlevlerinin olduğu bilinmektedir (Jansson & Lund, 2012; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009). Bu nedenle bu küçük RNA'larda meydana gelen bozukluklar hastalıklarla da doğrudan ilişkilidir (Akkaya & Dinçer, 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, başta kanser olmak üzere, Alzheimer, şizofreni gibi merkezi sinir sistemi hastalıkları ve kardiovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığın patogeneğinde miRNA'larla ilgili işlev bozukluklarının olduğu gösterilmiştir (Bodur & Demirpençe, 2010; Federica Calore et al., 2013; MacFarlane & Murphy, 2010).

miRNA'ların mRNA'yı parçalayarak ya da translasyonu baskılayarak genlerin ifadelerini düzenledikleri bilinmektedir. Genomda oluşan delesyon, amplifikasyon gibi oluşumların miRNA'ların ifade düzeylerinde değişikliklere sebebiyet vermesi neticesinde işlev bozukluklarının ortaya çıkması söz konusudur. miRNA'yı kodlayan dizide delesyon meydana gelmesi miRNA ifadesinin azalmasına ve sonuçta hedef mRNA ile onun ürünü olan proteinin artmasına neden olur. Amplifikasyon oluşumunda ise tam tersi bir şekilde ilgili miRNA'nın ifadesinin artışından ve hedefi olan mRNA'nın ve ondan kodlanan proteinin azalması söz konusudur (Bodur & Demirpençe, 2010; Seydel & Aksoy, 2009).

Normalde hücre çoğalması, büyüme ve farklılaşma gibi olayları kontrol eden miRNA'larda, kanserleşme sürecinde işlev bozukluğu oluşmaktadır. miRNA genlerinin yaklaşık olarak yarısından fazlasının, kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde ya da kırılğan bölgelerde yerleşim gösterdiği gözlenmiştir. miRNA'ların bu yerleşim özelliklerinin neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğunu düşündürmüştür (Çelik Aşçı et al., 2013; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Tuğ et al., 2008; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010; Ventura & Jacks, 2009).

miRNA'lar ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 2002 yılında Calin ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. miR-15a ve miR-16-1 genlerinin bulunduğu 13q14 kromozomal bölgesi Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastaların yarısından fazlasında delesyona uğramaktadır. Calin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla, analiz edilmiş KLL'li hastaların %68'inde bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışma grubu tarafından, genomik kararsızlık (instabilite) ve miRNA arasındaki ilişki araştırılmış ve sonuçta çalışılan 186 miRNA geninin 98'i haricindekilerin (% 52.5) kanserle ilişkili genomik olarak kararsız bölgelerde lokalize olduğu bulunmuştur (Jansson & Lund, 2012; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Sassen et al., 2008; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tuna, 2010; Ventura & Jacks, 2009).

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'lara göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilirler. Kanserin gelişimini arttırdığı düşünülen miRNA'lar 'onkomir' olarak tanımlanmaktadır. Onkogen olarak işlev gösteren bu miRNA'lar hedefi olan tümör baskılayıcı genleri baskılayarak tümörün gelişmesine katkı sağlarlar. Genellikle kanserlerde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı ya da antiapoptotik olarak fonksiyon gösterdikleri rapor edilmiştir. Görevleri bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar ise 'tümör baskılayıcı miRNA'lar' olarak tanımlanmaktadır. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonundaki azalışın onkogenlerin ekspresyonunu arttırdığı ve sonuçta tümör oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Bodur & Demirpençe, 2010; Federica Calore et al., 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Ventura & Jacks, 2009; Zhao et al., 2012).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1-Gereç

Hücre kültürü çalışmaları ve diğer moleküler düzeyde yapılan yöntemler için uygun, steril ve tek kullanımlık malzemeler kullanılmış olup, hücre kültürü işlemleri laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları ve diğer deney aşamalarında kullanılan gereçler aşağıda alt başlıklar halinde verilmiştir.

3.1.1-Stromal hücrelerin izolasyonunda kullanılan solüsyonlar

- Kolajenaz Tip II (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12) (Hyclone, USA)
- Fetal Sığır Serumumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)

3.1.2-Stromal hücrelerin besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar

- % 10 oranında FBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- % 0,2 oranında Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- İnsülin
- Hidrokortizon
- Fibroblast Growth Factor (FGF;Fibroblast Büyüme Faktörü)
- DMEM/F-12 (Hyclone, USA)

3.1.3-Alt-Kültür (pasajlama), hücrelerin sayımı ve dondurulması işlemlerinde kullanılan gereçler ve solüsyonlar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)

- DMEM/F-12 (Hyclone, USA)
- FBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- % 0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel)
- Thoma lamı
- Dimetilsülfoksit (DMSO; AppliChem, Darmstadt, Germany)

3.1.4-Akım sitometrik analizlerde kullanılan antikor, solüsyon ve kimyasallar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- % 0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Stromal hücre besi yeri
- CD45 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD13 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD34 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD44 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 90 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 33 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 71 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 73 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 29 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 105 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 10 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- HLA G (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- IgG1 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- IgG1/G2a (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell wash, BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- Soğuk fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH7,4; (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- Permabilizasyon çözeltisi

3.1.5-Gerçek zamanlı PCR'da kullanılan malzemeler

- RNA İzolasyon Kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany)
- cDNA Sentez Kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany)
- miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Sistemi'nin (EXIQON, United States) 'Pick-&-Mix microRNA PCR Paneli

3.1.6-In vitro osteojenik ve adipojenik farklılaştırma çalışmalarında kullanılan solüsyon ve kimyasallar

- DMEM/F-12 (Hyclone, USA)
- FBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- 3-İzobutil-1-metilksantin (IBMX)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Absolu etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Deksametazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- İnsülin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- İndometazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- Askorbat-2-fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Alizarin kırmızısı (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Aseton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İzopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.1.7-Çalışmada kullanılan diğer plastik ve sarf malzemeler

- 15 ml konik tabanlı kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 50 ml konik tabanlı kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 6 kuyucuklu hücre kültür plakaları (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)

- 12 kuyucuklu hücre kültür plakaları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 8 kuyucuklu hücre kültür odacıkları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 25 cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France)
- 75 cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 0,20 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany)
- 0,45 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany)
- 70 µm por çaplı hücre süzgeci (Cell Strainer, BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- Pipet uçları (0,5-10, 10-100, 200-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Çok kanallı pipet ve pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Tek kullanımlık steril pipetler (5, 10,25 ve 50 ml'lik) (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- Kriyotüpler (Greiner-bio-one, Carolina, USA)
- Lamel (22x22mm)

3.1.8-Çalışmada kullanılan cihazlar

- CO₂ inkübatör (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Laminar akışlı steril kabin (Class II, Heraeus, Hanau, Germany)
- Inverted mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan; CKX41)
- Binoküler mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; CME)
- Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (Real Time PCR) cihazı (LC 480II Roche, Mannheim, Germany)
- Picodrop (Picodrop Limited, 40 High Street, Hinxton, CB10 1QY, UK)
- Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (Termal Cykler; Takara Bio inc., Shiga, Japan) cihazı
- Monokromatik sistemli mikroplaka okuyucu (VersaMax, Molecular Device, USA)

- Vorteks (Labart, Berlin, Germany; MVS1)
- Mikrosantrifuj (Sigma, Osterode, Germany; 1-14 ve Hettich, Gartenstr, Germany; Micro 120)
- Soğutmalı santrifüj (Universal 320 R, Hettich, Germany)
- Masaüstü santrifüj (Sigma, Osterode, Germany; 2-16PK)
- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Heildoph Electro GmbH&Co., Kelheim, Germany; MR Hei-Standard)
- Hassas terazi (Shimadzu, Makati, Philippines; AW120 model)
- 37°C su banyosu (Nüve, Ankara, Türkiye; ST 402)
- Floresans mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; DMI 4000)
- Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur akım sitometri cihazı (BD Biosciences, California, USA)
- BD Cell Quest TM software programı (BD Biosciences, California, USA)
- Saklama dolabı (+4°C) (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; SRR-49FD-MEDE)
- Eksi 20°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Eksi 86°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; MDF-U5386S Model)
- Eksi 150°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Sıvı azot tankı (MVE Chart Industries, Minnesota, USA)
- Buz yapma makinesi (Scotsman, Milan, Italy; AF 80)
- Bidistile su cihazı (GFL, Burgwedel, Germany; 2104)
- pH metre (WTW Inolab, Weilheim, Germany; PH720 Set)

3.2-Yöntem

Bu çalışma için; Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan KAEK 2012/35 protokol numaralı yazısı ile çalışmanın etik yönden bir sakınca taşımadığını belirten onay raporu alınmıştır.

3.2.1-Stromal hücrelerin izolasyonu

Kocaeli Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Biriminde meme kanseri nedeniyle opere edilen kadın hastalar (n=3) ile; meme küçültme ameliyatı (redüksiyon mamoplasti) sebebiyle Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Biriminde opere edilen sağlıklı kadınlar (n=3) çalışmaya alındı. Operasyon sırasında elde edilen tümör dokusundan patolojik ön incelemeyi takiben 1 cm³ lük bir parça alınarak %5 antibiyotik

içeren (Penisilin/Streptomisin) HBSS içerisinde Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'ne ulaştırıldı.

Steril ortamda ("Class II" Laminer kabin) sağlıklı ve kanser hastalarından alınan meme dokuları bir petri içine alındı ve %5 antibiyotik içeren HBSS ile yıkanarak makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalama işlemini takiben dokular daha önceden %0,2' lik olacak şekilde hazırlanmış "kollajenaz tip II enzimi" ile 45 dk 37°C'de muamele edildi. Süre sonunda enzimin etkisini durdurmak için FBS içeren besiyeri eklenip 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücre süspansiyonu yıkandı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak ve hücre peleti resüspanse edilerek 100 µm por çaplı filtreden süzülerek tekrar santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak ve daha önceden belirlenmiş olan hücrelerin iyi çoğalm gösterdiği serum, antibiyotik, insülin, hidrokortizon ve FGF içeren besiyeri (DMEM/F12) eklenmiş kültür kaplarına hücrelerin ekimi gerçekleştirildi ve 37°C, % 5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi (**Şekil 3.1**).

3.2.2-Stromal hücrelerin kültürü

İzole edilen stromal hücrelerin kültürü % 10 FBS, % 0,2 antibiyotik (primocin), insülin, hidrokortizon (1mg/ml) ve FGF (10 ng/ml) içeren besiyeri (DMEM/F12) içerisinde gerçekleştirildi. Besi yeri eklendikten sonra, hücreler 37°C, % 5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi. Flaskın tabanı yaklaşık % 70 oranında hücreler ile kaplanınca tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildi ve bu ilk pasaj (alt-kültür) olarak değerlendirildi. Hücre sayımı Thoma Lamı kullanılarak trypan blue boyası ile yapıldı ve kullanılan kültür kaplarının (BD Biosciences) yüzey alanına uygun olacak şekilde kültür kaplarına ekim gerçekleştirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanarak 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı.

Eksi 152°C'de stoklanmış olan MDA-MB-231 (ATCC) meme kanser hücre hattı da iyi çoğalm gösterdiği serum, antibiyotik, insülin, hidrokortizon ve FGF eklenmiş besiyerinde (DMEM/F12) canlandırılıp çoğaltıldı.

3.2.3-Stromal hücrelerin karakterizasyon işlemleri

3.2.3.1-Stromal hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu

Pasaj 3 (P3)'e getirilen hücrelerin akım sitometrik analizleri, *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 5x10⁶ hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel Fluorescein isothiocyanate (FITC)- ve Phycoerythrin (PE)-konjuge monoklonal antikolar (CD105, CD45, CD44,

CD90, CD34, CD73, CD71, CD33, CD10, CD29, HLA-G, CD13) ve uygun izotip kontrollerinden eklenerek 45 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu eklenip santrifüj edilerek 400 µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse hale getirildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur (BD Biosciences, San Diego, USA) akım sitometri cihazında okutulurken analizi *BD CellQuestsoftware* (BD Pharmingen) programı ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: Stromal hücrelerin izolasyon basamakları. Doku parçalarının steril kabinde (A,B) küçük parçalara ayrılması (C,D), tüp içine alınıp, enzim ile su banyosunda inkübe edilmesi (E,F) ve yıkama işlemleri (G) sonrasında hücrelerin kültür kaplarına ekilip inkübatörde (H) kültüre edilmesi izlenmektedir.

3.2.3.2-Stromal Hücrelerin in vitro farklılaştırma çalışmaları

3.2.3.2.1-Osteojenik farklılaştırma

Stromal hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek ve "Mesencult Osteojenik Farklılaştırma Kiti" kullanılarak 4 hafta boyunca kültüre edildi ve osteojenik farklılaşma Alizarin Red S histolojik boyaması ile gösterildi. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen stromal hücre besi yeri ile kültüre edilen hücreler kullanıldı.

Osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücrelerde, 4 hafta sonunda morfolojik gözlemlerle kalsiyum nodüllerinin varlığı belirlendi. Bu gözlemlerin sonunda hücreler %70'lik alkol ile 5 dk oda ısısında inkübe edilerek fikse edildi. Fiksasyonu takiben, distile su içerisinde %2 Alizarin Red-S (Fluka) olacak şekilde Alizarin Red-S boyası hazırlanarak pH'sı 4.0-4.3 olarak ayarlandı. Bu boya ile hücreler 45 sn inkübe edildi. Osteojenik farklılaştırmanın varlığı Alizarin Red-S boyasının kalsiyum nodüllerini boyaması ile belirlendi.

3.2.3.2.2-Adipojenik farklılaştırma

Stromal hücreleri adipojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için, hücreler 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler uygun yoğunluğa eriştiğinde %10 FBS, indometacin (200 μ M), insülin (10 μ g/mL), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (0,5 mM), deksametazon (10^{-6} M) ve %0,2 primosin içeren L-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose, Gibco) besi yerinde yaklaşık 15 gün bekletildi. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen stromal hücre besi yeri ile kültüre edilmiş hücreler kullanıldı.

Adipositlere yönlendirilen hücreler %4 Paraformaldehit (PFA, Merck) ile 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam slayt üzerindeki hücreler son olarak %60 oranında 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakılarak fiksasyon işlemi tamamlandı. Fiksasyondan sonra, isopropanol ile OilRed O (Sigma-Aldrich) 1:3 oranında karıştırılarak stok solüsyon oluşturuldu. Ardından stok solüsyon ile distile su 3:2 oranında karıştırılarak, hücrelerle yaklaşık 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Böylece, yağ veziküllerinin varlığı OilRed O boyası ile boyanarak adipojenik farklılaşma belirlendi.

3.2.3.2.3-Nörojenik farklılaştırma

Stromal hücreleri nörojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler uygun yoğunluğa eriştiğinde %10 FBS, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml Epidermal büyüme faktörü (EGF; Epidermal growth factor),

10 ng/ml Brain derived neurotrophic factor (BDNF; Beyin türevli nörotropik faktör), 0.5 mM isobutyl-methylxanthine ve %0,2 primosin içeren LDMEM kültür medyumunu içinde 24-72 saat bekletildi. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen stromal hücre besiyeri ile kültüre edilen hücreler kullanıldı.

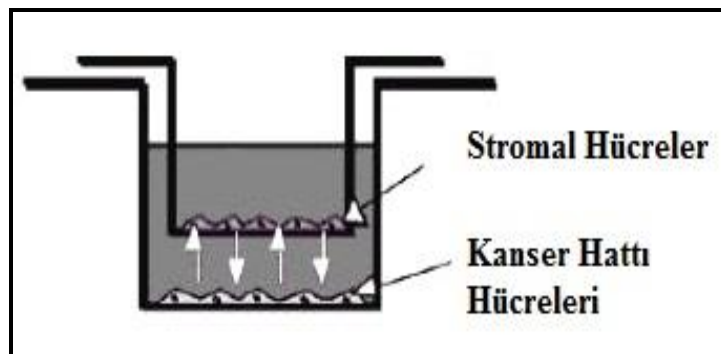
İnkübasyon süresi sonunda nörojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücreler öncelikle PBS ile iki defa yıkandı ve yıkama işlemi takiben hücreler metanol ile 10 dk -20°C'de fikse edildi. Fiksasyon sonrası GFAP (Glial fibrillary acidic protein), β 3-tubulin (tubulin beta 3), Map2ab (Microtubule Associated Protein 2ab), nestin, c-Fos gibi antikolar kullanılarak immünfloresan boyamaları gerçekleştirildi.

3.2.3.2.3.1-İmmunofloresan İşaretleme

Hücreler metanolle fikse edilip PBS (10mM fosfat, 150mM sodyum klorid, İnvitrogen, USA) ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dk inkübe edildi ve sonrasında Antibody Diluent ile uygun oranlarda dilue edilen primer antikolar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kere 2 dk yıkama işleminden sonra immünfloresan çalışmalar için uygun floresan (FITC-, Texas Red (TR)-) işaretli sekonder antikolarla oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi ve nükleer boya içeren kapatma medyumunu (Ultra Cruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenip fotoğraflandı.

3.2.4-Ortak-kültür çalışmaları

Ortak-kültür tekniği kendi içinde iki başlık altında incelenebilir. Bunlardan biri, iki farklı hücre kaynağının birbirleriyle temas edecek şekilde aynı kültür kabına konması ile gerçekleştirilen **direkt ortak-kültür**; diğeri ise iki farklı hücre kaynağının birbirleriyle temasını engelleyerek **insert (ara bölüm)** olarak adlandırılan değişik boyutlarda porları olan membranlar aracılığıyla aynı kültür kabına konması ile gerçekleştirilen parakrin etkileşime dayanan **indirekt ortak-kültürdür** (**Şekil 3.2**). Çalışmamızda indirekt ortak-kültür tekniği kullanıldı.



Şekil 3.2: Ara bölüm ve indirekt ortak-kültür ortamının şematize hali

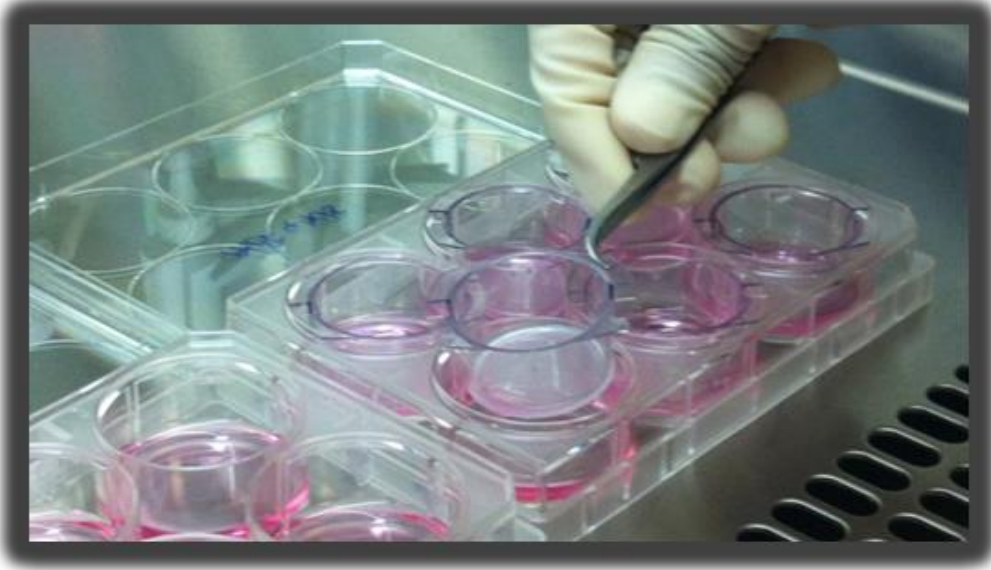
Stoklanmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve stromal hücreler T75 kültür kaplarına ekilip canlandırıldı. Kültür kabının tabanı yaklaşık %70 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle hücreler kaldırılıp 6 kuyucuklu kültür kaplarında ortak-kültüre edildi. Meme kanseri hattı hücreleri 6 kuyucuklu kültür kaplarının tabanına kuyucuk başına 25×10^3 ; eş zamanlı olarak stromal hücreler de ayrı bir 6 kuyucuklu kültür kabı içerisinde ara bölümlerin üzerine yine kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat yapışmaları için beklendi (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3: MDA-MB-231 meme kanseri hattı hücrelerinin 6 kuyucuklu kültür kaplarına; eş zamanlı olarak stromal hücrelerin de arabölüm üzerine ekildiğini gösteren şekil izlenmektedir.

24 saat sonunda üzerine stromal hücreler yapışan ara bölümler kanser hücrelerinin üzerine alınıp (**Şekil 3.4**) ortak-kültür işlemi 4 gün devam ettirildi. Ortak kültüre alınmış hücrelerin birbirlerine olan etkışimlerini anlayabilmek için kontrol amaçlı olarak kanser hücreleri ve stromal hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında ayrıca kültüre edildi.

Sonuç olarak deneyimizde, sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilmiş stromal hücreler ve kanser hattı hücrelerinin ayrı ayrı kültüre edildiği deney grupları ile stromal hücreler ile kanser hattı hücrelerinin ortak kültürlerinin gerçekleştirildiği deney grupları olmak üzere 5 grup kullanıldı.



Şekil 3.4: 24 saatin sonunda üzerine stromal hücrelerin ekildiği ara bölümlerin kanser hücreleri ile aynı ortama alındığını gösteren şekil.

3.2.5-WST-1 (Water-Soluble Tetrazoliummonosodium salt-1) hücre canlılığı ve çoğalma testi

Yapılan ortak-kültür sonrasında stromal hücrelerin ve MDA-MB-231 kanser hattı hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre canlılığını göstermek amacıyla WST-1 solüsyonu (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche) kullanıldı. Hücreler tasarlanan deney planına uygun olarak 12-kuyucuklu kültür kaplarına (25×10^3 stromal hücre : $12,5 \times 10^3$ kanser hücresi olacak sayıda) ekilip ortak-kültür için belirlenen zaman süresince kültüre edildi. Bu sürenin sonrasında besiyerleri %10 WST-1 solüsyonu içeren besiyeri ile değiştirilip 4 saat 37°C , %5 CO_2 ve nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ortamda bulunan tetrazolium halkası, hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşumu neticesinde örneklerin optik dansiteleri (OD) mikroploka okuyucu (Versamax, USA) ile 480 nm dalga boyunda okutularak değerlendirildi.

3.2.6-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi

Ortak- kültür sonrasında süpernatanta salınan IL-8, IL-6 ve IL-1B seviyeleri üretici firmanın (Camarillo CA, invitrogen) belirttiği işlem basamakları izlenerek monokromatör sistemli mikroploka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi.

Ortak kültür sonrası besi yerine salgılanan sitokin miktarlarını ölçmek için kültür sıvıları her bir deney grubundan 3'er tekrarlı olacak şekilde alınarak -80°C 'de saklandı. Ölçüm öncesinde bütün sıvılar ve kitlerin içerikleri oda sıcaklığına getirildikten sonra her bir standart ve örnekten

üretici firmanın klavuzunda belirtilen miktarlarda (IL-8 ve -1 β için 50 μ l; IL-6 için 100 μ l) ELISA kuyucuklarına eklendi sonrasında kitlerin içeriğinde bulunan biotin konjugat yine önerilen miktarlarda (IL-8 ve -6 için 50 μ l; IL-1 β için 100 μ l) kuyucuklara eklenip belirtilen sürelerde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkanarak ve Streptavidin-HRP çalışma solüsyonundan 100 μ l eklenip belirtilen süre kadar inkübe edildi. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra ortama 100 μ l Kromojen eklenerek yaklaşık 30 dk inkübasyon sonrasında reaksiyon 100 μ l durdurma solüsyonu (Stop Solution) ile durdurularak spektrofotometrede (VersaMax, Molecular Device, USA) 450 nm dalga boyunda absorban ölçüldü. Ölçümler her örnek için üç kez tekrarlandı.

3.2.7-RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Ortak-kültür sonrası, hücre peletleri 200 μ l PBS içerisinde homojenize edildikten sonra Total RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany) içerisinde bulunan lizis solüsyonundan 400 μ l eklenerek 15 sn süresince vorteksledi. Daha sonra örnekler, iç içe geçirilen toplama ve filtreli tüplere aktarılarak ve 8000g'de 15 sn santrifüj yapıldı. DNAaz ve DNAaz inkübasyon tampon solüsyonu 1:10 oranında karıştırılarak her örneğe 100 μ l eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Yıkama tampon çözeltisi 1'den (Wash buffer 1) her örneğe 500 μ l eklendikten sonra 8000g'de 15 sn santrifüj edildi. Daha sonra yıkama tampon çözeltisi 2'den (Wash buffer 2) her örneğe önce 500 μ l eklenip 8000g'de 15 sn sonrasında 200 μ l eklenip 13000g'de 2 dk santrifüj edildi. Yıkamalar sonrasında her defasında toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Bu aşamalardan sonra tüpler bir kere 13000g'de 1 dk santrifüj edilip toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler temiz toplama tüplerine aktarıldı. Tüplere ayrıştırma (elution) tamponu eklenerek 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10000g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu işlemlerden sonra filtreli tüpler atılarak toplama tüplerindeki örnekler buza alındı. RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra örneklerin saflığı ve konsantrasyonu picodrop spektrofotometre (Hinxton, CB10 1QY, UK) ile ölçülerek ve 1 μ g total RNA olacak şekilde cDNA'ya çevrim gerçekleştirildi.

RNA konsantrasyon ölçümünden sonra hesaplanan RNA miktarına karşılık gelen miktarda RNA alınarak toplam miktar su ile 8.4 μ l olacak şekilde tamamlandı. Örnekler PCR tüplerine aktarıldıktan sonra örnek başına, Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (*Roche, Mannheim, Germany*) içeriğinde bulunan 1 μ l Oligo DT, 2 μ l Random hexamer eklendi. İlk aşamada ısıtıcı blokta 65°C'de 10 dk primerlerin RNA örneklerine bağlanmaları için beklendi. İkinci aşamada, her bir örneğe eklenecek reaksiyon solüsyonu, 4 μ l tampon çözeltisi, 0.5 μ l RNAaz inhibitörü, 2 μ l dNTP, 1 μ l DTT ve 1.1 μ l ters transkriptaz (RT) eklentileri karıştırılarak hazırlanıp, buz üzerinde RNA içeren PCR tüplerine aktarıldı. Bundan

sonraki reaksiyon 55°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk gerçekleştirildi ve 4°C'de sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklandı. Devamında örnek içerisinde hedeflenen genlerin ifade seviyeleri niceleyici olarak gerçek zamanlı PCR'da belirlendi.

3.2.8-Gerçek-zamanlı (Real-time) PCR ile gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Hedef genlerin amplifikasyonu uygun UPL (Universal Probe Library) Problarının (Taqman hidroliz problemleri) kullanımıyla LightCycler 480 (RocheDiagnostics, Rotkreuz, Switzerland) real-time PCR cihazında eşit miktarda cDNA kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef gen ve ona uygun seçilmiş olan referans genler (HPRT) aynı kuyucuklarda uygun primer ve problemler eşliğinde çoğaltıldı (**Tablo 3.1**). Primer ve problemler üretici firmanın önerdiği şekilde daha önceden standardize edildiği gibi kullanıldı. PCR koşulları; 95°C'de 10 dk inkübasyon, takibinde 45 siklus 95°C'de 10 sn denatürasyon, 60°C'de 30 sn annealing ve 72°C'de 1 sn uzama şeklinde uygulandı. Sonuçlar LightCycler yazılımıyla (version 4), seri dilüsyonla bilinen konsantrasyonlarda hazırlanmış standartlara göre analiz edildi. PCR etkinliği LightCycler Yazılımı ile hesaplanarak yalnızca 1.85 - 2.0 arasındaki değerler kullanıldı.

Tablo 3.1: İfade seviyeleri belirlenen genlere ait primer dizileri ile prob numaraları ve referans genleri.

