

**Nükleik Asit Tabanlı Sandviç Formatında mikroRNA Dizi
Platformunun Geliştirilmesi ve Meme Kanseri Çalışmalarında
Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**

Proje No: 109M488

Prof.Dr. Hüseyin Avni Öktem

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif Erson Bensan

Dr. Can Özen

EKİM 2012

ANKARA

Önsöz

Başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta önemli rol oynamalarından dolayı günümüzde hem temel araştırmalarda hem de klinikte miRNA'ların tespitine yönelik muhtelif teknikler geliştirilmektedir. Tamamlanan projemiz kapsamında mevcut sistemlere alternatif oluşturabilecek sandviç hibridizasyona dayalı bir miRNA dizi platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaların tümü TÜBİTAK tarafından sağlanan desteklerle, ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü, Nanobiyoteknoloji Ar-Ge Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ODTÜ Merkezi Labaratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Biriminden de hizmet alımları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar sonucunda sandviç hibridizasyon temelli miRNA dizi platformu konusunda önemli seviyede bilgi birikimi oluşturulmuştur. Önce sentetik miRNA dizileri kullanılarak geliştirilen sandviç hibridizasyon temelli miRNA platformu daha sonra hücre hatlarından izole edilen total RNA örnekleri ile test edilerek platformun total RNA örnekleri ile kullanılabilme potansiyeli incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar baz alınarak birçok yeni Ar-Ge projesi ve tez çalışması tetiklenmiş olup bazıları projenin sonuçlanmasını takiben ivedilikle başlatılmıştır.

Projede emeği geçen tüm araştırmacılar adına TÜBİTAK'a sağlamış olduğu destekten dolayı teşekkür ederiz.

Saygılarımla,



İÇİNDEKİLER

1	Giriş	12
1.1	MikroRNA	12
1.2	MikroRNA ve Kanser İlişkisi	13
1.3	MikroRNA'ların Kanser Tespitinde Kullanılması	14
1.4	Çalışmada kullanılan mikroRNA'lar	15
1.5	Dizi Teknolojisi ve Sandviç Hibridizasyon Yöntemi	16
2	Gereç ve Yöntem.....	18
2.1	Platform	18
2.2	Slayt	19
2.3	Problar	19
2.3.1	Prob 1	19
2.3.2	Adaptör (A)	20
2.3.3	Eşlenik Olmayan Adaptör (Ank)	20
2.3.4	Prob 2 (P2).....	20
2.3.5	Pozitif kontrol	20
2.3.6	Modifiye Problar.....	20
2.4	Çapraz Bağlayıcı	22
2.5	Slayt Analizi.....	22
3	Proje aşamaları	23
3.1	Aşama I: Sandviç hibridizasyon temelli miRNA dizi platformunun geliştirilmesi	23
3.1.1	Birinci Aşamada Kullanılan Oligonükleotid Dizileri	24
3.1.2	Slayt Tasarımı	26
3.2	Aşama II: Farklı miRNA örnekleri ile dizi platformun çalıştırılması.....	26
3.2.1	miRNA prob setleri Çalışması Kapsamında Kullanılan Oligonükleotid Dizileri... ..	27
3.2.2	Slayt Tasarımı	29
3.3	Aşama III: Platformunun Çalışabilirliğinin Total RNA Örnekleri Kullanılarak Araştırılması.....	30
3.3.1	Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	31

3.3.2	Hücre Hatlarının Büyütülmesi	31
3.3.3	Total RNA İzolasyonu.....	32
3.3.4	DNase Uygulaması.....	32
3.3.5	Gerçek Zamanlı RT-PCR Çalışmaları	32
3.3.6	Total RNA Örneklerinin Platform Üzerinde Denenmesi.....	34
4	Bulgular	35
4.1	Aşama I: Sandviç Hibridizasyon Temelli miRNA Dizi Platformunun Geliştirilmesi	35
4.1.1	Çapraz Bağlayıcı.....	35
4.1.2	Nükleik Asit Tabanlı Sandviç Formatında Dizi Analizi Platformunun DNA Adaptörleri ile test edilmesi.....	36
4.1.3	Bloklama ve Hibridizasyon Çözeltileri Optimizasyonu	37
4.1.4	Oligonükleotid Tipi	39
4.1.5	DNA-DNA ve DNA-RNA Sandviç Sistemi.....	41
4.1.6	Farklı Sinyal Probları	42
4.1.7	Yem Probu (P1) Derişiminin Optimizasyonu	44
4.1.8	Sinyal Probu (P2) Derişiminin Optimizasyonu.....	45
4.1.9	Hibridizasyon Süresi Optimizasyonu	47
4.1.10	Hibridizasyon Sıcaklığı Optimizasyonu	48
4.1.11	Yıkama Koşullarının Optimizasyonu	50
4.1.12	Hassasiyetin Belirlenmesi.....	52
4.1.13	miR21 için Optimize Koşullar.....	53
4.2	Aşama II: Farklı miRNA örnekleri ile dizi platformun çalıştırılması.....	54
4.2.1	miRNA-Prob setlerinin denemesi	54
4.2.2	Prob setlerinin tek slayt üstünde denenmesi	56
4.2.3	Yıkama Koşulları Optimizasyonu	57

4.2.4	P1-P2 Bağlanması Test Edilmesi.....	58
4.2.5	FAM İşaretli Adaptor ile Platformun Test Edilmesi	59
4.2.6	Adaptörlerin Diğer Prob Setlerine Bağlanma Oranlarının Belirlenmesi.....	61
4.2.7	MikroRNA prob setleri için hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonu	64
4.2.8	miR200 ailesinin özgünlüğünün test edilmesi.....	68
4.2.9	miR200c adaptörünün bağlanma koşullarının optimizasyonu.....	69
4.2.10	Platformun hassasiyetinin belirlenmesi	71
4.3	Aşama III: Platformunun çalışabilirliğinin total RNA örnekleri kullanılarak araştırılması.	74
4.3.1	Total RNA izolasyonu.....	74
4.3.2	cDNA Analizi	75
4.3.3	Gerçek zamanlı RT-PZR çalışmaları	76
4.3.4	DNase Uygulaması.....	77
4.3.5	Total RNA Örneklerinin miRNA Platformuna Uygulanması	79
5	Tartışma ve Sonuç.....	82
6	REFERANSLAR.....	84
	PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	87

Tablolar

Tablo 1: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan P1 dizilimleri	24
Tablo 2: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan adaptör dizilimleri	25
Tablo 3: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan P2 dizilimleri	25
Tablo 4: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan pozitif kontrol dizilimleri	26
Tablo 5: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan P1 dizilimleri	27
Tablo 6: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan P2 dizilimleri	28
Tablo 7: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan miRNA (adaptör) dizilimleri.....	28
Tablo 8: Çalışmada hücre hatlarını büyütmek için kullanılan mediumlar	31
Tablo 9: Çalışmada kullanılan Taqman Probları	34
Tablo 10 : Sandviç sistemin test edilmesi için kullanılan prob ve adaptör dizileri.....	36
Tablo 11: Bloklama ve hibridizasyon çözeltisi denemelerinde kullanılan koşullar	38
Tablo 12: Oligonükleotid tipi çalışmalarında kullanılan koşullar	39
Tablo 13: DNA-DNA, DNA-RNA sandviç sistemleri arasındaki farkların incelenmesi için kullanılan koşullar.....	41
Tablo 14: Farklı sinyal problemlerinin test edilmesi için kullanılan koşullar	43
Tablo 15: P1 derişiminin test edilmesi için kullanılan koşullar	45
Tablo 16: P2 derişiminin test edilmesi için kullanılan koşullar	45
Tablo 17: Hibridizasyon süresinin test edilmesi için kullanılan koşullar	47
Tablo 18: Hibridizasyon sıcaklığının test edilmesi için kullanılan koşullar	49
Tablo 19: Yıkama koşullarının test edilmesi için kullanılan koşullar	50
Tablo 20: Hassasiyetin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan koşullar	52
Tablo 21: miR21 için optimize koşullar	54
Tablo 22 : Yeni prob setlerinin denenmesi için kullanılan koşullar	54
Tablo 23 : Yeni prob setlerinin denenmesi için kullanılan diğer koşullar.....	57
Tablo 24: Platformun seçiciliğinin test edilmesi sırasında kullanılan koşullar	62
Tablo 25 : Hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonu çalışmalarında kullanılan koşullar.....	65
Tablo 26: miR200c bağlanma koşullarının iyileştirilmesi için yapılan denemeler.....	70
Tablo 27: Platformun seçiciliğinin test edilmesi sırasında kullanılan kullanılan koşullar	72
Tablo 28: Total RNA konsantrasyonu	75

Tablo 29: Ters Transkripsiyon analizleri için kullanılan koşullar	75
Tablo 30: Gerçek zamanlı RT-PZR.....	76
Tablo 31: Total RNA konsantrasyonu	77
Tablo 32: GAPDH PZR solüsyonu.....	77
Tablo 33: GAPDH PZR koşulları	77
Tablo 34: Hücre Hatları RNA konsantrasyonu.....	78
Tablo 35: Platformun meme kanseri hücre hatlarının total RNA örnekleri ile test edilmesi sırasında kullanılan koşullar	79
Tablo 36: Platformun meme kanseri hücre hatlarından alınan total RNA örnekleri ile test edilmesi sırasında kullanılan koşullar	82

Şekiller

Şekil 1: mRNA'ların miRNA'lar tarafından kontrol edilme yolları	12
Şekil 2: Piyasadaki miRNA tespitine yönelik dizi platformlarının çalışma prensibi	16
Şekil 3: Nükleik asit tabanlı sandviç formatında miRNA dizi platformu	17
Şekil 4: Nükleik asit tabanlı sandviç formatında miRNA dizi platform	18
Şekil 5: Kilitli nükleik asit monomerleri	21
Şekil 6: 2' O-Metil modifiye nükleik asit monomeri	21
Şekil 7: Sulfo-EMCS ve SM(PEG)n çapraz bağlayıcılarının kimyasal yapıları	22
Şekil 8: Birinci aşama slayt tasarımı	26
Şekil 9: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan slayt tasarımı	29
Şekil 10: Üçüncü aşamada izlenen prosedür basamakları	30
Şekil 11: Gerçek zamanlı RT-PCR Çalışmaları	33
Şekil 12: Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar	35
Şekil 13: Sandviç sistemin 1, 5, 10 µM P1 konsantrasyonları ile test edilmesi	37
Şekil 14: Çalışma kapsamında denenen bloklama ve hibridizasyon çözeltileri	38
Şekil 15: Oligonükleotid tipleri	40
Şekil 16 DNA-RNA ve DNA-DNA sandviç sistemleri arasındaki fark	42
Şekil 17: FAM ve Biotin işaretli sinyal probu	43
Şekil 18 P1 derişimi optimizasyonları	44
Şekil 19: P2 derişimi optimizasyonları	46
Şekil 20 Hibridizasyon süresi optimizasyonları	48
Şekil 21 Hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonları	49
Şekil 22 Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları	51
Şekil 23 Hassasiyetin belirlenmesi	53
Şekil 24: miR21 için geçen dönem optimize edilen koşullar kullanılarak yeni miRNA prob setleri için oluşturulan sandiviç deneyleri	55
Şekil 25: Yeni prob setleri ile oluşturulan platform için elde edilen sonuçlar	56
Şekil 26: Yeni prob setleri ile oluşturulan platform için elde edilen sonuçlar	58
Şekil 27: P1 ve P2 problemlerinin bağlanma olasılığı	59
Şekil 28: FAM işaretli P1 ile platformun performansı	60

Şekil 29: Adaptörlerin özgünlüğünün belirlenmesi çalışmalarında kullanılan slayt tasarımı ve beklenen sonuç	61
Şekil 30: Platformun seçiciliği.....	63
Şekil 31: 30°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar.....	65
Şekil 32: 35°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar.....	66
Şekil 33: 40°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar	67
Şekil 34: 45°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar A.....	68
Şekil 35: 50°C hibridizasyon sıcaklığında miR200 ailesine ait adaptörlerin seçiciliğinin test edilmesi	69
Şekil 36: miR200c için bağlanma koşullarının test edilmesi.....	71
Şekil 37: Dizi platformunun hassasiyeti.....	73
Şekil 38: DNase işlemi uygulanmış örnekler.....	78
Şekil 39: Hücre hatları	80
Şekil 40: Hücre hatları	81

Özet

MikroRNA'ların (miRNA) gelişim ve farklılaşma yolları, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre döngüsü ve hücre ölümü gibi önemli mekanizmalarda kritik görevleri olduğu ve ifadeleri bozulan miRNA'ların kanser başta olmak üzere pek çok hastalık patolojisinde önemli rolleri olduğu son yıllarda yapılan birçok araştırmada belirtilmektedir. Bu sebeple günümüzde hem temel araştırmalarda hem de klinikte miRNA'ların tespitine yönelik muhtelif teknikler geliştirilmektedir. Tamamlanan projemiz kapsamında mevcut sistemlere alternatif oluşturabilecek sandviç hibridizasyona dayalı bir miRNA dizi platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Projemiz kapsamında geliştirilen platform, tespiti amaçlanan hedef miRNA ve buna yarı eşlenik olan iki oligonükleotid probdan oluşmaktadır. Bu sisteme göre hedef miRNA (adaptör) dizisinin bir kısmına eşlenik şekilde tasarlanmış olan yem prob (Prob1) cam yüzeye çapraz bağlayıcılar yardımıyla sabitlenmekte, hedef mikroRNA'nın (adaptör) hibridizasyon yoluyla Prob1'e bağlandığı takdirde adaptörün varlığı yarı eşlenik olan sinyal probunun da (Prob2) sandviç sisteme bağlanması ile belirlenmektedir. Sandviç tabanlı miRNA dizi platformu RNA'nın direkt olarak kullanılmasına olanak sağlayarak, mevcut dizi sistemlerinde gerekli olan komplementer DNA sentezi ve/veya işaretlenmesi olmadan çalışabilmektedir.

Sandviç hibridizasyon tabanlı miRNA dizi platform 7 miRNA (miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b, miR200c) için geliştirilmiş, normal ve kanser hücre hatları ile test edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, dizi platform, meme kanseri, sandviç hibridizasyon

Abstract

Micro RNAs (miRNA) are small non-coding RNAs that are involved in important regulatory pathways such as differentiation, development, metabolism, cell proliferation and cell death. Several recent researches show that deregulated expression of miRNAs has crucial roles in disease pathologies, mainly in cancer. Furthermore, expression patterns of miRNAs appear to be tissue specific and they have higher stability than mRNAs. These make miRNAs ideal biomarkers. Therefore, accurate miRNA detection both in research and in clinical setups is becoming crucial. Various commercial platforms are present to serve this purpose. In the presented study, we aimed to develop an alternative to existing tools to detect miRNAs using an array platform based on sandwich hybridization.

The sandwich hybridization method is based on the recognition of a specific DNA/RNA sequence (target) by two probes. In this method, the capture probe (P1) which is fixed to the solid surface with the help of cross-linkers, is specific to one part of the target molecule. Target molecule binds to the capture probe and the existence of target molecule is defined with the binding of signal probe (P2). Sandwich hybridization does not require a labelling and/or cDNA synthesis steps. Therefore, non-labelled miRNA sequences can be directly applied to the system.

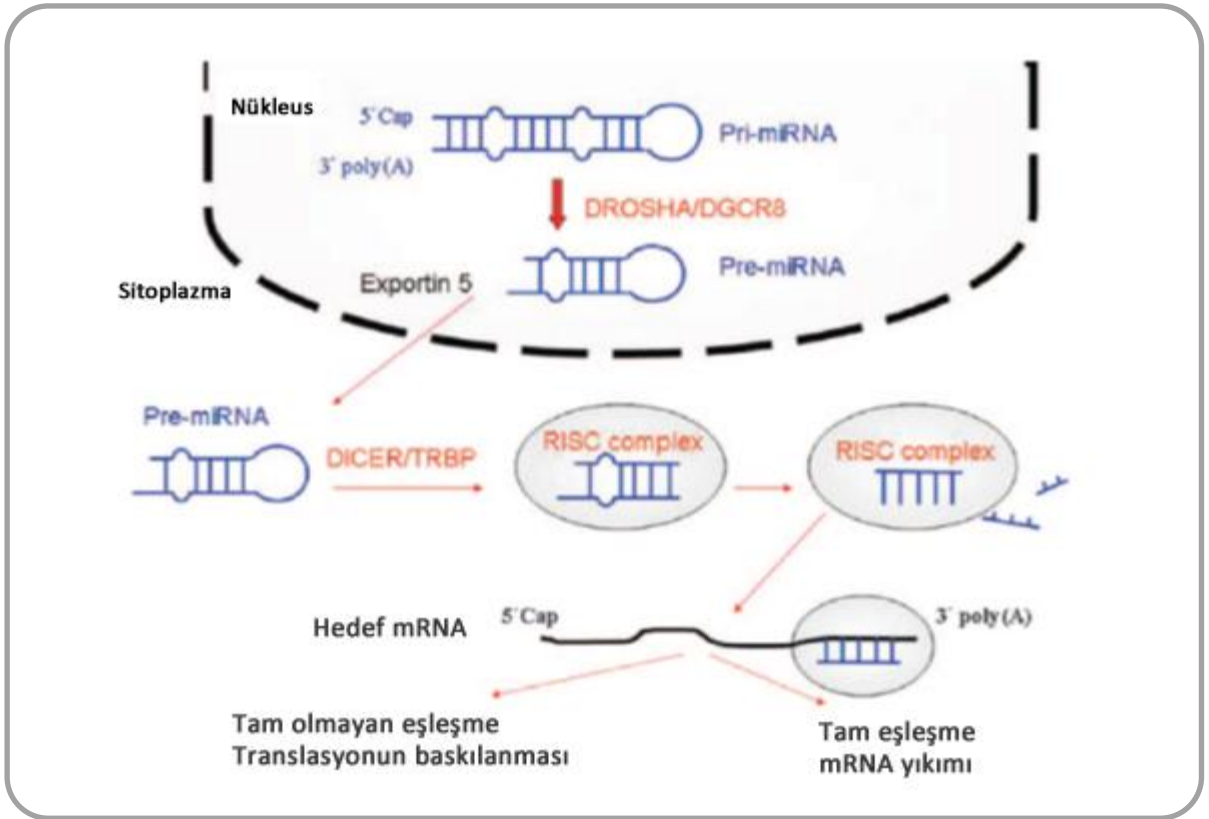
The sandwich hybridization base miRNA detection chip was performed for seven miRNAs (miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b, miR200c) and tested with normal and cancer cell lines.

Keywords : miRNA, microarray, breast cancer, sandwich hybridization

1 Giriş

1.1 MikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA) protein kodlamayan, 16-29 baz uzunluğunda RNA molekülleridir. Evrimsel olarak korunmuş bu RNA molekülleri, hedefledikleri mRNA'ların 3'UTR (untranslated region, transle edilmeyen bölge) bölgelerine bağlanarak, mRNA'nın translasyonunu engelleyebilir veya bazı durumlarda mRNA'nın yıkımına yol açabilirler.



Şekil 1: mRNA'ların miRNA'lar tarafından kontrol edilme yolları (Erson ve Petty, 2008'den uyarlanmıştır)

Hayvanlarda miRNA'ların, mRNA yıkımına yol açmadan proteine dönüşüm aşamalarında daha etkili oldukları bilinmektedir (Erson ve Petty, 2008). Öte yandan miRNA'lar ile gen anlatımının (ekspresyonunun) kontrol edilmesi oldukça karmaşık bir sistemdir. Hedef bölge

genellikle birden fazla miRNA için bağlanma bölgesi içerir. Ayrıca tek bir miRNA farklı görevleri olan 200'den fazla mRNA'yı kontrol edebilir (Krek ve ark., 2005).

İlk olarak 1993 senesinde *Caenorhabditis elegans*'da tanımlanmalarının ardından miRNA'ların varlıkları pek çok organizmada (örn. primatlarda, kemirgenlerde, kuşlarda, balıklarda, solucanlarda, sineklerde, bitkilerde ve virüslerde) gösterilmiştir (Griffiths-Jones ve ark., 2008; Bartel 2004; Ambros ve ark., 2003; Lee ve Ambros 2001).

İnsan genomunda yaklaşık 1000 tane miRNA geni olduğu tahmin edilmekte ayrıca protein kodlayan genlerin %30'unun da miRNA'lar tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir (Berezikov ve ark., 2005). Bu özellikleri ile miRNA'lar gelişim ve farklılaşma yolları, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre döngüsü ve hücre ölümü gibi önemli mekanizmalarda görev alarak bu önemli mekanizmaları kontrol etmektedirler. Yapılan son araştırmalarda ifadeleri bozulan miRNA'ların kanser başta olmak üzere pek çok hastalık patolojisinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir.

1.2 MikroRNA ve Kanser İlişkisi

MikroRNA'ların kanser açısından önemli olabileceği görüşü ilk kez kronik lenfositik lösemi hastalarında sıklıkla silinen veya değişime uğrayan 13q14 bölgesindeki miR15a ve miR16a genlerinin tanımlanmasıyla ve B hücrelerinde anti-apoptotik BCL-2'yi hedeflediklerinin anlaşılmasıyla ortaya çıkmıştır (Cimmino ve ark., 2005; Calin ve ark., 2002). Kanser hücrelerinde sıklıkla görülen genomik instabilite bölgeleri incelendiğinde miRNA'ların bu bölgelerde yoğun olarak buldukları ve DNA kopya sayısı anormallikleri gösterdikleri anlaşılmıştır (Calin ve ark., 2004).

Daha önce belirtildiği gibi her bir miRNA'nın yaklaşık 200 adet mRNA hedefleyebileceği tahmin edilmektedir. Bu yüzden ifadesi değişmiş bir miRNA'nın pek çok farklı yolağı etkileyebileceği açıktır. Bu görüşü destekleyecek bulgular her geçen gün artmakta ve miRNA'ların pek çok farklı hastalık etiolojisindeki rolleri anlaşılmaktadır (Erson ve Petty 2008).

Yapılan çalışmalar miRNA'ların dokuya özel ifade profilleri de olduğunu göstermektedir. Bu sayede dokuları ve farklı dokularda başlamış tümörleri de birbirinden ayırmak mümkün olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, bir miRNA gen ifadesi çalışmasında diğer incelenen dokularla karşılaştırıldığında, sadece normal memede ifade edilen bir miRNA gen profili olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2004).