Genin Sembölü	Erişim Numarası	Prob Numarası	Referans Gen	Primer Dizisi
HMGA2	NM_003483	34	HPRT	L: tccctctaaagcagctcaaaa R: acttggttgggccatttct
AIB1	NM_001174087	84	HPRT	L: tatgatgcagccccaggt R: gtcggaagtgatgacttagcag
PDCD4	NM_001199492	10	HPRT	L: ggaaagcgtaaagatagtgtgtg R: ttcttcagcagcatatcaatctc
RhoC	NM_001042678	4	HPRT	L: attgaggtggacggcaag R: aggccgcagtcgatcata
HoxD10	NM_002148	2	HPRT	L: ctgaggtctccgtgtccagt R: gctggttggtgatcagacttg
KRAS	NM_004985	62	HPRT	L: tggacgaatgatccaacaat R: tccctcattgcactgtactcc
CD44	NM_000610	67	HPRT	L: tggatcaggcattgatgatg R: gtcaaaagcccgtgggtg
BRCA1	NM_007294	11	HPRT	L: ttgtgatgtggaggagcaa R: gattccaggtaaggggtcc
RYBP	NM_012234	22	HPRT	L: catctgcgatgtgaggaaag R: gccaccagctgagaattgat
Wnt2	NM_003391	78	HPRT	L: tttggcaggtcctactcc R: tacaggccctggtgatgg
PPARα	NM_0010019285	5	HPRT	L: gactggaactggatgacag R: tttagaaggccaggacgatct

3.2.9-miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

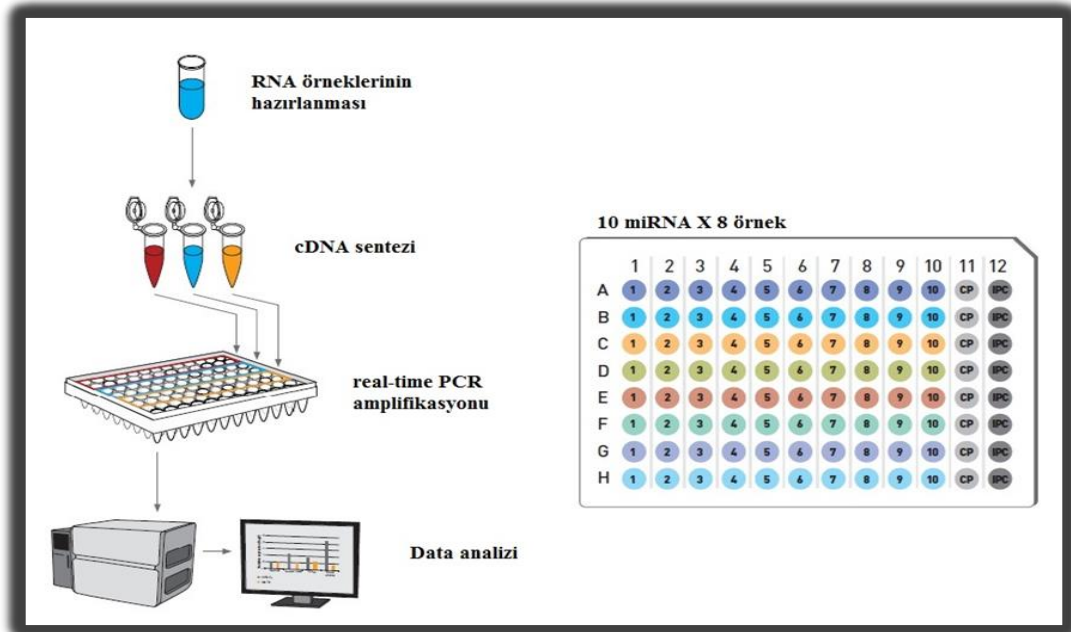
miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Sistemi'nin (EXIQON, United States) 'Pick-&-Mix microRNA PCR Panel'leri olarak adlandırılan ve çalışma öncesinde istediğimiz miRNA'ların yerleştirildiği hazır plakalar kullanıldı (**Tablo 3.2**).

Tablo 3.2: Çalışılan miRNA'ları gösteren panel düzeni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
B	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
C	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
D	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
E	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
F	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
G	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
H	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200b-3p	UniSp6 CP	UniSp3 IPC

Kullanılmış olan bu sistem 2 aşamalı protokolden oluşmaktadır (**Şekil 3.5**);

1. cDNA Sentezi
2. Gerçek-zamanlı PCR amplifikasyonu



Şekil 3.5: miRNA PCR panelleri için çalışma akışı (Exiqon, Instructionmanual v.5.3#203301 September 2013)

İlk aşama olan cDNA sentezi için, reaktiflerin erimesi sağlandıktan sonra her bir örnek için tabloda (**Tablo 3.3**) belirtilen miktarlarda bir karışım hazırlanıp 42°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk inkübasyon ve son olarak 4°C'de soğutma işlemi sağlandıktan sonra örnekler 4°C ya da -20°C'de saklandı.

Tablo 3.3: Revers transkripsiyon reaksiyon koşulları

Reaktif	Hacim (µl)
5x Reaksiyon Tamponu	2
Nükleaz içermeyen su	4,5
Enzim karışımı	1
Sentetik RNA spike (opsiyonlu)	0,5
Kalıp total RNA	2
Toplam Hacim	10

İkinci aşama olan gerçek-zamanlı PCR aşamasında ise öncelikle hazırlanan cDNA örnekleri 100 kat seyreltilmiş sonrasında bu cDNA örnekleri ve PCR master mix 1:1 oranında karıştırılıp hazır halde gelen PCR plakalarının her bir kuyucuğuna bu karışımdan 10 µl eklenip plakaların üzeri kapatılarak ve 1500 g'de 1 dk santrifüj edildi. Son olarak PCR amplifikasyonu ise gerçek-zamanlı PCR (Roche, Lightcycler 480) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (**Tablo 3.4**).

Tablo 3.4: Gerçek-zamanlı PCR koşulları

İşlem basamakları	Cihazın ayarları
Polimeraz Aktivasyonu/Denatürasyon	95°C, 10dk 45 siklus
Amplifikasyon	95°C, 10sn 60°C 1dk
Melting curve analizi	evet

3.2.10-İstatistiksel yöntem

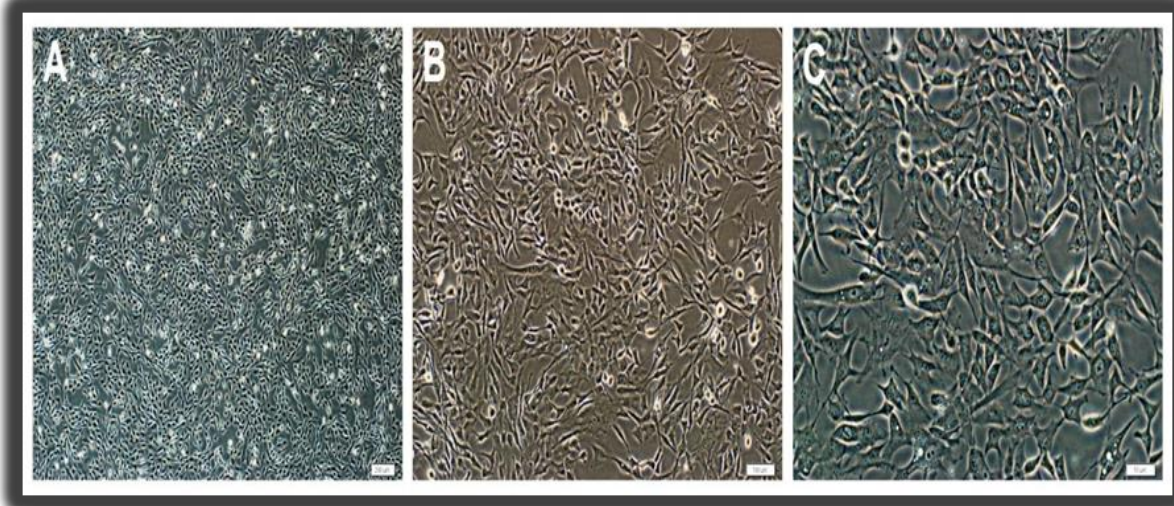
Her deney için en az 3 adet tekrar yapıldı. Çalışmaların verileri, standart sapma (\pm SD) gözönünde bulundurularak rapor edildi. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 20.0 ile gerçekleştirildi ve veriler Kruskal-Wallis ve Independent-Sample T Testi ile değerlendirildi. Ek olarak ifade seviyeleri belirlenen gen ve miRNA'ların tanısal değerleri ROC (Receiver Operating Characteristic Curve; Alıcı İşlem Karakteristik Eğrisi) analiziyle belirlendi. Deney ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

4- BULGULAR

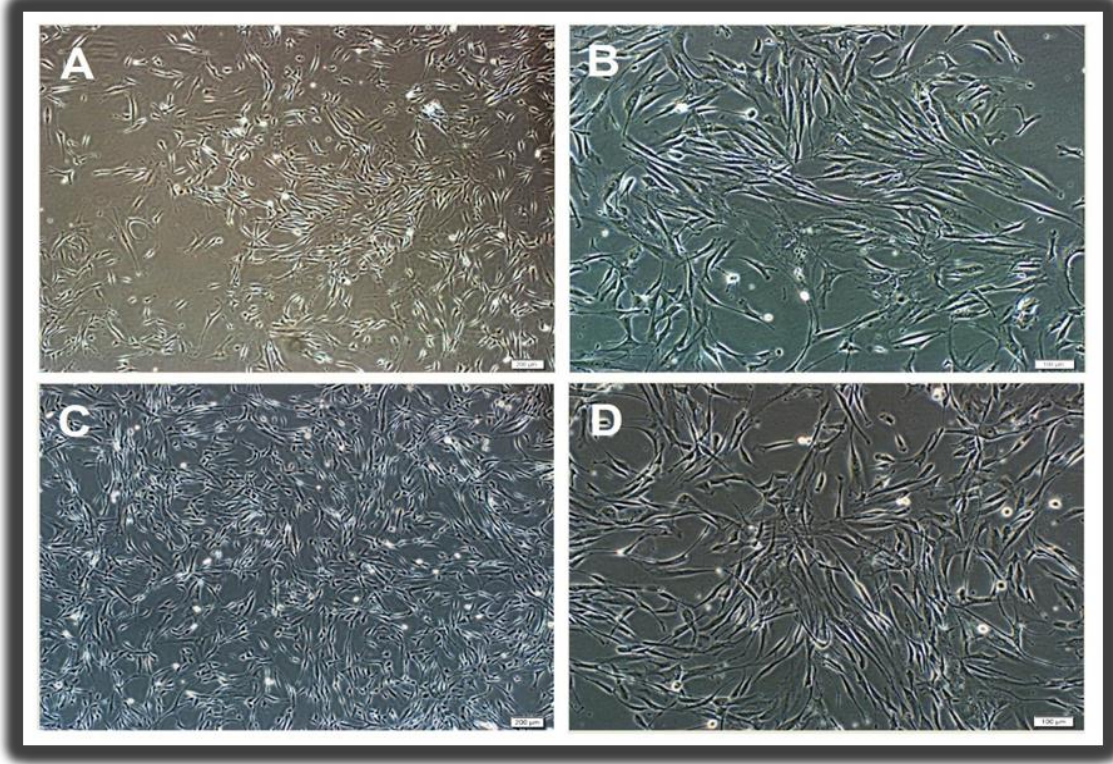
4.1. Mezenkimal Stromal Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Opere edilen vakalardan alınan doku parçaları laboratuvara ulaştırılıp uygun işlem basamakları takibinde enzimatik sindirme yöntemiyle mezenkimal stromal hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi.

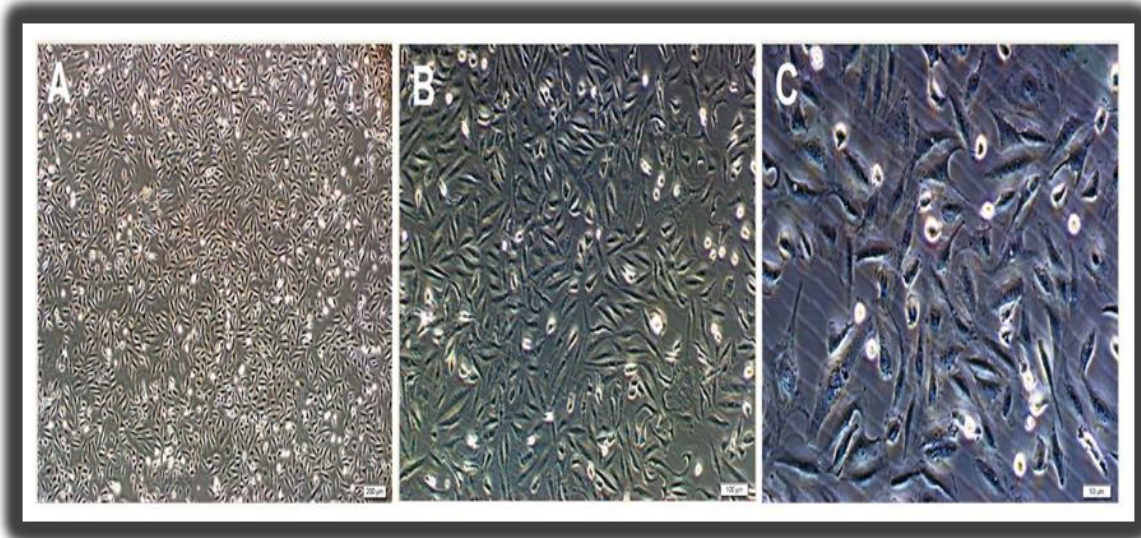
İzole edilen hücreler ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı uygun şartlarda kültüre edildi ve morfolojik takipleri faz kontrast mikroskopi ile yapıldı. Kültürün ilk günlerinden itibaren hem sağlıklı hem de malign meme dokusundan elde edilen mezenkimal stromal hücrelerin, fibroblast benzeri ve iğsi yapıda oldukları, ilerleyen günlerde ise koloniler oluşturarak çoğaldıkları dikkati çekmektedir (**Şekil 4.1, 4.2**). Bununla birlikte meme kanseri hücre hattının ise kübik yapıda oldukları gözlemlendi (**Şekil 4.3**).



Şekil 4.1: iSMD-MKH'lerin P3, 2.günde faz-kontrast mikroskobik görünüşleri (A-C) izlenmektedir (Büyütme: **A-** 4X, **B-** 10X, **C-** 20X).



Şekil 4.2: iMMD-MKH' lerin (A, B) pasaj 0 - 6.gün; (C,D) pasaj 3 - 2. gün; faz-kontrast mikroskobik görüntüleri izlenmektedir (Büyütme: **A-C:** 4X, **B-D:** 10X).

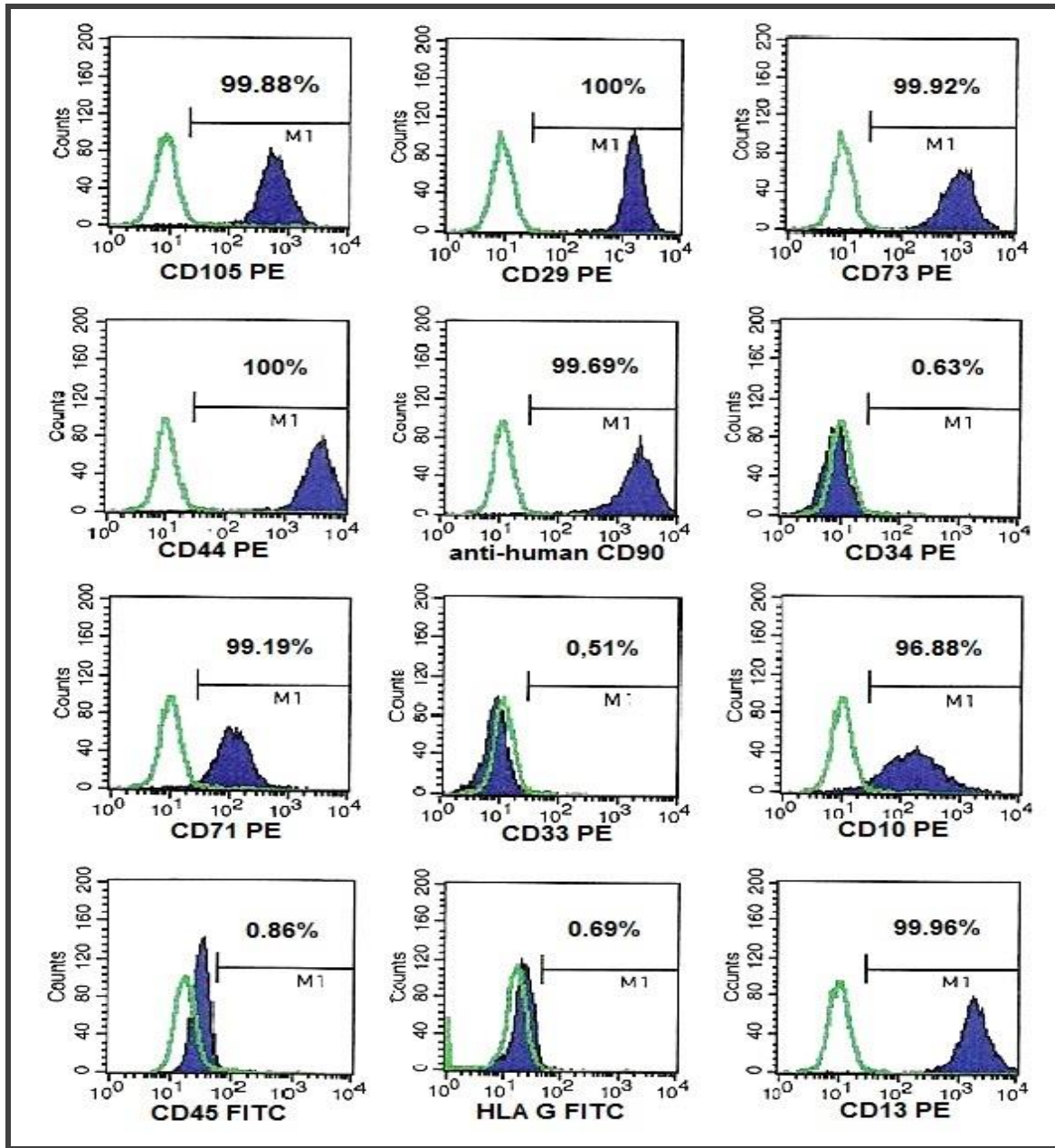


Şekil 4.3: MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının faz-kontrast mikroskobik görüntüleri (A-C) izlenmektedir (Büyütme: **A-** 4X, **B-** 10X, **C-** 20X).

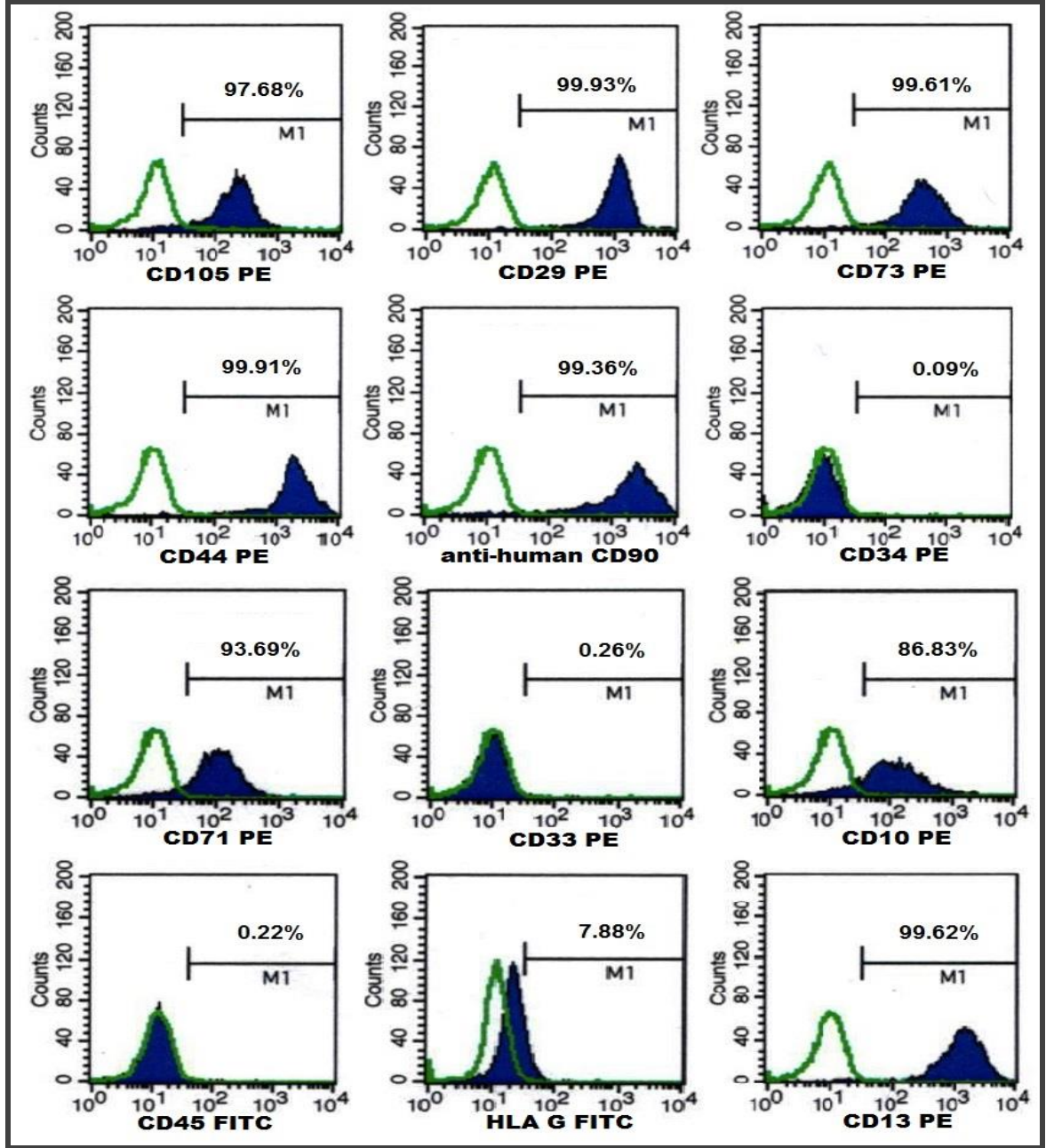
4.2-Mezenkimal Stromal Hücrelerin Karakterizasyonu

4.2.1-Mezenkimal stromal hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu

Yapılan akım sitometri analizleri sonucunda hem sağlıklı hem de malign meme dokularından izole edilen stromal hücrelerin yüzey belirteci olarak CD105, CD29, CD73, CD44, CD90, CD71, CD10, CD13 yönünden pozitif; CD34, CD33, CD45 ve HLA G yönünden negatif oldukları gösterildi (**Şekil 4.4 ve 4.5**).



Şekil 4.4: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi. CD105, CD29, CD73, CD44, CD90, CD71, CD10, CD13 yönünden pozitif; CD34, CD33, CD45 ve HLA G yönünden negatif oldukları izlenmektedir.



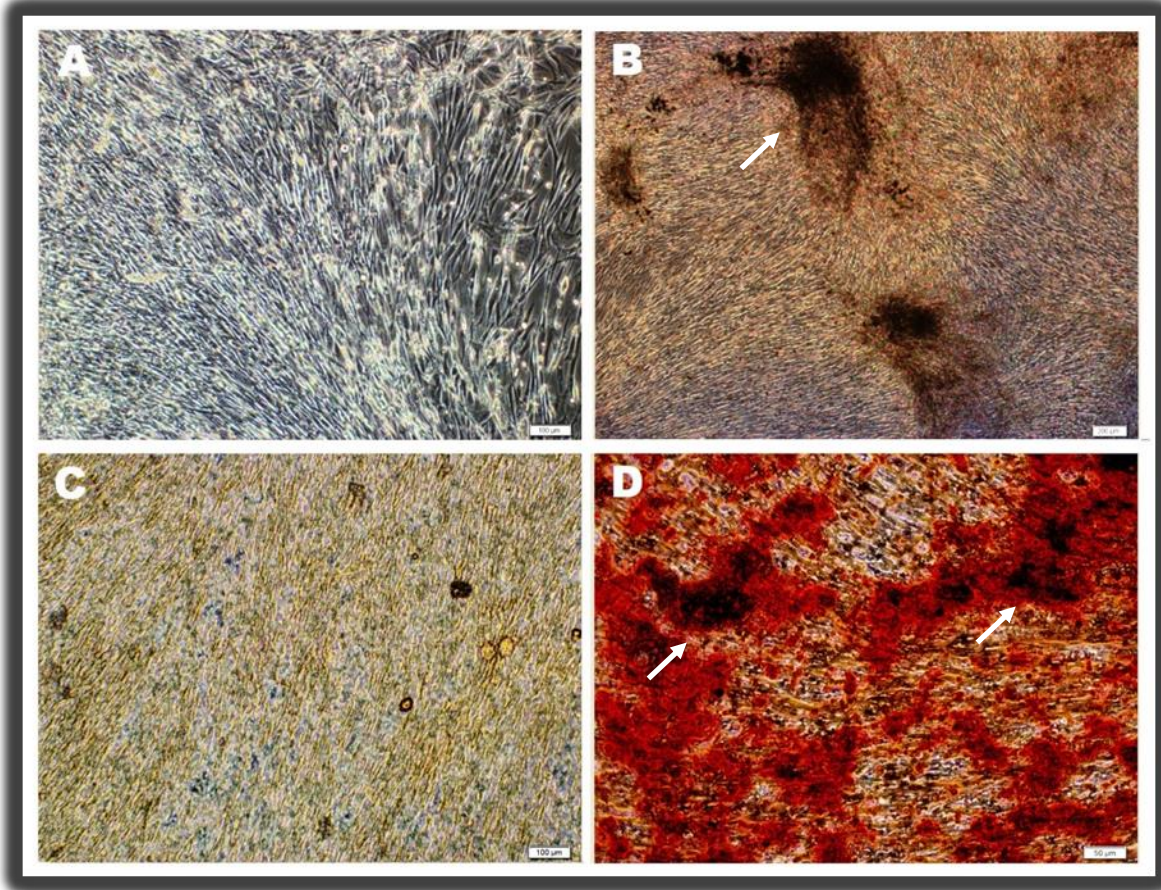
Şekil 4.5: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi. CD105, CD29, CD73, CD44, CD90, CD71, CD10, CD13 yönünden pozitif; CD34, CD33, CD45 ve HLA G yönünden negatif oldukları izlenmektedir.

4.2.2-Mezenkimal stromal hücrelerin *in vitro* farklılaştırma çalışmaları

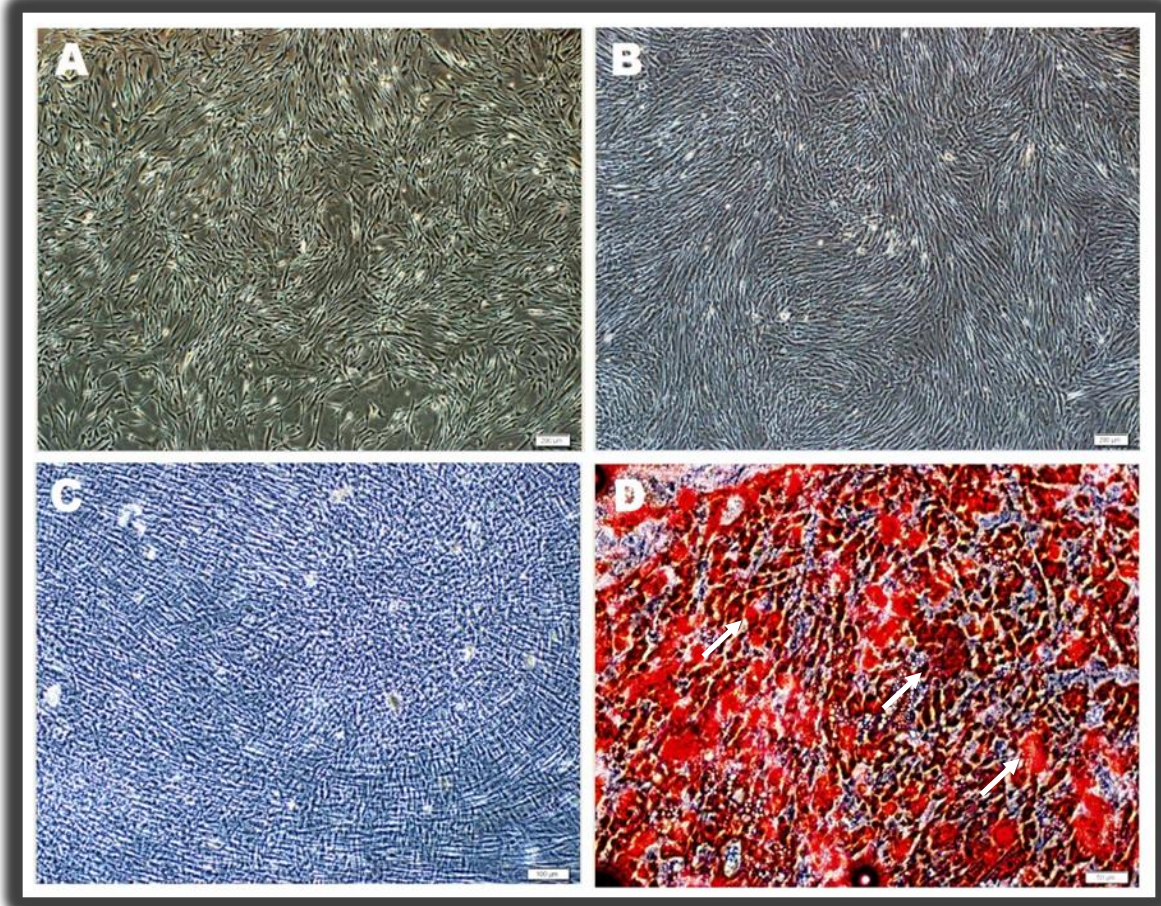
4.2.2.1-Osteojenik farklılaştırma

Osteojenik farklılaştırma amaçlı sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücreler farklılaşma besi yerinde yaklaşık 4 hafta inkübe edildi ve sonrasında Alizarin Red-S boyaması ile kalsiyum nodüllerinin varlığı gösterildi.

Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış gruplarda Alizarin Red-S boyaması öncesinde (**Şekil 4.6 ve 4.7 B**) ve sonrasında (**Şekil 4.6 ve 4.7 D**) faz kontrast mikroskopik incelemelerimizde boyanmış kalsifiye nodüller izlenmiştir. Herhangi bir farklılaşma besi yeri uygulanmayan kontrol gruplarında ise kalsiyum fosfat nodüllerinin olmadığı ve dolayısı ile Alizarin Red boyası ile pozitif reaksiyon vermediği tespit edildi (**Şekil 4.6 ve 4.7 C**).



Şekil 4.6: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin kemik yönde farklılaşması. **A**-Kontrol, **B**-Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış grupların 14. gündeki boyanma öncesi görüntüleri; **C**-Kontrol, **D**-Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış kalsiyum nodüllerinin (→) boyanma sonrası görüntüleri izlenmektedir (Büyütme: **A-C**: 10X, **B**- 4X, **D**- 20X).

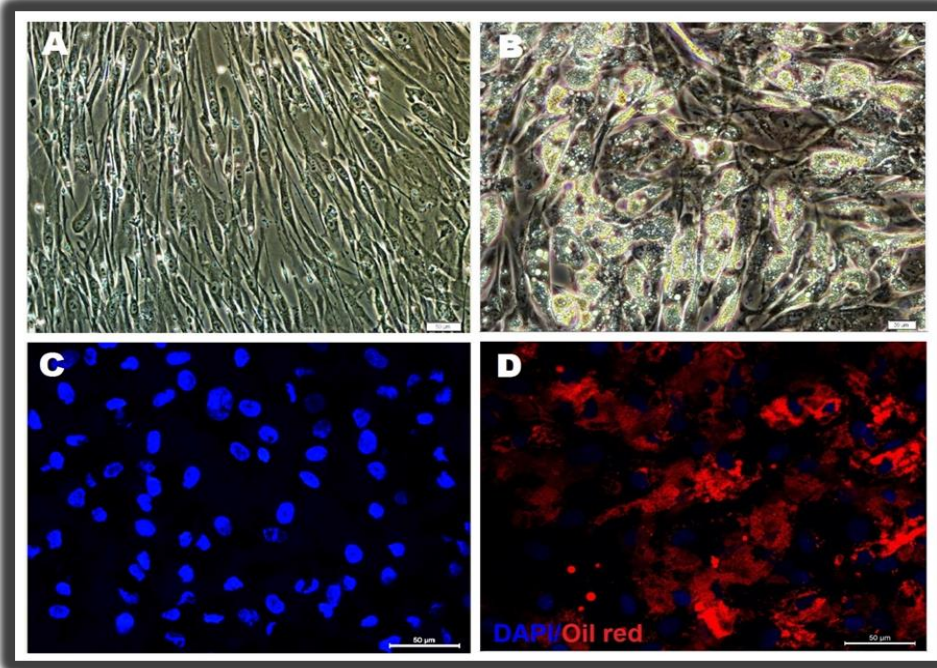


Şekil 4.7: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin kemik yönde farklılaşması. **A-** Kontrol, **B-** Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış grupların 3. gündeki boyanma öncesi görüntüleri; **C-**Kontrol, **D-** Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış kalsiyum nodüllerinin (→) boyanma sonrası görüntüleri izlenmektedir (Büyütme: **A-B:** 4X, **C-** 10X, **D-** 20X).

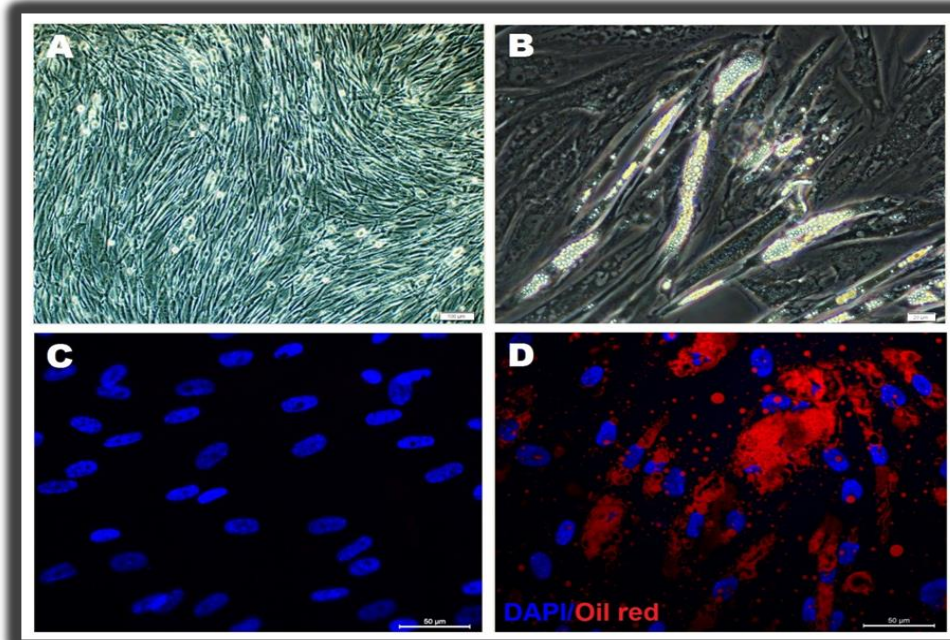
4.2.2.2-Adipojenik farklılaştırma

Sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücreleri adipositlere yönlendirmek için alınan adipojenik farklılaşma ortamında yaklaşık 15 gün sonunda morfolojik olarak değişimler gözlemlendi (**Şekil 4.8 ve 4.9 B**).

Hücreler 15 günlük adipojenik farklılaşma besi yeri ile inkübasyon sonunda sabitlenerek Oil Red O boyası ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin kırmızı renk verdiği (**Şekil 4.8 ve 4.9 D**), kontrol grubu hücrelerinin ise Oil Red O boyası ile pozitif reaksiyon vermediği görüldü (**Şekil 4.8 ve 4.9 C**).



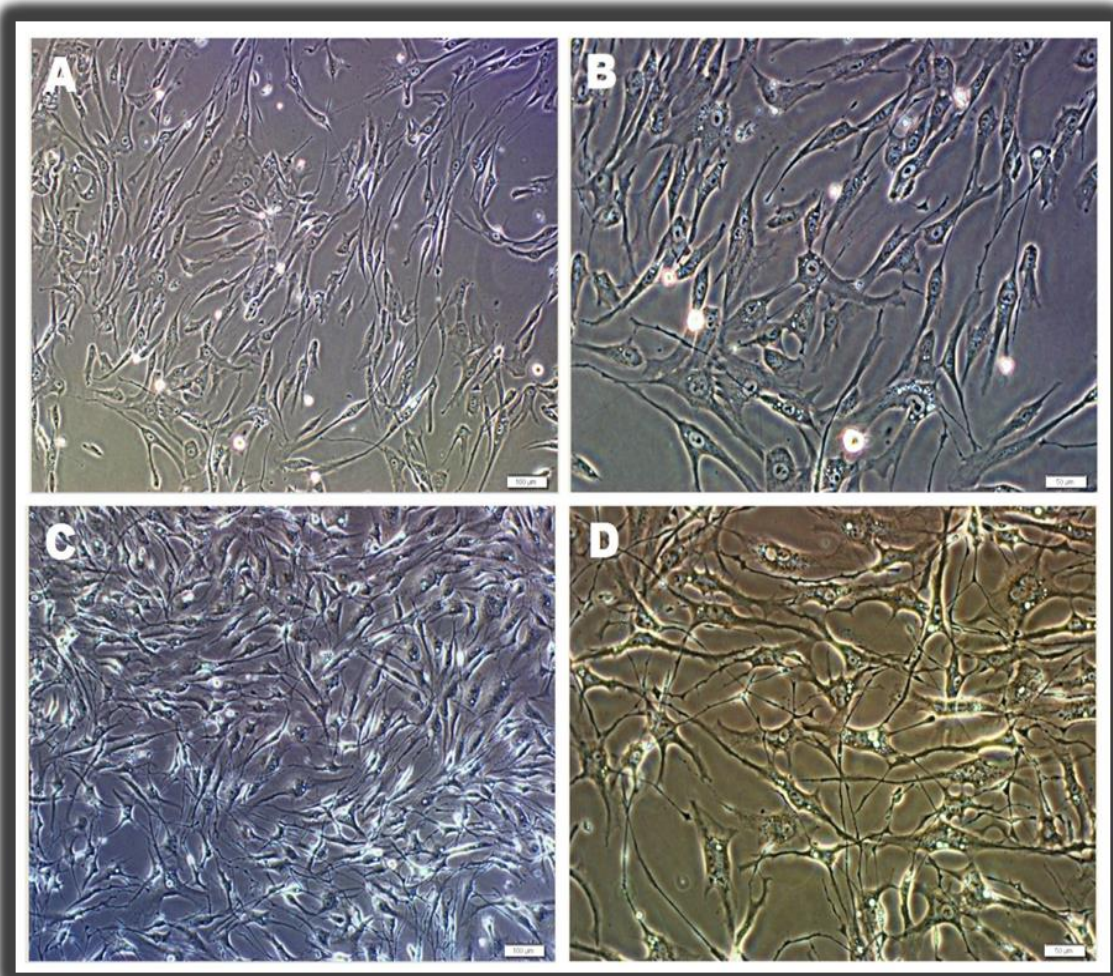
Şekil 4.8: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin 15 günlük adipojenik farklılaştırmasının faz kontrast mikroskopi (A-B) ve Oil Red O boyaması sonrasında (C-D) immünofloresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-** Kontrol, **B-** Adipojenik farklılaşma besi yerinde adipositlere yönlendirilmiş hücrelerin morfolojik görüntüleri; Oil Red O boyaması sonrası **C-** Kontrol, **D-** adipojenik farklılaşmaya yönlendirilen grupta boyanan yağ vezikülleri izlenmektedir (Büyütme: **A-C-D:** 20X, **B-** 40X).



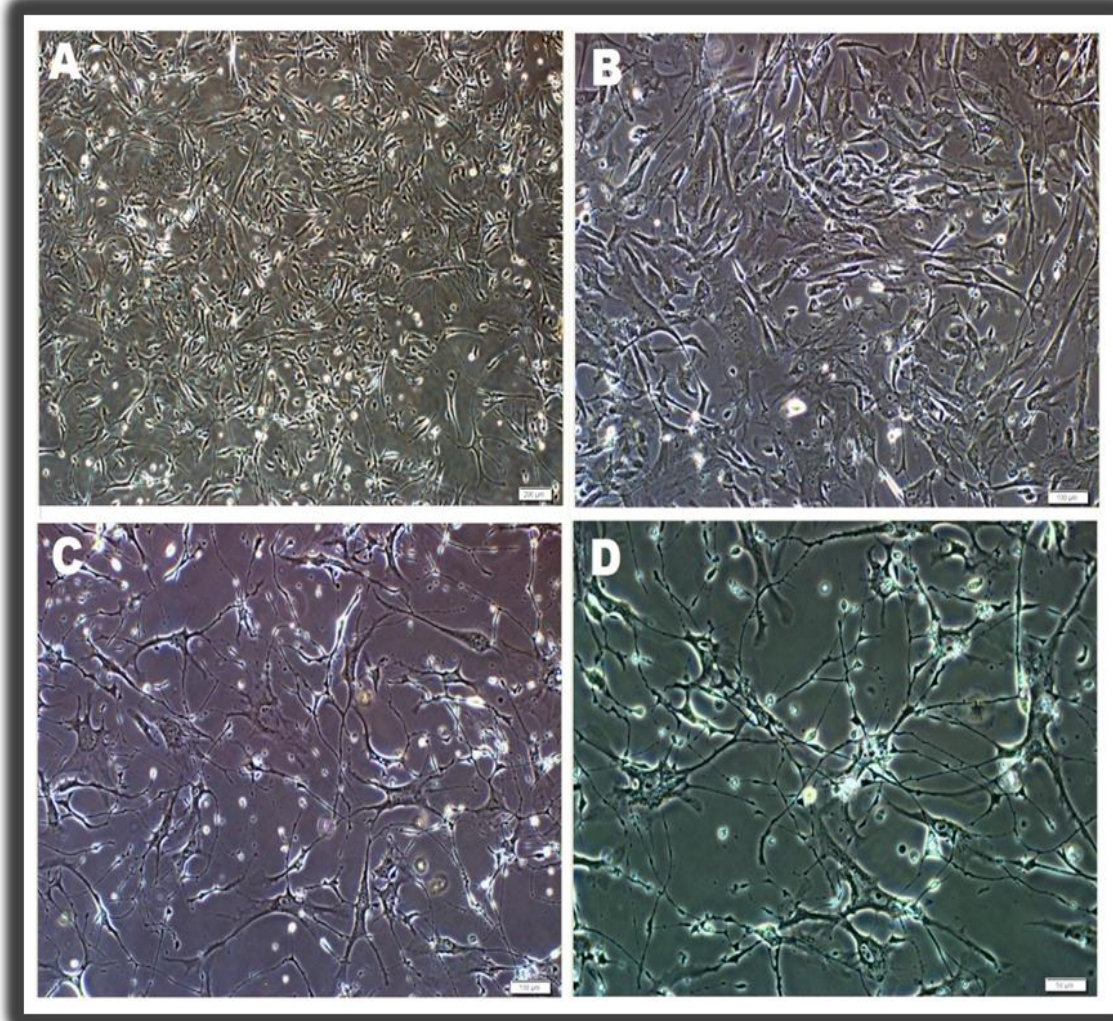
Şekil 4.9: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin 15 günlük adipojenik farklılaştırmasının faz kontrast mikroskopi (A-B) ve Oil Red O boyaması sonrasında (C-D) immünfloresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-** Kontrol, **B-** Adipojenik farklılaşma besi yerinde adipositlere yönlendirilmiş hücrelerin morfolojik görüntüleri; Oil Red O boyaması sonrası **C-** Kontrol, **D-** adipojenik farklılaşmaya yönlendirilen grupta boyanan yağ vezikülleri izlenmektedir (Büyütme: **A-** 10X, **B-** 40X, **C-D:** 20X).

4.2.2.3-Nörojenik farklılaştırma

Sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücreler nörojenik farklılaştırma besi yerinde yaklaşık 72 saat inkübe edildi ve süre sonunda hücrelerin morfolojik olarak nöron benzeri hücrelere farklılaştığı gözlemlendi (**Şekil 4.10 ve 4.11 C-D**). Herhangi bir farklılaşma besi yeri uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise morfolojik olarak herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

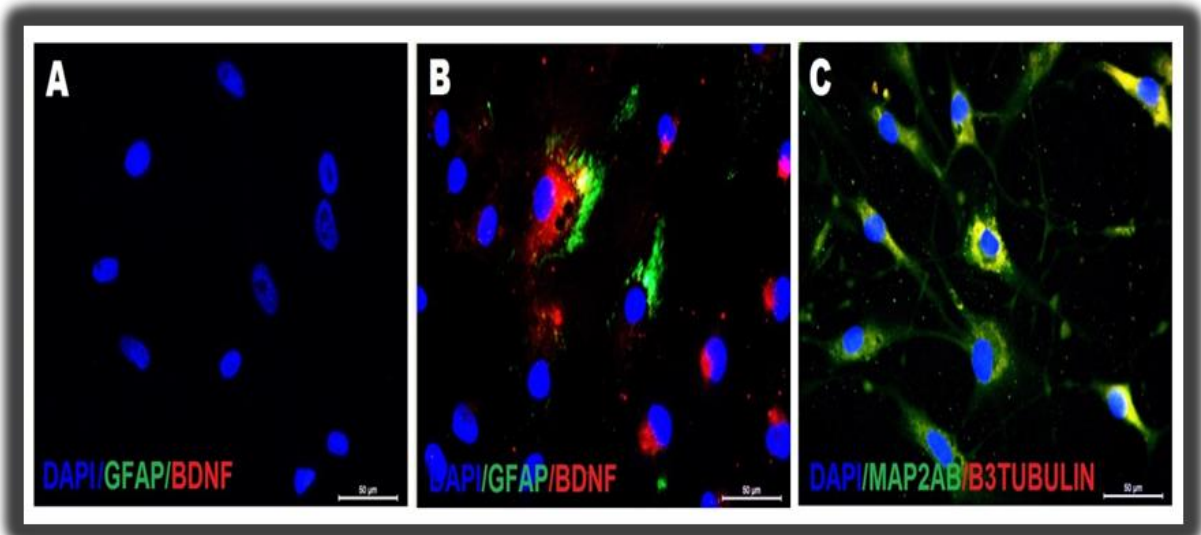


Şekil 4.40: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaşma besi yerinde 72 saat inkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. **A-B-** Kontrol, **C-D-** Nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilmiş stromal hücrelerin nöron benzeri hücrelere dönüştükleri izlenmektedir (Büyütme: **A-C:** 10X, **B-D:** 20X).

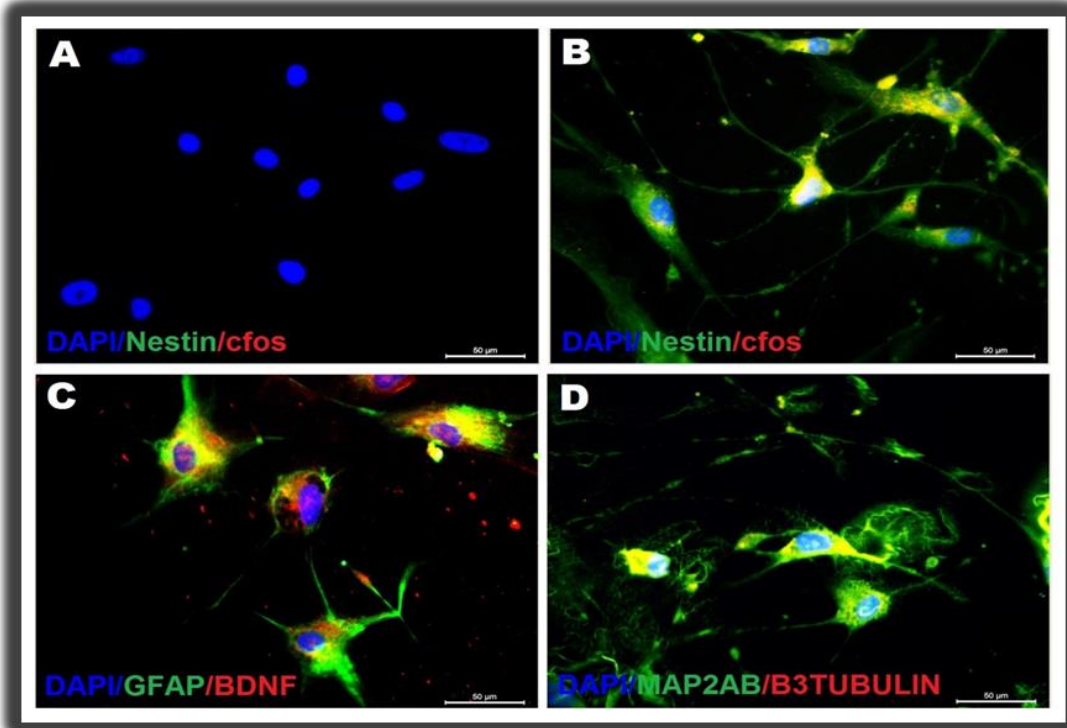


Şekil 4.11: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaşma besi yerinde 72 saat inkübasyon sonrası faz kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. **A-B-** Kontrol, **C-D-** Nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilmiş stromal hücrelerin nöron benzeri hücrelere dönüştükleri izlenmektedir. (Büyütme: **A-** 4X, **B-C:** 10X, **D-** 20X).

Nörojenik farklılaşmaya alınan stromal hücrelerin, nörojenik belirteçlerden olan GFAP, β 3-Tubulin, BDNF, MAP2ab, nestin ve cfos antikoru ile immünfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan stromal hücreler kullanılmıştır (**Şekil 4.12 ve 4.13**).



Şekil 4.52: Sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaştırma koşulları altında inkübasyonundan sonra BDNF, GFAP, MAP2ab ve β 3-TUBULIN antikoları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-** Kontrol, **B-C-** Nörojenik farklılaştırmaya alınmış deney grupları (Büyütme: **A-B-C:** 20X).



Şekil 4.13: Malign meme dokusundan izole edilen stromal hücrelerin nörojenik farklılaştırma koşulları altında inkübasyonundan sonra nestin, c-Fos, BDNF, GFAP, MAP2ab ve β 3-TUBULIN antikoları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-** Kontrol, **B-C-D-** Nörojenik farklılaştırmaya alınmış deney grupları (Büyütme: **A-B-C-D:** 20X).

Sonuç olarak nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilen stromal hücrelerde GFAP, BDNF, MAP2AB, β 3-Tubulin, nestin ve c-Fos gibi belirteçler pozitif reaksiyon verirken (**Şekil 4.12 B,C; Şekil 4.13 B,C,D**); herhangi bir farklılaşma besi yeri uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise negatif reaksiyon (**Şekil 4.12 ve 4.13 A**) gösterdiği gözlemlendi.

4.3-Ortak Kültür Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Meme kanser hattı hücreleri ile sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilmiş olan stromal hücreler karakterizasyon işlemlerini takiben yarı geçirgen membranlar aracılığıyla 4 gün boyunca ortak-kültür işlemine tabi tutuldu. Dört günlük inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin çoğalma kapasitelerini belirlemek amacıyla WST-1 testi uygulandı. ELISA testleri için süpernatantlar toplandı ve belirlenen miRNA ve onlarla ilişkili olan genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için de RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

4.4-WST-1 Testi Değerlendirmesi

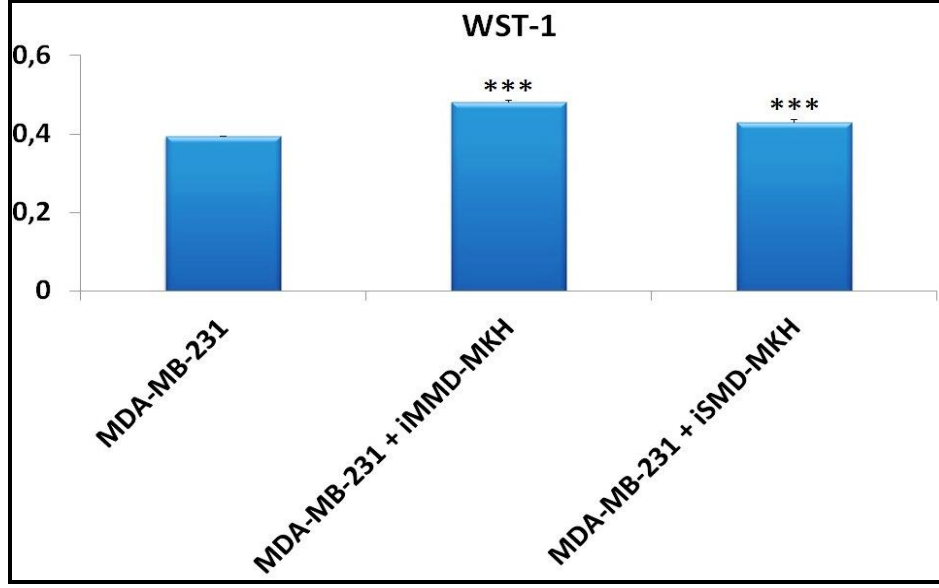
Gerçekleştirilen ortak-kültür çalışmaları sonrasında, kanser mikroçevresinde bulunan mezankimal stromal hücre karakterindeki hücreler ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin çoğalma kapasitelerini göstermek amacıyla WST-1 testi uygulandı.

Tablo 4.1: WST-1 testi sonrası deney gruplarının çoğalma kapasitelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve *p* değerleri.

Deney Grupları	WST-1	<i>p</i> değerleri
1) MDA-MB-231	0,39±0,002	
2) MDA-MB-231 + iMMD-MKH	0,48±0,004	0.000***
3) MDA-MB-231 + iSMD-MKH	0,43±0,006	0.000***
4) iMMD-MKH	1,74±0,012	0.000***
5) iSMD-MKH	1,53±0,013	0.000***

(***: $p \leq 0,001$ Deney gruplarının MDA-MB-231 grubuna göre karşılaştırılması ile belirlenen istatistiksel anlam derecesini ifade etmektedir.)

WST-1 testi analiz sonuçlarımıza göre, sağlıklı ve malign meme doku kaynaklı stromal hücreler ile ortak kültür sonrasında kanser hücrelerinin çoğalma kapasitelerinde anlamlı düzeyde ($p \leq 0,001$) artış gözlemlendi. Bununla birlikte malign meme doku kaynaklı stromal hücrelerin sağlıklılara oranla kanser hücre çoğalmasını daha belirgin şekilde uyardığı tespit edildi ($p \leq 0,001$) (**Tablo 4.1, Grafik 4.1**).



Grafik 4.1: WST-1 testi ile, 4 günlük ortak kültür sonrası deney gruplarının çoğalm kapasitelerinin değişim oranları (***: $p \leq 0,001$).

4.5-ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

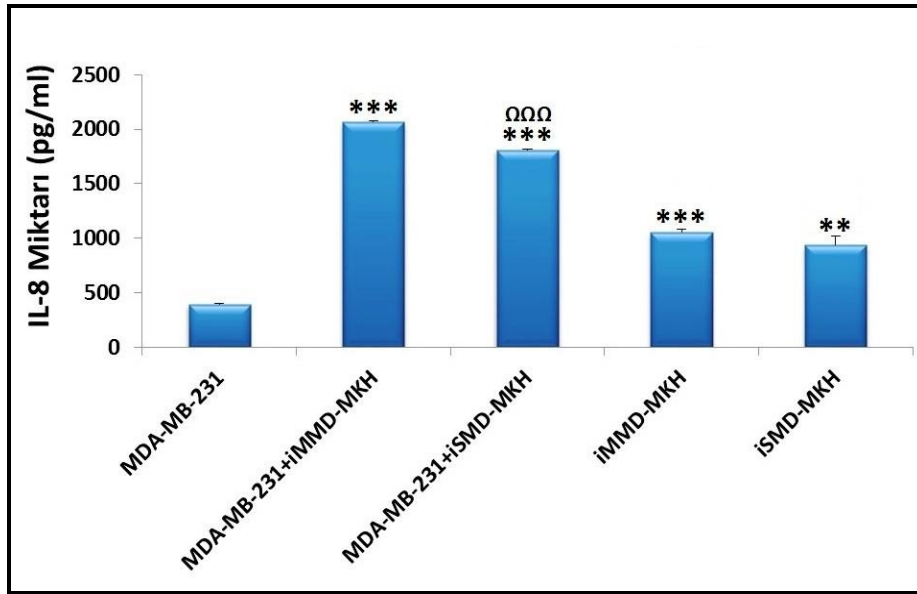
Kanser mikroçevresinde yerleşik stromal hücre kaynaklı olduğu düşünülen sitokinlerin seviyelerini belirleyebilmek amacıyla, malign ve sağlıklı meme dokularından elde edilen stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında elde edilen süpernatantlar kullanılarak IL-8, IL-6 ve IL-1 β düzeyleri ELISA yöntemi ile saptandı ve deney grupları arasında karşılaştırıldı.

Metastazla ilişkili olduğu bilinen IL-8 seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan ELISA testi sonucunda, hem iSMD-MKH'lerinden ($p \leq 0,01$) hem de iMMD-MKH'lerinden ($p \leq 0,001$) salınan miktarlar meme kanseri hücre hattı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oldukları belirlendi. Bununla birlikte, iSMD-MKH ve iMMD-MKH'leri ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında ise her iki deney grubunda da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p \leq 0,001$) artış olduğu gözlemlendi. Ayrıca kanser hücrelerinin iMMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasındaki seviyelerinin iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültüre kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p \leq 0,001$) yüksek olduğu belirlendi (**Tablo 4.2, Grafik 4.2**).

Tablo 4.2: ELISA testi ile belirlenen IL-8 seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve *p* değerleri

Deney Grupları	IL-8	<i>p</i> değerleri
MDA-MB-231	394,82±2,18	
MDA-MB-231+iMMD-MKH	2065,61±8,08	0.000***
MDA-MB-231+iSMD-MKH	1812,27±1,73	0.000***
iMMD-MKH	1052,36±27,42	0.000***
iSMD-MKH	935,17±87,43	0.000***

(***: $p \leq 0,001$ Deney gruplarının MDA-MB-231 grubuna göre karşılaştırılması ile belirlenen istatistiksel anlam derecesini ifade etmektedir.)