Normal dokularda yapılan çalışmalara ek olarak primer tümör ve kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda da ifade düzeyleri değişmiş pek çok miRNA belirlenmiştir. Örneğin miR520c ve miR373'ün artışı, meme hücre adhezyon ve hareketliliğinde rol alan CD44 proteinin miktarını azaltarak meme kanseri hücrelerine metastatik özellik kazandırabilmektedir (Huang ve ark., 2008). Meme kanserinde (başka kanserlerde de) miR21 ifadesinin arttığı bulunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda miR21'in meme kanseri hücrelerinde fazla üretilmesi sonucunda apoptozda rol alan PDCD4 (Programmed Cell Death 4) ve aktin filamentlere bağlanan TPM1 (tropomyosin) proteinlerinde azalma tespit edilmiştir (Frankel ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2007). Buna bağlı olarak da meme kanseri hücrelerinde miR21 susturulduğunda, artan apoptoz ve azalan proliferasyon görülmüştür (Si ve ark., 2007). miR10b'nin fazla üretilmesi meme tümörlerinde invazyonu arttırmaktadır (Ma ve ark., 2007). Metastatik tekrar görülen meme kanseri hastalarında miR335 ve miR126 ifadelerinin az olduğu ve bu iki miRNA'nın metastas baskılayıcı özellikte oldukları tespit edilmiştir (Tavazoie ve ark., 2008; Frankel ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2007; Si ve ark., 2007). Bunlara ek olarak bazı miRNA gen ifadelerinin, özellikle belli bazı meme tümör tipleriyle ilintili olduğu anlaşılmaktadır. miR30 gen ifadesinin azaldığı tümörler, östrojen ve progesteron reseptör negatif tümörler olarak belirlenmiştir (Iorio ve ark., 2005).

1.3 MikroRNA'ların Kanser Tespitinde Kullanılması

Tümörlerin moleküler sınıflandırılması tümör tiplerinin, aşamalarının anlaşılması ve buna bağlı olarak daha doğru ve erken teşhis tekniklerinin geliştirilmesi ve etkili ilaç tedavilerinin seçimi için önemlidir. Kanser teşhisinde mRNA ya da miRNA gibi birçok biyo-belirteç kullanılabilir. Öte yandan kanser hücrelerinde bozulan miRNA ifadesinin profillenmesinin mRNA'ya göre daha üstün olması bu küçük RNA moleküllerinin hastalarda

diagnostik ve prognostik biyo-belirteçler olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. MikroRNA'lar daha dokuya özel olduğundan ifade profilleri özgündür ve farklı tümör tiplerini ayırt etmekte daha hassastırlar. Ayrıca miRNA'ların vücut sıvılarında da bulunması ve küçük boyutlarından ötürü RNaz etkilerinden korunabilmeleri, bu moleküllerin biyo-belirteçler olarak kullanılma potansiyellerini gündeme getirmiştir.

Bunlara bağlı olarak miRNA'ların tespit edilmesi gerek temel araştırmalarda gerekse klinik uygulamalarda önem kazanmaktadır. Bu sebeple miRNA'ların tespitine yönelik muhtelif teknikler geliştirilmektedir.

1.4 Çalışmada kullanılan mikroRNA'lar

Çalışmamızda literatürde meme kanseri ile ilişkisi olduğu belirlenen miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b ve miR200c kullanılarak dizi platformu geliştirilmiştir.

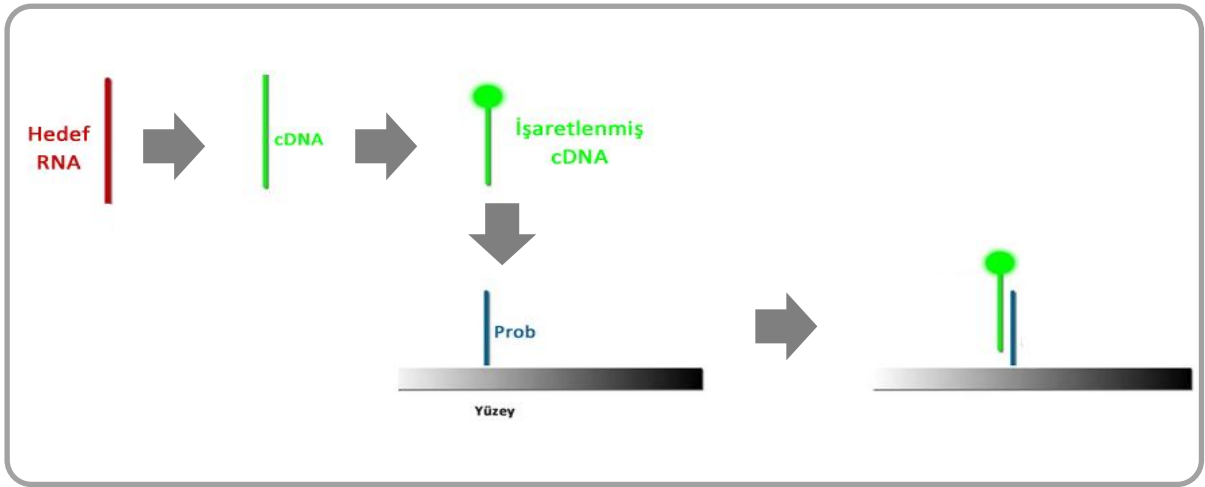
MikroRNA'lardan miR21 ifadesinin meme kanserinde (başka kanserlerde de) arttığı bulunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda miR21'in meme kanseri hücrelerinde fazla üretilmesi sonucunda apoptozda rol alan PDCD4 (Programmed Cell Death 4) ve aktin filamentlere bağlanan TPM1 (tropomyosin) proteinlerinde azalma tespit edilmiştir (Frankel ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2007). Buna bağlı olarak da meme kanseri hücrelerinde miR21 susturulduğunda, artan apoptoz ve azalan proliferasyon görülmüştür (Si ve ark., 2007). miR10b'nin fazla üretilmesi meme tümörlerinde invazyonu arttırmaktadır (Ma ve ark., 2007). On normal ve 76 neoplastik meme kanseri örneği ile yapılan bir çalışmada miRNA ekspresyonunun normal ve kanserli dokuları net bir şekilde ayırabildiği belirlenmiştir (Iorio ve ark., 2005). Ayrıca meme kanserinde miR21 ifadesinin arttığı, miR125b, miR145 ve miR10b'nin ifadelerinin azaldığı birçok çalışmada gözlemlenmiştir (Mattie ve ark., 2006; Iorio ve ark., 2005).

Yukarıda belirtilen miRNA'lara ek olarak platformu normalize etmek amacıyla U6 RNA da platforma eklenmiştir.

1.5 Dizi Teknolojisi ve Sandviç Hibridizasyon Yöntemi

Son 20 yılda önemli gelişmelere tanık olan ve eşlenik nükleik asit zincirlerinin (DNA-DNA, DNA-RNA veya RNA-RNA) hibridizasyonu prensibine dayalı oligonükleotid dizi teknolojisi, genotipleme, mutasyon taraması, gen ifade analizi ve tek nükleotid polimorfizmi belirleme gibi moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılabilen, hassas ve hızlı analiz imkanı tanıyan bir biyoanalitik araç halini almıştır (Muyal ve ark., 2008; Schena ve ark., 1995).

MikroRNA tespitine yönelik dizi platformları Exiqon (miRCURY), Affymetrix (GeneChip miRNA) ve Invitrogen (NCode) gibi büyük şirketler tarafından sağlanmaktadır. Bu platformlarda, belirli metodlarla işaretlenmiş RNA örnekleri dizi platformlarında kullanılmaktadır. Bir başka deyişle dizi platformuna uygulanmadan önce bir işleminden geçirilerek işaretlenmelidir.

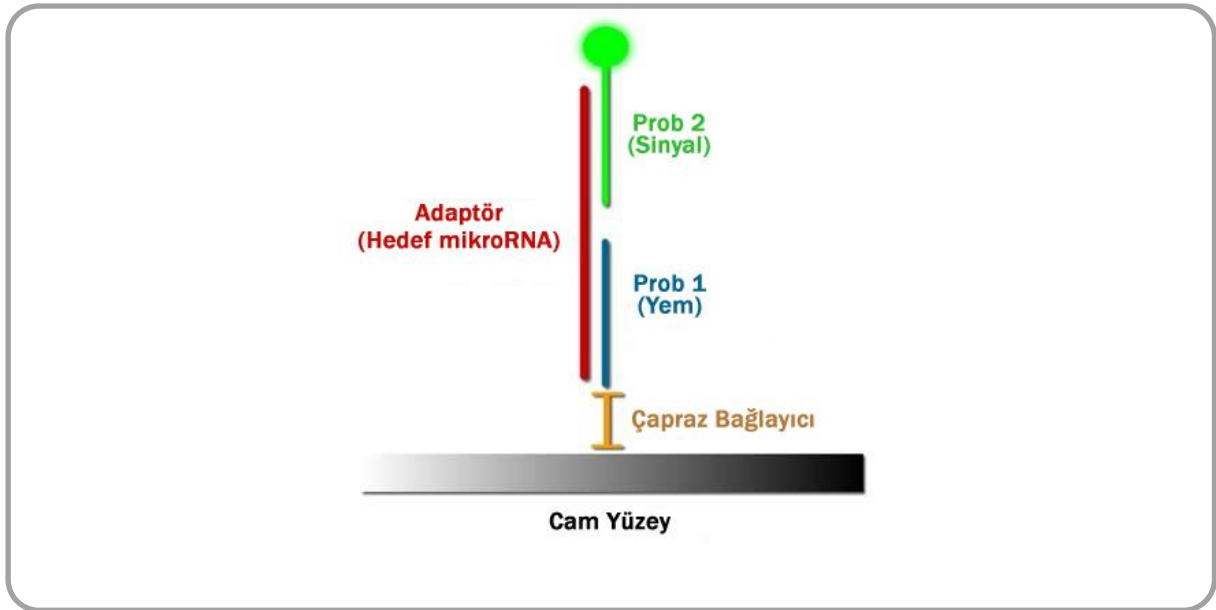


Şekil 2: Piyasadaki miRNA tespitine yönelik dizi platformlarının çalışma prensibi

Ayrıca bu sistemlerin büyük bölümü donanımlarıyla beraber satılmakta oldukları için büyük bir finansal yatırım da gerektirmektedirler. Yapılan bu donanımsal yatırımın sadece üretici firma tarafından üretilen çipleri okumak için kullanılabilmesi de ticari dizi sistemlerinin diğer önemli dezavantajlarından biridir.

Dizi tipi olarak kullanılabilir opsiyonlardan biri olan sandviç hibridizasyon formatında ise hedef dizinin sisteme uygulanmadan önce işaretlenmesi gerekmemektedir. Sandviç hibridizasyon sistemi Northern Blot gibi konvansiyonel RNA tayin metodlarına göre daha hızlı ve güvenilir sonuçlar sağlamanın yanı sıra daha hassas fakat masraflı RT-PCR gibi modern metodlara göre de daha ekonomik bir çözüm sunmaktadır. Hem DNA hem de RNA uygulamaları bulunan bu platforma elektrokimyasal ve optik türde farklı sinyal metodları entegre edilebilmektedir (Du ve ark., 2009; Wang ve ark., 2008).

Tüm bu sebeplerden dolayı, çalışmada mevcut sistemlere alternatif oluşturabilecek sandviç hibridizasyonuna dayalı bir miRNA dizi platformu geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, sandviç hibridizasyon esasına dayalı, nükleik asit tabanlı ve miRNA tespitinde kullanılabilir slayt formatında bir dizi platformu oluşturulmuştur. Geliştirilen platform, tespiti amaçlanan hedef miRNA ve buna yarı eşlenik olan iki oligonükleotid probdan oluşmaktadır.



Şekil 3: Nükleik asit tabanlı sandviç formatında miRNA dizi platformu

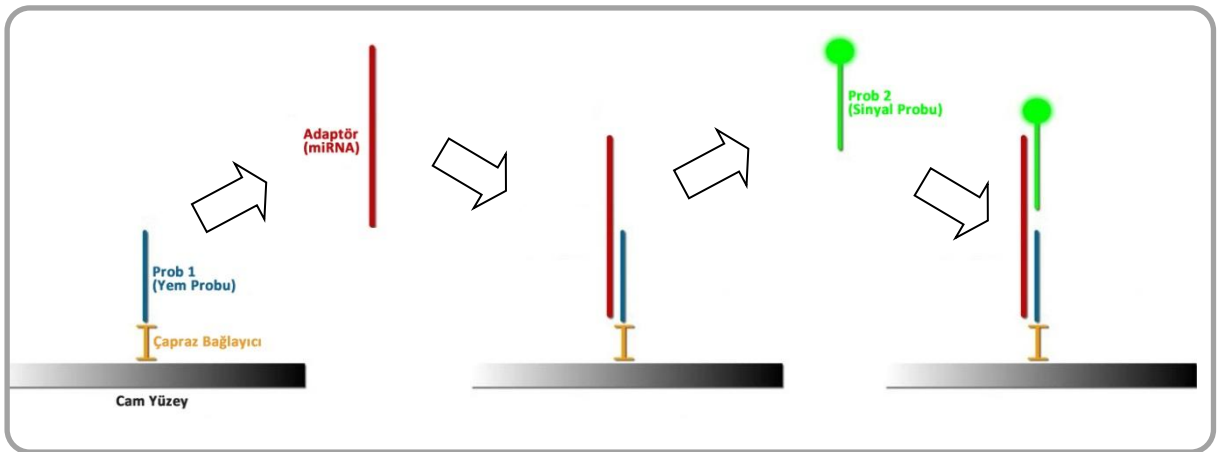
Geliştirilen bu platform miRNA'ların, iki farklı prob kullanılarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 3). Geliştirilen dizi platformu hedef miRNA moleküllerinin herhangi bir şekilde işaretlenmesini gerektirmeden miRNA'nın direkt olarak kullanılmasına olanak

sağlayarak, mevcut dizi sistemlerde gerekli olan komplementer DNA sentezi veya işaretlemesi olmadan çalışabilmektedir. Platformun diğer bir avantajı da ihtiyaçlara göre değiştirilebilecek bir esnekliğe sahip olmasıdır. miRNA'ların kanser dışındaki diğer hastalıkları da izleme ve teşhis etmede biyo-belirteç olarak kullanılabilmesi düşünüldüğünde proje kapsamında geliştirilen bu platformun çok farklı kullanım alanlarına yönelebileceği gözlemlenmektedir.

2 Gereç ve Yöntem

2.1 Platform

Daha önce belirtildiği gibi projemiz kapsamında geliştirilen platform, tespiti amaçlanan hedef miRNA ve buna yarı eşlenik olan iki oligonükleotid probdan oluşmaktadır. Şekil 4, çalışmada geliştirilen sandviç platformu temsil etmektedir. Bu sisteme göre hedef miRNA (adaptör) dizisinin bir kısmına eşlenik şekilde tasarlanmış olan yem prob (Prob1) cam yüzeye çapraz bağlayıcılar yardımıyla sabitlenmekte, hedef miRNA'nın (adaptör) hibridizasyon yoluyla Prob1'e bağlandığı takdirde adaptörün varlığı yarı eşlenik olan sinyal probunun da (Prob2) sandviç sisteme bağlanması ile belirlenmektedir.



Şekil 4: Nükleik asit tabanlı sandviç formatında miRNA dizi platform

2.2 Slayt

Çalışmalarda yüzeyi poli-L-lysin ile amino fonksiyonelleştirilmiş 25 x 75 x 1 mm boyutlardaki cam mikroskop slaytları kullanılmış ve gerekli slaytlar Thermo Scientific firmasından temin edilmiştir.

2.3 Problar

Çalışmada kullanılacak problar (P1 ve P2) için en uygun dizilimler moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan yazılımlar kullanılarak belirlenmiştir. Tasarlanan tüm oligonükleotidler uygun yazılımlar kullanılarak:

- Hedeflenen hibridizasyon (adaptör ile prob 2 ve prob 1 arasında),
- İstenmeyen hibridizasyon (prob 2 ve prob 1 arasında)
- İkincil yapı (secondary structure) ve saç tokası (hairpin) oluşumu açılarından test edilmiştir.

Bu analizler sonucunda hedeflenen hibridizasyon (adaptör ile prob 2 ve prob 1 arasında), istenmeyen hibridizasyon (prob 2 ve prob 1 arasında) ve P1 / P2 için ikincil yapı (secondary structure) ve saç tokası (hairpin) oluşumu açılarından dizilimden kaynaklanan herhangi bir problem olmadığı ortaya çıkmıştır.

Belirlenen oligonükleotidler "Integrated DNA Technologies" (C Leuven, Belçika) firmasından temin edilmiştir.

2.3.1 Prob 1

- Çalışmamızda poly-L-lysin kaplı cam yüzeye çapraz bağlayıcılar yardımıyla sabitlenen oligonükleotid, Prob 1 (P1) olarak adlandırılmıştır (Şekil 3).
- P1'in dizilimi tesbit edilmesi amaçlanan miRNA sekansına yarı eşleniktir.
- P1'in 5' ucu tiyol modifikasyonu taşımaktadır.

2.3.2 Adaptör (A)

- Çalışma kapsamında tespit edilmesi amaçlanan hedef miRNA molekülü Adaptör (A) olarak adlandırılmıştır (Şekil 3).

2.3.3 Eşlenik Olmayan Adaptör (Ank)

- Negatif kontrol olarak kullanılacak P2 ve P1 problemlerine eşlenik olmayan miRNA molekülü Adaptör Negatif Kontrol (Ank) olarak isimlendirilmiştir.

2.3.4 Prob 2 (P2)

- Prob 1 tarafından yüzeyde tutulacak adaptöre yarı eşlenik olan ve sinyal molekülü taşıyan oligonükleotid Prob 2 (P2) olarak isimlendirilmiştir.
- P2'in dizilimi, tesbit edilmesi amaçlanan miRNA sekansına yarı eşleniktir.
- P2, 3' ucunda floresan bir boya olan 6-karboksifloresin (6-FAM) yada biyotin ligandı taşımaktadır.

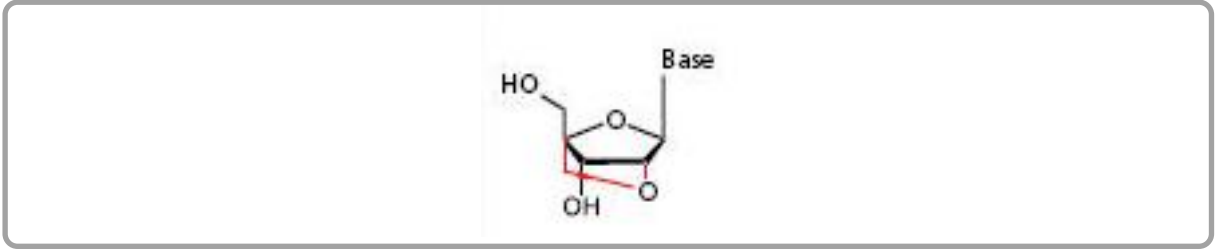
2.3.5 Pozitif kontrol

- Proje kapsamında pozitif kontrol olarak Fam işaretli P1, optimizasyon için kullanılan miRNA'nın (miR21) DNA dizilimi ve işaretli miR21 kullanılmıştır.

2.3.6 Modifiye Problemler

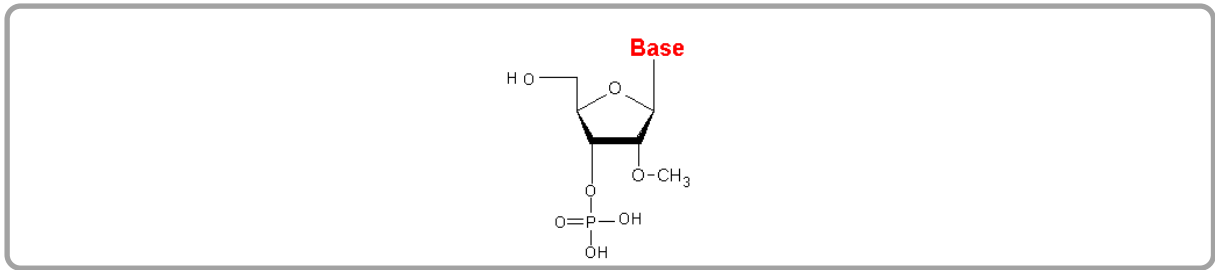
Proje kapsamında hedef miRNA'yı tanıyacak problemlerin seçiciliğini ve oluşacak sandviç hibridinin termal stabilitesini artırmak için normal oligonükleotid problemlerin yanı sıra kilitli (locked nucleic acid - LNA) ve 2'O-Metil modifiye oligonükleotidler de kullanılmıştır.

Kilitli nükleik asitler (LNA), şekil 4’de görüleceği gibi 2’-O atomu 4’-C-atom’una metilen bağı ile bağlanmış nükleik asit benzerleridir. Metilen bağı ile kilitlenmiş nükleotidler diğer nükleotidlere bağlanmak için en uygun şekilde kalır ve böylece yarı eşlenik oligonükleotid dizisine normal oligonükleotid problara göre çok daha kolay ve çabuk bağlanır (Şekil 5).



Şekil 5: Kilitli nükleik asit monomerleri

2’O-metil modifiye nükleotidler, riboz şekerinin 2’ pozisyonunda alkil modifikasyonları içeren RNA nükleotidleridir (Şekil 6). LNA’lerde olduğu gibi bu modifikasyonlara sahip nükleotidlerin varlığı problemlerin hibridizasyon kinetiğini etkileyerek hedef dizilime (mikroRNA) bağlanma olasılıklarını arttırmaktadır.



Şekil 6: 2’ O-Metil modifiye nükleik asit monomeri

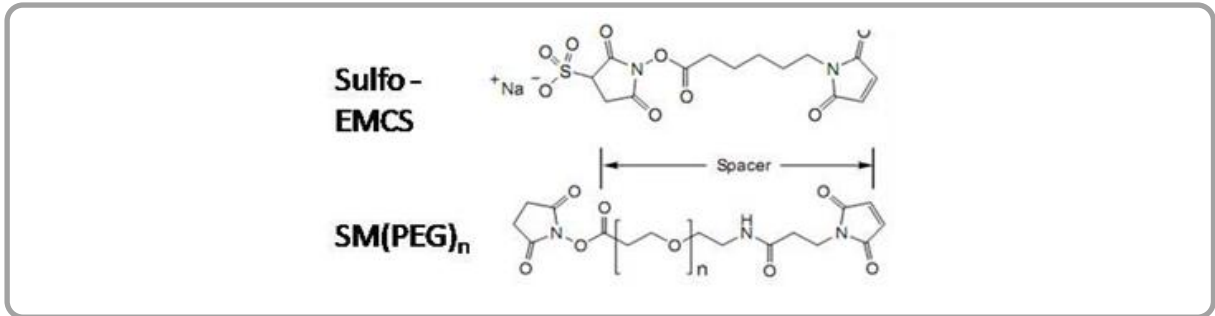
Çalışmada kullanılacak problemler (P1 ve P2) için en uygun LNA ve 2’ O – Metil konformasyonları yine yazılımlar kullanılarak belirlenmiştir. Hedeflenen hibridizasyon (adaptör ile prob 2 ve prob 1 arasında), istenmeyen hibridizasyon (prob 2 ve prob 1 arasında), ikincil yapı (secondary structure) ve saç tokası (hairpin) oluşumu açılarından test edilmiştir.