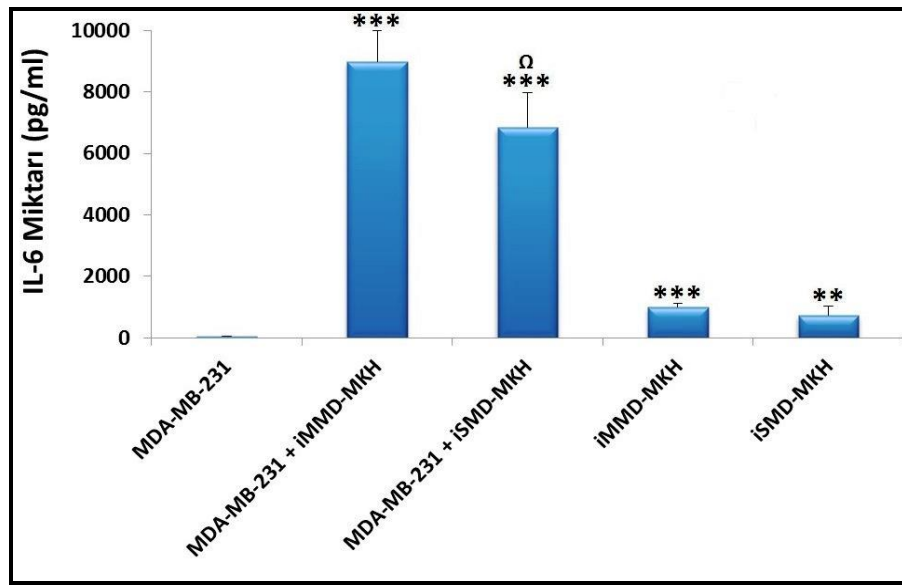
Grafik 4.2: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-8 seviyelerinin gösterilmesi (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$ Deney gruplarının MDA-MB-231 grubuna göre karşılaştırılması sonucunda tespit edilen istatistiksel anlam derecelerini; ΩΩΩ: $p < 0,001$ ise MDA-MB-231+iMMD-MKH ve MDA-MB-231+iSMD-MKH gruplarının karşılaştırılması ile tespit edilen istatistiksel anlam derecesini ifade etmektedir).

IL-6 seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan ELİZA testi sonucunda, iSMD-MKH ve iMMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında kanser hücrelerindeki seviyelerinde anlamlı düzeyde ($p \leq 0,001$) artış olduğu gözlemlendi. Ek olarak, kanser hücrelerinin iMMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında seviyelerinin iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültüre kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (Ω: $p \leq 0,05$) yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca iSMD-MKH'leri ($p \leq 0,01$) ile iMMD-MKH'lerinden ($p \leq 0,001$) salınan IL-6 seviyelerinin kanser hücrelerinden salınan IL-6 seviyelerine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (**Tablo 4.3, Grafik 4.3**).

Tablo 4.3: ELISA testi ile belirlenen IL-6 seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve *p* değerleri.

Deney Grupları	IL-6	<i>p</i> değerleri
MDA-MB-231	63,18±3,68	
MDA-MB-231+iIMMD-MKH	8979,06±1005,65	0.000***
MDA-MB-231+iSMD-MKH	6839,2±1123,23	0.000***
iIMMD-MKH	996,78±133,33	0.000***
iSMD-MKH	723,75±301,75	0.005**

(***: $p \leq 0,001$ Deney gruplarının MDA-MB-231 grubuna göre karşılaştırılması ile belirlenen istatistiksel anlam derecesini ifade etmektedir.)

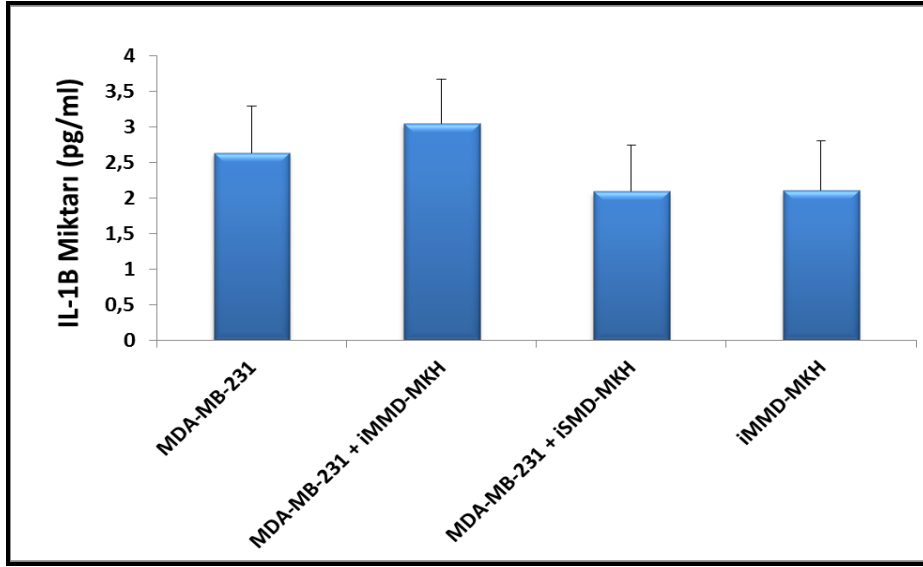


Grafik 4.3: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-6 seviyelerinin gösterilmesi (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$ deney gruplarının MDA-MB-231 grubuna göre karşılaştırılması sonucunda tespit edilen istatistiksel anlam derecelerini; Ω: $p \leq 0,05$ ise MDA-MB-231+iIMMD-MKH ve MDA-MB-231+iSMD-MKH gruplarının karşılaştırılması ile tespit edilen istatistiksel anlam derecesini ifade etmektedir).

IL-1 β seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan ELISA testi sonucunda, iIMMD-MKH'lerinin ortak kültürleri sonrasında kanser hücrelerinden salınan IL-1 β seviyelerinin yalnız kültüre edilen kanser hücrelerinden salınan IL-1 β seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olduğu, iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük olduğu gözlenmiştir (**Tablo 4.4, Grafik 4.4**).

Tablo 4.4: ELISA testi ile belirlenen IL-1 β seviyelerinin değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve *p* değerleri.

Deney Grupları	IL-1 β	<i>p</i> değeri
MDA-MB-231	2,64 \pm 0,65	
MDA-MB-231+iMMD-MKH	3,06 \pm 0,61	0.520
MDA-MB-231+iSMD-MKH	2,1 \pm 0,65	0.493
iMMD-MKH	2,11 \pm 0,70	0.514



Grafik 4.4: ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan IL-1 β seviyelerinin gösterilmesi.

4.6-Gen ve miRNA Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücreler ile meme kanseri hücre hattının ortak kültürleri sonrasında, meme kanseri ile ilişkili miRNA'ların (let7, miR-17-5p, miR-21, miR-27, miR-10b, miR-373, miR-520c, mir-200 ailesi) ayrıca bu miRNA'lar ile ilişkilendirilen yollara ait bazı genlerin (HMGA2, AIB1, PDCD4, HOXD10, RHOC, RYBP, CD44, BRCA1, KRas, Wnt2) ifade seviyeleri tüm deney gruplarında gerçek-zamanlı PCR ile kantitatif olarak belirlendi.

Gerçekleştirilen gen ve miRNA ifade analizleri neticesinde; tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA'lardan biri olan let-7a ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kanser hücrelerinde iMMD-MKH'ler ile ortak kültür sonrasında belirgin düzeyde azaldığı; zıt olarak iSMD-MKH'ler ile ortak kültürleri sonrasında ise arttığı gözlemlendi. Ek olarak, yalnız kültüre edilen iMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinin let-7a ifade seviyelerinin ise kanser hücrelerine oranla azaldığı gözlemlenmiş, özellikle iMMD-MKH'lerinde

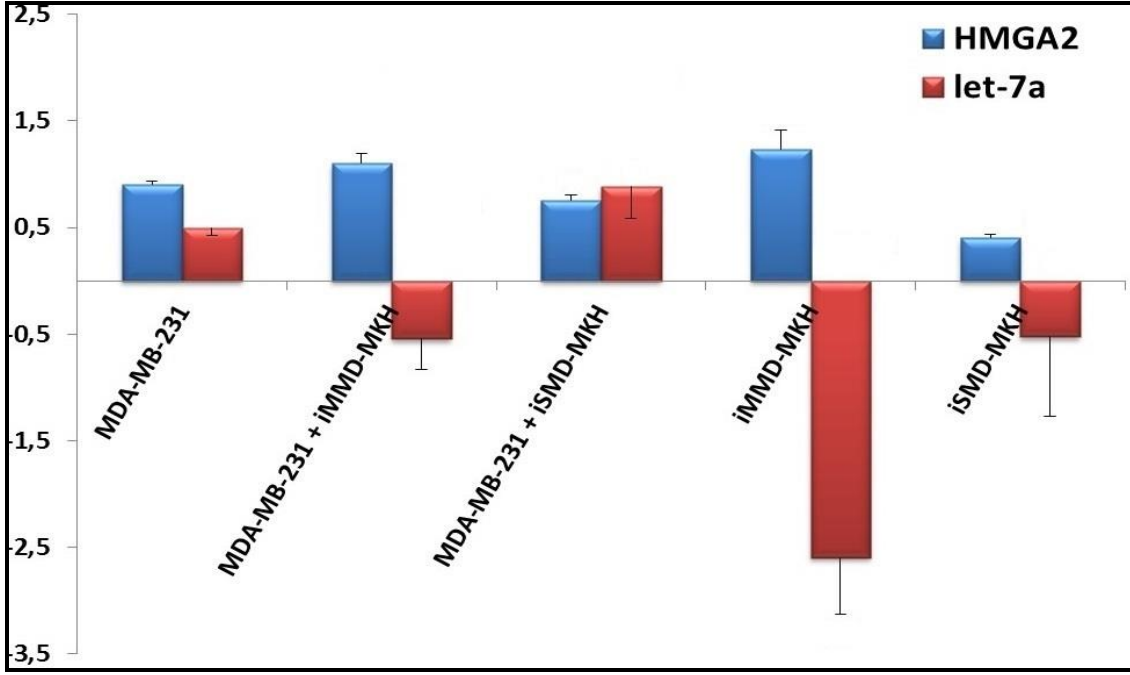
istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) azalış belirlenmiştir. Ayrıca kanser hücre hattının iMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasında iki grup arasındaki ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, iSMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (*: $p < 0,05$) artış gözlemlendi (**Tablo 4.5, Grafik 4.5**).

Tablo 4.5: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen HMGA2 geni ve let-7a ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	HMGA2 ve let-7 Ortalama \pm Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	0,91 \pm 0,03 0,5 \pm 0,08		0.273 0.171	0.411 0.523	0.171 0.011*	0.100 0.201
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	1,10 \pm 0,09 -0,54 \pm 0,28	0.273 0.171		0.055 0.045*	0.784 0,235	0.006** 0.927
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0,75 \pm 0,05 0,89 \pm 0,30	0.411 0.523	0.055 0.045*		0.028* 0.001***	0.411 0.055
4. iMMD-MKH	1,23 \pm 0,18 -2,60 \pm 0,54	0.171 0.011*	0.784 0.235	0.028* 0.001		0.003** 0.201
5. iSMD-MKH	0,40 \pm 0,03 -0,53 \pm 0,74	0.100 0.201	0.006** 0.927	0.411 0.055	0.003** 0.201	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır HMGA2, ikinci satır ise let-7 bulgularını göstermektedir.)

Let-7 ailesi üyelerinin hedefi olan ve bir onkogen olarak kabul edilen HMGA2'nin ifade seviyeleri ise let-7a'nın zıttı yönünde belirlendi. iMMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültürleri sonrasında kanser hücrelerindeki HMGA2 seviyelerinde artış gözlenirken, iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında azalış gözlemlendi. Ayrıca yalnız kültüre edilen iMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinin ifade seviyeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise iMMD-MKH'lerindeki ifadenin anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) yüksek olduğu belirlendi (**Tablo 4.5, Grafik 4.5**).



Grafik 4.5: HMGGA2 geni ve let-7a ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

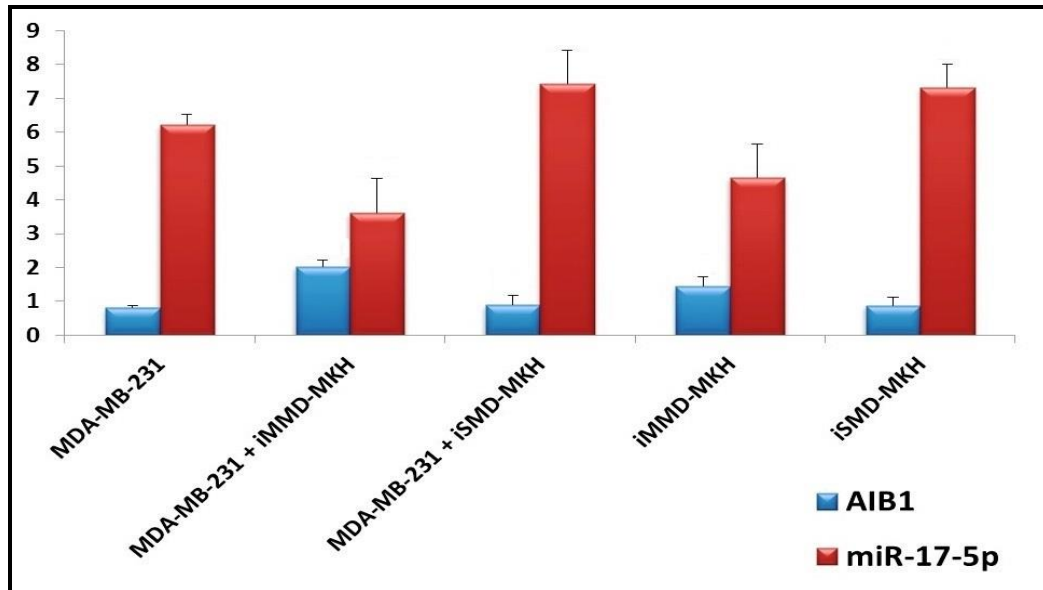
Tümör baskılayıcı olarak işlev gören miR-17-5p ve onun hedeflerinden biri olarak belirtilen onkogenik özellikteki AIB1 geni ifadelerinin let-7a ve HMGGA2 arasında gözlemlenen değişimlere benzer olarak birbirinin tersi şekilde olduğu belirlendi. Gerçekleştirilen analizler neticesinde miR-17-5p ifadesinin istatistiksel olarak anlam bulunamamış olsa da, iIMMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasında kanser hücrelerinde azaldığı, iSMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasında ise artış gösterdiği belirlendi. Ayrıca iIMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasında iki grubun birbirleri arasındaki miR-17-5p ifadeleri karşılaştırıldığında, iSMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) artış gözlemlendi. Ek olarak iIMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinin miR-17-5p ifade seviyeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında iSMD-MKH'lerinde anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) artış gözlemlendi (**Tablo 4.6, Grafik 4.6**).

Tablo 4.6: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen AIB1 geni ve miR-17-5p ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	AIB1 ve miR-17-5p Ortalama± Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	0,81±0,05 6,22±0,31		0.006** 0.121	0.648 0.273	0.055 0.273	0.715 0.273
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	2,03±0,20 3,61±1,04	0.006** 0.121		0.022* 0.008**	0.411 0.648	0.018* 0.008**
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0,89±0,27 7,45±0,98	0.648 0.273	0.022* 0.008**		0.144 0.028*	0.927 —
4. iMMD-MKH	1,44±0,30 4,67±0,97	0.055 0.273	0.411 0.648	0.144 0.028*		0.121 0.028*
5. iSMD-MKH	0,88±0,23 7,32±0,70	0.715 0.273	0.018* 0.008**	0.927 —	0.121 0.028*	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır AIB1, ikinci satır ise miR-17-5p bulgularını göstermektedir.)

miR-17-5p'nin hedeflerinden biri olduğu belirtilen onkogenik işlev gösteren AIB1 geninin ifade seviyelerinin miR-17-5p'nin tersi yönünde azalış ya da artış gösterdiği gözlemlendi. iMMD-MKH'leri ile ortak kültürleri sonrasındaki kanser hücrelerinin AIB1 ifadelerinin anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) artış gösterdiği belirlendi. Ek olarak kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında yalnız başına kültüre edilen iMMD-MKH'lerinde ki AIB1 ifade düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olduğu gözlemlendi. iMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında iki grubun birbirleri arasındaki AIB1 ifade seviyeleri karşılaştırıldığında ise, iSMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen deney grubunda anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) azalış gözlemlendi (**Tablo 4.6, Grafik 4.6**).



Grafik 4.6: AIB1 geni ve miR-17-5p ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

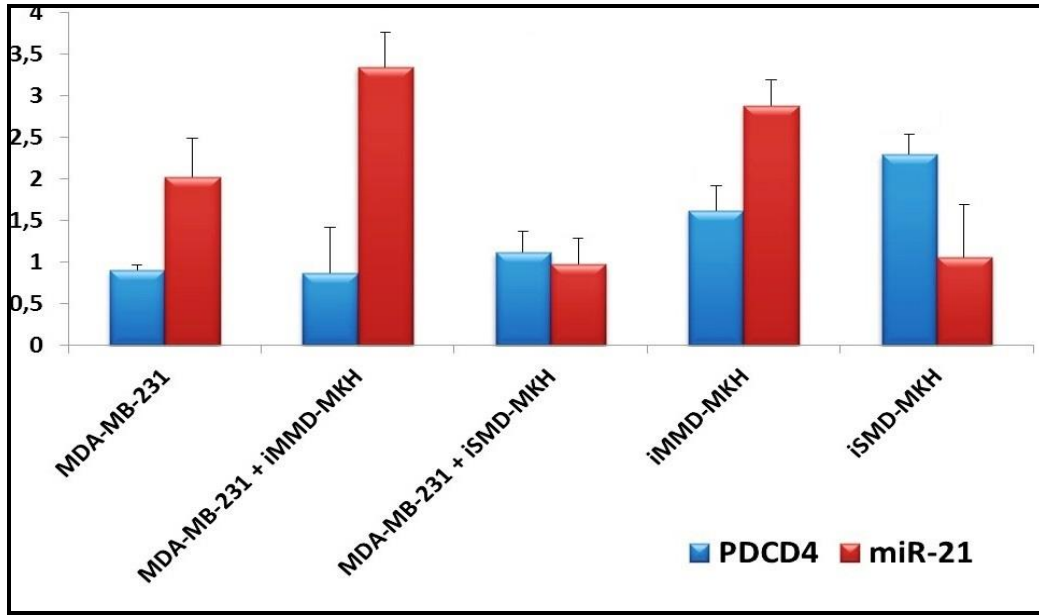
Onkogen olarak davrandığı belirtilen miR-21 ifadesinin, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da iIMD-MKH'ler ile ortak kültür sonrasındaki kanser hücrelerinde artış gösterdiği belirlenirken; iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında ise azalış gösterdiği belirlendi. iIMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında, iki grup kendi aralarında karşılaştırıldığında iSMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen deney grubunda anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) azalış olduğu gözlemlendi. Ek olarak, iIMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinin miR-21 ifade seviyeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise iSMD-MKH'lerinde anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) düşük olduğu belirlendi (**Tablo 4.7, Grafik 4.7**).

Tablo 4.7: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen PDCD4 geni ve miR-21 ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	PDCD4 ve miR-21 Ortalama \pm Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	0,90 \pm 0,06 2,02 \pm 0,47		0.615 0.110	0.465 0.253	0.040* 0.337	0.004** 0.235
2. MDA-MB-231+iIMD-MKH	0,87 \pm 0,55 3,35 \pm 0,42	0.615 0.110		0.819 0.006**	0.120 0.522	0.018* 0.005**
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	1,12 \pm 0,25 0,97 \pm 0,32	0.465 0.253	0.819 0.006**		0.185 0.036*	0.032* 0.964
4. iIMD-MKH	1,63 \pm 0,29 2,88 \pm 0,31	0.040* 0.337	0.120 0.522	0.185 0.036*		0.411 0.032*
5. iSMD-MKH	2,30 \pm 0,24 1,07 \pm 0,63	0.004** 0.235	0.018* 0.005**	0.032* 0.964	0.411 0.032*	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır PDCD4, ikinci satır ise miR-21 bulgularını göstermektedir.)

miR-21'in hedefi olduğu belirtilen ve tümör baskılayıcı olarak işlev gören PDCD4 geninin ifade seviyelerinde ki değişimlerin miR-21'in tersi yönünde olduğu belirlendi. iIMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında PDCD4 ifade seviyelerinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da iIMD-MKH'leri ile ortak kültürde azalış gözlenirken; iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültürde az da olsa artış gözlemlendi. Ayrıca iSMD-MKH'lerinin yalnız kültüre edildiği deney grubundaki PDCD4 ifade seviyeleri, kanser hücre hattı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) yüksek olduğu belirlendi (**Tablo 4.7, Grafik 4.7**).



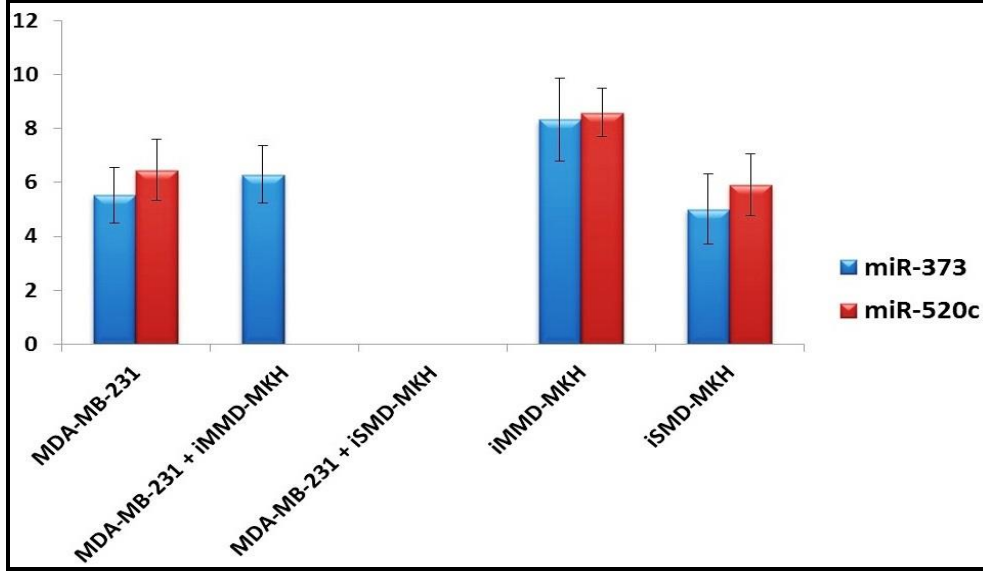
Grafik 4.7: PDCD4 ve miR-21 ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Kanser hücre göçü ve yayılımını uyardığı düşünülen miR-373 ve miR-520c ifade seviyelerinin analizleri neticesinde istatistiksel olarak anlam bulunamamış olsa da, MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile karşılaştırıldığında, yalnız başlarına kültüre edilen iMMD-MKH'lerinde miR-373 ve miR-520c ifade seviyelerinin arttığı, iSMD-MKH'lerinde ise azaldığı belirlendi. Ayrıca iMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında, iki grup kendi aralarında karşılaştırıldığında, iMMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen deney grubunda miR-373 ifade seviyelerinin anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.8, Grafik 4.8).

Tablo 4.8: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-373 ve miR-520c ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	miR-373 ve miR-520c Ortalama ± Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	5,53±1,02 6,46±1,13		0.891 0.066	0.060 0.066	0.271 0.258	0.614 0.777
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	6,30±3,06 0±0	0.891 0.066		0.044* —	0.336 0.003**	0.521 0.120
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0±0 0±0	0.060 0.066	0.044* —		0.003** 0.003**	0.169 0.120
4. iMMD-MKH	8,34±1,54 8,60±0,89	0.271 0.258	0.336 0.003**	0.003** 0.003**		0.109 0.157
5. iSMD-MKH	5,00±1,30 5,91±1,15	0.614 0.777	0.521 0.120	0.169 0.120	0.109 0.157	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır miR-373, ikinci satır ise miR-520c bulgularını göstermektedir.)



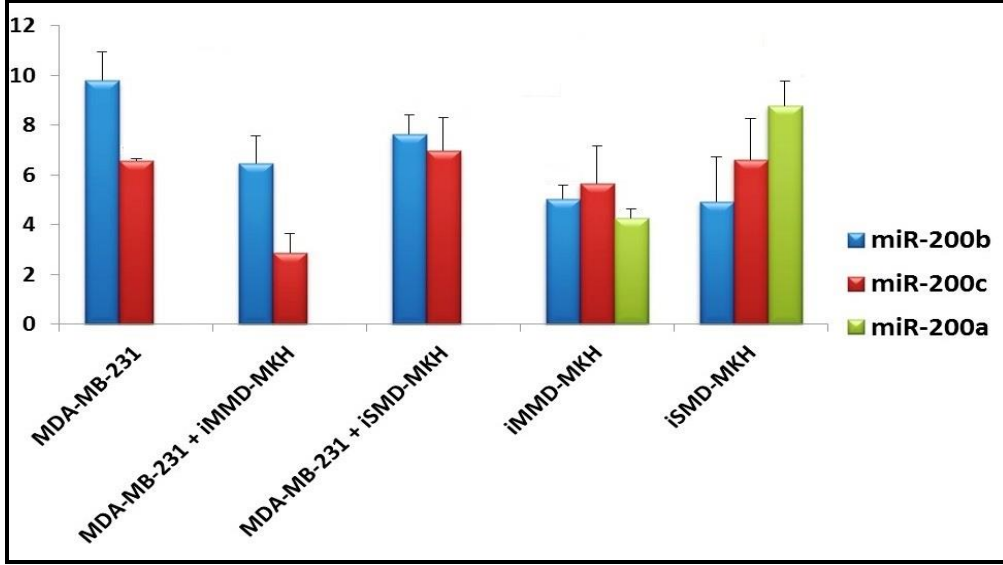
Grafik 4.8: miR-373 ve miR-520c ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Tümörün baskılanmasında rol oynadığı bilinen miR-200 ailesi üyelerinden miR-200a, miR-200b ve miR-200c ifade seviyeleri gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında değerlendirildi. Yapılan analizler neticesinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da iIMMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında miR-200b ve miR-200c ifade seviyelerinin kanser hücrelerinde azalmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca iIMMD-MKH'lerindeki miR-200b ifade seviyeleri MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) azalmış olduğu bulundu. Ek olarak diğer deney gruplarında ifadeleri düşük olduğu için saptanamayan miR-200a seviyeleri, yalnız kültüre edilen meme kanser hücre hattı ile iSMD-MKH grupları arasında karşılaştırıldığında iSMD-MKH grubunda anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.9, Grafik 4.9).

Tablo 4.9: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-200b ve miR-200a ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	miR-200b ve miR-200a Ortalama ± Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	9,8±1,12 0±0		0.68 —	0.361 —	0.005** 0.064	0.008** 0.005**
2. MDA-MB-231+iIMMD-MKH	6,47±1,11 0±0	0.68 —		0.361 —	0.315 0.064	0.411 0.005**
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	7,64±0,77 0±0	0.361 —	0.361 —		0.055 0.064	0.083 0.005**
4. iIMMD-MKH	5,03±0,57 4,26±0,39	0.005** 0.064	0.315 0.064	0.055 0.064		0.855 0.354
5. iSMD-MKH	4,94±1,77 8,78±0,97	0.008** 0.005**	0.411 0.005**	0.083 0.005**	0.855 0.354	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır miR-200b, ikinci satır ise miR-200a bulgularını göstermektedir.)



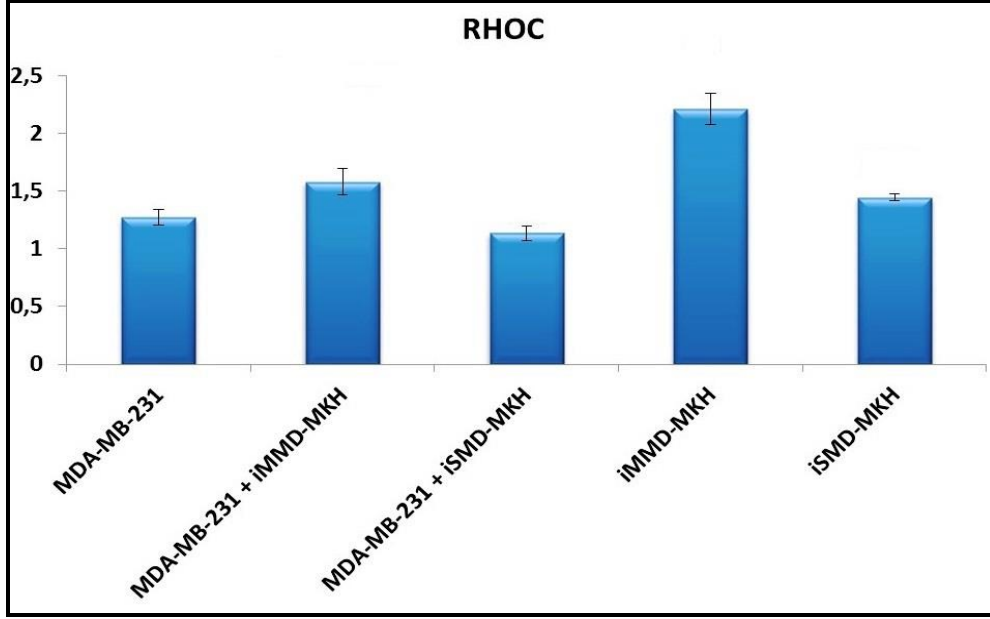
Grafik 4.9: miR-200b, miR-200c ve miR-200a ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Hücre çoğalması ve tümörün malign hale gelmesi ile ilişkili olan RhoC geni ifade seviyeleri analizlerinde, iIMMD-MKH'leri ile ortak kültür sonrasında MDA-MB-231 hücrelerindeki RhoC geni ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da artış olduğu belirlendi. iIMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinin ortak kültürü sonrasındaki RhoC ifadeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, iSMD-MKH'leri ile ortak kültür gerçekleştirilen grupta anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) azalış gözlemlendi. Ayrıca yalnız başlarına kültüre edilen iIMMD-MKH'lerinin RhoC ifade seviyeleri kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında (*: $p \leq 0,05$) anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi (**Tablo 4.10, Grafik 4.10**).