Bu analizler sonucunda belirlenen problemlerin çalışma açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Belirlenen oligonükleotidler “Integrated DNA Technologies” (C Leuven, Belçika) ve “Exiqon” (Vedbaek, Danimarka) firmalarından temin edilmiştir.

2.4 Çapraz Bağlayıcı

Çalışmada cam yüzeydeki amino gruplarına tiyol modifiye oligonükleotidleri kovalent olarak bağlamak için çapraz bağlayıcılar kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcıların (NHS) ester grubu pH 7-9’da birincil aminlerle reaksiyona girerek amid bağı oluştururken diğer uçtaki maleimit grubu pH 6.5-7.5’da sulfhidril gruplarla reaksiyona girerek stabil tiyoeter bağı kurar. Çalışmada farklı uzunluğa sahip heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar (Sulfo EMCS, SMPEG2, SMPEG6, SMPEG12) denenmiştir. Denenen Sulfo-EMCS ve SM(PEG)_n çapraz bağlayıcılarının kimyasal şekilleri aşağıda verilmektedir (Şekil 7).



Şekil 7: Sulfo-EMCS ve SM(PEG)_n çapraz bağlayıcılarının kimyasal yapıları

2.5 Slayt Analizi

Çalışmanın ilk döneminde slaytlar konfokal lazer tarama mikroskobu ile taranarak sinyal elde edilmiştir. Sinyaller 488 nm argon lazeriyle uyarı yapılarak, 4X büyütme objektif (numerik açıklık 0.1) ve uzun geçişli (long pass) LP505 filtre seti kullanılarak 1024x1024 çözünürlükte ve 12 bit olarak kaydedilmiştir.

Çalışmanın devamında ise slaytların analizi için proje kapsamında alınan mikrodizin tarayıcı (Axon Genepix 4100A) system kullanılmıştır. Alınan mikrodizin tarayıcı iki farklı dalga boyunda (532 nm ve 635 nm) tarama yaparak veri toplayabilme özelliğine sahiptir. Sistemin çözünürlüğü kullanıcı tarafından 5-100 mikron arasında seçilebilmekte ve her tip mikrodizin slaytı ile çalışabilmektedir. Mikrodizin tarayıcı temin edildikten sonra elde edilen tüm sinyaller 532 nm dalga boyunda ve 5 mikron çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

3 Proje aşamaları

Projemiz kapsamında DNA tabanlı miRNA platformunun geliştirilmesi için üç temel aşamanın tamamlanması hedeflenmiştir. Bunlar:

Aşama I: Sandviç hibridizasyon temelli miRNA dizi platformunun geliştirilmesi.

Aşama II: Farklı miRNA örnekleri ile dizi platformun çalıştırılması.

Aşama III: Platformunun çalışabilirliğinin total RNA örnekleri kullanılarak araştırılması.

3.1 Aşama I: Sandviç hibridizasyon temelli miRNA dizi platformunun geliştirilmesi

Projenin ilk aşaması poli-L-lysin kullanılarak amino fonksiyonel gruplarıyla kaplanmış cam slaytlara heterobifonksiyonel bir çarpaz bağlayıcı yoluyla tiyol modifiye uçundan sabitlenecek oligonükleotid prob, bu prob tarafından hibridizasyon yoluyla yüzeye tutunacak hedef miRNA ve hedef sekansa yarı-eşlenik sinyal probunun oluşturacağı sandviç formatının geliştirilmesi ve optimizasyonu üzerine kurulmuştur. Bu aşamada miR21 hedef miRNA olarak kullanılmıştır. Hedef miRNA'yı tanıyacak problemlerin seçiciliğini ve oluşacak sandviç hibridinin termal stabilitesini artırmak için kilitli (locked nucleic acid-LNA) ve 2' O-Metil modifiye oligonükleotidlerin de kullanıldığı bu aşamada ayrıca çarpaz bağlayıcı uzunluğu, prob konsantrasyonu, hibridizasyon süresi, sıcaklığı ve hibridizasyon sonrası yıkama koşulları gibi

deneysel parametreler çalışılarak projenin alt yapısını oluşturacak oligonükleotid dizi platformu optimize edilmiştir.

3.1.1 Birinci Aşamada Kullanılan Oligonükleotid Dizileri

Projenin birinci aşamasında miR21 hedef miRNA olarak kullanılmış ve buna eşlenik P1 ve P2 problemleri belirlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi platformun performansını arttırmak için modifiye problemler ve farklı sinyal çeşitleri denenmiştir.

Prob 1 (P1)

Çalışmanın birinci aşamasında hedef miRNA dizilimine yarı eşlenik olan ve cam yüzeye bağlanan yem probu için kullanılan dizilimler Tablo 1’de verilmektedir. LNA modifiye nükleotidlere sahip olan prob, P1-L; 2’O-Metil modifiye nükleotidlere sahip prob ise P1-M olarak isimlendirilmiştir.

Tablo 1: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan P1 dizilimleri

Prob	P1 dizilimi
▪ P1	5’-/5ThioMC6-D AAAAAAAAAATCAACATCAGT-3’
▪ P1 –L	5’-/5ThioMC6-D AAAAAAAAAAT <u>CAACATCAGT</u> -3’
▪ P1 –M	5’-/5ThioMC6-D AAAAAAAAA <u>UCAUCAUCAGU</u> -3’

**Kilitli ve 2’O-Metil modifiye nükleotidler altı çizili olarak gösterilmiştir.*

Adaptör (A ve Ank)

Projenin birinci aşamasında miR21 hedef miRNA olarak kullanılmıştır. Ayrıca P1 ve P2’ye eşlenik olmayan bir dizilim de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İlgili dizilimler Tablo 2’de verilmektedir.

Tablo 2: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan adaptör dizilimleri

Adaptör	Adaptör dizilimi
▪ miR21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
▪ Eşlenik Olmayan Adaptör (Ank)	5'-CACGUUCGGAUACAUCGAUCGAC-3'

Prob 2 (P2)

Çalışmada kullanılan P2 dizilimleri Tablo 3'de verilmektedir. Tabloda LNA modifiye nükleotidlere sahip olan prob P2-L; 2'O-Metil modifiye nükleotidlere sahip prob ise P2-M olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada biotin ve FAM işaretleri sinyal olarak kullanılmıştır. Buna göre ucunda 6-FAM bulunan proplar P2-L-F ve P2-M-F; biyotin ligandı bulunanlar ise P2-L-B ve P2-M-B olarak isimlendirilmiştir.

Tablo 3: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan P2 dizilimleri

Prob	P2 dizilimi
▪ P2-F	5'-TGATAAGCTAAAAAAAAAAAA/6-FAM/-3'
▪ P2-L-F	5'- <u>TGATAAGCT</u> AAAAAAAAAAAA/6-FAM/-3'
▪ P2-M-F	5'- <u>UGAUAAGCU</u> AAAAAAAAAAAA/6-FAM/-3'
▪ P2-B	5'-TGATAAGCTAAAAAAAAAAAA/3Bio/ -3'
▪ P2-L-B	5'- <u>TGATAAGCT</u> AAAAAAAAAAAA/3Bio/ -3'
▪ P2-M-B	5'- <u>UGAUAAGCU</u> AAAAAAAAAAAA/3Bio/ -3'

* Kilitli ve 2'O-Metil modifiye nükleik asit bazları altı çizili olarak gösterilmiştir.

Pozitif kontrol dizilimleri

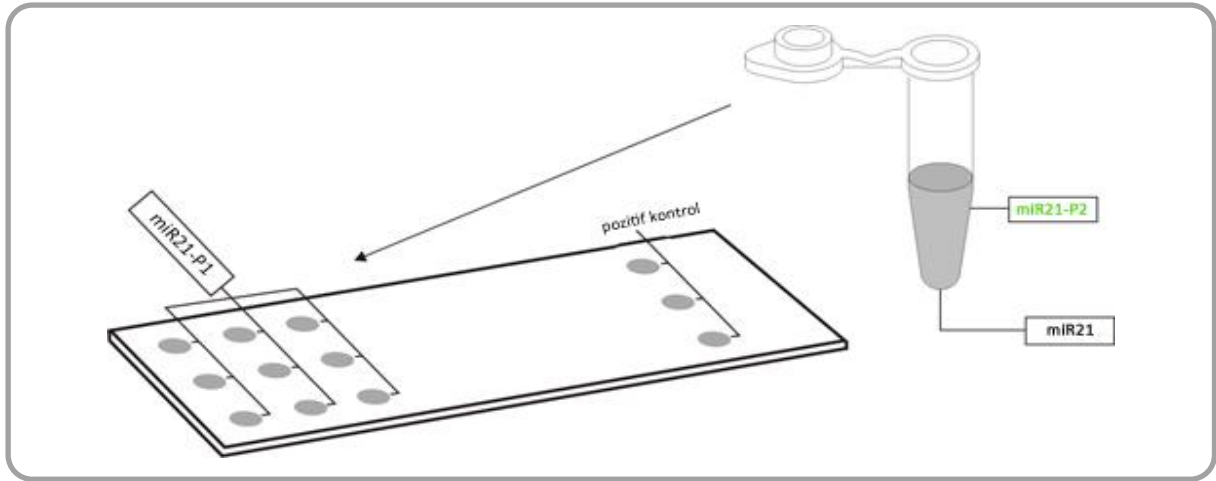
Platformu test etmek için çeşitli dizimler kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında pozitif kontrol olarak kullanılan dizilimler Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4: Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan pozitif kontrol dizilimleri

Pozitif kontrol	Pozitif kontrol dizilimleri
▪ P1-FAM	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAATCAACATCAGT/36-FAM/-3'
▪ miR21 FAM	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA/36-FAM/-3'
▪ miR21-DNA	5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'

3.1.2 Slayt Tasarımı

Projenin birinci aşaması olan sandviç hibridizasyon temelli miRNA dizi platformu geliştirme çalışmalarında Şekil 8'de gösterilmekte olan slayt tasarımı kullanılmıştır. Her slayt üç pozitif kontrol, dokuz adet de test noktası içermektedir. Pozitif kontrol olarak işaretli miR21 problemleri (miR21-F) kullanılmıştır. Buna göre kullanılan her slaytta üçü pozitif kontrol, dokuzu P2-A-P1 sandviç sistemi veya P2-Ank-P1 negatif kontrolü olmak üzere toplam 12 nokta spotlanmıştır.



Şekil 8: Birinci aşama slayt tasarımı

3.2 Aşama II: Farklı miRNA örnekleri ile dizi platformun çalıştırılması.

Çalışmanın ikinci aşaması farklı miRNA'ların dizi platformunda tanınması üzerine kurulmuştur. Olgun miRNA dizinlerinin uzunlukları farklı olabilmekte veya aynı aileden gelen benzer miRNA dizinlerinin birbirinden ayırt edilebilmesi gerekmektedir. Çalışmanın ikinci aşamasında meme kanserinde ifadesinin değiştiği bilinen miRNA'lar arasından farklı

uzunlukta olanlar ve aynı akraba gen kümesine ait olup dizinleri birbirine benzeyen miRNA'lar seçilerek, miRNA tabanlı çipin hassasiyeti ve seçiciliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple meme kanserinde azaldığı ve arttığı bilinen miRNA'lar belirlenmiş ve sentetik olarak elde edilen bu miRNA'lara özgün problar kullanılarak slayt formatında çipler hazırlanarak özgün sinyal eldesi optimize edilmeye çalışılmıştır. Optimize koşullara ulaşılabilmesi için hibridizasyon süresi, sıcaklığı ve hibridizasyon sonrası yıkama koşulları gibi deneysel parametreler bu aşamada da araştırılmıştır.

3.2.1 MikroRNA prob setleri çalışması kapsamında kullanılan Oligonükleotid Dizileri

Çalışmanın ilk aşamasında kilitli (LNA) problemlerin daha iyi sonuçlar verdiği görüldüğünden ikinci aşamada gerçekleştirilen çalışmalarda sadece LNA modifiye nükleotidlere sahip problemler kullanılmıştır.

Prob 1 (P1)

Çalışmanın ikinci aşamasında problemler LNA modifiye nükleotidlere sahip oldukları için [(miRNA ismi)-P1-L] olarak işaretlenmiş ve her bir miRNA için bir P1-L belirlenmiştir. Kullanılan P1 dizilimleri Tablo 5'de verilmektedir.

Tablo 5: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan P1 dizilimleri

Prob	P1 dizilimi
▪ miR21-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAAAT <u>CAACATCAGT</u> -3'
▪ miR10b-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAACACAA <u>ATTCGG</u> -3'
▪ miR145-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAAAGGG <u>ATCCIG</u> -3'
▪ miR125-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAA <u>TCACAAGTTAG</u> -3'
▪ miR200a-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAA <u>CATCGTTACC</u> -3'
▪ miR200b-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAA <u>TCATCATTACC</u> -3'
▪ miR200c-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAA <u>TCATCATTAC</u> -3'
▪ U6-P1-L	5'-/5ThioMC6-D/AAAAAAAAA <u>CGATACAGAGAAGAT</u> -3'

*Kilitli nükleotidler altı çizili olarak gösterilmiştir.

Prob 2 (P2)

Çalışmanın ikinci aşamasında LNA modifiye nükleotidlere sahip ve 3' ucunda 6-FAM ligandı bulunan P2 problemleri [(miRNA ismi)- P2-L-F] olarak isimlendirildi. İlgili dizilimler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan P2 dizilimleri

Prob	P2 dizilimi
▪ miR21-P2-L-F	5'- /TGATAAGCTAAAAAAAAAAA/36-FAM/ -3'
▪ miR10b-P2-L-F	5'- /TCTACAGGGTAAAAAAAAAAA/36-FAM/ -3'
▪ miR145-P2-L-F	5'- /GAAAACCTGGACAAAAAAAAAAA/36-FAM/ -3'
▪ miR125-P2-L-F	5'- / GTCTCAGGGAAAAAAAAAAA /36-FAM/ -3'
▪ miR200a-P2-L-F	5'- / GACAGTGTAAAAAAAAAAA /36-FAM/ -3'
▪ miR200b-P2-L-F	5'- / GGCAGTATTAAAAAAAAAAAA /36-FAM/ -3'
▪ miR200c-P2-L-F	5'- / CGGCAGTATTAAAAAAAAAAAA /36-FAM/ -3'
▪ U6-P2-L-F	5'- / AGCATGGCCCCTGCAAAAAAAAAAAA /36-FAM/ -3'

**Kilitli nükleotidler altı çizili olarak gösterilmiştir.*

Adaptörler (A)

miRNA dizilimleri (adaptörler) Tablo 7'de belirtilmiştir.

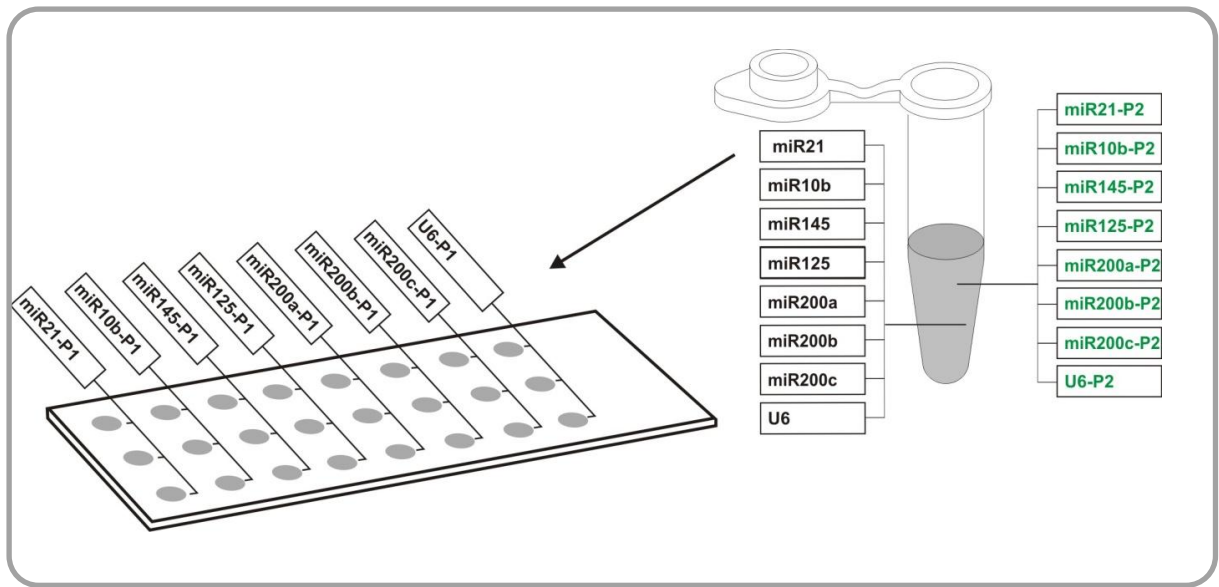
Tablo 7: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan miRNA (adaptör) dizilimleri

Adaptör	Adaptör dizilimi
▪ miR21	5'- UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
▪ miR10b	5'- UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG -3'
▪ miR145	5'- GUCCAGUUUUGCCAGGAAUCCCU -3'
▪ miR125	5'- UCCUGAGACCCUAACUUGUGA -3'
▪ miR200a	5'- UAACACUGUCUGGUAACGAUGU -3'
▪ miR200b	5'- UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA-3'
▪ miR200c	5'- UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA-3'
▪ U6	5'- GCAGGGGCCAUGC UAAUCUUCUCUGUAUCG-3'

Çalışmalar kapsamında negatif kontrol olarak ilk aşamada kullanılan Ank sekansı kullanılmıştır (Tablo 2).

3.2.2 Slayt Tasarımı

Projenin ikinci aşaması olan farklı miRNA'ların dizi platformunda tanınması işlemlerinde şekil 9'da gösterilen slayt tasarımı kullanılmıştır.

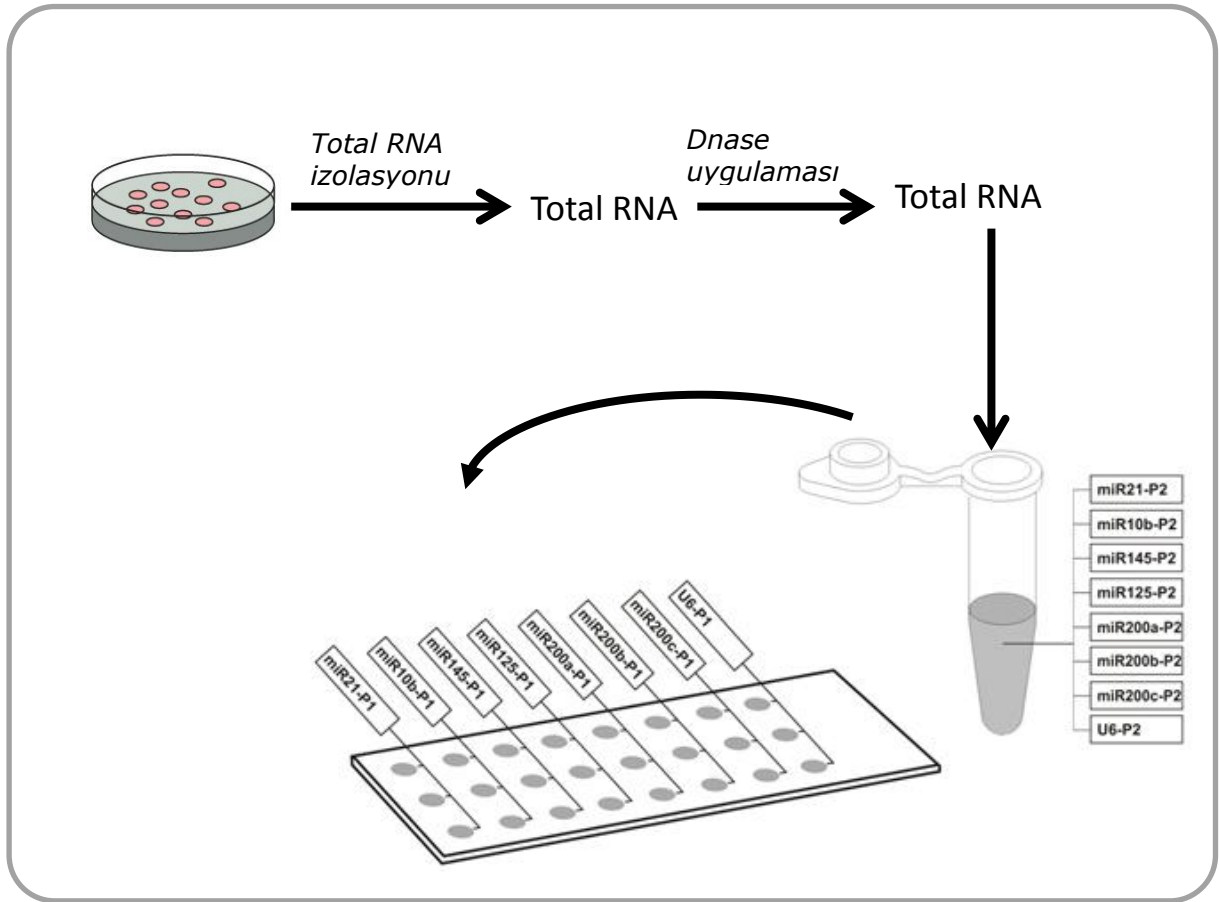


Şekil 9: Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan slayt tasarımı

Buna göre hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip miRNA için P1 noktalanmıştır ve her tip miRNA başına 3 tekrar noktası oluşturulmuştur. Çalışmada adaptörler (miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b, miR200c, U6) ve P2-L'ler (miR21-P2-L, miR10b-P2-L, miR145-P2-L, miR145-P2-L, miR200a-P2-L, miR200b-P2-L, miR200c-P2-L, U6-P2-L) birlikte inkübe edilerek slaydın üzerine eklenmiş ve böylelikle uygun hibridizasyon sıcaklığında P2+A çiftlerinin P1'lere bağlanması sağlanmıştır.

3.3 Aşama III: Platformun Çalışabilirliğinin Total RNA Örnekleri Kullanılarak Araştırılması

Son aşama, geliştirilen platformun hassasiyeti ve hibridizasyonun özgünlüğü doğrulandıktan sonra normal ve farklı metastatik özellikte olan meme kanseri hücreleri (hücre hattı ve ticari olarak mevcut olan ve kanserli dokulardan izole edilmiş totalRNA örnekleri kullanılarak platformun performansının test edilmesi üzerine kurulmuştur. Bu amaçla izlenen prosedür Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10: Üçüncü aşamada izlenen prosedür basamakları

Ayrıca bu üçüncü aşamada hücre hatlarından izole edilen total RNA örnekleri kullanılarak, platformdan elde edilecek sonuçlarla mukayese etmek amacı ile gerçek zamanlı RT-PCR çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada immortal ama tümörigenik olmayan (MCF10A ve MCF12A), metastas negatif (MCF7) ve metastas pozitif (MDA-MB-231) hücre hatları kullanılarak RNA izole edilmiş, elde edilen RNA'lar geliştirilen platformda test edilmiştir.