Tablo 4.10: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen RhoC ve HoxD10 genlerinin ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

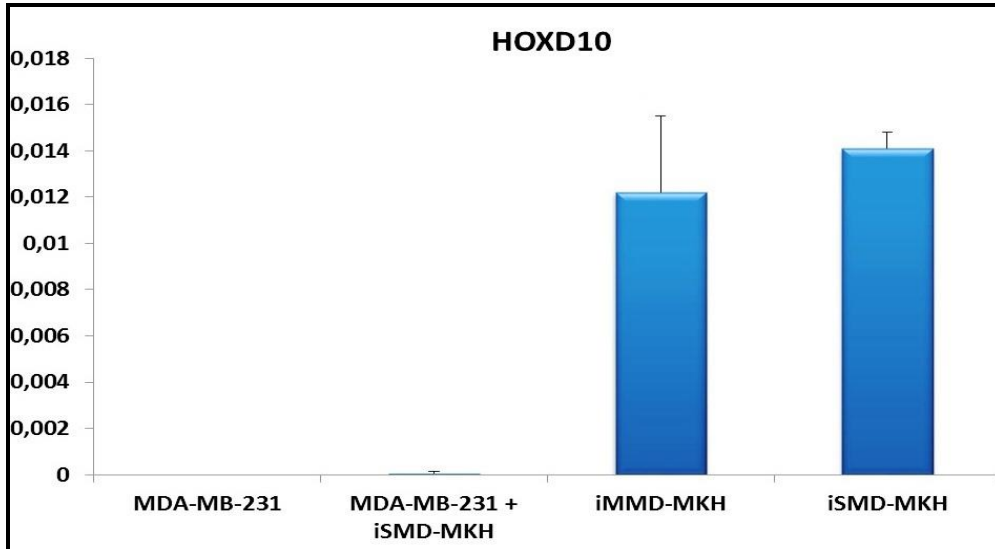
Deney Grupları	RhoC ve HOXD10 Ortalama± Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	1,27±0,07 0±0		0.121 —	0.411 0.194	0.014* 0.028*	0.361 0.018*
2. MDA-MB-231 + iIMMD-MKH	1,58±0,11 0±0	0.121 —		0.018* 0.194	0.361 0.028*	0.523 0.018*
3. MDA-MB-231 + iSMD-MKH	1,13±0,07 5,95E-05±7,70E-05	0.411 0.194	0.018* 0.194		0.001*** 0.415	0.083 0.335
4. iIMMD-MKH	2,21±0,14 1,22E-02±0,003	0.014* 0.028*	0.361 0.028*	0.001*** 0.415		0.121 0.882
5. iSMD-MKH	1,44±0,03 1,41E-02±0,0007	0.361 0.018*	0.523 0.018*	0.083 0.335	0.121 0.882	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır RhoC, ikinci satır ise HoxD10 bulgularını göstermektedir.)



Grafik 4.10: RhoC geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

miR-10b ve RhoC geni ile ilişkili olduğu düşünülen HoxD10 geninin ifade seviyeleri analizlerinde, MDA-MB-231 hücrelerinde ve bu hücrelerin iMMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültürleri sonrasında ifade seviyeleri çok düşük olduğu için saptanamamış olmasına rağmen, iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında az da olsa HoxD10 ifadesinin olduğu tespit edildi. Bununla birlikte iMMD-MKH'lerinin HoxD10 ifadeleri kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) yüksek olduğu belirlendi (**Tablo 4.10, Grafik 4.11**).



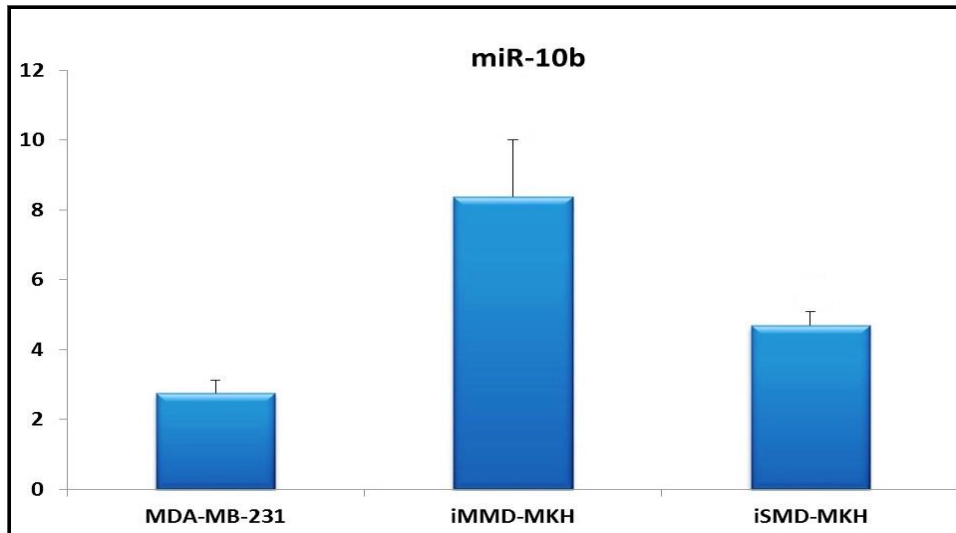
Grafik 4.11: HoxD10 ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Tümör boyutu ve yayılabilirliği ile ilişkili olduğu belirtilen miR-10b ifade seviyeleri, MDA-MB-231 hücrelerinin iMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültürleri sonrasında çok düşük olduğu için belirlenemedi. Bununla birlikte, MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile iMMD-MKH'lerindeki miR-10b ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin bir artış olduğu görüldü (**Tablo 4.11**, **Grafik 4.12**).

Tablo 4.11: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen miR-10b ve miR-27b ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	miR-10b ve miR-27b Ortalama± Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	2,76±0,36 2,61±0,37		0.203 0.068	0.203 0.927	0.090 0.008**	0.396 0.648
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	0±0 4,32±0,36	0.203 0.068		— 0.083	0.003** 0.411	0.034* 0.171
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0±0 2,60±0,69	0.203 0.927	— 0.083		0.003** 0.011*	0.034* 0.715
4. iMMD-MKH	8,39±1,61 5,21±0,34	0.090 0.008**	0.003** 0.411	0.003** 0.011*		0.396 0.028*
5. iSMD-MKH	4,70±0,39 2,82±0,27	0.396 0.648	0.034* 0.171	0.034* 0.715	0.396 0.028*	

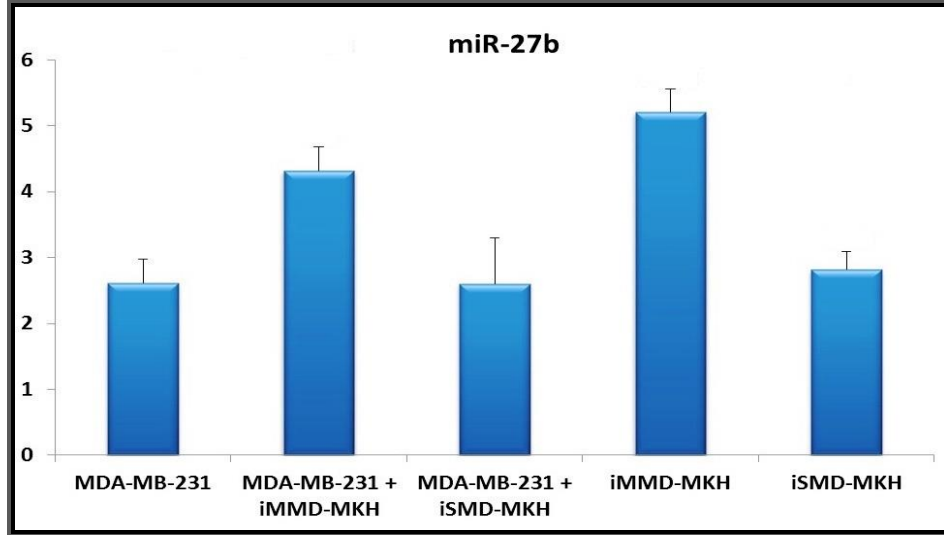
(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır miR-10b, ikinci satır ise miR-27b bulgularını göstermektedir.)



Grafik 4.12: miR-10b ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Pro-onkogenik özellikte olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiş olan miR-27b ifade seviyelerinin, iMMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmış olduğu tespit edildi. Benzer olarak iMMD-MKH'lerin yalnız kültüründeki ifade

seviyelerinin de MDA-MB-231 kanser hücre hattına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (**: $p \leq 0,01$) arttığı belirlendi. Bununla birlikte, iMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerindeki miR-27b ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, iMMD-MKH'lerinde anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) daha fazla ifade edildiği gözlemlendi (**Tablo 4.11, Grafik 4.13**).



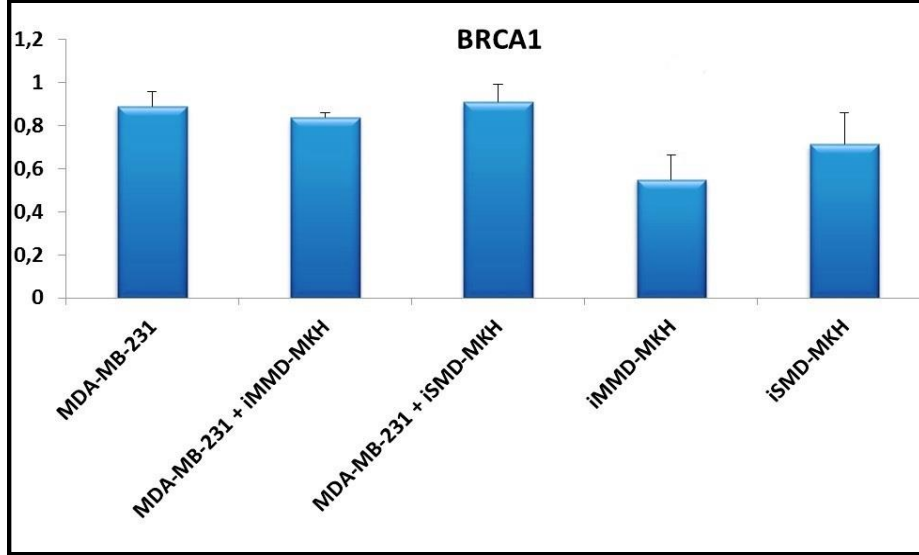
Grafik 4.13: miR-27b ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Gerçekleştirilen analizler neticesinde tümör baskılayıcı gen olarak bilinen BRCA1'in ifade seviyelerinde değişimler gözlemlenmiş olmasına rağmen MDA-MB-231 hücrelerinin iMMD-MKH ve iSMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültürleri sonrasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunamadı. Ancak, iMMD-MKH'lerindeki BRCA1 ifade seviyesi MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) düşük olduğu tespit edildi (**Tablo 4.12, Grafik 4.14**).

Tablo 4.12: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen BRCA1 ve CD44 ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

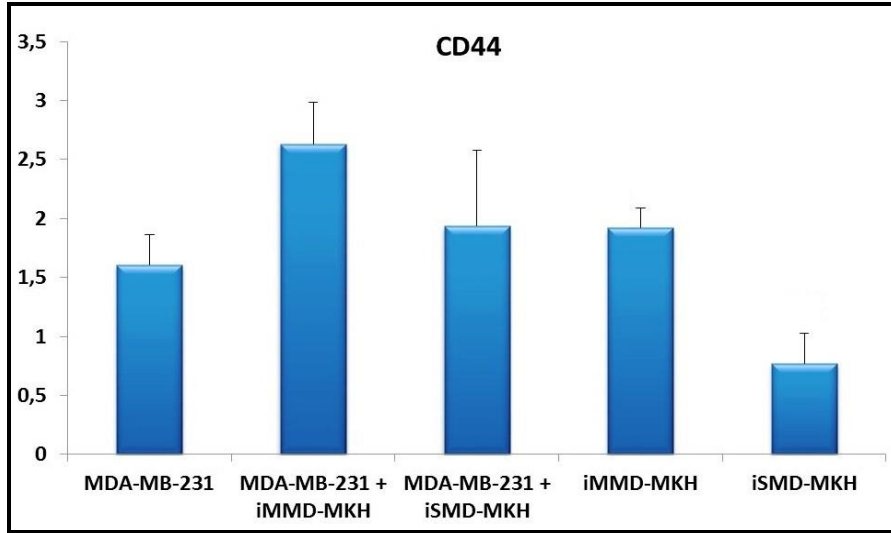
Deney Grupları	BRCA1 ve CD44 Ortalama \pm Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	0,89 \pm 0,07 1,61 \pm 0,31		0.493 0.028*	0.749 0.465	0.015* 0.361	0.120 0.273
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	0,84 \pm 0,02 2,63 \pm 0,17	0.493 0.028*		0.314 0.144	0.082 0.201	0.385 0.001***
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0,91 \pm 0,08 1,93 \pm 0,29	0.749 0.465	0.314 0.144		0.006** 0.855	0.061 0.068
4. iMMD-MKH	0,55 \pm 0,11 1,92 \pm 0,1	0.015* 0.361	0.082 0.201	0.006** 0.855		0.385 0.045*
5. iSMD-MKH	0,71 \pm 0,15 0,77 \pm 0,26	0.120 0.273	0.385 0.001***	0.061 0.068	0.385 0.045*	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (**Not:** Birinci satır BRCA1, ikinci satır ise CD44 bulgularını göstermektedir.)



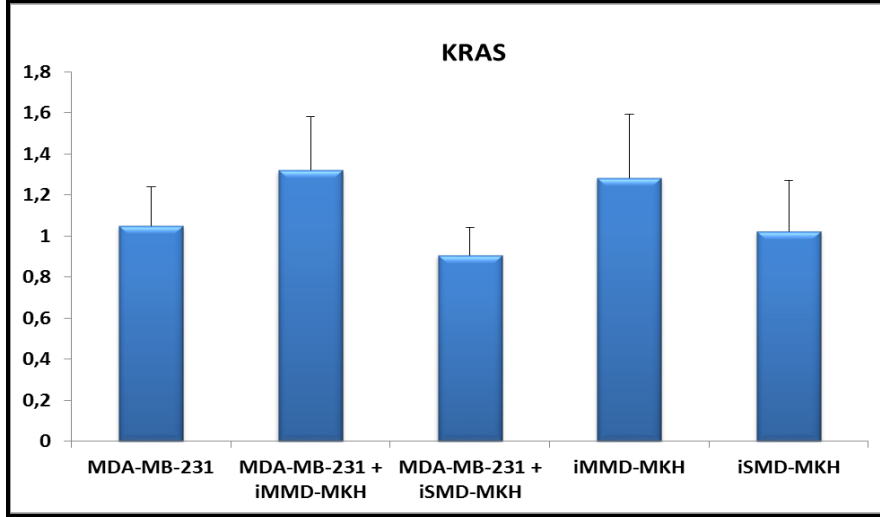
Grafik 4.14: BRCA1 geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Hücre çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi biyolojik süreçlerle ilişkili olduğu düşünülen CD44 geninin ifade seviyelerinin, iMMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında kanser hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($*: p \leq 0,05$) artmış olduğu belirlendi. Ek olarak, iMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerindeki ifade seviyeleri karşılaştırıldığında iMMD-MKH'lerinde anlamlı düzeyde ($*: p \leq 0,05$) fazla olduğu gözlemlendi (**Tablo 4.12, Grafik 4.15**).



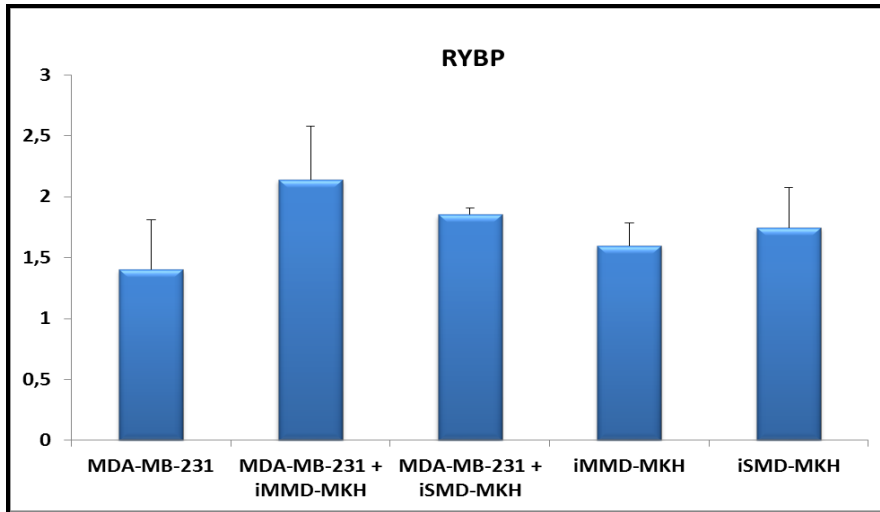
Grafik 4.15: CD44 geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Ras gen ailesinden olan KRAS geni ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da deney grupları arasında değişimler gözlemlendi. Özellikle iMMD-MKH gruplarındaki ifadesinin diğer gruplara göre daha fazla olduğu, zıt olarak iSMD-MKH'lerinde ise daha az olduğu belirlendi (**Grafik 4.16**).



Grafik 4.16: KRAS geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Transkripsiyonel baskılayıcı olarak ifade edilen RYBP geninin ifade seviyelerinin analizleri neticesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da değişimler saptandı. MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla iMMD-MKH ve iSMD-MKH'lerinde RYBP geninin ifadesinin az da olsa fazla olduğu tespit edildi (**Grafik 4.17**).



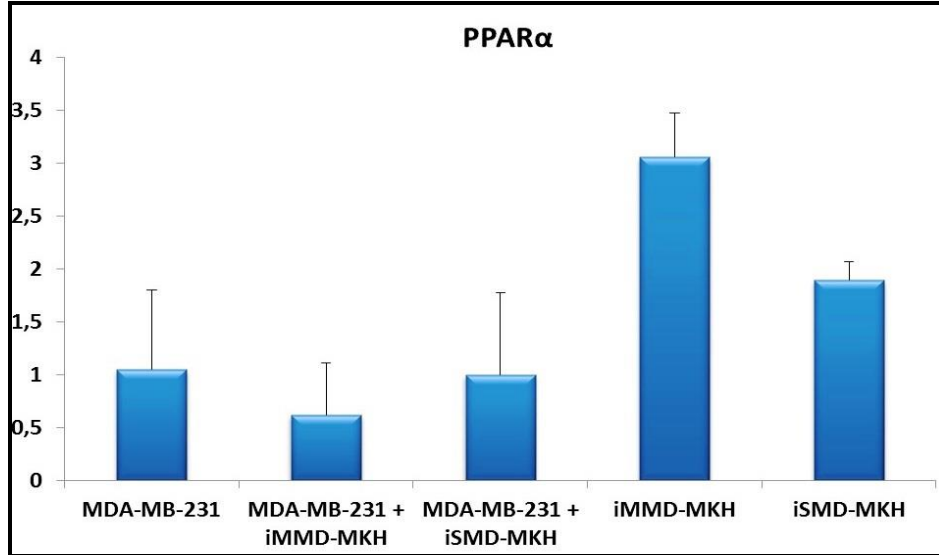
Grafik 4.17: RYBP geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Hüresel farklılaşma, gelişme ve aynı zamanda tümör oluşumuyla ilişkili olduğu bilinen PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) ailesinin bir üyesi olan PPAR α ifade seviyelerinin iMMD-MKH'leri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında kanser hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalmış olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte iMMD-MKH'lerindeki ifade seviyeleri MDA-MB-231 hücre hattı ile karşılaştırıldığında ise anlamlı düzeyde (*: $p \leq 0,05$) yüksek olduğu tespit edildi (**Tablo 4.13, Grafik 4.18**).

Tablo 4.13: Gerçek zamanlı-PCR ile analiz edilen PPAR α ifade değişim oranlarının ortalamaları, standart sapmaları ve deney grupları arasındaki istatistiksel anlam dereceleri.

Deney Grupları	PPAR α Ortalama \pm Standart sapma	İstatistiksel Değerlendirme				
		1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
1. MDA-MB-231	1,05 \pm 0,75		0.584	0.927	0.022*	0.171
2. MDA-MB-231+iMMD-MKH	0,62 \pm 0,49	0.584		0.523	0.005**	0.055
3. MDA-MB-231+iSMD-MKH	0,99 \pm 0,78	0.927	0.523		0.028*	0.201
4. iMMD-MKH	3,05 \pm 0,42	0.022*	0.005**	0.028*		0.361
5. iSMD-MKH	1,89 \pm 0,17	0.171	0.055	0.201	0.361	

(***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$)



Grafik 4.18: PPAR α geni ifade seviyelerinin gerçek zamanlı-PCR ile analiz sonuçları (X eksenini deney gruplarını, Y eksenini ise referans gene göre kat değişimlerini göstermektedir).

Gelişimsel süreçler ve onkogenез ile ilişkili olduğu belirtilen WNT (Wingless-type MMTV integration site family) gen ailesinin bir üyesi olan WNT2'nin ifade seviyeleri deney gruplarında çok düşük olduğu için tespit edilemedi.

4.7-İfade Seviyeleri Belirlenen Gen ve miRNA'ların Tanısal Değerinin ROC Analiziyle Belirlenmesi

Çalışmamızda kanser hücreleri, malign özellikteki stromal hücreler ve bu iki hücre grubunun ortak kültürleri sonrasında ifade seviyelerini belirlediğimiz gen ve miRNA'ların bu deney grupları arasında tanısal bir değeri olup olmadığı ROC eğri analizi ile değerlendirildi. Ölçümlerin istatistik sonuçları, hassasiyet ve özgüllük değerleri **Tablo 4.14, 4.15 ve 4.16**'da, kriter değerleri **Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16**'da gösterildi.

Yapılan ölçümlerin tek tek tanısal değerleri analiz edildi ve sonuç olarak hassasiyet ve özgüllük değerlerinin önemli derecede yüksek oldukları belirlendi. Ancak kanser hücre grubunda miR-373, miR-520c ve PPAR α 'nın özgüllük değerlerinin düşük olduğu buna rağmen malign stromal hücrelerde ve bu hücrelerin kanser hücreleri ile ortak kültürlerinin gerçekleştirildiği deney gruplarında bu değerlerin yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 4.14: MDA-MB-231 kanser hücre hattında gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri

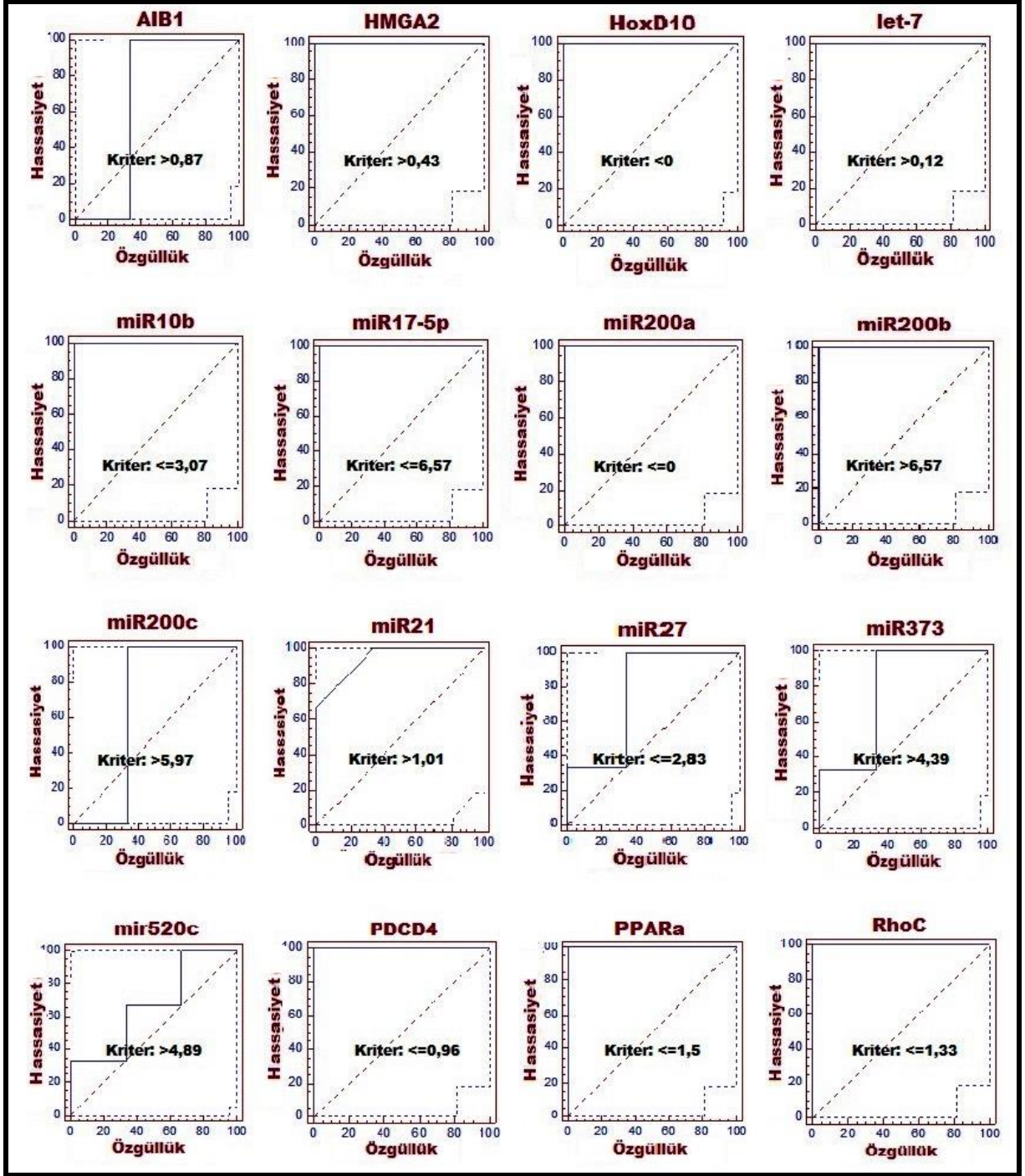
MDA-MB-231 grubu ölçümleri	Standart Hata	p değeri	Hassasiyet / Özgüllük Değerleri
let-7	0,000	0.000	100 / 100
miR17-5p	0,000	0.000	100 / 100
miR10b	0,000	0.000	100 / 100
miR21	0,0786	0.0001	100 / 66,67
miR27	0,248	0.2636	100 / 66,67
miR373	0,248	0.2636	100 / 66,67
miR520c	0,272	0.5403	100 / 33,33
miR200a	0,000	0.000	100 / 100
miR200b	0,000	0.000	100 / 100
miR200c	0,333	0.6171	100 / 66,67
HMGA2	0,000	0.000	100 / 100
AIB1	0,333	0.6171	100 / 66,67
HoxD10	0,000	0.000	100 / 100
RhoC	0,000	0.000	100 / 100
PDCD4	0,000	0.000	100 / 100
PPAR α	0,000	0.000	100 / 100

Tablo 4.15: Malign meme dokusu kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri

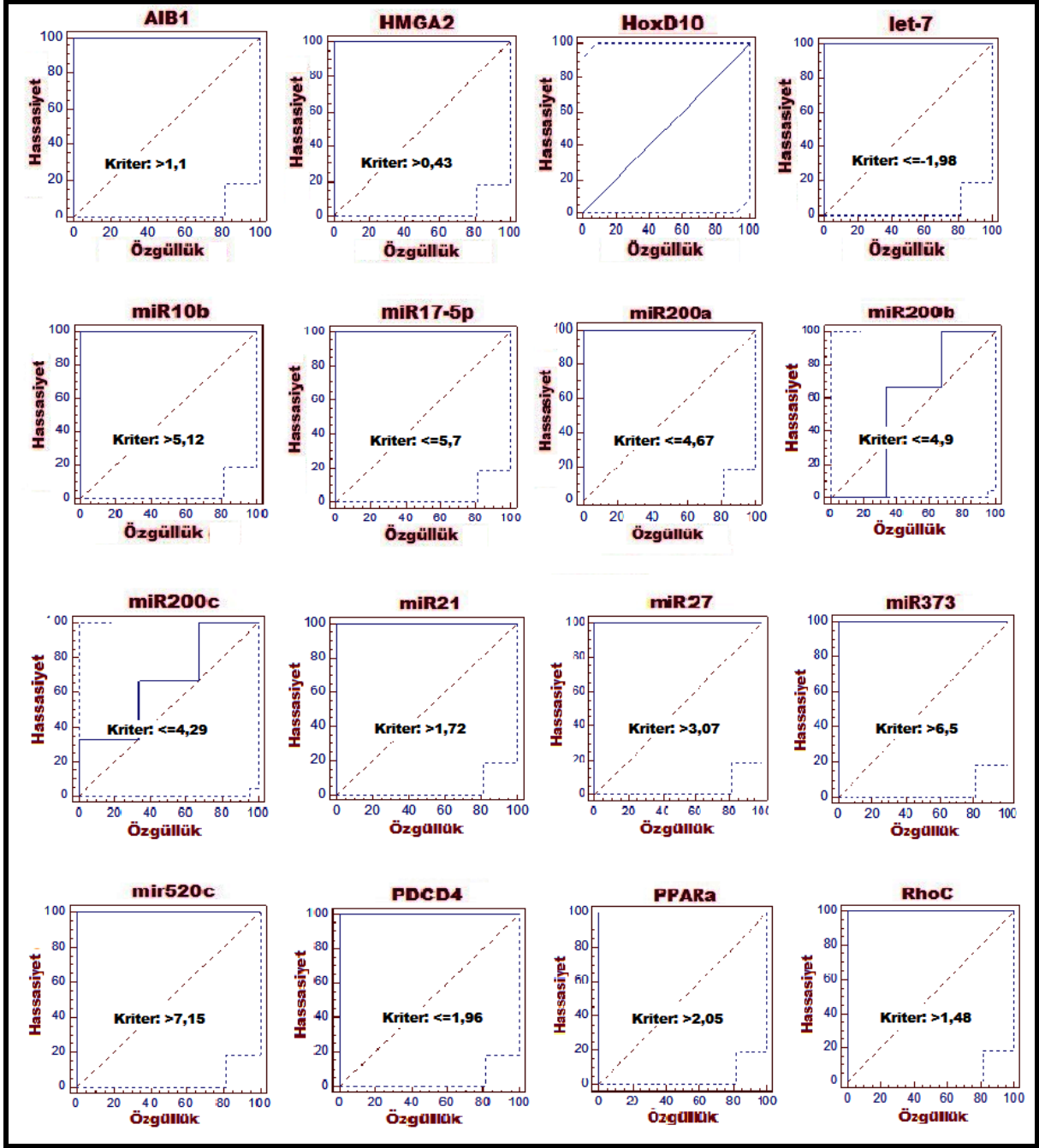
iMMD-MKH grubu ölçümleri	Standart Hata	p değeri	Hassasiyet / Özgüllük Değerleri
let-7	0,000	0.000	100 / 100
miR17-5p	0,000	0.000	100 / 100
miR10b	0,000	0.000	100 / 100
miR21	0,000	0.000	100 / 100
miR27	0,000	0.000	100 / 100
miR373	0,000	0.000	100 / 100
miR520c	0,000	0.000	100 / 100
miR200a	0,000	0.000	100 / 100
miR200b	0,314	0.8597	66,67 / 66,67
miR200c	0,272	0.5403	33,33 / 100
HMGA2	0,000	0.000	100 / 100
AIB1	0,000	0.000	100 / 100
HoxD10	0,000	1.000	-
RhoC	0,000	0.000	100 / 100
PDCD4	0,000	0.000	100 / 100
PPARα	0,000	0.000	100 / 100

Tablo 4.16: MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile malign stromal hücrelerin ortak kültürleri sonrası gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri

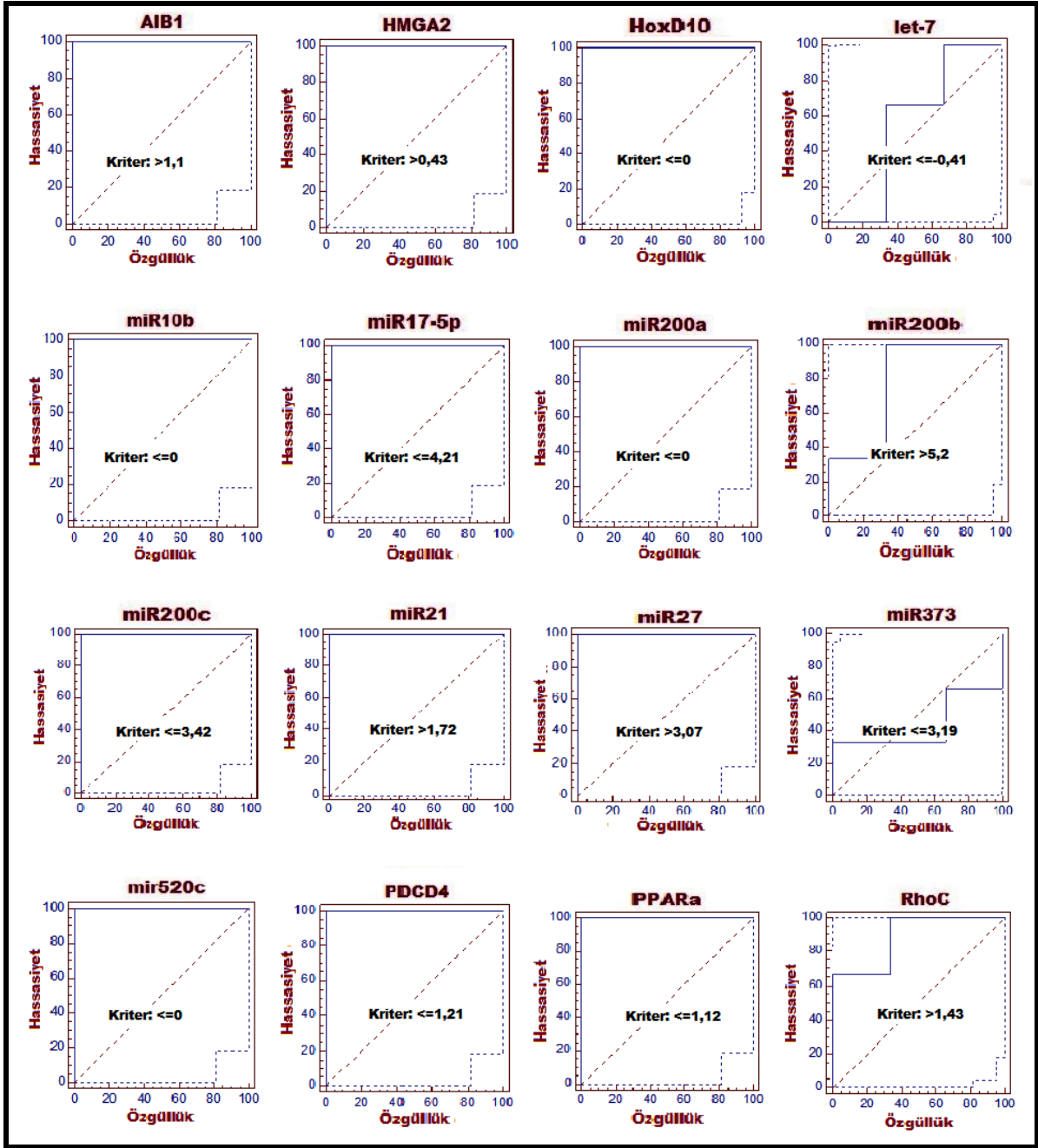
MDA-MB-231 + iMMD-MKH grubu ölçümleri	Standart Hata	p değeri	Hassasiyet / Özgüllük Değerleri
let-7	0,314	0,8597	66,67 / 66,67
miR17-5p	0,000	0.000	100 / 100
miR10b	0,000	0.000	100 / 100
miR21	0,000	0.000	100 / 100
miR27	0,000	0.000	100 / 100
miR373	0,314	0.8597	33,33 / 100
miR520c	0,000	0.000	100 / 100
miR200a	0,000	0.000	100 / 100
miR200b	0,248	0.2636	100 / 66,67
miR200c	0,000	0.000	100 / 100
HMGA2	0,000	0.000	100 / 100
AIB1	0,000	0.000	100 / 100
HoxD10	0,000	0.000	100 / 100
RhoC	0,157	0.0133	100 / 66,67
PDCD4	0,000	0.000	100 / 100
PPARα	0,000	0.000	100 / 100



Şekil 4.14: MDA-MB-231 kanser hücre hattında gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri sonuçları ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.



Şekil 4.15: Malign meme dokusu kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.



Şekil 4.16: MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile malign stromal hücrelerin ortak kültürleri sonrası gen ve miRNA ifadelerinin ROC analizleri ile hassasiyet ve özgüllük değerleri.

5- TARTIŞMA

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser tıp tarihi boyunca en yaygın araştırma konularından biri olmuş ve olmaya devam etmektedir. Tanı ve tetkik yöntemlerinin günden güne gelişmesi ile her yıl daha fazla kanser vakası teşhis edilmektedir. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen ve sürekli artış gösteren kanser türüdür (Akdeniz, 2010; Pekmez, 2010). Son zamanlarda meme kanserinin teşhisi, evrelendirilmesi, tedavisi ve hastaların sağ kalımlarıyla ilgili olarak elde edilen gelişmeler neticesinde moleküler incelemeler önem kazanmıştır. Ancak meme kanserinin erken dönemde tespit edilebilmesi, hastalığın tam olarak anlaşılıp prognostik faktörlerin belirlenebilmesi ve tümör mikroçevresini de içine alan hedefe yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilebilmesi açısından daha pek çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Ayrıca son yıllarda miRNA'ların düzenlenmesindeki bozuklukların başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde rol oynadığı gösterilmiş, ifade profillerinin belirlenmesinin tanı ve tedavide fayda sağlayacağı öngörülmüştür. Kanserli ve normal dokularda miRNA'lar ile onların hedefledikleri mRNA'ların ifade düzeylerinin belirlenip değerlendirilmesinin kanserin erken tanı ve tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir (Çelik Aşçı et al., 2013). Bu nedenlerle, gerçekleştirdiğimiz çalışmada kanser hücreleri ile sağlıklı ve malign meme dokusundan elde edilen stromal hücrelerin ortak kültürlerinde birbirleri üzerine nasıl etkiler gösterdiğini ve bu olası etkilerde miRNA'ların rolünü araştırmayı amaçladık.

Tümör mikroçevresi, tümör hücreleri ile immün, stromal ve inflamatuvar hücrelerden oluşur. Bu hücrelerden salınan sitokinler, büyüme faktörleri ve bağlantı (adhezyon) moleküllerinin tümör ilerlemesi ve metastazını destekleyebileceği belirtilmektedir. Bahsi geçen bu hücrelerin hepsi birbirleriyle yakından ilişkilidirler, inflamatuvar ve pro-angiogenik süreçlerde önemli rol oynarlar ve tümör hücre çoğalmasını desteklerler (Nery et al., 2013; Sullivan, 2011; Zhao et al., 2012).

Ayrıca ilginç olarak, kronik inflamasyon ve tümör gelişimi ya da ilerlemesi arasında bir ilişki olduğu, kanserlerin yaklaşık %15'inin de inflamatuvar etyolojiye dayandırıldığı da rapor edilmiştir. Normal fizyolojik inflamatuvar yanıt, mekanik uyarın, enfeksiyöz ajanlar ya da kimyasal tahrişle oluşan doku hasarı üzerine ortaya çıkar. Kronik patolojik inflamasyona ise tümör hücreleri gibi devam eden kalıcı bir uyarının varlığı aracılık eder. Uzun süren bu inflamatuvar sitokin maruziyetinin ise DNA hasarı ve angiogenezin indüksiyonu aracılığıyla tümör büyümesini destekleyecek potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Lewis, Varghese, Xu, & Alexander, 2006).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, insan MKH'lerin tanımlanmasında 3 minimal ölçüt önermiştir. Bu ölçütlere göre MKH'ler (i) standart kültür koşullarında plastik kültür kabına yapışma özelliğinde olmalı; (ii) yüzey moleküllerinden CD105, CD73 ve CD90'ı pozitif olarak, CD45, CD34, CD14, CD11b ve HLA-DR gibi antijenleri ise negatif olarak ifade etmeli; (iii) *in vitro* olarak osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşma özelliğinde olmalıdırlar (D.-R. Chen et al., 2014; Dominici et al., 2006; Guan & Chen, 2013; Nery et al., 2013; Özen & Sancak, 2014).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, öncelikle sağlıklı ve malign meme dokularından MKH'ler uygun yöntemler eşliğinde izole edilmiş ve izole edilen hücreleri tanımlamak amacıyla literatürde belirtilen ölçütlere uygun olarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon amaçlı gerçekleştirilen akım sitometrik analizler neticesinde sağlıklı ve malign meme dokusu kaynaklı MKH'lerin CD105, CD29, CD73, CD44, CD90, CD71, CD10, CD13 gibi belirteçler bakımından pozitif; CD34, CD33, CD45 ve HLA G gibi belirteçler bakımından ise negatif oldukları belirlenmiştir.

Ek olarak, elde ettiğimiz MKH'ler karakterizasyon amacıyla *in vitro* koşullarda adipojenik, osteojenik ve nörojenik olarak farklılaştırılmıştır. Sonuç olarak sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücrelerin *in vitro* koşullarda kimyasal uyanlarla adipojenik, osteojenik ve nörojenik yönde farklılaşabildikleri bir takım parametreler ile kontrol edilerek ortaya konmuştur. Adipojenik farklılaşmada inkübasyon süresinin sonunda gerçekleştirilen Oil red O boyaması ile, hücrelerin sitoplazmalarında yağ damlacıklarının olduğu belirlenmiştir. Osteojenik indüksiyon sonrası Alizarin kırmızısı boyamaları sonucunda kalsifiye kemik nodülleri tespit edilmiştir. Farklılaştırma çalışmaları adına son olarak gerçekleştirilen nörojenik farklılaşmada, indüksiyon sonrası hücrelerin morfolojik olarak nöron benzeri hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir. Ayrıca nörojenik farklılaşmaya alınan stromal hücrelerin bazı nörojenik belirteçlerle immünfloresan boyamaları gerçekleştirilmiş ve sonuçta pozitif reaksiyon verdikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, hem sağlıklı hem de malign meme dokusu kaynaklı MKH'lerin *in vitro* olarak farklılaşma özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir.

Karakterizasyon amaçlı olarak gerçekleştirilen akım sitometrik analizler neticesinde elde edilen bulguların literatürlerde de belirtilen CD105, CD73 ve CD90 gibi belirteçlerin pozitif; CD45, CD34 gibi belirteçlerin negatif olmaları nedeniyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklılaştırma çalışmaları sonucunda elde edilen çıktılardan da literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Dominici et al., 2006; Nery et al., 2013).

Sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilmiş olan hücrelerin MKH karakterinde oldukları gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde

belirlendikten sonra bu hücrelerin meme kanser hattı hücreleri ile ortak-kültürleri gerçekleştirilmiştir. Ortak-kültür çalışmaları sonrasında stromal hücreler ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin çoğalma kapasitelerini göstermek amacıyla gerçekleştirilmiş olan WST-1 testi sonucunda stromal hücrelerin kanser hücrelerinin çoğalma kapasitelerini arttırdığı belirlenmiştir. Hatta malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin kanser hücrelerinin çoğalma kapasitelerini sağlıklı stromal hücrelere oranla daha belirgin düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum da bize tümör mikroçevresinde bulunan stromal hücrelerin malign özellik kazanmaya daha yatkın olduğunu ek olarak kanser hücreleri ile etkileşimleri sonucunda stromal hücrelerden salınan bazı faktörlerin tümör hücre gelişimi ve ilerlemesine neden olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamıza benzer olarak son yapılan bazı çalışmalarda MKH'ler ile ortak-kültür sonrasında tümör hücrelerinin çoğalması ve metastaz yeteneklerinin artışı ile ilişkili bulgular olduğu belirtilmiştir (Guan & Chen, 2013). Ayrıca Karnoub ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmalarında kök hücrelerin meme tümör hücrelerinin çoğalması ve metastazını desteklediğini ve kemik iliği kaynaklı MKH'lerin, meme kanser hücrelerinin kaynaklandığı ortama doğru göç ettiğini göstermişlerdir (Karnoub et al., 2007). Benzer olarak McLean ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada yumurtalık tümör mikroçevresindeki MKH'ların tümörögenezi ilerlettiğini destekler nitelikte sonuçlar bulduklarını rapor etmişlerdir (McLean et al., 2011).

Sitokinler, hem stromal hücrelerin hem de tümör hücrelerinin büyümesini, sinyalizasyonunu ve farklılaşmasını düzenlerler. Stromal hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin malign hücrelerin davranışlarını etkileyebilirken, kanser hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin tümör mikroçevresi içerisinde optimum büyüme koşulları sağlamak için işlev gördükleri rapor edilmiştir (Lewis et al., 2006). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada kanser mikroçevresinde stromal hücre kaynaklı olduğu düşünülen sitokinlerin seviyelerini belirleyebilmek amacıyla, malign ve sağlıklı meme dokularından elde edilen stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında IL-8, IL-6 ve IL-1 β düzeylerini ELISA yöntemi ile saptadık.

Sitokinlerin hücreler arasındaki kemotaksiye aracılık eden bir grubu olan kemokinler, yapılarındaki sistein motiflerine göre sınıflandırılan geniş bir ailedir. Aslında nötrofil kemoatraktan olarak sınıflandırılan kemokin ailesinin bir sitokini olan IL-8'in çeşitli insan kanserlerinde tümörün ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Tümör ve tümör mikroçevresindeki IL-8'in anjiogenezi düzenlemesi, kanser hücre büyümesi ve sağ kalımı ile tümör hücre hareketindeki olası fonksiyonları aracılığıyla tümör ilerlemesine katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Singh, Simões, Howell, Farnie, & Clarke, 2013; Waugh & Wilson, 2008; Yuan, Chen, Yao, & Yang, 2005).

Biz de IL-8 seviyelerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz ELISA testi sonucunda, sağlıklı ve malign meme dokusu kaynaklı stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında salınan IL-8 seviyelerinin belirgin şekilde arttığını hatta bu artışın malign stromal hücreler ile ortak kültür sonrasında sağlıklılara oranla daha fazla olduğunu gözlemledik. Benzer olarak son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser hücreleri ile stromal hücreler arasındaki etkileşimin yanısıra stromal hücrelerdeki IL-8 ve diğer büyüme faktörlerinin ifadesinin kanser hücrelerini uyurabileceği belirtilmektedir (Singh et al., 2013; Waugh & Wilson, 2008; Yuan et al., 2005).

Kanserin patogenezinde önemli rol oynayan sitokinlerden biri IL-6'dır. Multifonksiyonel bir sitokin olan IL-6'nın, tümör hücrelerini de içeren farklı hücre tiplerinin biyolojik aktivitelerinde ayrıca çeşitli malign durumlarda büyüme ve farklılaşmanın yönlendirilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Conze et al., 2001; Dethlefsen, Højfeldt, & Hojman, 2013; Knüpfer & Preiß, 2007; Sullivan, 2011). IL-6 seviyelerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz ELISA testi sonucunda, stromal hücreler ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında ortama salınan IL-6 seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığını, malign stromal hücreler ile ortak kültür sonrasında ise artışın daha belirgin olduğunu saptadık. De Luca ve arkadaşları (2012), MKH'lerden salgılanan IL-6 ve VEGF'nin meme kanseri hücre göçünün desteklenmesinde parakrin faktör olarak etki edebileceklerini rapor etmişlerdir (De Luca, Lamura, Gallo, Maffia, & Normanno, 2012).

Bunlara ek olarak, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda çeşitli rolleri olan IL-1'in de birçok tümör tipinde ifadesinin arttığı ve tümör ilerlemesinde etkili bir faktör olabileceği rapor edilmiştir. IL-1 ailesi 3 proteinden oluşur; IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra). IL-1 α ve IL-1 β farklı genlerden kaynaklanırlar fakat fonksiyonel olarak benzerdirler ve aynı reseptöre bağlanırlar (Lewis et al., 2006). Çalışmamızda IL-1 β seviyelerini belirlediğimiz ELISA testi sonucunda, malign meme dokusu stromal hücreleri ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında salgılanan IL-1 β seviyelerinde anlamlı olmasa da artış belirledik. Soria ve arkadaşları (2011), IL-1 β ve TNF α gibi faktörlerin koordineli ekspresyonlarının kanserin seyri açısından önemli olabileceğini ve hastalığın tekrarını teşvik edebileceğini rapor etmişlerdir (Soria et al., 2011). Carmi ve arkadaşları (2013) IL-1 β 'nin tümör mikroçevresinde bulunan ana bir sitokin olduğuna vurgu yaparak, miyeloid hücrelerinden üretilen IL-1 β 'nin endotelial hücrelerden VEGF salınımını aktive ettiğini bu durumda anjiogenez ve tümörün ilerlemesi için inflamatuvar mikroçevrenin oluşumunu sağladığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte elde ettikleri bulgular neticesinde IL-1 β inhibisyonunun etkili bir anti-tümör terapi olabileceğini belirtmişlerdir (Carmi et al., 2013).

Benzer olarak yapılan çalışmalarda IL-6, IL-8 ve TNF gibi faktörlerin direkt ya da indirekt olarak tümör büyümesini destekleyebileceği belirtilmiştir (Lewis et al., 2006). Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kemik iliği kaynaklı mezenchimal kök hücrelerin meme tümör büyümesini sitokin ağları oluşturarak hızlandırabileceğini belirtmişlerdir (S. Liu et al., 2011).

Kanser hücresinin önemli özelliklerinden biri gen ekspresyon seviyelerinde gözlemlenen değişikliklerdir. Bu değişiklikler neticesinde hücreler kontrolsüz çoğalma özelliği kazanabilmektedir. Çok basamaklı bir süreç olan kanser gelişiminde çeşitli onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde gelişen mutasyonların birikimi söz konusudur ve durum tümör tiplerine göre farklılık göstermektedir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonları, hücrelerin kontrolsüz çoğalması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi bir takım malign özellikler kazanmasına neden olurlar (Aslan, 2010; Öncel, 2012).

mRNA molekülünün yıkıma uğraması ya da translasyona girememesiyle posttranskripsiyonel gen susturumu oluşur. Bu esnada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı ya da şeklinde bir değişiklik olmamakla birlikte, sentezlenmiş olan mRNA'ya kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır (Bodur & Demirpençe, 2010). miRNA'lar hayvan ve bitkilerde gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak ortaya çıkmışlardır. Hayvanlarda miRNA'lar ağırlıklı olarak 3' ucunda transle olmayan bölgelerde bulunan kısmen tamamlayıcı olduğu dizilere bağlanırlar ve translasyonel baskılamaya bazen de hedef mRNA'nın yıkımına aracılık ederler. miRNA'ların çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi hücrel süreçlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, anormal miRNA ekspresyonlarının kanseri de içine alan bazı hastalıklarla ilişkili olduğu da belirtilmektedir (Frankel et al., 2008; Lal, 2010; Zhao et al., 2012).

Geçen birkaç yıl içinde, kanserle-ilişkili sinyal yollarının düzenleyicileri olarak miRNA'ların büyük potansiyeli olduğu ortaya çıkmıştır. Kanser ve kanserin hücrel sinyal yollarındaki düzensizlik ile miRNA'lar arasındaki ilişkinin anlaşılmasına miRNA'ların hedef tanımasındaki bilgi eksikliği engel olmuştur. Buna rağmen çeşitli çalışmalarda, hedefe bağlanmada miRNA bağlanma bölgesinin merkezi bir rol oynadığı belirtilmiş, ek olarak fonksiyonel miRNA'nın hedef bağlanma bölgesine tam olmayan eşleniklik ile bağlandığı da rapor edilmiştir. Bu nedenle, miRNA hedef tanıma mekanizma ve yöntemleri hakkında bilgi elde etmek için deneysel yaklaşımlara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (Frankel et al., 2008).

miRNA'ların büyük çoğunluğunun intronik bölgelerden kodlandığı ancak genler arası bölgelerde veya eksonlardan da kodlanabildiği ifade edilmektedir. Bunun yanında kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da fragil bölgelerin %50'sinden fazlasının miRNA'ları kodlayan genlerden

oluşması miRNA'ların kanser patogeneğinde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. *C. elegans* ve *Drosophila* canlılarında tanımlanan ilk miRNA'ların bazılarının kanserle ilişkili yollarda işlev gördükleri gösterilmiştir. miRNA'ların karsinogeneşte etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, normal dokular ile karşılaştırmalı olarak farklı kanser türlerinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş ve farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılıkların belirlenmesi ile insan kanserlerinde etkili olan miRNA'lar ve patolojik rolleri ortaya konulmuş ve konulmaya devam etmektedir. Ek olarak miRNA'ların ifade profillerinin belirlenmesi kanserlerin sınıflandırılması açısından da oldukça önemlidir (Çelik Aşçı et al., 2013; Frankel et al., 2008; Küçük hüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010; Zhao et al., 2012).

Calin ve arkadaşlarının 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları çalışmayla kanserleşme süreci ile miRNA'lar arasındaki ilişki ilk defa ortaya konulmuştur. KLL hastaları ile yapılan bu çalışmada hastaların yarısından fazlasında 13q14 bölgesinin delesyona uğradığı ve bu bölgede yalnızca mir-15a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu belirlenmiş sonrasında yapılan değerlendirmeler neticesinde KLL hastalarının yaklaşık %68'inde bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı gösterilmiştir (Çelik Aşçı et al., 2013; Frankel et al., 2008; Küçük hüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

Jiang ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla, akciğer, meme, kolorektal, hematolojik, prostat, pankreatik ve baş ve boyun kanserlerinden oluşan 32 insan hücre hattında 222 adet prekürsör miRNA ekspresyon profillerini incelemişler, sonuç olarak da bazı miRNA öncüllerinin, çoğu hücre hattında benzer seviyelerde ifade olduğunu belirtmişlerdir (Jiang, Lee, Gusev, & Schmittgen, 2005).

Iorio ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, miRNA'ların normal meme dokusuyla karşılaştırıldığında insan meme kanserlerinde anormal şekilde ifade edildiğini göstermişlerdir. Genel olarak bakıldığında, mir-125b, mir-145, mir-21 ve mir-155 gibi miRNA'ların ifadelerinin normal dokulara kıyasla kanser dokularında açıkça ayrı olduğunu belirtmişler (Iorio et al., 2005).

Yapılan çalışmalar neticesinde miRNA'ların, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin yeni bir sınıfı olarak işlev gördükleri belirtilmiştir. miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'lara göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilir. Görevleri onkogenlerin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak belirtilmektedir. Bu miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve sonuçta tümör oluşumuna ya da ilerlemesine neden olur. Tümör baskılayıcı miRNA'ların aksine, onko-mir olarak ifade edilen miRNA'ların ise hedefi olan tümör baskılayıcı genin ifadesini azaltarak

kanserin gelişimini arttırıcı yönde işlev gösterdikleri bilinmektedir (Lal, 2010; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; Tunalı & Tiryakioğlu, 2010).

Cimmino ve arkadaşları 2005 yılında yayınladıkları çalışma ile miR-15a ve miR16-1'in ifade seviyelerinin KLL hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters orantılı olduğunu ve bu miRNA'ların tümör baskılayıcı olarak işlev gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (Cimmino et al., 2005; Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Saydam et al., 2011).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada sağlıklı ve malign meme dokularından elde edilen stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında, meme kanseri ile ilişkili let7, miR-17-5p, miR-21, miR-27, miR-10b, miR-373, miR-520c, mir-200 ailesi gibi miRNA'ların ayrıca bu miRNA'lar ile ilişkilendirilen yolaklara ait HMGA2, AIB1, PDCD4, HOXD10, RHOC, RYBP, CD44, BRCA1, KRas, Wnt2 gibi genlerin ifade seviyeleri tüm deney gruplarında real-time PCR ile kantitatif olarak belirlendi.

Tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA'lardan biri de, let-7 ailesinin üyeleridir. *C. elegans*'da canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen bir miRNA olarak keşfedilmiştir. İnsan kanserlerinde genelde delesyona uğramış kromozom bölgesinde yer alırlar (Seydel & Aksoy, 2009). 2005 yılında Johnson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla, let-7 ailesinin üyelerinin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen bir tümör basılayıcı fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Yakın zamanda yapılan son çalışmalarda, let-7 miRNA ailesi üyelerinin iyi bilinen başka bir onkogen olan HMGA2'nin mRNA'sını da hedef aldığı belirtilmektedir. Sonuç olarak H-RAS ve HMGA2 genleri let-7'nin aşırı ekspresyonuyla downregüle edilmektedir (Küçükhüseyin & Öztürk, 2013; Lal, 2010; Y. S. Lee & Dutta, 2007; Saydam et al., 2011; Seydel & Aksoy, 2009; F. Yu et al., 2007).

High-Mobility Group A (HMGA) ailesi 3 protein içerir: HMGA1a, HMGA1b ve HMGA2. Bu proteinler iki farklı gen tarafından kodlanırlar. HMGA proteinleri, AT-zengin DNA dizilerinin küçük oluşuna DNA bağlama domainleri aracılığıyla bağlanırlar. HMGA proteinleri kendiliğinden transkripsiyonel aktivite göstermezler, fakat birçok genin aktivitesini düzenlerler. Normal hücrelerde ve yetişkin dokularda HMGA protein seviyelerinin çok düşük ya da hiç olmadığı, fakat çoğu tümörde, neoplastik dönüşüm geçirmiş hücrelerde ve embriyonik hücrelerde yüksek olduğu belirtilmektedir. HMGA aşırı ekspresyonunun büyük ölçüde yüksek malign fenotiple aynı zamanda metastaz varlığı ve sağ kalımla ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (Y. S. Lee & Dutta, 2007; Puca et al., 2014).

Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin let-7 ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde düşük olduğunu bununla birlikte kanser hücreleri ile ortak kültürleri sonrasında ise ifade seviyelerinin kanser hücrelerinin yalnız kültürlerine oranla düşüş

gösterdiğini; ek olarak sağlıklı meme dokusu kaynaklı stromal hücreler ile ortak kültürleri sonrasında ise kanser hücrelerindeki *let-7* ifade seviyelerinin az da olsa artış gösterdiğini tespit ettik. *Let-7* ifade seviyelerine zıt olarak HMGA2 onkogeninin ifade seviyelerinin ise malign stromal hücrelerin hem yalnız kültürlerinde hem de kanser hücreleri ile olan ortak kültürlerinde, kanser hücrelerinin yalnız kültürlerine oranla yüksek olduğunu belirledik.

Bizim bulgularımıza benzer olarak, Lee ve Dutta yaptıkları çalışma neticesinde, HMGA2 onkogeni ve büyümeyi baskılayıcı *let-7* arasında karşılıklı bir ilişki olduğunu açığa çıkarmışlardır. Ek olarak, tümöröenez sırasındaki HMGA2 aşırı artışının *let-7*-bağımlı yollarla bağlantılı olarak ortaya çıkabileceği varsayımında bulunmuşlardır (Y. S. Lee & Dutta, 2007).

Sonuç olarak literatürle de uyumlu olan bu çıktılarımız bize, malign meme dokusu mikroçevresinden izole ettiğimiz hücrelerin, kanserle ilişkili özelliklerinin yüksek olduğunu bununla birlikte kanser hücreleri ile aynı ortamda bulduklarında ise kanser hücrelerinin malign özelliklerinin artışını teşvik ettiğini düşündürmüştür.

p160 steroid reseptör koaktivatör ailesinin üyesi olan AIB1 (Amplified in breast cancer), östrojen ve progesteron reseptörü gibi nükleer reseptörlerin ayrıca E2F1 ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitelere aracılık eder. AIB1, nükleer reseptör-aracılı hastalıklarda özellikle meme, prostat, mide ve pankreatik kanserler gibi malign hastalıklarda rol oynar ve onkogen gibi davranır. AIB1'in, hormon-bağımlı meme kanserinde rol oynadığı ve bu örneklerde AIB1 mRNA ve protein seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca farelerde AIB1'in aşırı ifadesinin tümör oranının artışına neden olduğu da belirtilmiştir (Bouras, Southey, & Venter, 2001; Chang & Wu, 2012; Hossain, Kuo, & Saunders, 2006). Mir-91 olarak da bilinen mir-17-5p 13. kromozomun (13q31) üzerinde yer almaktadır. Mir-17-5p'nin bu lokasyonu, meme kanserini de içeren farklı kanser tiplerinde heterozigozite kaybına uğradığı belirtilmiştir (Hossain et al., 2006).

Biz de çalışmamızda onkogen olarak davrandığı bilinen AIB1 geninin ifade seviyelerinin, malign stromal hücrelerin hem yalnız kültürlerinde hem de kanser hücreleri ile olan ortak kültürlerinde, kanser hücrelerinin yalnız kültürlerine oranla yüksek olduğunu belirledik. miR-17-5p ifade seviyelerinin AIB1 geninin ifade seviyelerinin zıttı yönünde, malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin kanser hücreleri ile ortak kültürleri sonrasında kanser hücrelerinin yalnız kültürlerine oranla belirgin bir şekilde düşük olduğunu tespit ettik.

Bizim çalışmamıza benzer olarak Hossain ve arkadaşları (2006), mir-17-5p'nin meme kanseri hücre çoğalmasının kontrolünde AIB1 onkogeninin potansiyel translasyonel baskılayıcısı olduğunu rapor etmişler

ve sonuçlarının mir-17-5p'nin meme kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı bir role sahip olduğunu ortaya çıkardığını belirtmişlerdir (Hossain et al., 2006). Li ve arkadaşları da (2011) yaptıkları çalışma neticesinde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde mir-17-5p'nin yüksek seviyede ifade edildiğini tespit etmişlerdir (Li, Bian, Liao, Li, & Zhao, 2011).

Kemirgen hücrel dönüşümün inhibitörü olarak tanımlanmış olan PDCD4'ün, translasyon başlatma kompleksinin ökaryotik başlatma faktörü 4A (eIF4A) ile doğrudan etkileşerek protein sentezini inhibe ettiği belirtilmektedir. Ek olarak PDCD4'ün, AP-1-aracılı trans-aktivasyonu inhibe ettiği ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21'in ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur. Ayrıca PDCD4 ekspresyonunun bazı tümör tiplerinde çok az ya da hiç olmadığı ve PDCD4'ün ektopik ekspresyonunun fare deri kanser modelinde tümör oluşumunu azalttığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, PDCD4 kaybının çeşitli yollarla hücrelerin büyümesi için avantajlar sağladığı ve böylece kanser gelişimini kolaylaştırdığı belirtilmiş aynı zamanda kanser tedavisinde moleküler bir hedef olarak kullanılabilmesine dair görüşler de rapor edilmiştir (Frankel et al., 2008; Jansen, Camalier, Stark, & Colburn, 2004; Lankat-Buttgereit & Göke, 2009; Soon & Kiaris, 2013; H.-S. Yang et al., 2001).

miR-21'in çeşitli tümör tiplerinde onkogen olarak davrandığı belirtilmiş ayrıca meme kanserinde aşırı derecede ifade edildiği de vurgulanmıştır (Iorio et al., 2005; Vimalraj, Miranda, Ramyakrishna, & Selvamurugan, 2013; Zhu, Si, Wu, & Mo, 2007). Yapılan çalışmalarda PDCD4 mRNA ve protein seviyelerinin miR-21 inhibisyonu ile artışı PDCD4'ün miR-21 için önemli bir fonksiyonel hedef olduğuna işaret etmiştir (Frankel et al., 2008; Lankat-Buttgereit & Göke, 2009; Vimalraj et al., 2013).

Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin miR-21 ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde yüksek olduğunu, benzer şekilde kanser hücreleri ile ortak kültürleri sonrasında da kanser hücrelerinin yalnız kültürlerine oranla yüksek olduğunu; bununla birlikte dikkat çekici olarak sağlıklı meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin hem yalnız kültürlerinde hem de kanser hücreleri ile olan ortak kültürleri sonrasında miR-21 ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde düşük olduğunu tespit ettik. miR-21 sonuçlarının aksine hedefi olan tümör baskılayıcı özellikle davranan PDCD4 geninin ifade seviyelerinin ise malign stromal hücrelerin kanser hücreleri ile olan ortak kültürleri sonrasında çok anlamlı olmasa da düşüş gösterdiğini; sağlıklı stromal hücrelerin kanser hücreleri ile olan ortak-kültürleri sonrasında ise yüksek olduğunu belirledik.

Çalışmamıza benzer olarak Lisa ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, miR-21 inhibisyonu ile ekspresyonu artan transkriptler arasındaki miR-21'in tamamlayıcısı olan motifin anlamlı derecede yüksek

olarak ifade edildiğini göstermişlerdir. İlginç olarak, lusiferaz deneyleri ile test ettikleri 6 adet 3'-UTR dizisinden sadece PDCD4 dizisinin miR-21 inhibisyonuna yanıt verdiğini gözlemlenmişlerdir (Frankel et al., 2008). Frankel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise PDCD4'ün doğrudan, bir onkogen olan miR-21 tarafından düzenlendiğini belirterek elde ettikleri sonuçlarda PDCD4 mRNA seviyesinde aynı zamanda endojen PDCD4 protein seviyesinde miR-21 inhibisyonu ile yaklaşık 3.5 kat artış gözlemlenmişlerdir (Frankel et al., 2008).

miR-520c ve miR-373 onkogen olarak karakterize edilen önemli miRNA'lardır. Meme ve prostat kanseri hücrelerinde, miR-520c ve miR-373'ün kanser hücre göçü ve invazyonunu uyardığı belirtilmiştir (Huang et al., 2008; P. Liu & Wilson, 2012; Ventura & Jacks, 2009). Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerinin miR-373 ve miR-520c ifadelerinin kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olduğunu tespit ettik. Bu bağlamda elde ettiğimiz çıktılar, uzun süreli kültürlerde malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin kanser hücrelerinin hücre göçü ve invazyonunu destekleyebileceğini düşündürmüştür.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miR-200 ailesi üyelerinin karsinogenez ve kanser tedavisi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Yumurtalık, akciğer ve mide kanseri gibi bazı malign durumlarda miR-200 ailesinde düzensizlik olduğu rapor edilmiş aynı zamanda miR-200 ailesinin epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyen tümör baskılayıcı olabileceği varsayılmıştır (Feng, Wang, & Chen, 2012; Shimono et al., 2009; Ye et al., 2014). Bu bağlamda biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada, kanser hücrelerini malign stromal hücreler ile aynı ortamda kültüre ettiğimizde miR-200b ve -200c ifade seviyelerinin azaldığını tespit ettik. Benzer olarak Zhao ve arkadaşları, meme kanserli hastalardan elde ettikleri kanser-ilişkili fibroblastlar ile normal fibroblastların miRNA profillerini karşılaştırdıklarında bazı miRNA'ların ifade seviyelerinin arttığını bazılarının ise azaldığını tespit etmişler. miR-200 ailesi üyelerinden miR-200b ve miR-200c'nin ifade seviyelerinin ise kanserle ilişkili fibroblastlarda azaldığına vurgu yapmışlardır (Soon & Kiaris, 2013; Zhao et al., 2012).

Tip I sınıfı Homeobox (Hox) genleri, gelişim sürecinde organogenez ve morfogenezde önemli rol oynayan ana transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Embriyogenezdeki rollerine ek olarak, yetişkin hücrelerde ifade edilen Hox genleri hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri ile birlikte hücre çoğalması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlerler. Lösemi ve meme, endometriyum, beyin, kolon, prostat, akciğer ve böbrek gibi solid tümörleri içeren bazı kanserlerin normal doku ile karşılaştırdıklarında Hox genlerinin değişen ekspresyon paternlerinin gözlemlendiği bilinmektedir. Önceleri Hox genlerinin ifadelerindeki artışın onkogenezi desteklediğine inanılsa da, son zamanlarda bazı Hox genlerinin kaybının da tümörögenез ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Carrio, Arderiu, Myers, & Boudreau, 2005). Meme kanserinin patolojik bir özelliği olan

normal meme dokusu yapısı ve polaritesinin kaybı, kanser hücreleri ve onları çevreleyen ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimlerin değişimi nedeniyledir. Normal meme bezinde Hox genleri, meme gelişimi ve hamilelik süresince hücre özgüllüğü, çoğalması ve farklılaşmasının belirlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu durumda, meme dokusu gelişiminin düzenlenmesi ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinde Hox genlerinin rolü göz önünde bulundurulursa, meme tümörlerinin anormal morfoloji ve davranışlarına neden olan hücre-hücrelerarası matriks etkileşimlerindeki değişimlerin temelinde yatan nedenin Hox gen ifadesinin kaybının olası olduğu düşünülmektedir (Carrio et al., 2005).

Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada, literatürle uyumlu olarak HoxD10 ifadelerini malign meme dokusu stromal hücreleri ile gerçekleştirdiğimiz ortak kültür sonrası kanser hücrelerinde ve yalnız kültüre ettiğimiz kanser hücrelerinde belirlenemeyecek kadar düşük olduğunu gözlemledik. Bununla birlikte sağlıklı ve malign stromal hücrelerin yalnız kültürlerinde ise belirlenecek düzeyde ifade olduğunu ancak malign stromal hücrelerdeki ifade düzeylerinin sağlıklılara oranla daha düşük olduğunu tespit ettik. Elde ettiğimiz bu veriler bize malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerinin, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerindeki değişimler neticesinde normal meme dokusunun kaybı nedeniyle tümörogenezi destekleyebileceğini düşündürmüştür.

Benzer olarak Carrio ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, sürekli HoxD10 ekspresyonunun in vivo olarak anjiogenezi baskıladığını göstermişlerdir. Özellikle, HoxD10'un anjiogenez süresince hücre göçü ve hücreler arası matriksin tekrar şekillenmesini direkt olarak etkileyen $\alpha 3$ integrin, matriks metalloproteinaz 14 (MMP-14) ve ürokinaz-tip plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR) gibi genlerin ekspresyonunu baskıladığı da belirtilmektedir. İlginç olarak, bu genlerin meme kanserini de içeren çeşitli hücrelerde invazyon, migrasyon ve tümör ilerlemesini destekleyebildiği, HoxD10'un hücre invazyonunun genel bir inhibitörü gibi işlev gördüğü olasılığının arttığı gösterilmiştir (Carrio et al., 2005).

RhoC (Ras homolog gene family, member C; Ras homoloji gen ailesi üyesi C) sitoplazma ve plazma membranında lokalizedir ve hücre hareketinde önemli olduğu düşünülmektedir. İnaktif GDP-bağlı ve aktif GTP-bağlı durumları arasında bir döngü içindedir ve sinyal iletim kaskadlarında moleküler anahtarlar olarak işlev görürler. Rho proteinleri, aktin hücre iskeletinin yeniden yapılanmasını destekler ve hücre şekli ile hareketini düzenler. RhoC'un aşırı ekspresyonu hücre çoğalması ve tümörlerin malign hale gelmesi ile ilişkilidir. Ekstrasellüler matriksin yıkılması ve yeniden yapılanmasına neden olur, bu durum da o anda dokuda olan hücrelerin kaçmasına yardımcı olur. Meme kanserinde yüksek RhoC proteininin klinik önemi bildirilmiştir. Genel olarak Rho proteinleri, özellikle RhoC ve RhoA, aktin stres fiberleri ve fokal adezyon kontakları oluşumunda hücre iskeletinin düzenlenmesine katılırlar. İmmortalize insan meme epitel hücreleri RhoC ile transfekte edildiklerinde, sitoplazmik

yapılarında çarpıcı bir değişikliğe gidip hareketli ve invazif hale gelirler (Kleer et al., 2005). Biz de çalışmamızda malign meme dokusu stromal hücrelerinde RhoC ifadelerinin belirgin şekilde yüksek olduğunu, ek olarak malign stromal hücreler ile kültüre edilen kanser hücrelerindeki ifadelerinde tek başına kültüre edilen kanser hücrelerine göre artış gösterdiğini belirledik.

Hücre hareketi ve polaritesiyle ilgili bir gen olan RhoC'un, ilerlemiş meme kanserlerinin en ölümcül formu olan inflamatuvar meme kanserinde aşırı derecede eksprese edilmiş olarak bulunduğu belirtilmiştir. Kleer ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar neticesinde RhoC'un, insan meme epitelyal hücreleri için son derece hareketli ve invazif fenotipe yol açan dönüştürücü bir onkogen olarak işlev gördüğünü rapor etmişlerdir. Meme kanserinin ilerlemesiyle birlikte RhoC ekspresyonunun da arttığını gözlemlemişler ve bunu da hastalığın agresif olması ve az olan hayatta kalma süresi ile ilişkilendirmişler. Bulgularında RhoC'un aşırı derecede ifade edilmesinin, tedaviye rağmen kötü sonuçlanan agresif meme kanserinin nadir ve özel bir belirteci ve klinik açıdan önemli sonuçları olabileceğini belirtmişlerdir (Kleer et al., 2005).

Metastatik meme kanser hücre hatlarında, transkripsiyon faktörü olan twist'in aktivasyonundan sonra miR-10b'nin aşırı ifade edildiği bu durumun da tümör boyutu ile invazivliğini arttırdığı belirtilmektedir. miR-10b'nin prometastatik gen ürünü olan RhoC'un indüksiyonu ile sonuçlanan HOXD10'un translasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalar neticesinde vurgulanmış, RhoC'un da hücre göçü ve invazyonu desteklediği bildirilmiştir (Ma, Teruya-Feldstein, & Weinberg, 2007; Vimalraj et al., 2013). İn vivo bir deneyde, metastatik olmayan kanserde miR-10b'nin aşırı ekspresyonuyla birlikte metastazın başlaması meme kanserinin metastazındaki rolünü göstermiştir. İlginç olarak, normal meme hücreleriyle karşılaştırıldığında miR-10b'nin meme kanser hücrelerinde ifadesinin azalması, tümör gelişimin başlaması ve çoğalması süresince hiçbir rol oynamadığına dair kanıt sağlamıştır (Ma, 2010; Negrini & Calin, 2008; Vimalraj et al., 2013). Benzer olarak biz de çalışmamızda kanser hücrelerindeki miR-10b ifadesini düşük bunun aksine malign stromal hücrelerde ise yüksek olduğunu tespit ettik. Malign stromal hücreler ile ortak kültür sonrası miR-10b ifade seviyelerinin tespit edilemeyecek kadar düşük olması literatürle uyumlu olarak bu hücrelerin gerçekten de kanser hücre çoğalmasını desteklediği yönündeki düşüncelerimizi kuvvetlendirmiştir. Benzer olarak Ma ve arkadaşları (2007) çalışmalarında HOXD10'u miR-10b'nin potansiyel bir hedefi olarak tanımlamışlar ve miR-10b'nin aşırı ifadesinin HOXD10 protein miktarını azalttığını ve bunun da RhoC geni ifadesinin artışına sebep olduğunu belirtmişlerdir (Ma et al., 2007).

Mir-27 ailesinin (miR-27a ve miR-27b) direkt olarak peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR- γ)'yı hedeflediği ve adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği belirtilmektedir. PPAR γ yolağının kanserde rol

oynadığı fakat hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik gibi davrandığı da bildirilmiştir (J.-J. Lee, Drakaki, Iliopoulos, & Struhl, 2011). Ayrıca PPAR ailesinin bir diğer üyesi olan PPAR α 'nın da miR-27b ve miR-21 tarafından düzenlendiği ve insan meme kanseri hücre dizilerinde bulunduğu da rapor edilmiştir (Golembesky et al., 2008; Peyrou, Ramadori, Bourgoïn, & Foti, 2012). Lee ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada nöroblastoma hücrelerinde mir-27b'nin PPAR γ 'yı hedeflediğini göstermişlerdir. Ayrıca mir-27b aşırı ekspresyonu ya da PPAR γ inhibisyonunun in vivo ve in vitro da nöroblastoma büyümesini blokladığı belirtilmiştir (J.-J. Lee et al., 2011). Lin ve arkadaşları da (2009) adipojenik farklılaşma süresince miR-27 ailesinin ifadesinin azaldığını, ifade seviyeleri arttığında ise adipojenik oluşumun engellendiğini tespit etmişler ve obezitenin patolojik gelişiminde rol oynayabilecek yeni bir adipojenik inhibitör sınıfı olabileceğini önermişlerdir (Lin, Gao, Alarcon, Ye, & Yun, 2009). Biz de çalışmamızda, miR-27b ifade seviyelerini malign stromal hücrelerin hem yalnız kültüründe hem de kanser hücreleri ile gerçekleştirilen ortak kültürlerinde belirgin bir şekilde yüksek olduğunu belirledik. miR-27b'nin ifade seviyelerindeki bu artışın adipojenik farklılaşmayı engelleyerek patolojik oluşumlara destek sağlamış olabileceğini bununla birlikte PPAR α seviyelerinde tespit ettiğimiz azalmış ifade seviyelerinin de PPAR α 'nın mir-27b'nin hedefi olabileceği fikrini düşündürmüştür.

Bazı çalışmalarda RYBP'nin apoptozu indükleyen ubiquitin-bağlayıcı bir protein olduğu belirtilmiş olmasına rağmen tam olarak fonksiyonu belli değildir (D. Chen et al., 2009). Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kontrol dokularıyla karşılaştırmalı olarak tümör dokularında RYBP'nin ifadesinin azaldığını ya da değiştiğini göstermek amacıyla insan doku örnekleri kullanmışlar. Ayrıca kemoterapotik ajanlara maruz kaldıktan sonra RYBP ve p53 seviyelerinde artış olduğunu da göstermişlerdir (D. Chen et al., 2009). Biz de çalışmamızda, sağlıklı meme dokusundan elde ettiğimiz stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürleri sonrasında anlamlı olmasa da RYBP ifadesinin arttığını tespit ettik. RYBP ifadesindeki bu artış, kanserleşme süreci içerisinde sağlıklı stromal hücrelerin apoptozu uyarıcı özelliklerinden dolayı tedavi anlamında olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Hücre bağlantı molekülleri ailesinin bir üyesi olan CD44'ün komşu hücreler ve hücreler ile hücre dışı matriks arasındaki bağlantı ve iletişimden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Hücre bağlantı molekülü-aracılı organizasyon normal meme histolojisinin temel özelliğidir ve doku bütünlüğünün sağlanması için gereklidir. Bu bağlantıların bozulması ya da düzenli olmaması doku yapısının bozulmasına neden olur ki bu durum da neoplastik oluşumun bir özelliğidir. CD44'ün hücreler arası bağlantılardaki rolüne ek olarak, hücreler arası sinyal mekanizmalarını yönlendirebileceği ve böylece meme kanserini içeren birçok kanser tipiyle ilişkili olabildiği belirtilmektedir. Bununla birlikte tümörü ilerletebileceği (Q. Yu & Stamenkovic, 1999, 2000) ve baskılayabileceği (Lopez et al., 2005) ile ilgili olarak da çelişkili veriler olduğu ifade edilmektedir (Louderbough &

Schroeder, 2011). Biz de gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, malign meme dokusu kaynaklı stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürü sonrasında CD44 ifadesinin arttığını belirledik. Bununla birlikte, sağlıklı stromal hücrelerde ifade seviyelerinin az olması bize CD44'ün tümörü ilerletici yönde ifade edildiğini düşündürmüştür.

Birçok ailesel meme kanserinin kalıtsal olduğu ve bu durumunda BRCA1 ya da BRCA2 genindeki mutasyonların aktarılmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Bu genler kontrolsüz hücre çoğalmasını engellemeye çalıştıkları için tümör baskılayıcı olarak tanımlanırlar (Friedenson, 2007; Narod et al., 2000; Wright et al., 2008). Biz de çalışmamızda, BRCA1 ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da malign meme dokusu kaynaklı stromal hücrelerin kullanıldığı deney gruplarında azalış tespit ettik. Ayrıca malign stromal hücrelerin yalnız kültürlerinde BRCA1 ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde düşük olması bu hücrelerde BRCA1 geninin mutasyona uğramış olabileceğini düşündürmüştür.

Hücre bölünmesinin düzenlenmesi ile de ilişkili olan KRAS geninin (Kiras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) bir onkogen olduğu bilinmektedir. Meme kanserini de içeren insan tümörlerinin birçok tipinde KRAS geninde nokta mutasyonlarının tespit edildiği ve bu mutasyonların kanser oluşum süreci üzerine önemli etkileri olduğu belirtilmiştir (Jančík, Drábek, Radzioch, & Hajdúch, 2010; Sánchez-Muñoz et al., 2010). Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada istatistiksel olarak anlamlı olmasa da malign stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürü sonrasında KRAS ifade seviyelerinin az da olsa arttığını tespit ettik. Bu sonuç da bize malign stromal hücrelerde KRAS geninde mutasyonların olmuş olabileceğini düşündürdü.

Gen ve miRNA'ların ifade seviyelerinin belirlenmesine ek olarak yapılan ölçümlerin tanısal değerleri analiz edildi. Neticede meme kanseri ile ilişkili oldukları yapılan çalışmalarda belirtilen bu gen ve miRNA'ların hassasiyet ve özgüllük değerlerinin önemli derecede yüksek oldukları belirlendi. Ancak dikkat çekici olarak kanser hücre grubunda miR-373, miR-520c ve PPAR α 'nın özgüllük değerlerinin düşük olduğu buna rağmen malign stromal hücrelerde ve bu hücrelerin kanser hücreleri ile ortak kültürlerinin gerçekleştirildiği deney gruplarında bu değerlerin yüksek olduğunu tespit ettik. Kanser yayılımı ile ilişkili olduğu bilinen miR-373 ve miR-520c'nin malign stromal hücrelerde ve malign stromal hücreler ile ortak kültür gerçekleştirilen deney gruplarında özgüllük değerlerinin kanser hücre grubuna göre yüksek olması, mikroçevredeki bu hücrelerin yayılım ve metastaz yapma yeteneklerinin olabileceğini aynı zamanda bu durumun tanıda da kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlarla, karsinogez sürecinde miRNA'ların düzenleyici rollerinin kanser hücreleri ile sınırlı olmadığına aynı zamanda tümör stromasının aktivasyonu ve kanserle-

ilişkili duruma geçişiyle de ilgili olduğuna dikkat çekilmiştir (Soon & Kiaris, 2013). Biz de, tümör mikroçevresinde bulunan MKH'lerin tümör hücre gelişimi ve ilerlemesini desteklediği görüşünden yola çıkarak, gerçekleştirdiğimiz deneylerden elde ettiğimiz bulgularımızın literatürle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Gerçekten de, malign meme dokusu tümör mikroçevresinden izole ettiğimiz stromal hücreler ile tümör hücrelerinin aynı ortamda kültürlerini gerçekleştirdiğimizde; birbirleri ile etkileşimleri sonucunda stromal hücre kaynaklı olan bir takım faktörlerin salınımlarının arttığını bu durumun da kanserli hücre çoğalmasını ve tümörün ilerlemesini desteklediğini düşünmekteyiz. Ek olarak onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikte işlev gören bir takım miRNA ve gen ifadelerinde gözlemlediğimiz değişiklikler, stromal hücrelerin kanserle ilişkili duruma geçebileceklerini ve kanser hücrelerinin malign özelliklerinin artışına katkıda bulunabileceklerini düşündürmüştür.

miRNA'ların ilk olarak tanımlanmalarından bu zamana kadar oluşumları ve etki mekanizmalarını anlamak adına birçok çalışma yapılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde miRNA'ların düzenlenmesindeki bozuklukların yer aldığı gösterilmiş ayrıca onkogenik, tümör baskılayıcı ya da metastatik özellik gösterdiklerinin anlaşılması ile kanserin teşhis ve tedavisindeki önemlerine vurgu yapılmıştır. Ancak yine de işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılması, hedeflerinin tanımlanabilmesi ve tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleşebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamızın kanser gelişimine katkıda bulunduğu bilinen mikroçevredeki hücrelerin özelliklerinin daha iyi anlaşılması ile geleneksel tedavi yöntemlerine ek olarak; sadece kanser hücrelerini hedef alan tedavi yaklaşımlarının dışında tümör stromasının/mikroçevresinin de içinde olduğu yeni protokollerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara öncü bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda stromal hücrelerin hasar ve inflamasyonlu alanlarda rejeneratif özellikte olmalarının yanında; tümör mikroçevresinde bulduklarında tümörle ilişkili hücelere benzer özellik kazandıkları bildirilmiş ve çalışmalardan alınan bu sonuçlar ilgiyi tümör mikroçevresinde bulunan stromal hücrelerin etkilerini anlamaya çevirmiştir. Bu bağlamda, gerçekleştirdiğimiz çalışmada, kök hücre karakterinde olduğunu belirlediğimiz stromal hücrelerin, kanser hücreleri ile ortak-kültürleri sonrasında kanser hücre çoğalmasını desteklediğini belirledik.

Tümör mikroçevresindeki stromal hücrelerden kaynaklanan bazı proinflamatuvar sitokinlerin birtakım sinyal yolları üzerinden etki göstererek tümör hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiş ancak moleküler mekanizmalar tam anlamıyla aydınlatılmış değildir. Çalışmamızda malign meme dokusu kaynaklı stromal hücreler ile MDA-MB-231 kanser hücre hattının ortak kültürü sonrasında kanserin patogenezi ile ilişkilendirilen IL-8, IL-6 ve IL1 β gibi bir takım sitokin ve kemokin seviyelerinin belirgin şekilde arttığını tespit ettik.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, malign meme dokusundan elde ettiğimiz stromal hücreler ile MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının ortak kültürleri sonrasında, meme kanseri ile ilişkili olarak tümör baskılayıcı özellikte olan let-7, miR-17-5p, miR-200b ve miR-200c gibi bir takım miRNA'ların ifade seviyelerinin azaldığını; onkogenik özellikte ya da tümör yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülen miR-21, miR-373 ve miR-27b gibi miRNA'ların ifadelerinin ise arttığını belirledik. Benzer şekilde malign stromal hücreler ile gerçekleştirilen ortak kültür sonrasında, meme kanseri ile ilişkilendirilen genlerden tümör baskılayıcı özellikte olan BRCA1 ve PDCD4'ün ifadelerinin azaldığını; zıt olarak tümörün ilerlemesi ile ilişkili olan HMGA2, AIB1, RhoC, CD44, KRAS gibi genlerin ifadelerinin ise artış gösterdiğini tespit ettik.