Ayrıca ticari olarak satılan normal (Ambion AM6952) ve kanserli (Clontech 636635) dokulardan elde edilmiş totalRNA örnekleri de test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimizasyona yönelik olarak hibridizasyon süresi, sıcaklığı ve hibridizasyon sonrası yıkama koşulları gibi deneysel parametreler bu aşamada da araştırılmıştır.

3.3.2 Hücre Hatlarının Büyütülmesi

Çalışmada kullanılacak total RNA örneklerinin izolasyonu için öncelikle hücre hatları uygun mediumlar kullanılarak büyütülmüştür. Hücre hatlarını büyütmek için kullanılan mediumlar Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: Çalışmada hücre hatlarını büyütmek için kullanılan mediumlar

Hücre Hattı	Özellik	Medium
MCF 10A	immortal , tümörigenik olmayan	DMEM/ Ham's F12, 20 ng/ml EGF, 0.5 ug/ml Hydrocortisone, 0.1 ug/ml Cholera toxin, 10 ug/ml insulin, %1 pen-strep, %5 horse serum
MCF12A	Immortal, tümörigenik olmayan	DMEM/Ham's F12, %10 FBS, 20 ng/ml EGF, 500 ng/ml Hydrocortisone, 0.01 mg/ml insulin, %1 non-essential aminoacid, %1 pen-strep
MCF7	Tümörigenik, metastas negatif	DMEM, %10 FBS ve %1 pen-strep
MDA-MB-231	Tümörigenik, metastas pozitif	DMEM, %10 FBS ve %1 pen-strep

Belirtilen mediumlar hazırlandıktan sonra her bir hücre hattından bir cryovial hücre T25 flasklara konarak gece boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası pasajlanan hücreler Hank tuz solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkanan hücreler tripsin/EDTA çözeltisi içinde %5 CO₂ ile 37 °C'de tüm hücreler flaskdan kalkıncaya kadar inkübe edilmiştir. Elde edilen hücreler ikiye bölünerek her bir flaskın üzerine medium eklendikten sonra %70 birleşme görülünceye dek hücre hatları inkübe edilmiştir.

3.3.3 Total RNA İzolasyonu

Trizol yöntemi RNA izolasyonu için oldukça sıklıkla kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Bu sebeple çalışmada büyütülen hücre hatlarından total RNA trizol yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Büyütülen hücre hatları üzerine trizol eklenerek 15 °C'den 30 °C'ye 5 dakika inkübasyonda tutulmuş ve homojenize edilmiştir. Chloroform kullanarak faz ayırma işlemi yapılmış ve sulu fazda kalan RNA izopropil alkol kullanılarak inkübe edilmiştir. Sentrifüjün ardından peletde kalan RNA etanol ile yıkanmıştır. Kurutulan ve Rnase içermeyen su içinde 55 – 60 C'de 10 dakika inkübe edilerek çözülen total RNA çalışmanın devamında kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.3.4 DNase Uygulaması

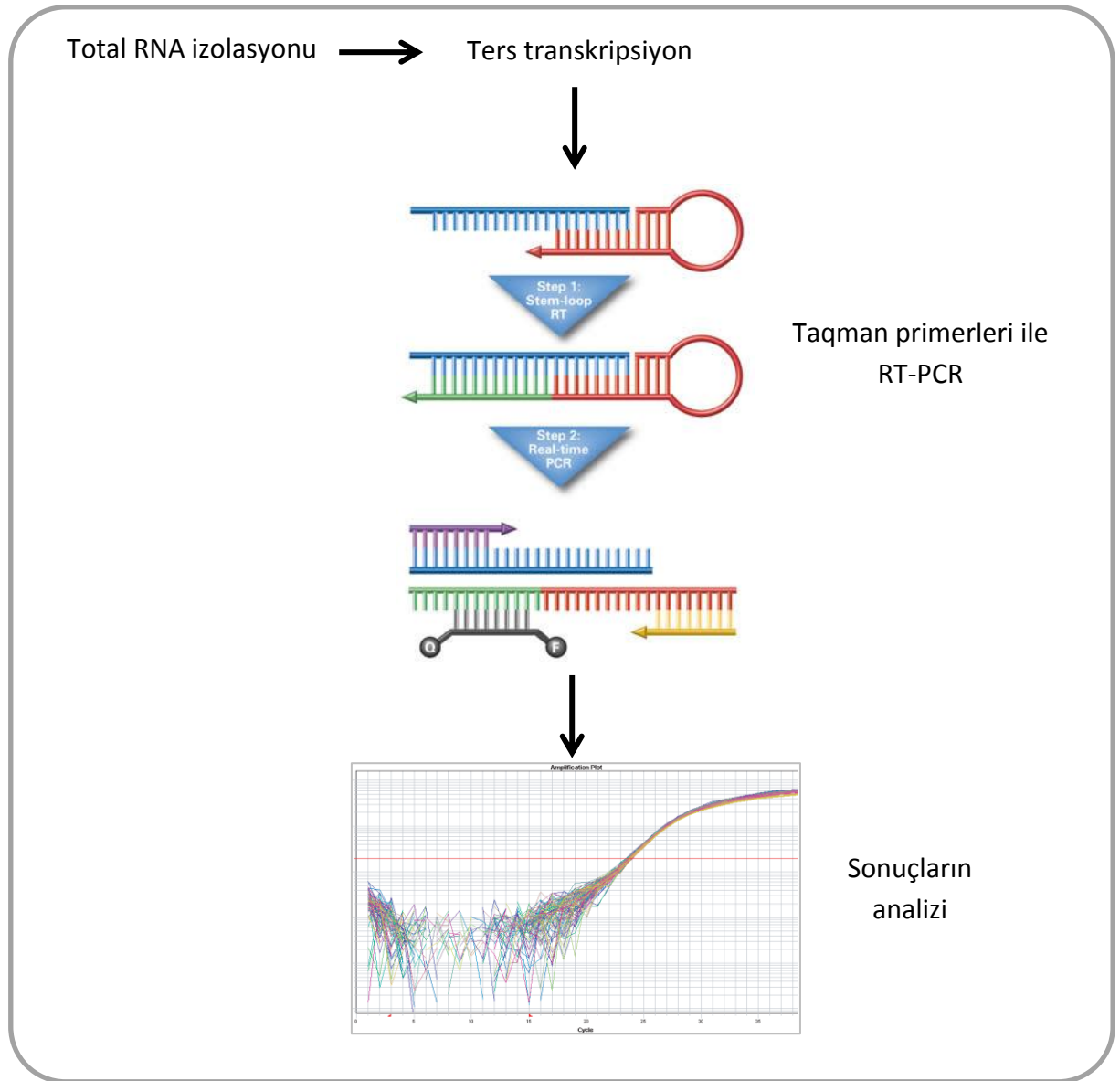
Dizi platformu çalışmada kullanılacak olan RNA'nın saf olması oldukça önemlidir. Bu sebeple izole edilen RNA'lar Dnase uygulamasından geçirilmiştir. DNase uygulaması için DNase (Fermentas) eklenen total RNA örnekleri 30 dakika 37 °C'de inkübe edildikten sonra EDTA eklenip 10 dakika 65 °C'de bekletilmiştir.

3.3.5 Gerçek Zamanlı RT-PCR Çalışmaları

RT-PCR, başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kuantifikasyonunu özgün ve hassas bir şekilde tespit edebilen ve birçok alanda bu amaçla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamız kapsamında izole edilen total RNA örnekleri kullanılarak mukayese amacı ile gerçek zamanlı RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmalar ile

sandviç hibridizasyon esaslı miRNA dizi platformunun gerçek örnekler ile göstereceği performansın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gerçek zamanlı RT-PCR analizleri için izole edilen total RNA örneklerinden öncelikli olarak ters transkripsiyon yöntemi ile cDNA'lar elde edilmiş. Elde edilen bu cDNA'lar Taqman primerleri kullanılarak RT-PCR çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntem Şekil 11'de verilmektedir.



Şekil 11: Gerçek zamanlı RT-PCR Çalışmaları (TaqMan® MicroRNA Assays and Arrays,Product Bulletin'den uyarlanmıştır)

Bu amaçla çalışmada kullanılan miRNA dizilimleri ve U6 için Taqman mikroRNA RT-PCR problemleri (Applied Biosystems) temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan Taqman problemleri Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9: Çalışmada kullanılan Taqman Problemleri

miRNA	Taqman Prob
miR21	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID:000397
miR10b	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID:000388
miR125b	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID:000449
miR145	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID: 000467
miR200a	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID: 000502
miR200b	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID: 001800
miR200c	TaqMan [®] MicroRNA Assays, Assay ID: 000505
U6	Taqman RNU6B assay : ID001093

3.3.6 Total RNA Örneklerinin Platform Üzerinde Denenmesi

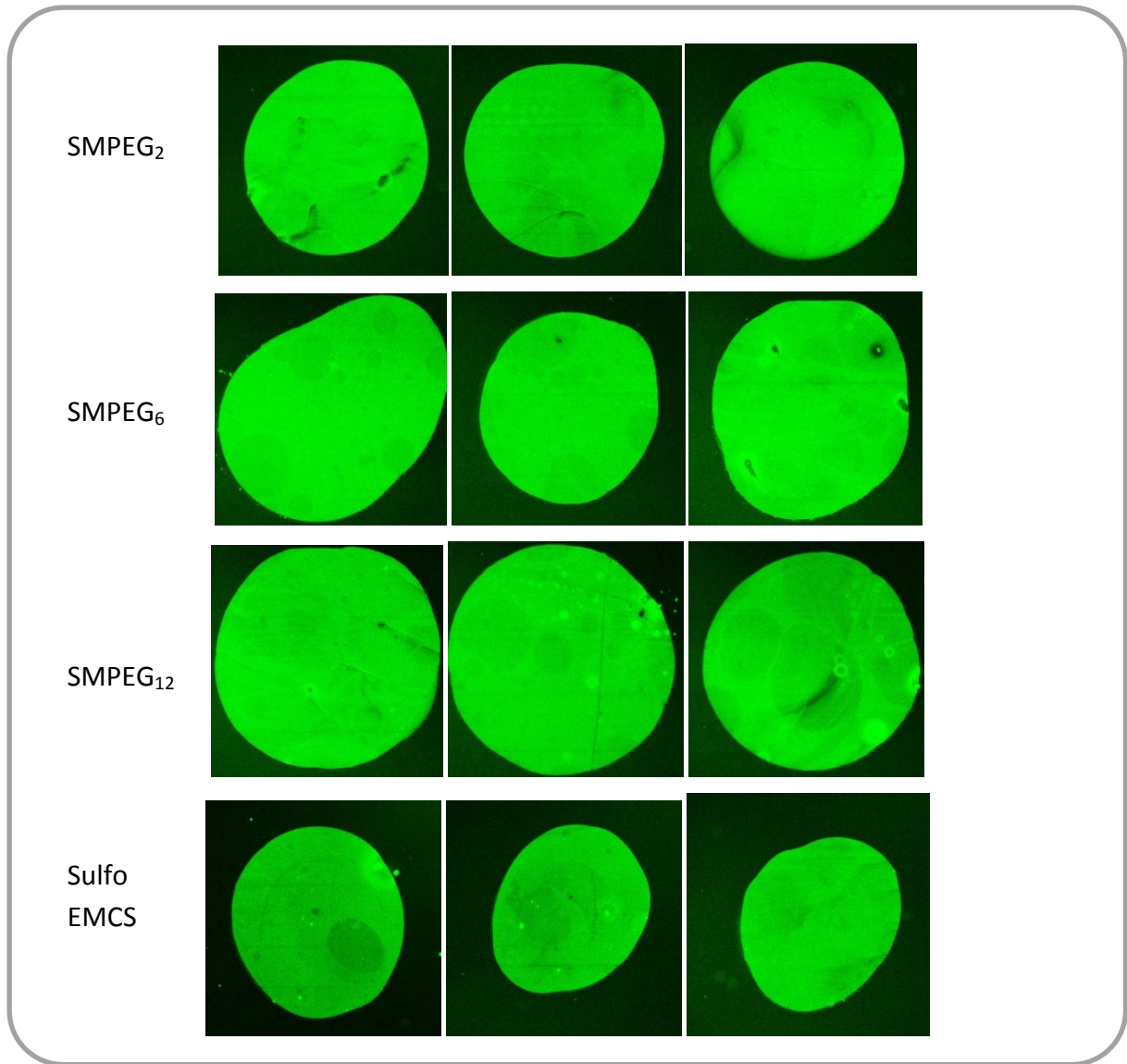
Total RNA örneklerinin platformda denenmesi platformun performansını belirlemede oldukça önemli sonuçlar verecektir. Bu sebeple hücre hatlarından izole edilen ve DNase işleminden geçirilen total RNA örnekleri platform üzerinde denenmiştir. Bu çalışmalar sırasında ikinci aşamada kullanılan sentetik adaptörler kullanılarak bir pozitif kontrol slaytı, iki tane de (Ank ve (P1+P2)) negatif kontrol slaytı yapılarak hücre hatlarından elde edilen total RNA örnekleri ile oluşturulan slaytların doğruluğu test edilmiştir. Ayrıca ticari olarak satılan normal (Ambion AM6952) ve kanserli (Clontech 636635) dokulardan elde edilmiş totalRNA örnekleri de platform üzerinde denenmiştir. Tüm bu deneylerde çalışmanın ilk iki aşaması sonucunda optimize edilen koşullar kullanılmıştır.

4 Bulgular

4.1 Aşama I: Sandviç Hibridizasyon Temelli miRNA Dizi Platformunun Geliştirilmesi

4.1.1 Çapraz Bağlayıcı

Çapraz bağlayıcıların etkinliği, 5' ucu tiyol modifikasyonu 3' ucunda ise 6-FAM sinyali taşıyan kontrol problemleri (5'-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA GCA TCT TCA ACG ATG GCC TTT CCT TT /6-FAM/-3') kullanılarak test edilmiştir.



Şekil 12: Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar

Çapraz bağlayıcıları test etmek için yapılan çalışmalarda pozitif kontrol ve çapraz bağlayıcı cam yüzeye uygulanmadan önce bir tüp içinde konjuge edilmiş ve daha sonra poly-L-lysin kaplı cam slaytlar üzerine uygulanmıştır.

Gerekli yıkama işlemlerini takiben yüzeye bağlanma etkinliğini gözlemlemek için oluşan florasan sinyaller tespit edilmiştir. Deney sonuçları Şekil 12’de verilmektedir.

Çalışılan çapraz bağlayıcıların hepsinden pozitif sonuç alınmıştır. Elde edilen sonuçlar (Şekil 12) ışığında SMPEG_n’in Sulfo EMCS’den daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Farklı uzunluklardaki SMPEG_n çapraz bağlayıcıları içinde ise en iyi sonuç verenin SMPEG₂ olduğu belirlenmiş ve platformda SMPEG₂ çapraz bağlayıcısı kullanılmıştır.

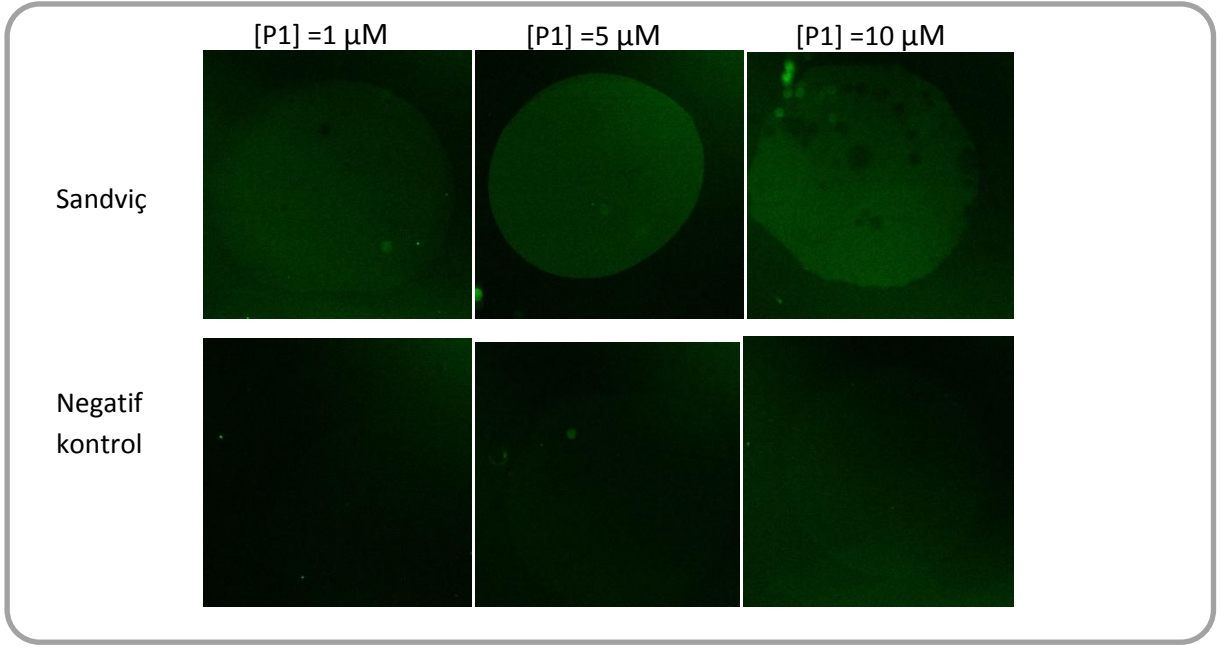
4.1.2 Nükleik Asit Tabanlı Sandviç Formatında Dizi Analizi Platformunun DNA Adaptörleri ile test edilmesi

Nükleik asit tabanlı sandviç formatında dizi analizi platformu ve bu platformun koşullarının test edilmesi için Prob 1, Prob 2, Adaptör ve Ank dizilimleri kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan dizilimler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10 : Sandviç sistemin test edilmesi için kullanılan prob ve adaptör dizileri

P/A	Dizilim
P1	5’-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA GCA TCT TCA ACG ATG GCC TTT CCT TT -3’
P2	5’-TCG CAA TGA TGG CAT TTG TAG GAG CAA AAA AAA A/6-FAM/ -3’
Ank	ACC CTG TAA ACG ATC ATC CCC ATT TTT TAC GGC CAATTG GAG GCCTCC CAAT -3’
A	5’- GCT CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG ATA AAG GAA AGG CCA TCG TTG AAG ATG C -3’

Bu çalışmalarda P2 ve A konsantrasyonları 20 µM olarak sabit tutulmuş, P1 konsantrasyonu olarak ise 1 µM, 5 µM ve 10 µM parametreleri denenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13: Sandviç sistemin 1, 5, 10 μM P1 konsantrasyonları ile test edilmesi

Bu çalışmalar sonucunda DNA-DNA formatında geliştirilmesi hedeflenen platformun sorunsuz olarak çalıştığı gözlenmiştir.

4.1.3 Bloklama ve Hibridizasyon Çözeltileri Optimizasyonu

Mikrodizi çalışmalarında temiz bir arka plan elde etmek için yem probunun cam yüzeye bağlanmasından sonra açıkta kalan reaktif amino gruplarını kapatarak spesifik olmayan nükleik asit – yüzey etkileşimlerini engellemek önemlidir. Bu amaçla iki farklı bloklama çözeltisi denenmiştir. Denenen bloklama çözeltileri aşağıda belirtilmiştir.

Bloklama çözeltisi I : 5X SSC, 0.1%SDS, 1%BSA,

Bloklama çözeltisi II: 2%BSA

Hibridizasyon çözeltisi de hibridizasyon dinamiğini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu sebeple çalışmalarda iki farklı hibridizasyon çözeltisi denenmiştir. Denenen hibridizasyon çözeltileri aşağıda belirtilmiştir.

Hibridizasyon çözeltisi I: 5X SSC, 0.1% SDS, 50%formamit

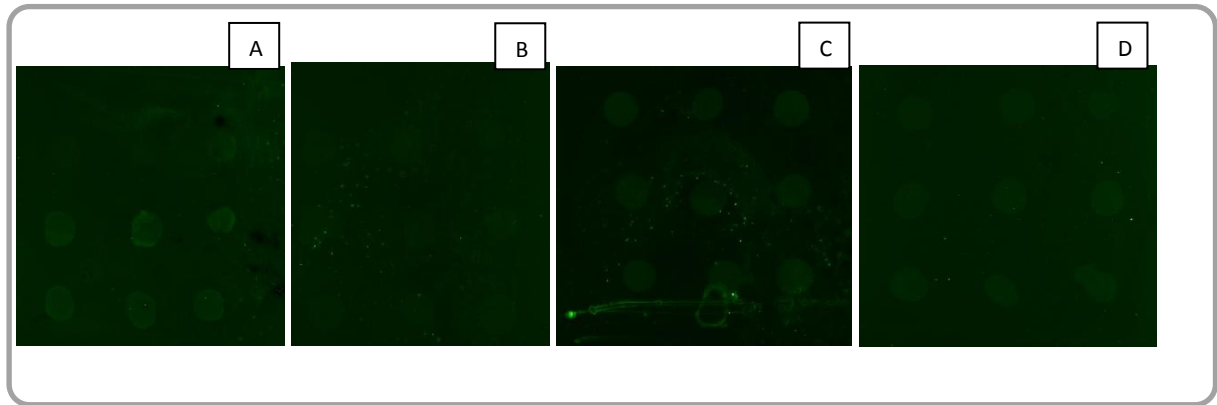
Hibridizasyon çözeltisi II: 0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA

Bloklama ve hibridizasyon çözeltisi denemelerinde kullanılan diğer koşullar Tablo 11’de belirtilmektedir.

Tablo 11: Bloklama ve hibridizasyon çözeltisi denemelerinde kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
DNA	miR21	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	30 °C	18 saat

Yapılan çalışmalar sonucunda bloklama çözeltisi II (2%BSA) ve hibridizasyon çözeltisi II (0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA) ile daha az arka plana ve daha yüksek verime sahip sandviç sistemi elde edildiği görülmüştür. Bu sebeple bundan sonraki çalışmalarda bloklama çözeltisi olarak %2 BSA; hibridizasyon çözeltisi olarak da 0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA kullanılmıştır.



Şekil 14: Çalışma kapsamında denenen bloklama ve hibridizasyon çözeltileri: A) Bloklama çözeltisi I,Hibridizasyon çözeltisi I; B) Bloklama çözeltisi I,Hibridizasyon çözeltisi II; C) Bloklama çözeltisi II,Hibridizasyon çözeltisi II; D) Bloklama çözeltisi II,Hibridizasyon çözeltisi I

4.1.4 Oligonükleotid Tipi

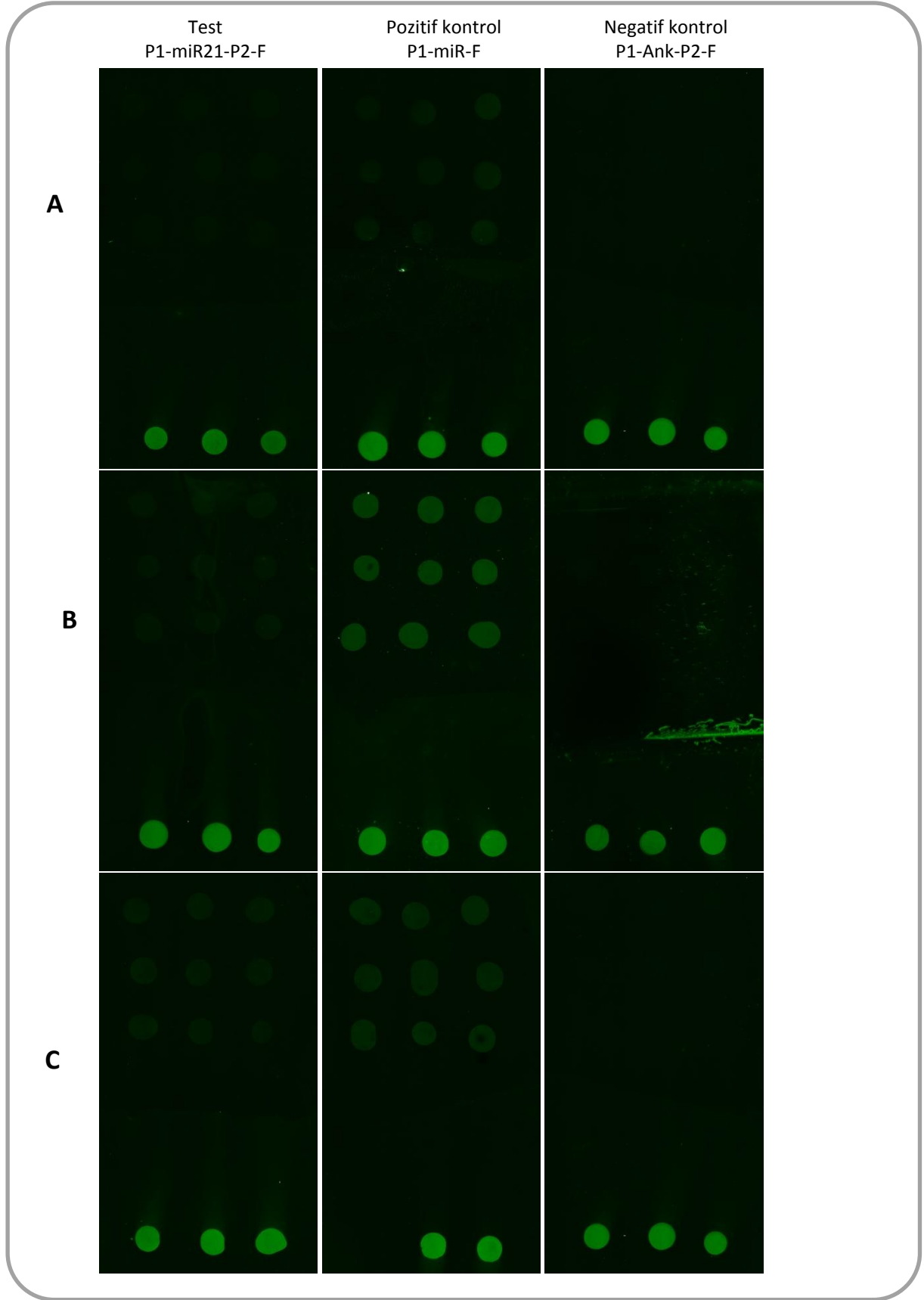
Dizi platformlarında seçicilik ve oluşan prob-hedef hibridinin stabilitesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmada, ayrı deney setleri içerisinde kimyasal yapısı değiştirilmemiş oligonükleotidlerin yanı sıra seçicilik ve termal dayanıklılık açısından önemli avantajları olan kitli (LNA-locked nucleic acid) ve 2'O-Metil modifiye oligonükleotidler kullanılarak platformun performansı denenmiştir.

Tablo 12: Oligonükleotid tipi çalışmalarında kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
1. DNA	1. miR21			P1 = 20 µM		
2. LNA	2.miR21-F	FAM	SMPEG ₂	P2 = 20 µM	30 °C	18 saat
3. 2'O-Metil	3.Ank			A = 20 µM		

Yukarıda belirtilen koşullar kullanılarak yapılan oligonükleotid tipi çalışmalarında elde edilen sonuçlar Şekil 15'de gösterilmektedir.

Şekil 15'den de görülebileceği gibi LNA modifiye ve 2'O-Metil modifiye proplar kimyasal yapısı değiştirilmemiş proplara göre çok daha iyi sonuçlar vermektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında oligonükleotid tipinin DNA-RNA sandviç sistemini önemli oranda etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple çalışmanın bundan sonraki aşamalarına LNA proplar kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 15: Oligonükleotid tipleri: A) kimyasal yapısı değiştirilmemiş problar B) LNA modifiye problar C) 2'O-Metil modifiye problar

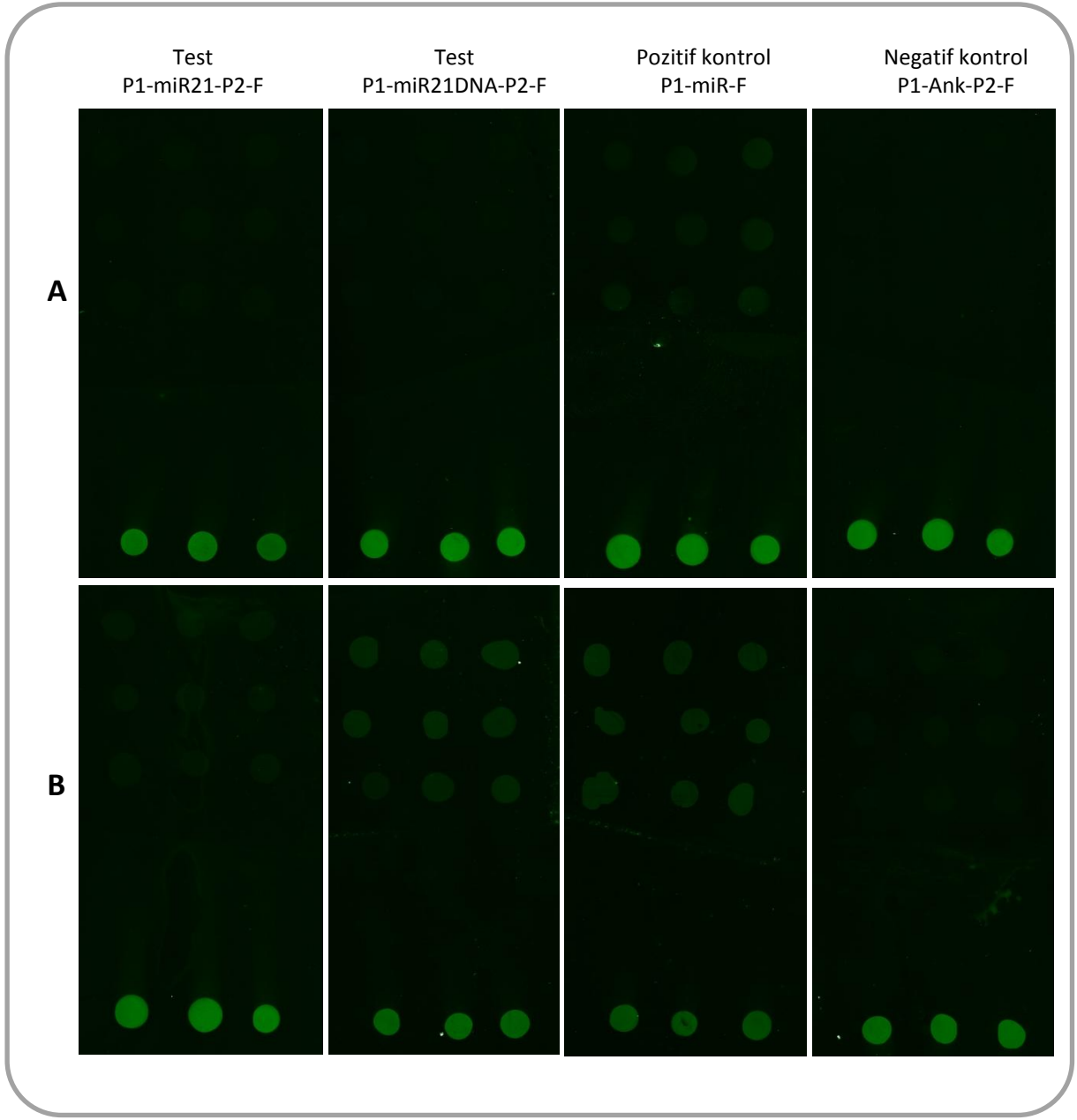
4.1.5 DNA-DNA ve DNA-RNA Sandviç Sistemi

DNA-DNA ve DNA-RNA sandviç sistemleri arasındaki farkı daha detaylı inceleyebilmek için miR21'in DNA dizilimi getirilmiş, sandviç sistem bu adaptör kullanılarak tekrarlanmış ve sonuçlar miR21 adaptörleri ile kurulan sandviç sistemle karşılaştırılmıştır. Çalışmalar hem kimyasal yapısı değiştirilmemiş problemlerle hem de LNA modifiye problemlerle tekrarlanmıştır. Denemelerde kullanılan koşullar aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 13: DNA-DNA, DNA-RNA sandviç sistemleri arasındaki farkların incelenmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
1. DNA 2. LNA	1. miR21 2. miR21-DNA 3. miR21-F 4. Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	30 °C	18 saat

DNA-DNA ve DNA-RNA sandviç sistemleri ile yapılan çalışmalar sonucunda her iki oligonükleotid tipi için de DNA-RNA sandviç sisteminin optimizasyon koşullarının çok daha hassas olması gerektiği görülmüştür. Buna ek olarak LNA modifiye problemlerin kimyasal yapısı değiştirilmemiş problemlere göre çok daha iyi çalıştığı tekrar gözlemlenmiştir.



Şekil 16 DNA-RNA ve DNA-DNA sandviç sistemleri arasındaki fark: A) kimyasal yapısı değiştirilmemiş proplar B) LNA modifiye proplar

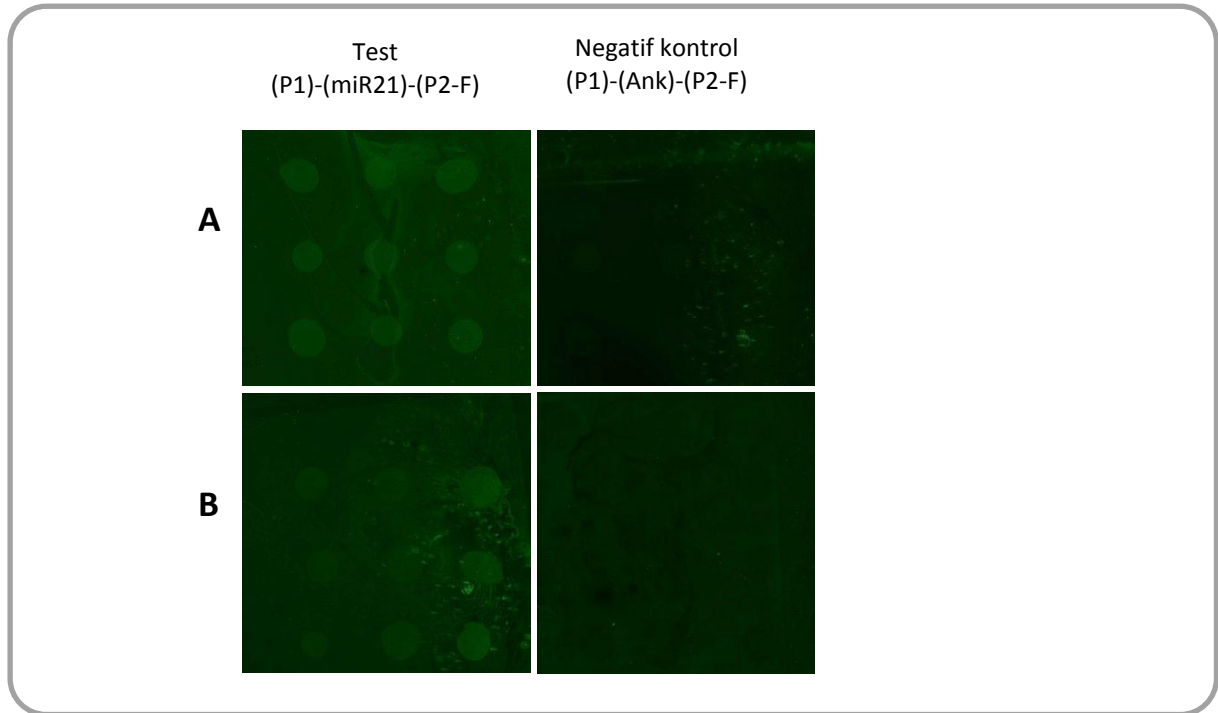
4.1.6 Farklı Sinyal Probları

Kurmak için çalışmalar yaptığımız sandviç sistemi kullanılacak sinyaller açısından esnek bir sistemdir. Sinyal probu farklı işaretlerle işaretlenebilir. Çalışmamızda sinyal probu FAM ve Biotin olmak üzere iki farklı işaretle işaretlenmiştir. LNA modifiye proplar kullanılarak bu iki

sinyalin farkına bakılmış, her iki sinyal cinsi için de pozitif sonuç alındığı görülmüştür (Şekil 17). Bundan sonraki çalışmalarda projede öngörüldüğü gibi FAM işaretli problar kullanılmaya devam edilmiştir.

Tablo 14: Farklı sinyal problarının test edilmesi için kullanılan koşullar

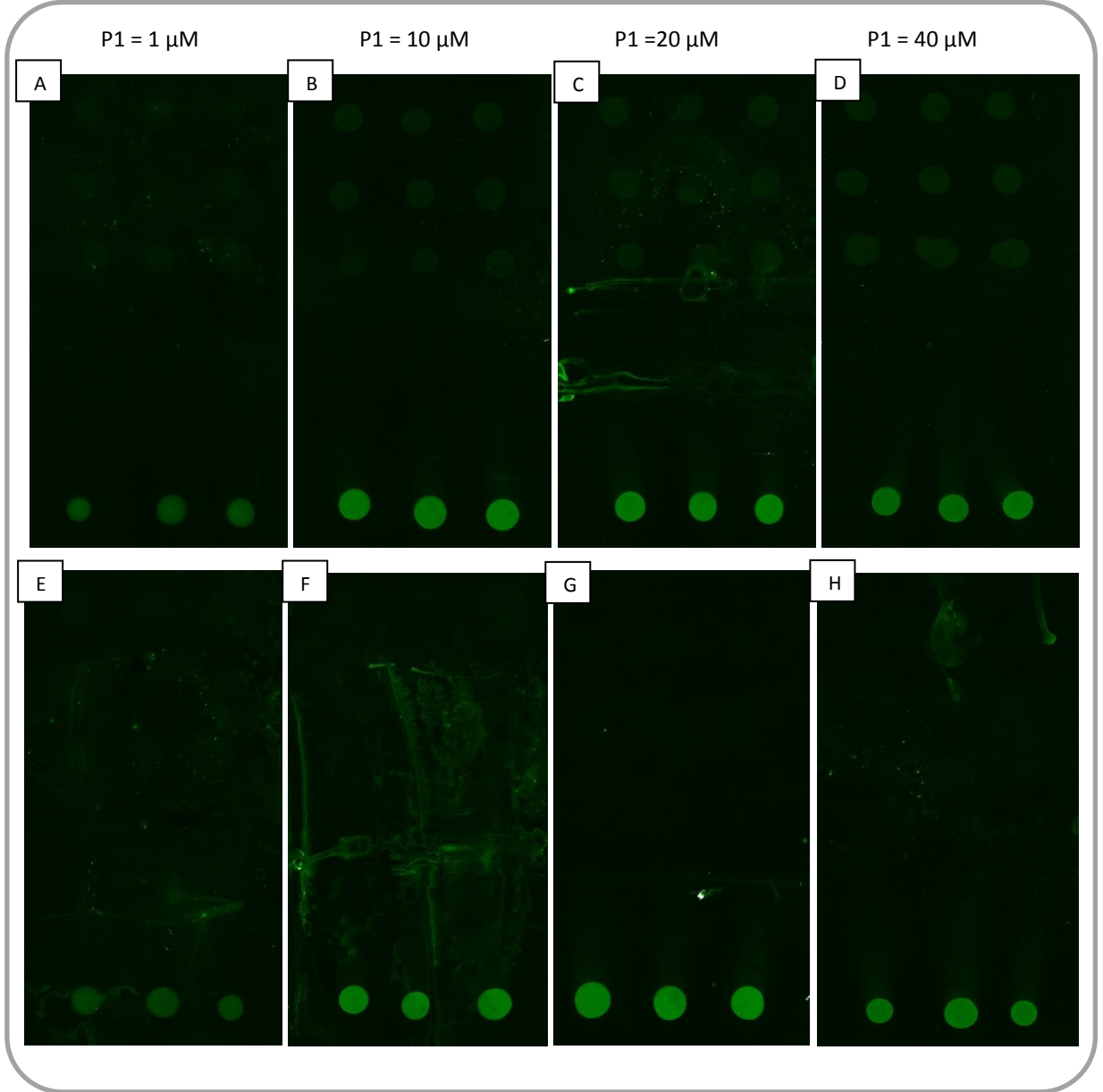
Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	1.FAM 2.BIO	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	30 °C	18 saat



Şekil 17: FAM ve Biotin işaretli sinyal probu A) FAM işaretli sinyal probu B) Biotin işaretli sinyal probu

4.1.7 Yem Probu (P1) Derişiminin Optimizasyonu

Yapılan alışmalarla LNA modifiye ve FAM işaretli problemlerin kullanılmasına karar verildikten sonra sandviç sistemin optimizasyonu için öncelikle farklı yem prob (P1) derişimleri denenmiştir.



şekil 18 P1 derişimi optimizasyonları A)1  M test; B) 10  M test; C)20  M test; D) 40  M test; E) 1  M negatif kontrol; B) 10  M negatif kontrol; C)20  M negatif kontrol; D) 40  M negatif kontrol

Bu amaçla sinyal probu (P2) ve adaptör derişimleri 40 μM olarak sabit tutularak yüzey probu (P1) için 1 μM , 10 μM , 20 μM ve 40 μM olmak üzere dört farklı derişim kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan diğer değişkenler Tablo 15’de belirtilmiştir.

Tablo 15: P1 derişiminin test edilmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P2 = 40 μM A = 40 μM	30 °C	18 saat

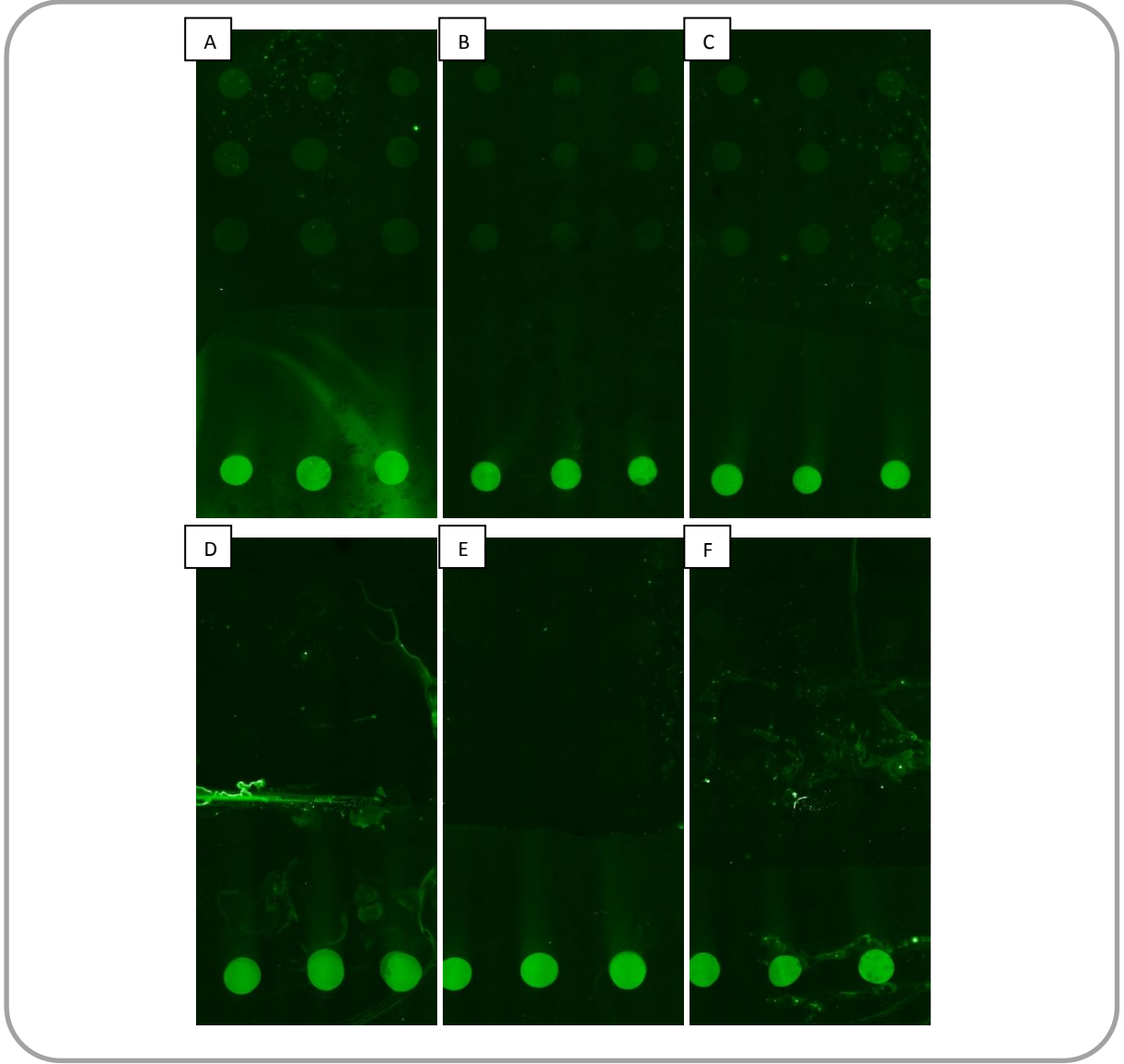
Şekil 18’den de görülebileceği gibi denenen en düşük derişim olan 1 μM ’da spotlar çok net değilken, P1 derişimi arttıkça spotlarda gözle görülür bir fark ortaya çıkmıştır. Öte yandan 20 ve 40 μM derişimleri arasında çok büyük bir fark görülmemesi sebebiyle çalışmanın devamında P1 derişimi olarak 20 μM kullanılmıştır.