Elde ettiğimiz çıktılar neticesinde, özellikle malign meme dokusu kaynaklı stromal hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürlerinde birbirleri ile etkileşimleri sonucunda stromal hücre kaynaklı olan bir takım faktörlerin salınımlarının arttığını bu durumun da kanserli hücre çoğalmasını ve tümörün ilerlemesini desteklediğini düşünmekteyiz. Ayrıca gerçekleştirdiğimiz çalışmayla kanserin hücre ve moleküler mekanizmaları ile tümör mikroçevresinin tümörögenezdeki etkilerinin ayrıntılı şekilde anlaşılmasına destek sağladığımızı söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, kansere bağlı ölümlerin sayısı gün geçtikçe artmakta ve geleneksel tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların kanser gelişiminde önemli rol oynadıkları göz önünde bulundurulduğunda, bu küçük moleküllerin teşhis ve tedavide

kullanılabileceği fikri gün geçtikçe güçlenmektedir. Bu bağlamda tümör mikroçevresinin içinde olduğu ve miRNA'ların belirteç olarak kullanılabileceği, geliştirilebilecek olan yeni tedavi yaklaşımlarının umut vaad edici olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akdeniz, A. (2010). *Triple negatif meme kanserlerinin demografik klinik ve patolojik karakteristikleri*. (Uzmanlık Tezi), Başkent Üniversitesi, Ankara.
- Akkaya, Z. Y., & Dinçer, P. (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*, 26(1).
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P. (2013). *Essential cell biology*: Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Hücrenin Moleküler Biyolojisi* (4. Baskı ed.). Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi.
- Aliustaoğlu, M. (2009). Temel Kanser Fzyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, 22(3), 46-49.
- Arnold, C.P., Tan, R., Zhou, B., Yue, S.-B., Schaffert, S., Biggs, J. R., Renault, V. M. (2011). MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome research*, 21(5), 798-810.
- Asadi, F., Lazennec, G., & Jorgensen, C. (2011). Importance of Stromal Stem Cells in Prostate Carcinogenesis Process.
- Asirvatham, A. J., Magner, W. J., & Tomasi, T. B. (2009). miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*, 45(2), 58-69.
- Aslan, G. (2010). Tümör İmmünolojisi Tumour Immunology.
- Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi.
- Barcellos-de-Souza, P., Gori, V., Bambi, F., & Chiarugi, P. (2013). Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1836(2), 321-335.
- Bodur, E., & Demirpençe, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89.
- Bouras, T., Southey, M. C., & Venter, D. J. (2001). Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer research*, 61(3), 903-907.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Calore, F., & Fabbri, M. (2011). MicroRNAs and Cancer. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Calore, F., Lovat, F., & Garofalo, M. (2013). Non-coding RNAs and cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 17085-17110.
- Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M. R., Baron, R., Apte, R. N. (2013). The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3500-3509.
- Carrio, M., Arderiu, G., Myers, C., & Boudreau, N. J. (2005). Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer research*, 65(16), 7177-7185.
- Chang, A. K., & Wu, H. (2012). The role of AIB1 in breast cancer. *Oncology letters*, 4(4), 588.
- Chen, D.-R., Lu, D.-Y., Lin, H.-Y., & Yeh, W.-L. (2014). Mesenchymal Stem Cell-Induced Doxorubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer. *BioMed research international*, 2014.
- Chen, D., Zhang, J., Li, M., Rayburn, E. R., Wang, H., & Zhang, R. (2009). RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO reports*, 10(2), 166-172.
- Chen, P.-S., Su, J.-L., & Hung, M.-C. (2012). Dysregulation of microRNAs in cancer. *J Biomed Sci*, 19(1), 90.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Dono, M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944-13949.
- Conze, D., Weiss, L., Regen, P. S., Bhushan, A., Weaver, D., Johnson, P., & Rincón, M. (2001). Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer research*, 61(24), 8851-8858.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2000). *The cell*: Sinauer Associates Sunderland.
- Cuiffo, B. G., & Karnoub, A. E. (2012). Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr*, 6(3), 220-230.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Çayırıcı, M. (2007). *Memenin invaziv duktal karsinomlarında siklin D1 ve p21 WAF1'in prognostik faktörler ve tamoksifen direnci ile ilişkisi.* (Uzmanlık Tezi), Sağlık Bakanlığı Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Çelik Aşçı, D., Koşar Aslan, P., & Özçelik, N. (2013). SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 20, Sayı 3 (2013).
- De Luca, A., Lamura, L., Gallo, M., Maffia, V., & Normanno, N. (2012). Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *Journal of cellular biochemistry*, 113(11), 3363-3370.
- Dethlefsen, C., Højfeldt, G., & Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 138(3), 657-664.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Esquivel-Chirino, C., Esquivel-Soto, J., Morales-González, J. A., Sánchez, D. M., Ventura-Gallegos, J. L., Hernández-Mora, L. E., & Zentella-Dehesa, A. (2013). Inflammatory Environmental, Oxidative Stress in Tumoral Progression.
- Farazi, T. A., Hoell, J. I., Morozov, P., & Tuschl, T. (2013). MicroRNAs in human cancer *MicroRNA Cancer Regulation* (pp. 1-20): Springer.
- Feng, B., Wang, R., & Chen, L.-B. (2012). Review of miR-200b and cancer chemosensitivity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66(6), 397-402.
- Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., & Lund, A. H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1026-1033.
- Friedenson, B. (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC cancer*, 7(1), 152.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gaur, A., Jewell, D. A., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J. H., Chen, C., Israel, M. A. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer research*, 67(6), 2456-2468.
- Golembesky, A. K., Gammon, M. D., North, K. E., Bensen, J. T., Schroeder, J. C., Teitelbaum, S. L., Santella, R. M. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARA) genetic polymorphisms and breast cancer risk: a Long Island ancillary study. *Carcinogenesis*, 29(10), 1944-1949.
- Guan, J., & Chen, J. (2013). Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment (Review). *Biomedical reports*, 1(4), 517-521.
- Güneş, H. V. (2013). *Moleküler Hücre Biyolojisi* (3. Baskı ed.). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Hagan, J., & Croce, C. (2007). MicroRNAs in carcinogenesis. *Cytogenetic and genome research*, 118(2-4), 252-259.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hannahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hatfield, S., & Ruohola-Baker, H. (2008). microRNA and stem cell function. *Cell and tissue research*, 331(1), 57-66.
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-531.
- Heneghan, H., Miller, N., Lowery, A., Sweeney, K., & Kerin, M. (2009). MicroRNAs as novel biomarkers for breast cancer. *Journal of oncology*, 2010.
- Hossain, A., Kuo, M. T., & Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 8191-8201.
- Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M., Le Sage, C., Nagel, R., Nair, S., Klein-Szanto, A. J. (2008). The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature cell biology*, 10(2), 202-210.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- İnan, S., & Özbilgin, K. (2009). Kök Hücre Biyolojisi. *Sağlıkta Birikim*, 1(5).
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Campiglio, M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65(16), 7065-7070.
- Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *BioMed research international*, 2010.
- Jansen, A. P., Camalier, C. E., Stark, C., & Colburn, N. H. (2004). Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Molecular cancer therapeutics*, 3(2), 103-110.
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*, 6(6), 590-610.
- Ji, Q., Karnak, D., Hao, P., Wang, R., & Xu, L. (2010). No small matter: microRNAs—key regulators of cancer stem cells. *International journal of clinical and experimental medicine*, 3(1), 84.
- Jiang, J., Lee, E. J., Gusev, Y., & Schmittgen, T. D. (2005). Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic acids research*, 33(17), 5394-5403.
- Karaöz, E., & Ovalı, E. (2004). *Kök Hücreler*. Trabzon: Derya Kitabevi.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.
- Kleer, C. G., Griffith, K. A., Sabel, M. S., Gallagher, G., van Golen, K. L., Wu, Z.-F., & Merajver, S. D. (2005). RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast cancer research and treatment*, 93(2), 101-110.
- Knüpfer, H., & Preiß, R. (2007). Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast cancer research and treatment*, 102(2), 129-135.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Küçükhüseyin, Ö., & Öztürk, O. (2013). miRNALAR ve Meme Kanserindeki Etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 3(5).
- Lal, E. O. D. A. (2010). MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer.
- Lankat-Buttgereit, B., & Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the Cell*, 101(6), 309-317.
- Lee, J.-J., Drakaki, A., Iliopoulos, D., & Struhl, K. (2011). MiR-27b targets PPAR γ to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 31(33), 3818-3825.
- Lee, Y. S., & Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development*, 21(9), 1025-1030.
- Lewis, A. M., Varghese, S., Xu, H., & Alexander, H. R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of translational medicine*, 4(1), 48.
- Li, H., Bian, C., Liao, L., Li, J., & Zhao, R. C. (2011). miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast cancer research and treatment*, 126(3), 565-575.
- Lim, P. K., Bliss, S. A., Patel, S. A., Taborga, M., Dave, M. A., Gregory, L. A., Rameshwar, P. (2011). Gap Junction-Mediated Import of MicroRNA from Bone Marrow Stromal Cells Can Elicit Cell Cycle Quiescence in Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 71(5), 1550-1560.
- Lin, Q., Gao, Z., Alarcon, R. M., Ye, J., & Yun, Z. (2009). A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *Febs Journal*, 276(8), 2348-2358.
- Liu, B., Sun, L., & Song, E. (2013). Non-coding RNAs regulate tumor cell plasticity. *Science China Life Sciences*, 56(10), 886-890.
- Liu, P., & Wilson, M. J. (2012). miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF- κ B factor in human fibrosarcoma cells. *Journal of cellular physiology*, 227(2), 867-876.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H., Monville, F., Kleer, C. G. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer research*, 71(2), 614-624.
- Lopez, J. I., Camenisch, T. D., Stevens, M. V., Sands, B. J., McDonald, J., & Schroeder, J. A. (2005). CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer research*, 65(15), 6755-6763.
- Louderbough, J. M., & Schroeder, J. A. (2011). Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1573-1586.
- Ma, L. (2010). Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*, 12(5), 210.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., & Weinberg, R. A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449(7163), 682-688.
- MacFarlane, L.-A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current genomics*, 11(7), 537.
- Mattiske, S., Suetani, R. J., Neilsen, P. M., & Callen, D. F. (2012). The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21(8), 1236-1243.
- Matur, İ., & Solmaz, S. (2011). Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar.
- Mbeunkui, F., & Johann Jr, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(4), 571-582.
- McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., Bai, S., Cho, K. R. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of clinical investigation*, 121(8), 3206-3219.
- Murchison, E. P., & Hannon, G. J. (2004). miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current opinion in cell biology*, 16(3), 223-229.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Narod, S. A., Brunet, J.-S., Ghadirian, P., Robson, M., Heimdal, K., Neuhausen, S. L., De los Rios, P. (2000). Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. *The Lancet*, 356(9245), 1876-1881.
- Negrini, M., & Calin, G. A. (2008). Breast cancer metastasis: a microRNA story. *Breast Cancer Res*, 10(2), 203.
- Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*, 83(1), 48-61.
- Organization, W. H. (1982). The World Health Organization histological typing of breast tumors. *Am J Clin Pathol*, 78(6), 806-816.
- Öncel, M. (2012). Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2(3), 91-100.
- Özen, A., & Sancak, İ. G. (2014). Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı.
- Pazarbaşı, U. A., & Kasap, M. (2003). Kanser Genetiği.
- Pekmez, M. (2010). *Meme kanseri tanısıyla mastektomi ameliyatı olmuş kadın hastalarda, cerrahi tedavi seçimine etkili olan prognostik faktörler*. (Uzmanlık Tezi), Başkent Üniversitesi, Ankara.
- Peyrou, M., Ramadori, P., Bourgoïn, L., & Foti, M. (2012). PPARs in liver diseases and cancer: epigenetic regulation by microRNAs. *PPAR research*, 2012.
- Polyak, K., & Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), a003244.
- Puca, F., Colamaio, M., Federico, A., Gemei, M., Tosti, N., Bastos, A. U., Fusco, A. (2014). HMGA1 silencing restores normal stem cell characteristics in colon cancer stem cells by increasing p53 levels. *Oncotarget*.
- Pucci, S., & Mazzei, P. (2011). MicroRNA dysregulation in colon cancer microenvironment interactions: the importance of small things in metastases. *Cancer Microenvironment*, 4(2), 155-162.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sağsöz, H. K., MA. (2008). Kök Hücreler. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2), 29-33.
- Sánchez-Muñoz, A., Gallego, E., de Luque, V., Pérez-Rivas, L. G., Vicioso, L., Ribelles, N., Alba, E. (2010). Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple-negative breast cancer. *BMC cancer*, 10(1), 136.
- Sassen, S., Miska, E. A., & Caldas, C. (2008). MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*, 452(1), 1-10.
- Saydam, F., Değirmenci, İ., & Güneş, H. V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser MicroRNAs and cancer.
- Seydel, D. Ö. G. Ş., & Aksoy, K. (2009). Onkogen ve Tümör Supressör Gen Olan miR-NA'ların Özellikleri ve Kullanım Alanları.
- Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R. W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Chiao, E. (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*, 138(3), 592-603.
- Singh, J. K., Simões, B. M., Howell, S. J., Farnie, G., & Clarke, R. B. (2013). Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res*, 15(4), 210.
- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*, 38(3), 323-332.
- Solakoğlu, Z. (2009). Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22(3), 20-25.
- Soon, P., & Kiaris, H. (2013). MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocrine-related cancer*, 20(5), R257-R267.
- Soria, G., Ofri-Shahak, M., Haas, I., Yaal-Hahoshen, N., Leider-Trejo, L., Leibovich-Rivkin, T., Gutman, M. (2011). Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC cancer*, 11(1), 130.
- Sullivan, N. J. (2011). Interleukin-6 in the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer—Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. M Gunduz (ed.), 165-175.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 14.
- Şahin, E. (2013). *Oral bölge kök hücre elde edilme kaynakları ve kullanımı* (Bitirme Tezi), Ege Üniversitesi, İzmir.
- Topuz, E., Aydın, A., Aykan, F. (2007). *Meme kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu 2006*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti.
- Tuğ, E., Erol, D., & Yüce, H. (2008). MikroRNA'lar ve insan Hastalıkları.
- Tuna, S. (2010). *Functional Characterization of microRNA-125B Expression in MCF7 Breast Cancer Cell Line*. (Master thesis), Middle East Technical University, Ankara.
- Tunalı, N. E., & Tiryakioğlu, N. O. (2010). Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(5), 1690-1700.
- Turaç, G. (2013). *Mezenkimal kök hücrelerde rekombinant tirozin hidroksilaz enziminin ekspresyonu*. (Yüksek Lisans Tezi), Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli.
- Ventura, A., & Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136(4), 586-591.
- Vimalraj, S., Miranda, P., Ramyakrishna, B., & Selvamurugan, N. (2013). Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs. *Disease markers*, 35(5), 369-387.
- Waugh, D. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*, 14(21), 6735-6741.
- Winter, J., & Diederichs, S. (2011). MicroRNA biogenesis and cancer *MicroRNA and Cancer* (pp. 3-22): Springer.
- Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., & Varticovski, L. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24-and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 10(1), R10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yang, H.-S., Jansen, A. P., Nair, R., Shibahara, K., Verma, A. K., Cmarik, J. L., & Colburn, N. H. (2001). A novel transformation suppressor, Pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappaB or ODC transactivation. *Oncogene*, 20(6), 669-676.
- Yang, X., Hou, J., Han, Z., Wang, Y., Hao, C., Wei, L., & Shi, Y. (2013). One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci*, 3(5).
- Ye, F., Tang, H., Liu, Q., Xie, X., Wu, M., Liu, X., Xie, X. (2014). miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *Journal of translational medicine*, 12(1), 17.
- Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Lieberman, J. (2007). let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell*, 131(6), 1109-1123.
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & development*, 13(1), 35-48.
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*, 14(2), 163-176.
- Yuan, A., Chen, J., Yao, P.-L., & Yang, P.-C. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*, 10, 853-865.
- Zhao, L., Sun, Y., Hou, Y., Peng, Q., Wang, L., Luo, H., Liu, M. (2012). MiRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in breast cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(11), 2051-2059.
- Zhu, S., Si, M.-L., Wu, H., & Mo, Y.-Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14328-14336.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı :Özlem Sağlam
Doğum tarihi ve yeri :06.09.1982/İzmit
Uyruğu :TC
Medeni durumu :Bekar
İletişim adresleri :Yenikent mah., Görkem sk., Esnaflar
Yapı Koop. C1 Blok Daire:2
Derince/KOCAELİ

Eğitim Durumu

Derece	Okul/Üniversite	Alan/Fakülte/Bölüm	Mezuniyet Yılı
İlköğretim	Piri Reis İlköğretim Okulu		1996
Lise	Fatsa Lisesi	Yabancı Dil Ağırlıklı	2000
Üniversite	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2001-2005
Yüksek Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2005-2008
Doktora	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2009-Devam

Yabancı Dil: İngilizce

Mesleki Deneyim:

Firma/Kurum	Yıl	Görevi
Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kök Hücre Anabilim Dalı	2009-2014	Araştırmacı

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

- 1) Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği

Sertifikalar

1. Deney hayvanları sertifikası. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2006
2. IV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları kursu sertifikası, 23.03.2009-27.03.2009, Kocaeli.

YAYINLAR

A.Makaleler

- 1) Karaoz E, Okçu A, **Sağlam Ö**, Genç ZS, Ayhan S, Kasap M. Pancreatic Islet Derived Stem Cells Can Express Co-Stimulatory Molecules of Antigen-Presenting Cells. **Transplantation Proceedings**, **42(9):3663-70, 2010.**
- 2) Karaöz E, Okçu A, Gacar G, **Sağlam Ö**, Yürüker S, Kenar H. A Comprehensive Characterization Study of Human Bone Marrow MSCs with an Emphasis on Molecular and Ultrastructural Properties. **Journal of Cellular Physiology**, **226(5):1367-82, 2011.**
- 3) Karaoz E, Demircan PÇ, **Sağlam Ö**, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human Dental Pulp Stem Cells Demonstrate Better Neural and Epithelial Stem Cell Properties than Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. **Histochemistry and Cell Biology**, **136(4):455-73,2011.**
- 4) **Sağlam Ö**, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV: The protective effects of cinnamon and sugar tea extract on diabetic rats with interrelationships between oxidative stress and DNA damage. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **6(43):3012-3017, DOI: 10.5897/AJPP12.539, 22 November, 2012.**
- 5) Karaoz E, Okcu A, Ünal ZS, Subasi C, **Sağlam Ö**, Duruksu G. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment both *in vitro* and *in vivo*. **Cytotherapy**, **15.557-570, 2013.**

B. SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLER

- 1) **Sağlam Ö**, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV. The effects of Cinnamon and sugar tea extracts on Oxidative Stress in STZ-NA diabetic rats. **2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Isparta, Türkiye, June 25-28, 2008.**

2) Gacar G, Genç ZS, Sağlam Ö, Sarıboyacı AE, Aksoy A, Karaöz E. İnsan mezenkimal kök hücrelerinde embriyonik transkripsiyon faktörlerin (Oct4, Rex1, Sox2, Nanog ve Foxd3) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 91. Antalya 2009.

3) Genç ZS, Sağlam Ö, Ayhan S, Bayazıt G, Karaöz E. Nestin erişkin kök hücreler için ortak bir belirteç olabilir mi? THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. s:87-88, Antalya 2009.

4) Sağlam Ö, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV. STZ ve STZ-NA ile diyabet oluşturulan sıçanlarda DNA hasarı. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009 / Bodrum.

4)

5) Değirmenci İ, Sağlam Ö, Özbayer C, Üstüner MC, Akın A, Gübeş HV. Deneysel tip I ve tip II diyabet modellerinde mitokondriyal lipid peroksidasyonu ve antioksidan seviyeleri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009 / Bodrum.

6) Genç ZS, Karaöz E, Sağlam Ö, Gacar G, Aksoy A, Kasap M. Kemik İliği, Yağ Dokusu ve Diş Pulpası gibi Farklı İnsan Dokularından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen Ekspresyon Profilinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Özet Kitabı, s.167, Bodrum, 2009.

7) Karaöz E, Okcu A, Sağlam Ö, Ayhan S, Gacar G, Duruksu G. Bone marrow derived mesenchymal stem cells can express genes with known anti-apoptotic function and co-stimulatory molecules of antigen presenting cells with-out stimulation in vitro. Haematologica 2010; 95(S2): 665.

8) Aksoy A, Sağlam Ö, Subaşı C, Erman G, Karaöz E. İnsan ve Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genotipik ve İnce Yapı Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. 36 Ulusal Hematoloji Kongresi, Poster No:P009, s36, Kasım 2010, Antalya.

9) Karaöz E, Okcu A, Gacar G, Sağlam Ö, Yürüker S, Kenar H. A Comprehensive Characterization Study of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with an Emphasis on Molecular and Ultrastructural Properties. The 17 IFSM International Microscopy Congress (IMC17), Rio de Janerio, September 19-24, 2010.

10) Karaoz E, Okcu A, Sağlam Ö, Genç ZS, Ayhan S, Kasap M. Co-stimulatory Molecules of Antigen Presenting Cells Expressed by Pancreatic Islet Derived Stem Cells. 5th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, P15, pp23, October 5-7,2010, Hannover, Germany.

11) Karaöz E, Okçu A, Unal ZS, Subasi C, **Saglam Ö**, Duruksu G. Differentiation of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells in Pancreatic Islet Microenvironment. **IDF 2011 World Diabetes Congress, P1576, 4-8 December 2011, Dubai, United Arab Emirates.**

12) Ünal ZS, **Sağlam Ö**, Duruksu G, Karaöz E, İki farklı (konvansiyonel ve gradient) yöntemle izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin uzun süreli kültürlerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-1, S164, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.**

13) **Sağlam Ö**, Ünal ZS, Subaşı C, Karaöz E. Malign Meme Dokusu Stromal Hücre Kaynaklı Il-6'nin STAT3 Aracılıklı Tümörögenez Etkisi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, **PP-31, S220, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.**

14) Subasi C, Erman G, Unal ZS, **Saglam Ö**, Gacar G, Karaoz E. Normal ve Malign Meme Dokusundan İzole Edilen Stromal Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik, Çoğalim Ve Apoptoza Direnç Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, PP-30, S219, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.**

15) Ünal ZS, Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, **Sağlam Ö**, Subaşı C, Karaöz E. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Uyarılmış CD3+T Hücreleri Üzerine Bağışık Baskılayıcı Etkisinin Apoptotik Sinyal Yolakları Düzeyinde Araştırılması. **XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, s49-50, 27-30 Ekim 2011, Antalya.**

16) **Sağlam Ö**, Ünal ZS, Subaşı C, Karaöz E. Malign Meme Dokusu Stromal Hücre Kaynaklı IL-6'nın STAT3 Aracılıklı Tümörögenez Etkisi. **XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, s50, 27-30 Ekim 2011, Antalya.**

17) Ünal ZS, Cengiz M, **Sağlam Ö**, Subaşı C, Karaöz E. Nöral Kök Hücre İzolasyonu, Çoğalma ve Farklılaşmasında Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin Önemi, **III. Kök Hücre Sempozyumu, s04, 30 Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.**

18) **Sağlam Ö**, Ünal ZS, Subaşı C, Karaöz E, Meme Dokusu Stromal Kök Hücre Kaynaklı IL-6'nın STAT3 Aracılıklı Tümörögenez Etkisi, **III. Kök Hücre Sempozyumu, P-09, 30Kasım-1Aralık 2012,Marmara Üniversitesi, İstanbul.**

19) Ünal ZS, Cengiz M, **Sağlam Ö**, Gacar G, Karaöz E. Hipoksik Ve Normoksik Koşullarda Mezenkimal Kök Hücrelerde MK2 Geni Susturulmasının Canlılık, Çoğalma Ve Farklılaşma Üzerine Etkileri, **4. Kök Hücre Sempozyumu, 20 Aralık 2013, İstanbul.**

20) Karaöz E, Aksoy A, Yusufoglu S, İnci Ç, **Sağlam Ö**, Erman G. Tip 1 Diyabetik ve Sağlıklı Hastalardan Elde Edilen CD4+ ve CD8+ T Hücrelerinin İnsan Beta Hücrelerine Etkisi. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, PP-51, S-67, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

21) Darıcı H, Öncü M, Duruksu G, **Sağlam Ö**, Karaöz E. Activating Pluripotency pathways via small molecules. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, S-13, S-35, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

22) **Sağlam Ö**, Değirmenci İ, Ünal ZS, Pösteği G, Güneş HV, Karaöz E. Kanser Hücrelerinin Çoğlaması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi ve miRNA İlişkisi. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi P-57, S-70, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

23) Ünal ZS, Cengiz M, **Sağlam Ö**, Gacar G, Subaşı C, Erman G, Karaöz E. Mezenkimal Kök Hücrelerde MAPKAPK-2 Geni Susturulmasının Canlılık, Çoğalma ve Farklılaşma Üzerine Etkilerinin Hipoksik ve Normoksik Koşullarda Değerlendirilmesi. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, P-58, S-71, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

Bilimsel Etkinlikler

Burslar

- 1)** Multiple myeloma kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve bu hücrelerden elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi (TÜBİTAK 112S086, 2012-2014).

Ödüller

1) Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2009 Yılı En İyi Bilimsel Proje Destek Ödülü 1.si.

Karaöz E, Sarıboyacı AE, Gacar G, Kasap M, Ayhan S, Aksoy A, Genç ZS, Okcu A, Demırcan PÇ, Bayazıt G, **Sağlam Ö.** Sıçan Pankreatik Adacık Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Antijen Sunma Özelliklerinin Araştırılması.

2) 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.

Genç ZS, **Sağlam Ö,** Ayhan S, Bayazıt G, Karaöz E. Nestin erişkin kök hücreler için ortak bir belirteç olabilir mi? THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. s:87-88, Antalya 2009.

3) Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2011 Yılı En İyi Bilimsel Yayın Ödülü 1.si.

Karaoz E, Okçu A, **Sağlam Ö,** Genç ZS, Ayhan S, Kasap M. Pancreatic Islet Derived Stem Cells Can Express Co-Stimulatory Molecules of Antigen-Presenting Cells. Transplantation Proceedings, 42(9):3663-70, 2010.

4) III. Kök Hücre Sempozyumu Sözlü Bildiri 2.si

Ünal ZS, Cengiz M, **Sağlam Ö,** Subaşı C, Karaöz E. Nöral Kök Hücre İzolasyonu, Çoğalma ve Farklılaşmasında Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin Önemi, **III. Kök Hücre Sempozyumu, s04, 30Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.**

5) Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2013 Yılı En İyi Bilimsel Yayın Ödülü 1.si.

Karaoz E, Okcu A, Ünal ZS, Subasi C, **Sağlam O,** Duruksu G. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment both *in vitro* and *in vivo*. *Cytotherapy*, 15.557-570, 2013.

6) VI. Dr. Aysun - Ahmet Küçükkel Tıp Ödülleri kapsamında Temel Tıp Bilimleri alanında en iyi bilimsel araştırma ödülü.

Karaoz E, Okcu A, Ünal ZS, Subasi C, **Sağlam O,** Duruksu G. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment both *in vitro* and *in vivo*. ***Cytotherapy*, 15.557-570, 2013.**

7) 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi Poster Bildirileri 3.lük Ödülü

Sağlam Ö, Değirmenci İ, Ünal ZS, Pösteki G, Güneş HV, Karaöz E. Kanser Hücrelerinin Çoğlaması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi ve miRNA İlişkisi. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi P-57, S-70, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

8) 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi Sözlü Bildiri Mansiyon Ödülü 1.si

Darıcı H, Öncü M, Duruksu G, **Sağlam Ö**, Karaöz E. Activating Pluripotency pathways via small molecules. **1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, S-13, S-35, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.**

9) V. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi MOKAD Poster Bildiri 3.lük ödülü

Sağlam Ö, Ünal ZS, Subaşı C, Karaöz E. Tumorigenesis effect of IL-6 in malign breast tissue stromal cells. **5th Multidisciplinary Cancer Research Congress, 23rd – 27th of April 2014, Bodrum-TURKEY.**

Pojeler

- 1)** Multiple myeloma kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve bu hücrelerden elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. TÜBİTAK 112S086 (2012-2014), Bursiyer.
- 2)** MDA-MB-231 Kanser Hücrelerinin Çoğalması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi ve miRNA İlişkisi. ESOGÜ BAP 2013-147, Proje Çalışanı.
- 3)** STZ-NA ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Cinnamon ve Şeker Çayı (Bitki Karışımı) Ekstraktlarının DNA Hasarı ve IR-B ile IP 3-Kinaz Ekspresyonu Üzerine Etkileri. ESOGÜ BAP 200711031 (2007-2009), Proje Çalışanı.

Bilimsel Toplantılardaki Görevler (Kongre, Kurs ve Sempozyum)

- 1.** VI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Düzenleme kurulu üyesi**, 01-05 Haziran 2009, Kocaeli.
- 2.** VII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Düzenleme kurulu üyesi**, 19-23 Ekim 2009, Kocaeli.
- 3.** VIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 2-6 Kasım 2009, Kocaeli.
- 4.** IX. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 22-26 Mart 2010, Kocaeli.
- 5.** X. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 14-18 Haziran 2010, Kocaeli.
- 6.** XI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 11-15 Ekim 2010, Kocaeli.
- 7.** XII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 29 Kasım-3 Aralık 2010, Kocaeli.
- 8.** XIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 13-17 Aralık 2010, Kocaeli.
- 9.** XIV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 21-25 Mart 2011, Kocaeli.
- 10.** XV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu (Kocaeli Üniversitesi-Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve TÜBİTAK Destekli) **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 09-13 Mayıs 2011, Kocaeli.
- 11.** I. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi (Uluslar arası Katılımlı), **Yerel Düzenleme Kurulu Üyesi** , 28 Eylül-2 Ekim 2011, Güral Sapanca Oteli, Kocaeli.
- 12.** XVI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 28 Kasım-2 Aralık 2011, Kocaeli.
- 13.** XVII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 24-28 Eylül 2012, Kocaeli.
- 14.** XVIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 05-09 Kasım 2012, Kocaeli.