4.1.8 Sinyal Probu (P2) Derişiminin Optimizasyonu

P1 probunun derişiminin belirlenmesinden sonra sandviç sistemimiz için farklı P2 derişimleri denenmiş ve en uygun P2 derişimi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla P2 için 20 μM , 30 μM ve 40 μM olmak üzere üç farklı derişim denenmiştir. Denemelerde kullanılan diğer değişkenler aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 16: P2 derişiminin test edilmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 μM A = 40 μM	30 °C	18 saat



Şekil 19: P2 derişimi optimizasyonları A)20 μ M test; B) 30 μ M test; C)40 μ M test; D) 20 μ M negatif kontrol; E)30 μ M negatif kontrol; F) 40 μ M negatif control

Denenen derişimler arasında çok büyük bir fark görülmemesi ve en parlak spotların 20 μ M derişimde görülmesi sebebiyle çalışmanın devamında P2 derişimi olarak 20 μ M kullanılmıştır (Şekil 19).

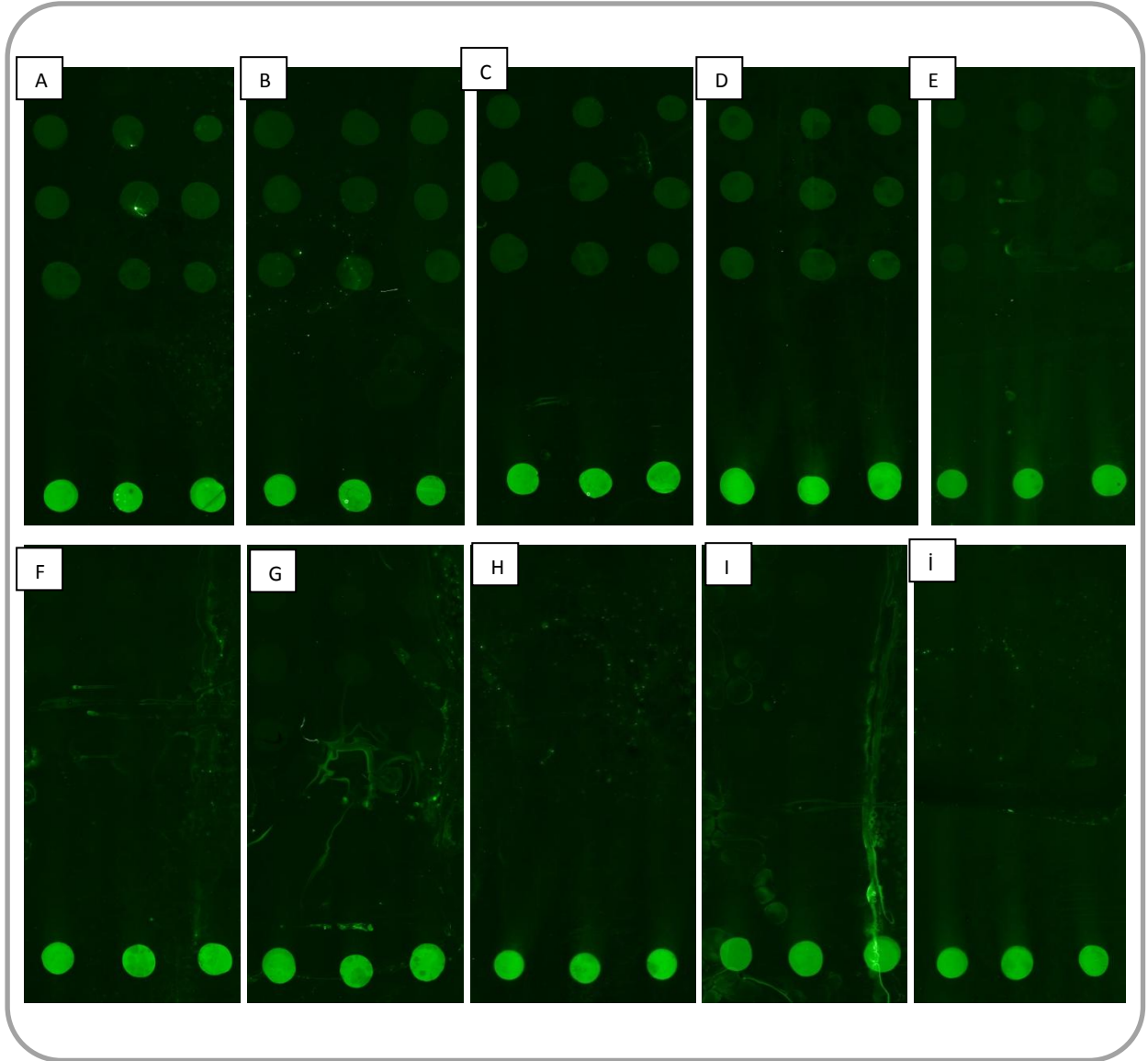
4.1.9 Hibridizasyon Süresi Optimizasyonu

Hibridizasyon süresi sandviç sisteminin oluşumunda önemli bir parametredir. Bu sebeple çalışma kapsamında hibridizasyon inkübasyon süresi için 30 dakika, 1 saat, 1,5 saat, 5 saat ve 18 saat parametreleri denenmiştir. Denemelerde kullanılan diğer değişkenler Tablo 17’de belirtilmiştir.

Tablo 17: Hibridizasyon süresinin test edilmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	30 °C

Yapılan denemelerde 30 dakika, 1 saat ve 1.5 saat hibridizasyon süreleri arasında bir fark olmadığı görülmüştür. Ayrıca hibridizasyon süresi 18 saat’e uzadığında sandviç sistemin veriminin düştüğü ve daha az sinyal alındığı belirlenmiştir. Çalışmanın toplam süresini kısaltmak amacı ile bundan sonraki çalışmalarda hibridizasyon süresi 30 dakikaya indirilmiştir.



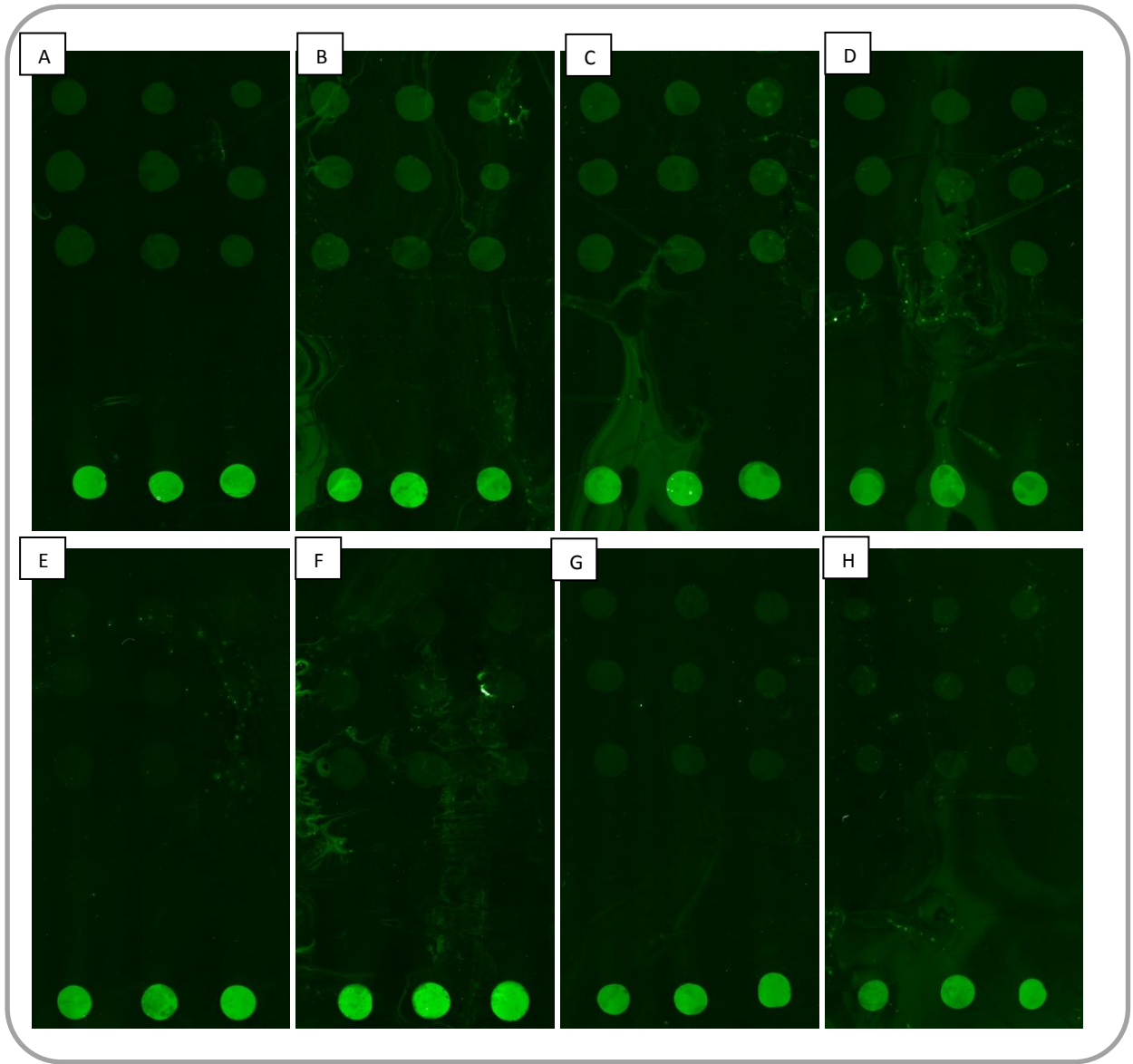
Şekil 20 Hibridizasyon süresi optimizasyonları A)30 dakika test; B)1 saat test; C)1,5 saat test; D) 5 saat test; E)18 saat test; F)30 dakika negatif kontrol; G)1 saat negatif kontrol; H)1,5 saat negatif kontrol; I) 5 saat negatif kontrol; i)18 saat negatif kontrol

4.1.10 Hibridizasyon Sıcaklığı Optimizasyonu

Sıcaklık, hibridizasyon dinamiğini etkileyen önemli bir parametredir. Çalışılan sistemin ortalama T_m değeri 56 °C'dir. Bu sebeple farklı hibridizasyon sıcaklıkları 30°C (T_m-25), 35°C (T_m-20), 40°C (T_m-15) ve 45 °C (T_m-10) parametreleri denenmiştir. Denemelerle ilgili diğer değişkenler Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18: Hibridizasyon sıcaklığının test edilmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	30 dakika



Şekil 21 Hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonları. A) 30°C test; B) 35 °C test; C) 40°C test; D) 45°C test; E) 30°C negatif kontrol; F) 35 °C negatif kontrol; G) 4 0°C negatif kontrol; H) 45°C negatif kontrol

Yapılan denemeler sonucunda hibridizasyon sıcaklığı arttıkça bağlanmanın arttığı görülmüştür. Öte yandan sıcaklığın artması ile negatif kontrollerde spesifik olmayan bağlanmaların da arttığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple çalışmanın devamında spesifik olmayan bağlanmanın en az olduğu 30°C, hibridizasyon sıcaklığı olarak kabul edilmiştir.

4.1.11 Yıkama Koşullarının Optimizasyonu

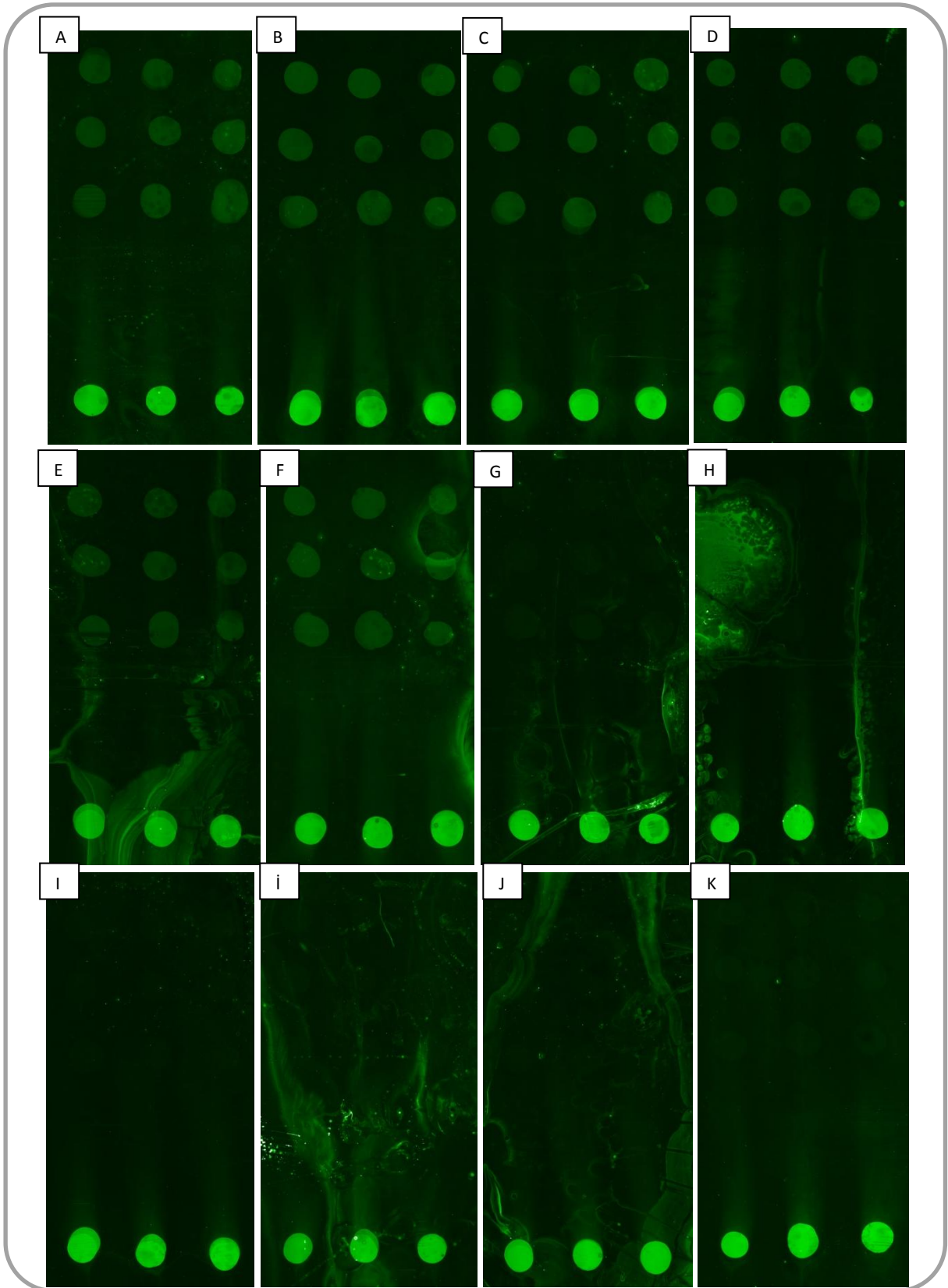
Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi ve arka planın azaltılmasında yıkama koşulları da önemli bir yer tutmaktadır. Bu sebeple farklı çözelti derişimi, süresi ve çalkalama hızları denenerek optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan yıkama koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Yıkama 1:	5XSSC + 0.1% SDS	10 dakika	1 tekrar
Yıkama 2:	5XSSC + 0.1% SDS	5 dakika	1 tekrar
	1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	0.1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	dH ₂ O	1 dakika	3 tekrar
Yıkama3:	1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	0.1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	dH ₂ O	1 dakika	3 tekrar

Denemelerde kullanılan diğer değişkenler şöyledir:

Tablo 19: Yıkama koşullarının test edilmesi için kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A= 20 µM	30 °C	30 dakika



Şekil 22 Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları A) Yıkama 1, 100 rpm, test; B) Yıkama 2,100 rpm, test; C)Yıkama 3, 100 rpm, test; D) Yıkama 1, 130 rpm, test; E) Yıkama 2, 130 rpm, test; F)Yıkama 3, 130 rpm, test; G) Yıkama 1, 100 rpm, negatif kontrol; H) Yıkama 2,100 rpm, negatif kontrol; I)Yıkama 3, 100 rpm, negatif kontrol; İ) Yıkama 1, 130 rpm, negatif kontrol; J) Yıkama 2,130 rpm, negatif kontrol; K)Yıkama 3, 130 rpm, negatif kontrol

Yapılan çalışmalar sonucunda Yıkama 1 ve 130 rpm’de yıkandığında düşük arka plana sahip sonuçlar alındığı görülmüştür (Şekil 22). Spesifik olmayan bağlanma da bu yıkamada en aza inmiştir. Ayrıca bu yıkama koşulu ile yıkama basamak sayısının da azaltılmış olması sebebiyle çalışmanın devamında tercih edilmiştir.

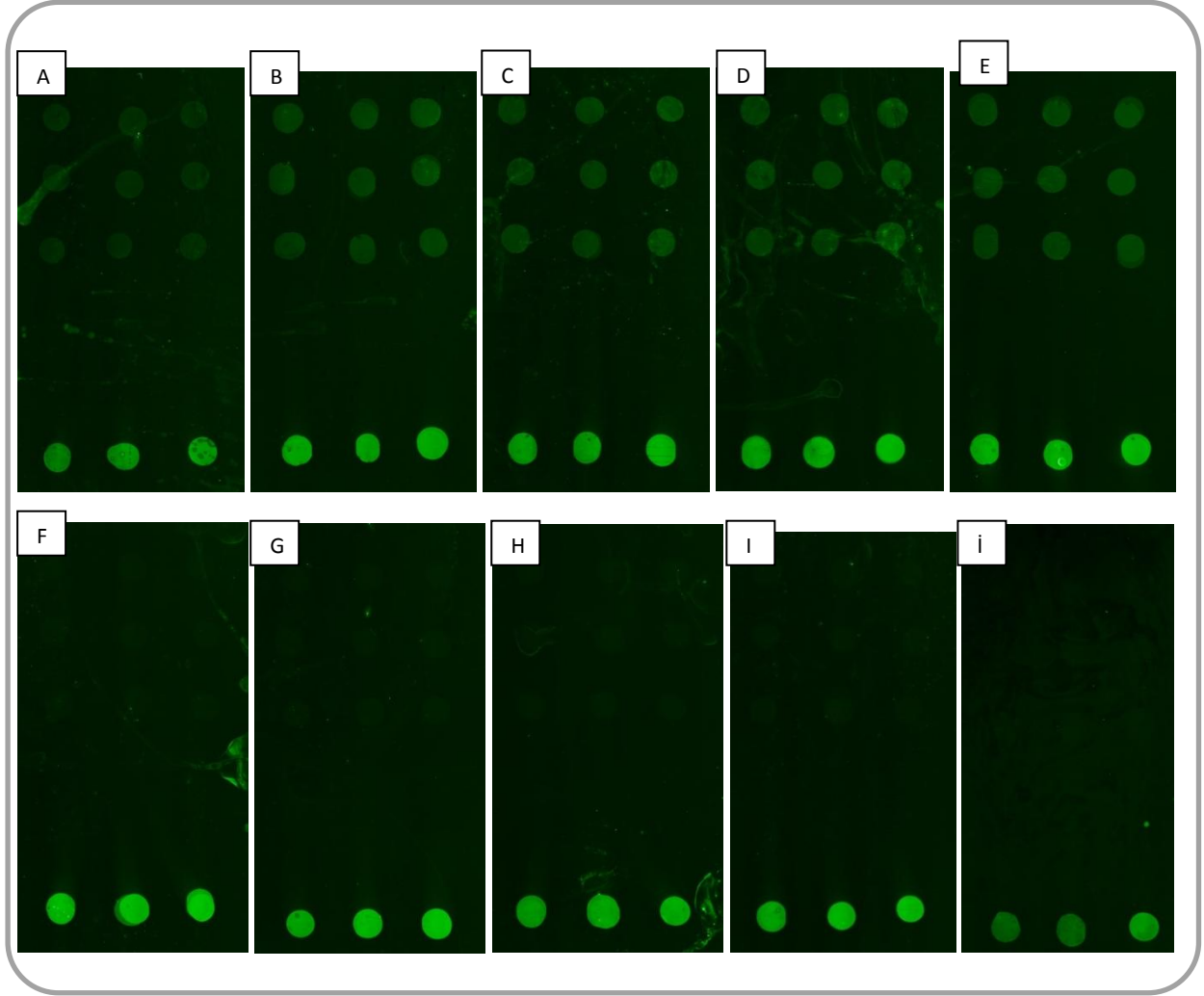
4.1.12 Hassasiyetin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA dizisi (A) ile gerçekleştirilen deneylerde, geliştirilen miRNA dizi platformunun tespit edebileceği minimum adaptör konsantrasyonu yani oluşturulan platformun hassasiyeti belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla adaptör için 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM , 10 μM ve 20 μM derişimleri denenmiştir. Hassasiyetin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan değişkenler Tablo 20’de, elde edilen sonuçlar Şekil 23’de belirtilmiştir.

Tablo 20: Hassasiyetin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan koşullar

Prob	Adaptör	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon zamanı
LNA	1. miR21 2.Ank	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 μM P2 = 20 μM	30 °C	30 dakika

Deney sonuçlarına göre platformun 0.01 μM adaptör konsantrasyonunda bile sinyal verebildiği belirlenmiştir.



Şekil 23 Hassasiyetin belirlenmesi A) 0.01 μM ,test; B) 0.1 μM ,test; C) 1 μM ,test; D) 10 μM ,test; E) 20 μM ,test; F) 0.01 μM ,negatif kontrol; G) 0.1 μM , negatif kontrol; H) 1 μM , negatif kontrol; I) 10 μM , negatif kontrol; İ) 20 μM , negatif kontrol

4.1.13 miR21 için Optimize Koşullar

Birinci aşama çalışmaları sonucunda miR21 adaptörü için DNA-RNA sandviç sistemi oluşturulmuş ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen optimum koşullar Tablo 21’de belirtilmiştir.

Tablo 21: miR21 için optimize koşullar

Prob	İşaret	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çöztisi	Hibridizasyon Çöztisi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon Zamanı
LNA	FAM	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 0.1 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 °C	30 dakika

4.2 Aşama II: Farklı miRNA örnekleri ile dizi platformun çalıştırılması.

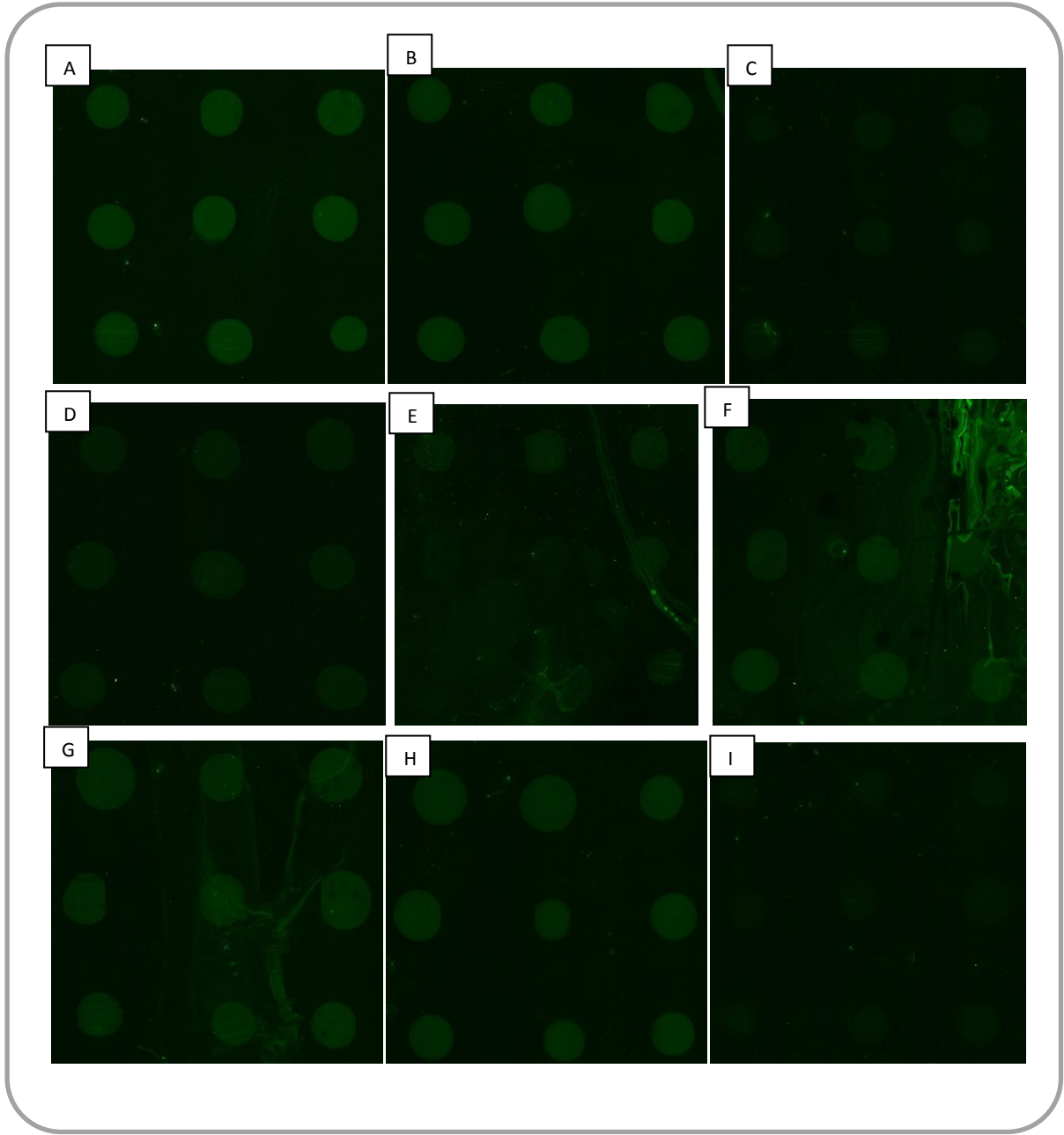
4.2.1 miRNA-Prob setlerinin denemesi

Çalışma kapsamında çalışılması planlanan prob setleri, öncelikle miR21 için optimize edilen koşullar baz alınarak denenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan koşullar Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 22 : Yeni prob setlerinin denemesi için kullanılan koşullar

Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çöztisi	Hibridizasyon Çöztisi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon Zamanı	Yıkama Koşulları
P1 = 10 µM P2 = 10 µM A = 10 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 °C	30 dakika	1X / 10 min / 5X SSC + 0.1% SDS

Her bir prob seti farklı bir slayt üzerinde çalışılmıştır. Ayrıca bir de negatif kontrol slaydı (P1-Ank-P2) hazırlanmıştır. İlgili çalışmalarda kullanılan slayt tasarımı Şekil 9’da, elde edilen sonuçlar ise şekil 24’de verilmiştir.



Şekil 24: miR21 için geçen dönem optimize edilen koşullar kullanılarak yeni miRNA prob setleri için oluşturulan sandviç deneyleri: A) miR21 B) miR10b C) miR145 D) miR125 E) miR200a F) miR200b G) miR200c H) U6 I) negatif kontrol

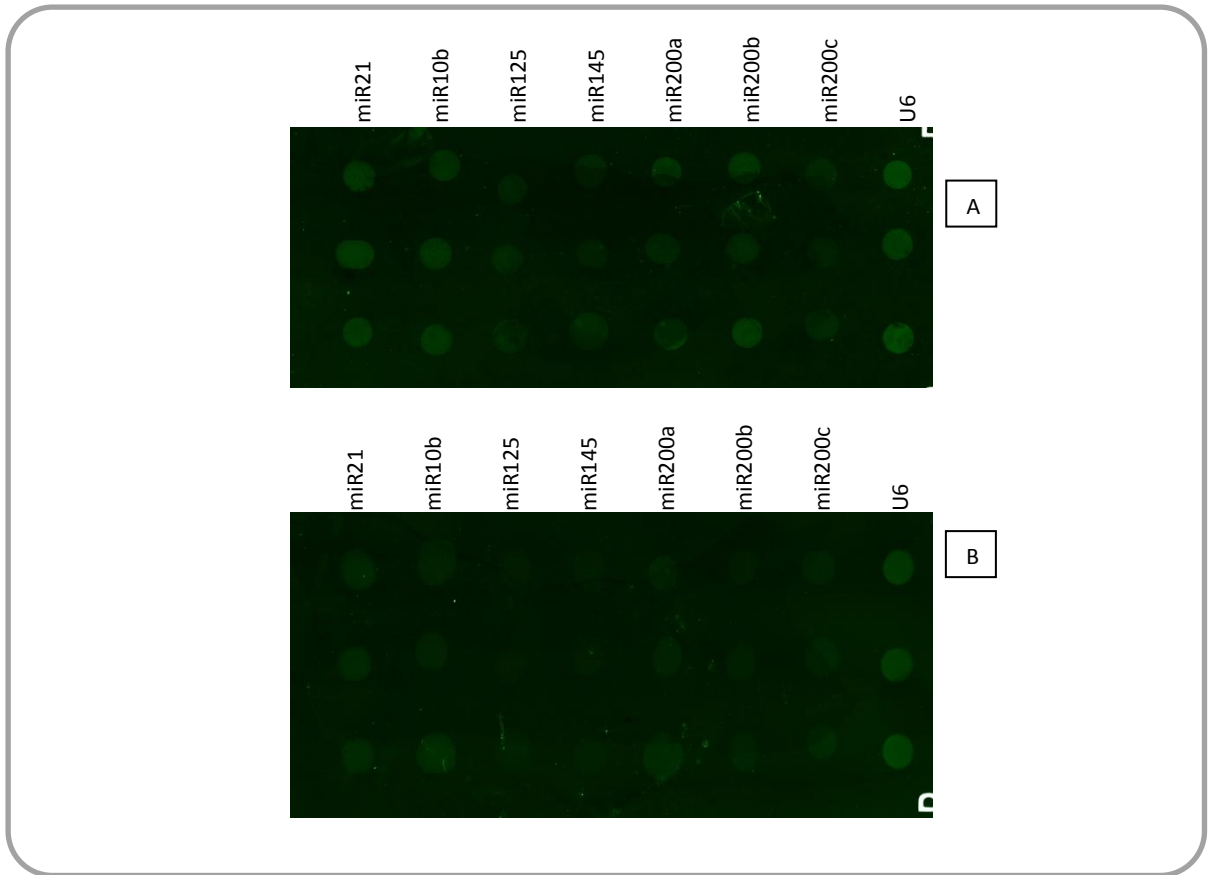
Elde edilen sonuçlara göre denenen koşulların miR21, miR10b, miR200b ve miR200c için uygun olduğu ancak koşulların miR145, miR125 ve miR200a için geliştirilmesi gerektiği

sonucuna varılmıştır. Bu sebeple çalışmanın devamında düşük verimli bu prob setleri için P1 ve P2 konsantrasyonları arttırılmıştır.

4.2.2 Prob setlerinin tek slayt üstünde denenmesi

Prob setlerinin tek tek slaytlar üzerinde çalıştırılması ve optimize edilmesinin ardından tüm problemler tek bir slayt üzerine yüklenerek deney tekrarlanmıştır. Bu amaçla kullanılan slayt tasarımı şekil 9’da verilmektedir. Çalışmanın devamında yapılan tüm deneylerde bu slayt tasarımı kullanılmıştır.

Prob setlerinin tek tek çalışılması sırasında kullanılan koşullar tekrarlanarak elde edilen sonuçlar Şekil 25’de verilmektedir.



Şekil 25: Yeni prob setleri ile oluşturulan platform için elde edilen sonuçlar A) 8 prob setinden oluşan miRNA platformu B) negatif kontrol

Tüm prob setleri ile oluşturulan platformun negatif kontrolünde prob setlerinin tek tek çalışılması sırasında görüldüğü gibi istenmeyen bağlanmalar görülmüştür.

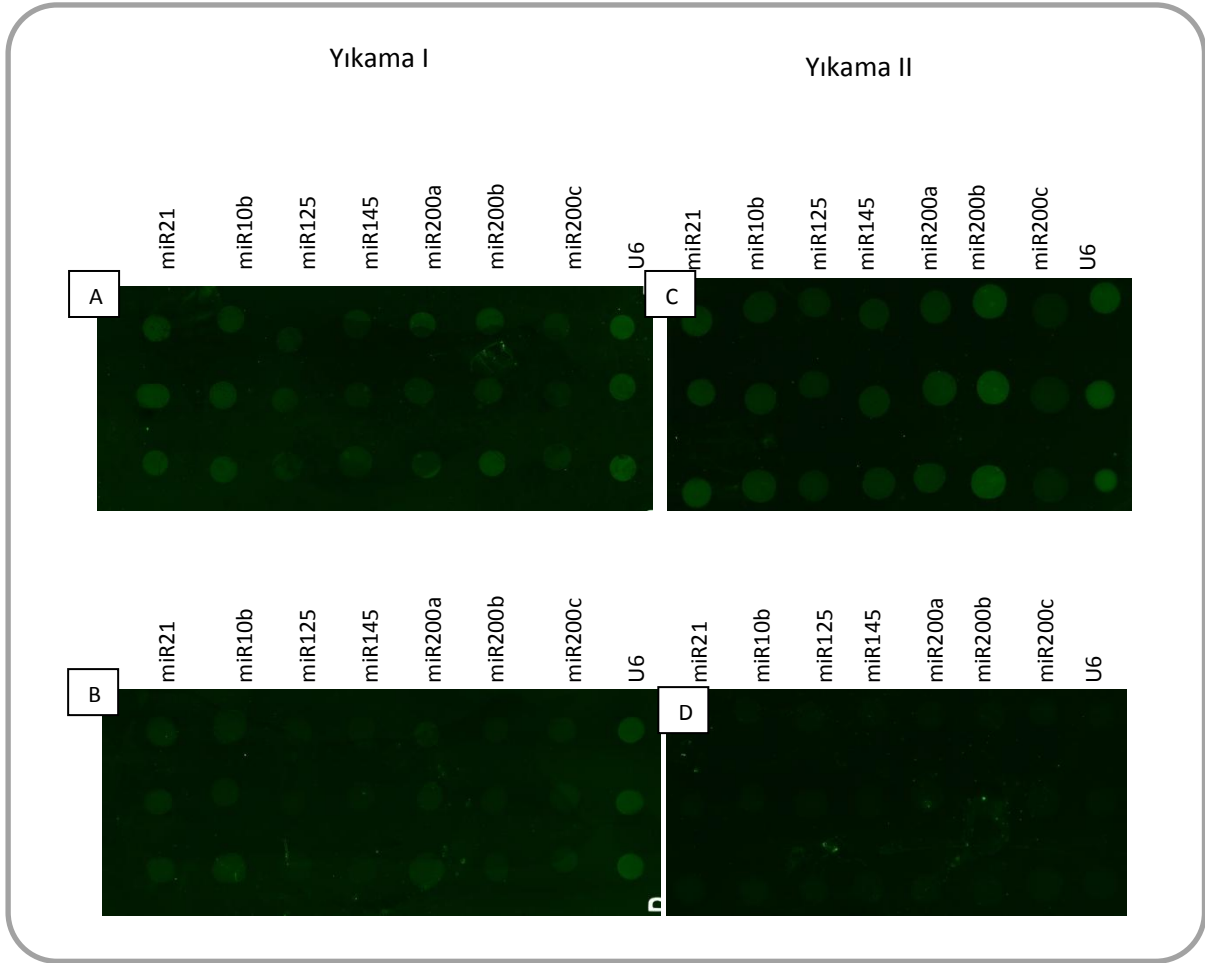
4.2.3 Yıkama Koşulları Optimizasyonu

İstenmeyen bağlanmaların engellenmesi ve arka planın azaltılmasında yıkama koşulları önemli bir yer tutmaktadır. Bu sebeple hibridizasyon sonrası yıkama koşulları arttırılarak sistem optimize edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada denenen yıkama koşulları aşağıda verilmiştir.

<u>Yıkama 1:</u>	5XSSC + 0.1% SDS	15 dakika	1 tekrar
	dH2O	1 dakika	3 tekrar
<u>Yıkama 2:</u>	5XSSC + 0.1% SDS	5 dakika	1 tekrar
	1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	0.1XSSC	5 dakika	1 tekrar
	dH2O	1 dakika	3 tekrar

Tablo 23 : Yeni prob setlerinin denenmesi için kullanılan diğer koşullar

Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çözeltisi	Hibridizasyon Çözeltisi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon Zamanı
P1 = 10 µM P2 = 10 µM A = 10µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 °C	30 dakika



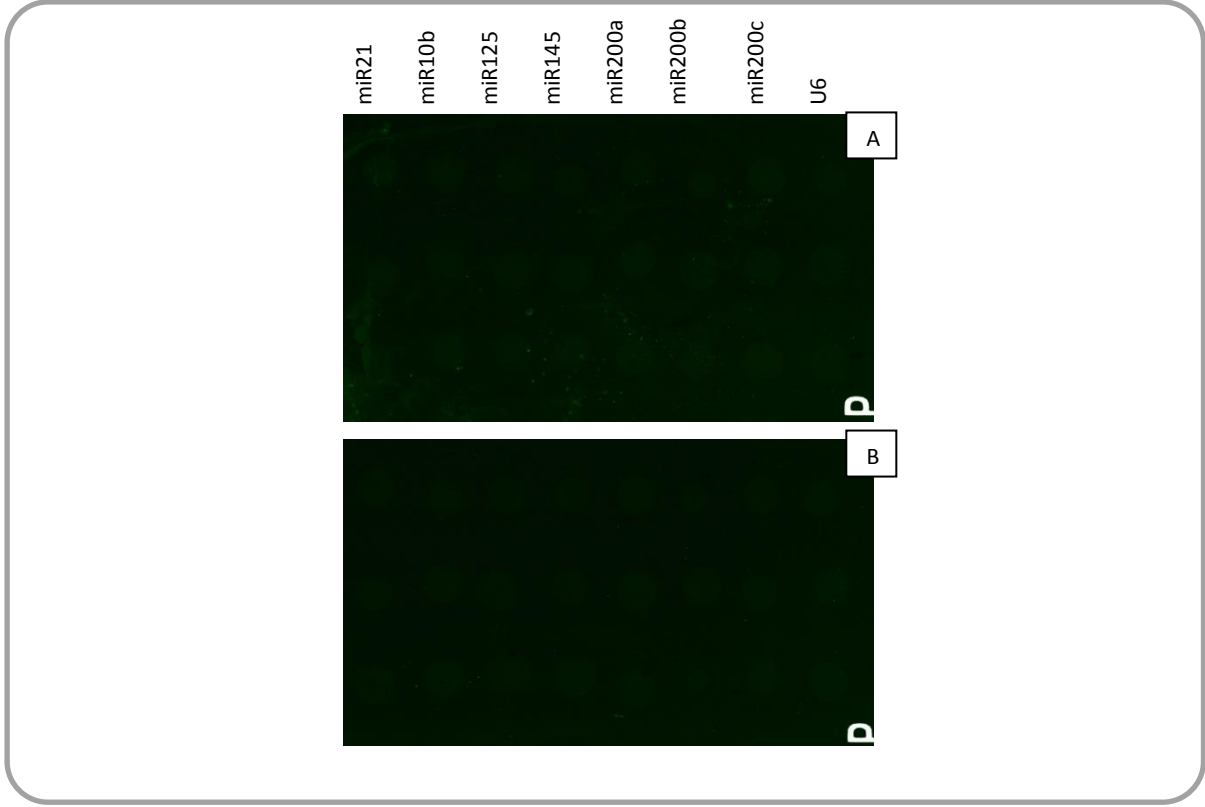
Şekil 26: Yeni prob setleri ile oluşturulan platform için elde edilen sonuçlar A) 8 prob setinden oluşan miRNA platformu, yıkama I B) negatif kontrol, yıkama I C) 8 prob setinden oluşan miRNA platformu, yıkama II D) negatif kontrol, yıkama II

Yıkamalar arttırıldığında negatif kontroldeki istenmeyen bağlanmaların azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple çalışmanın devamında ikinci yıkama koşulları kullanılmıştır.

4.2.4 P1-P2 Bağlanmasının Test Edilmesi

Daha önce belirtildiği gibi çalışmada kullanılan tüm problemler (P1 ve P2) çeşitli yazılımlar ile test edilmiş ve P1 ve P2 problemleri arasında istenmeyen hibridizasyonun olmadığı belirlenmiştir. Ancak farklı prob setleri arasında oluşabilecek istenmeyen hibridizasyonun varlığının test edilmesi için bir negatif kontrol deneyi tasarlanmıştır. Bu sette yine Şekil 9'da

gösterildiği gibi hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip mikroRNA için yüzey probları noktalanmış ve adaptörler eklenmeden sadece P2 probları ile inkübe edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar Şekil 27’de verilmektedir.



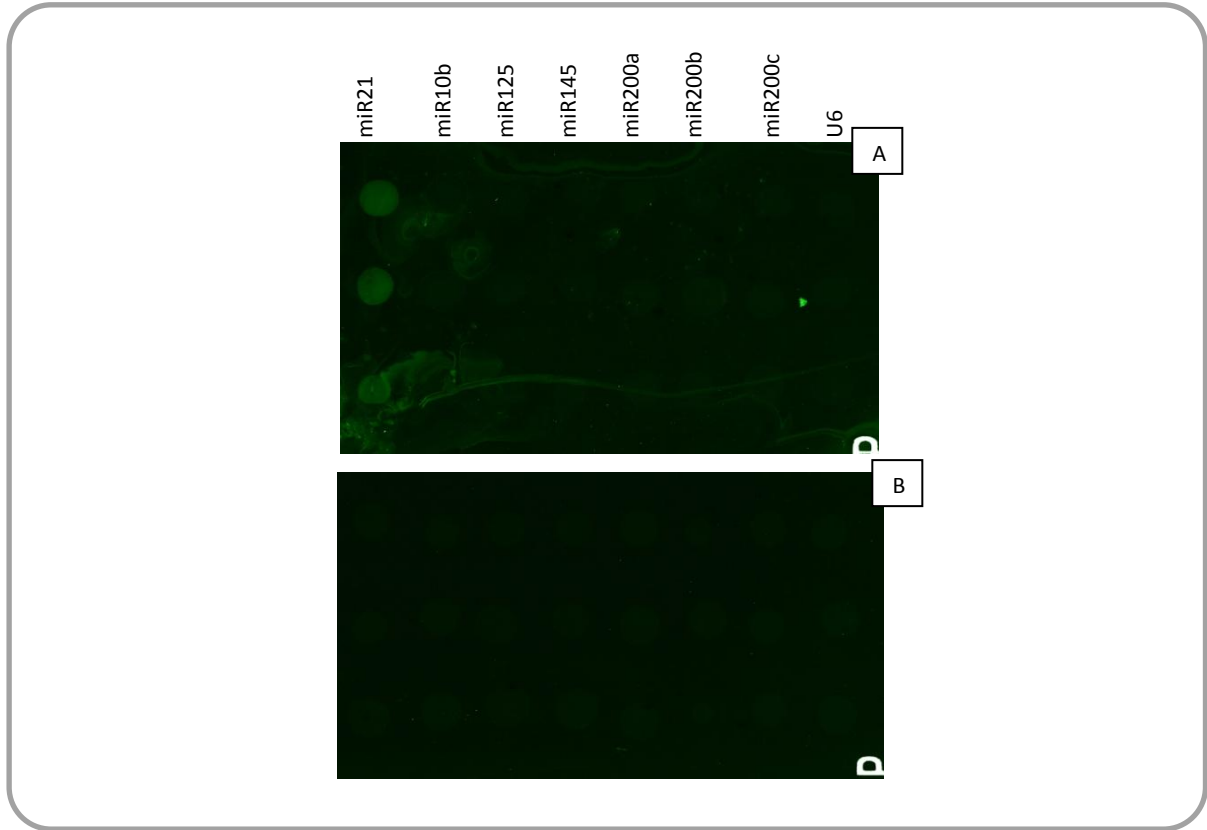
Şekil 27: P1 ve P2 problemlerinin bağlanma olasılığı A) P1 + P2 B) P1 + Ank + P2

Elde edilen sonuçlar aynı prob seti için P1 ve P2 problemleri arasında da, farklı prob setlerine ait P1 ve P2 problemleri arasında da istenmeyen hibridizasyonun görülmediğini göstermektedir.

4.2.5 FAM İşaretli Adaptor ile Platformun Test Edilmesi

miR21 prob setinin optimizasyonu için yapılan çalışmalarda pozitif kontrol olarak işaretli miR21 dizisi kullanılmıştır. FAM işaretli miR21 dizisi farklı miRNA örnekleri ile dizi platformunun çalıştırılması çalışmalarında da hazırlanan platformun performansını test etmek için kullanılmıştır. Yapılan deneylerde Şekil 9’da gösterildiği gibi hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip mikroRNA için P1 noktalanmıştır. Bunun üzerine adaptörler ve

P2 problemleri yerine sadece FAM işaretli miR21 eklenerek inkübe edilmiştir. Beklenti miR21-FAM dizisinin sadece kendi P1 yüzey probuna (P1-miR21-L) bağlanması ve diğer yüzey problemlerinde herhangi bir ışımaya gözlemlenmemesidir.

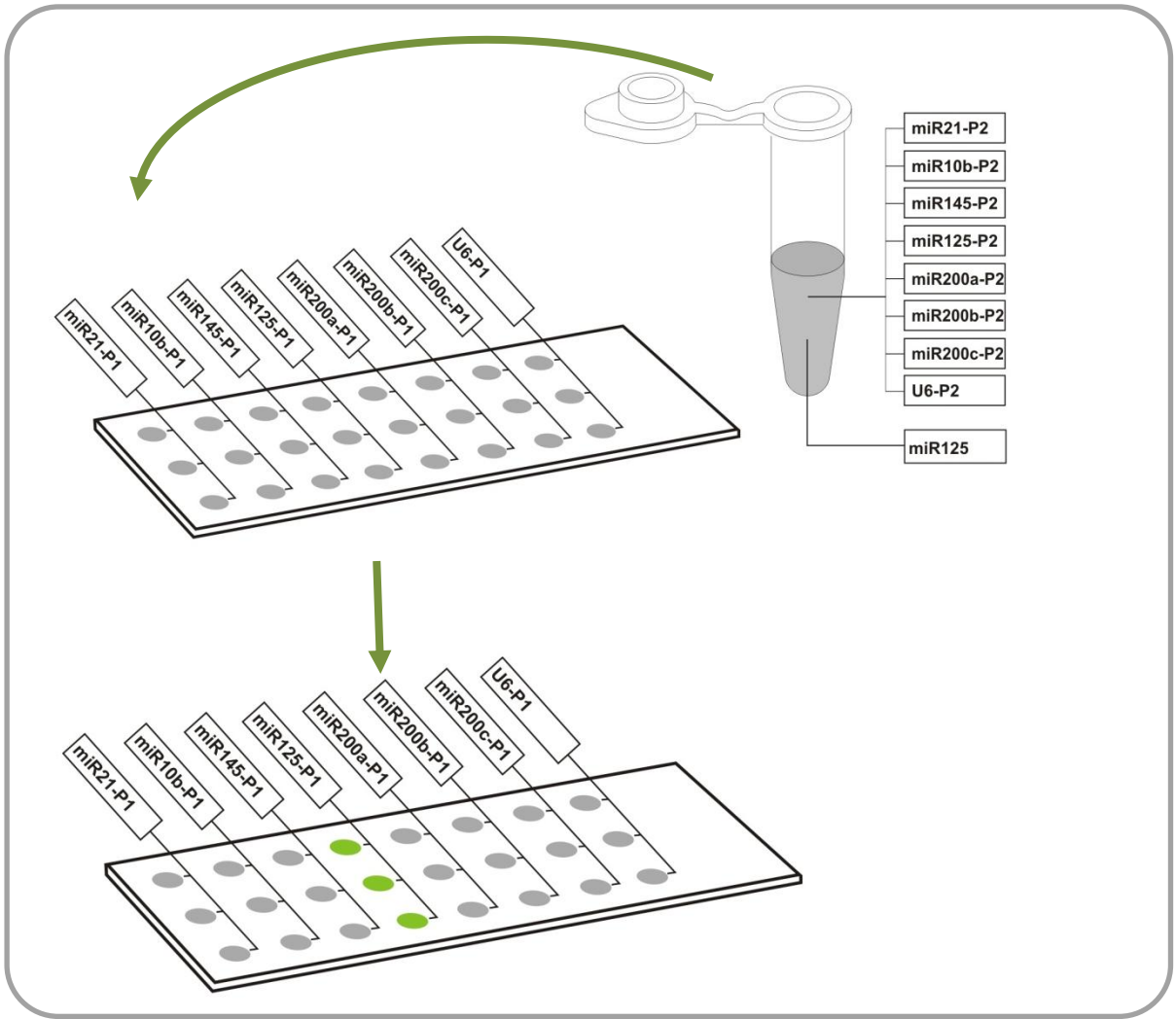


Şekil 28: FAM işaretli P1 ile platformun performansı A) P1 + miR21-FAM B) P1 + Ank + P2

FAM işaretli miR21 dizisi ile yapılan deneylerde ayrıca bir de Ank adaptörü kullanılarak negatif kontrol slaydı hazırlanmıştır. Deney sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 28’de verilmektedir. Çalışma sonucunda işaretli miR21 probunun özellikle kendi yüzey probuna bağlandığı görülmüştür. Negatif kontrolde çok az da olsa görünen bağlanmanın devamında platformun optimizasyon çalışmalarına devam edilmesi gerektiğini göstermektedir.

4.2.6 Adaptörlerin Diğer Prob Setlerine Bağlanma Oranlarının Belirlenmesi

Platformda her bir adaptörün kendi problemlerine bağlanması sekiz adaptör seti için oluşturulan platformun hibridizasyon özgünlüğü açısından çok önem taşımaktadır. Bu sebeple prob setlerinin özgünlüğünün belirlenmesi ve pozitif sinyallerin doğrulanması amacı ile bir dizi deney planlanmıştır.



Şekil 29: Adaptörlerin özgünlüğünün belirlenmesi çalışmalarında kullanılan slayt tasarımı ve beklenen sonuç

Bu deneylerde her adaptör tipi için bir slayt hazırlanmış ve Şekil 9'da gösterildiği gibi bu slaytlarda hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip miRNA için P1 noktalanmıştır. Daha

sonra tüm P2'ler (miR21-P2, miR10b-P2, miR145-P2, miR145-P2, miR200a-P2, miR200b-P2, miR200c-P2, U6-P2) ile sadece bir tip miRNA adaptörü inkübe edilmiş, ve bu çözelti P1'ler üzerine yüklenmiştir. Beklenen sonuç sadece içerdiği miRNA'ya ait bölgede sinyal gözlenmesidir (Şekil 29).

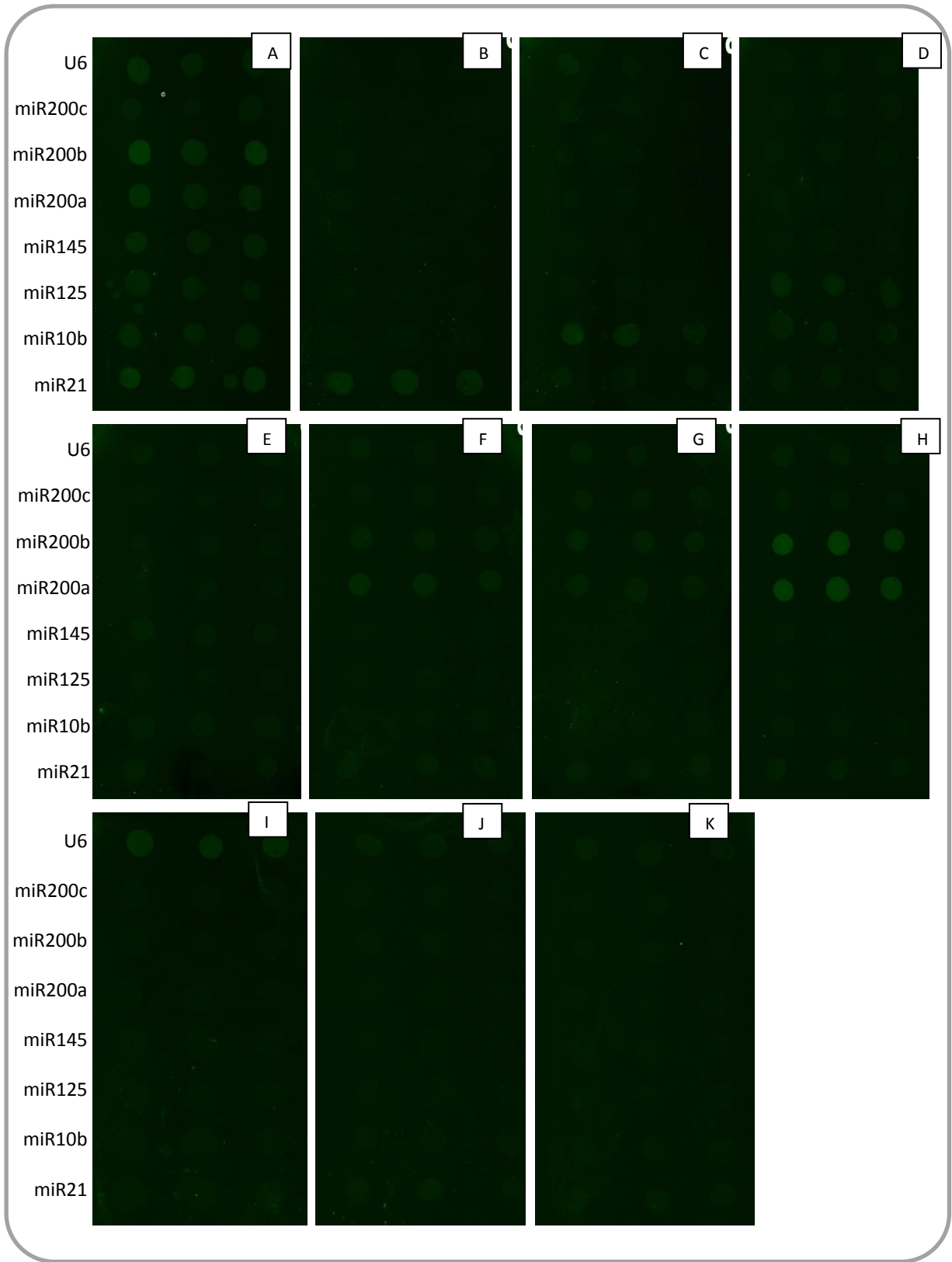
Bu deney setinde pozitif kontrol olarak tüm P2'ler ile tüm adaptörler (miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b, miR200c, U6) inkübe edilerek slayt üzerine yüklenmiş ve P1-A-P2 sandviç sistemi oluşturulmuştur. Ayrıca bir de negatif kontrol slaydı hazırlanmıştır. Deney seti için kullanılan koşullar tablo 24'de verilmektedir.

Tablo 24: Platformun seçiciliğinin test edilmesi sırasında kullanılan koşullar

Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çözeltisi	Hibridizasyon Çözeltisi	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
SMPEG2	P1 = 5 µM		0.6X SSC,		1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS
	P2 = 5 µM	2%BSA	0.5% SDS, 2%	30 dakika	1X / 5 min / 1X SSC
	A = 5 µM		BSA		3X / 1 min / dH2O

Şekil 30'dan da görülebileceği gibi adaptörler tüm P2'ler ile birlikte tek tek inkübe edilip platforma uygulandığında farklı bağlanma özellikleri göstermiştir. Örneğin miR21 ve miR10b sadece kendi problemlerine bağlanırken, aynı miRNA ailesine ait olan miR200a, 200b ve 200c kendileriyle birlikte ait oldukları aileye ait problemlere de bağlanma göstermişlerdir.

FAM işaretli miR21 ile yapılan çalışmalarda miR21 adaptörünün özellikle kendi yüzey probuna (miR21- P1-L) bağlandığı görülmüştür. Aynı şekilde adaptörlerin özellikle kendi yem problemlerine (P2) bağlanıp bağlanmadığını test etmek için 9 slayt hazırlanmıştır. Bu slaytlarda Şekil 9'da gösterildiği gibi hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip mikroRNA için P1 noktalanmıştır.



Şekil 30: Platformun seçiciliği A) Pozitif kontrol B) miR21 C) miR10b D) miR125 E) miR145 F) miR200a G) miR200b H)miR200c I) U6 J) Ank (Negatif kontrol) K) P1-P2 (negatif kontrol)

Tüm P2'ler (miR21-P2-L, miR10b-P2-L, miR145-P2-L, miR145-P2-L, miR200a-P2-L, miR200b-P2-L, miR200c-P2-L, U6-P2-L) ve sadece bir tip adaptör inkübe edilerek slaytların üzerine yüklenmiştir. Beklenen sonuç sadece adaptörünün eklendiği sırada sinyal gözlemlenmesidir. Örneğin şekil 27 A'da miR21 adaptörü tüm P2'ler (miR21-P2-L, miR10b-P2-L, miR145-P2-L, miR145-P2-L, miR200a-P2-L, miR200b-P2-L, miR200c-P2-L, U6-P2-L) ile inkübe edilmiş ve slayt üzerine yüklenmiştir. Beklenti sadece miR21 sırasında ışımaya görmektir.

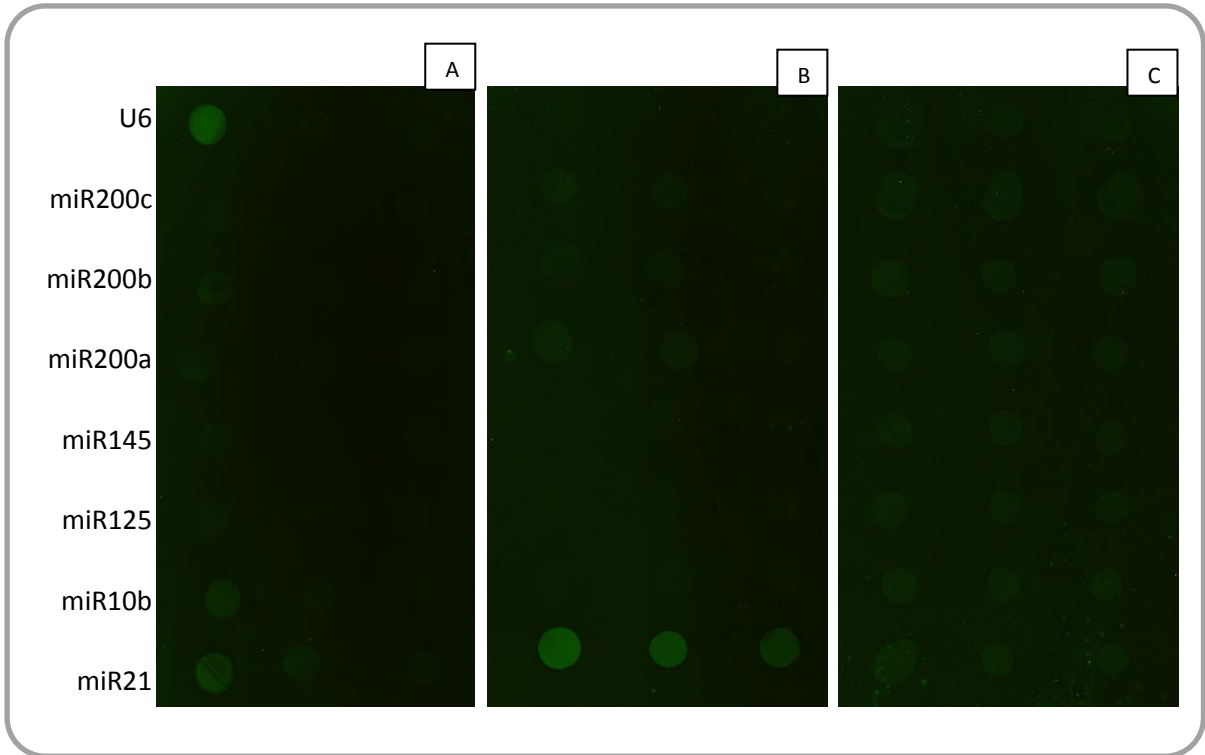
Elde edilen sonuçlar miR21, miR10b ve U6 prob setlerinde adaptörlerin kendi P2 yem problemlerine bağlandığını ancak diğer prob setlerinde istenmeyen hibridizasyonların varlığını göstermiştir.

4.2.7 MikroRNA prob setleri için hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonu

Yıkama koşullarının optimizasyonunun ardından, tüm miRNA'ların hibridizasyonunu iyileştirmek amacıyla hibridizasyon sıcaklığı için denemeler yapılmıştır. Bu amaçla hibridizasyon sıcaklığı olarak 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C denenmiştir. Her sıcaklık için üç slayt hazırlanmıştır. Bu slaytlara Şekil 9'da gösterildiği gibi hibridizasyon bölgesinde her satıra bir tip mikroRNA için P1 noktalanmıştır. İlk slaytda tüm P2'ler (miR21-P2, miR10b-P2, miR145-P2, miR145-P2, miR200a-P2, miR200b-P2, miR200c-P2, U6-P2) ile tüm adaptörler (miR21, miR10b, miR145, miR125, miR200a, miR200b, miR200c, U6) inkübe edilerek slayt üzerine yüklenmiş ve P1-A-P2 sandviç sistemi oluşturulmuştur. İkinci slaytda tüm P2'ler ile sadece miR21 adaptörü inkübe edilmiş ve bu çözelti P1'ler üzerine yüklenmiştir. Bu slayt ile platformun hibridizasyon özgünlüğü test edilmektedir. Belirli hibridizasyon sıcaklığında miR21 adaptörünün sadece kendi problemlerine bağlanması gerekmekte ve sadece miR21-P1'lerinin bağlandığı bölgede hibridizasyon gerçekleşmelidir. Çalışmada kullanılan sonuncu slayt ise adaptör yerine Ank kullanılarak oluşturulan negatif kontroldür. Hibridizasyon sıcaklığı için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında kullanılan koşullar Tablo 25'de verilmiştir.

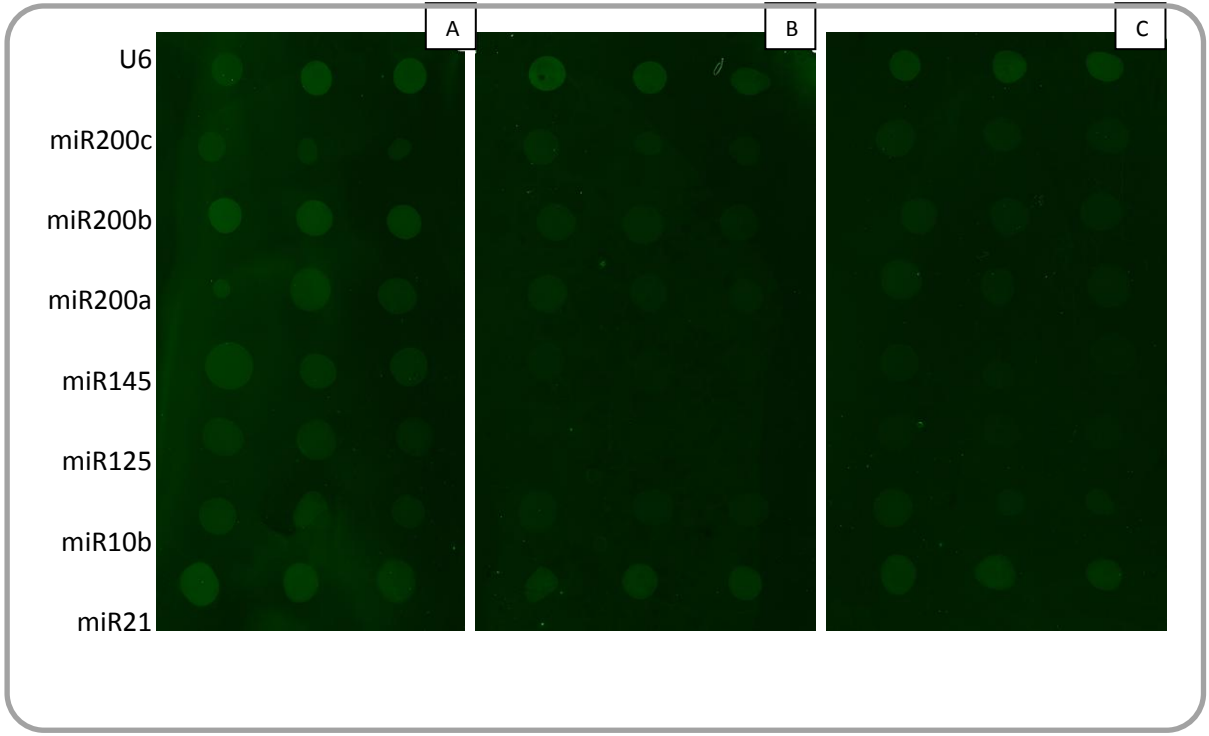
Tablo 25 : Hibridizasyon sıcaklığı optimizasyonu çalışmalarında kullanılan koşullar.

Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çöztisi	Hibridizasyon Çöztisi	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
SMPEG2	P1 = 5 µM P2 = 5 µM A = 5 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 dakika	1X / 10 min / 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH2O



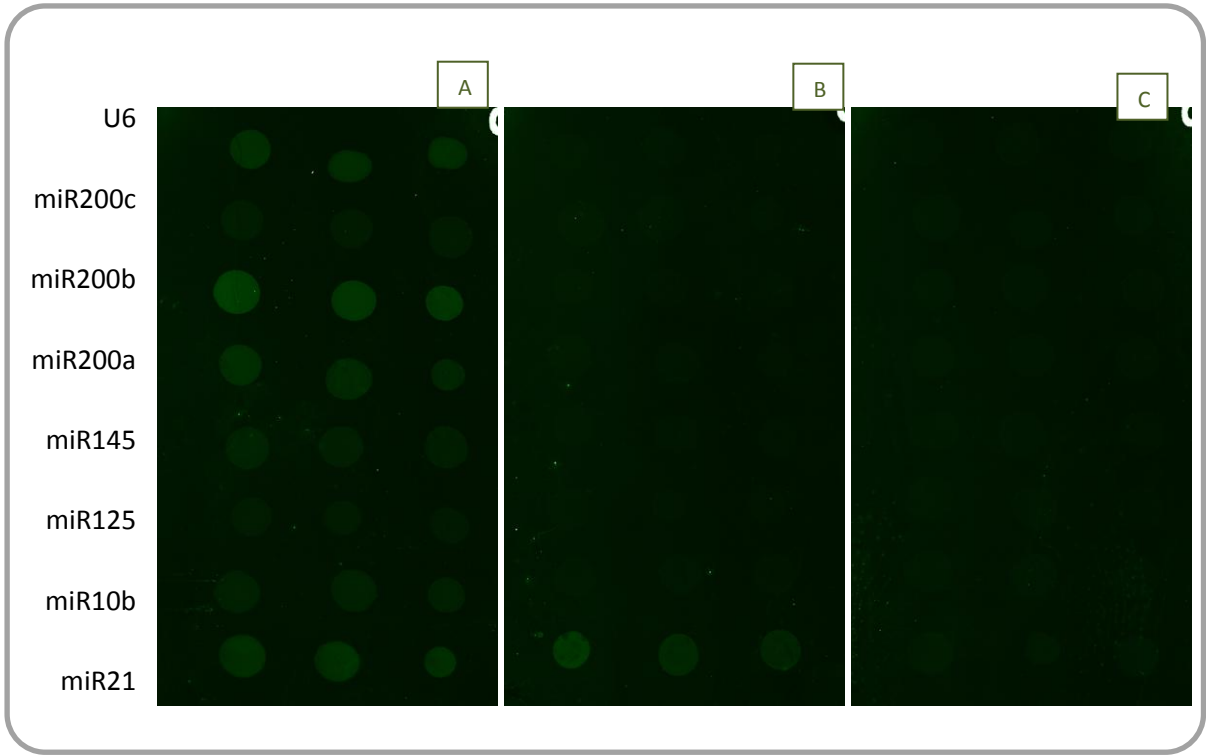
Şekil 31: 30°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar A) Sekiz prob setinden oluşan miRNA platformu, B) Sadece miR21 Adaptörü C) Negatif kontrol

Şekil 31'den de görebileceğiniz gibi 30°C hibridizasyon sıcaklığında P1-A-P2 bağlanması yeterince iyi olmamıştır. Ayrıca miR21 tek başına kullanıldığında her ne kadar sadece kendi prob seti ile bağlanma gösterse de negatif kontrolde spotlar görülmektedir. Bu sebeple 30°C inkübasyon sıcaklığının Tablo 25'de verilen koşullar altında uygun olmadığına karar verilmiştir.



Şekil 32: 35°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar A) Sekiz prob setinden oluşan miRNA platformu, B) Sadece miR21 adaptörü C) Negatif kontrol

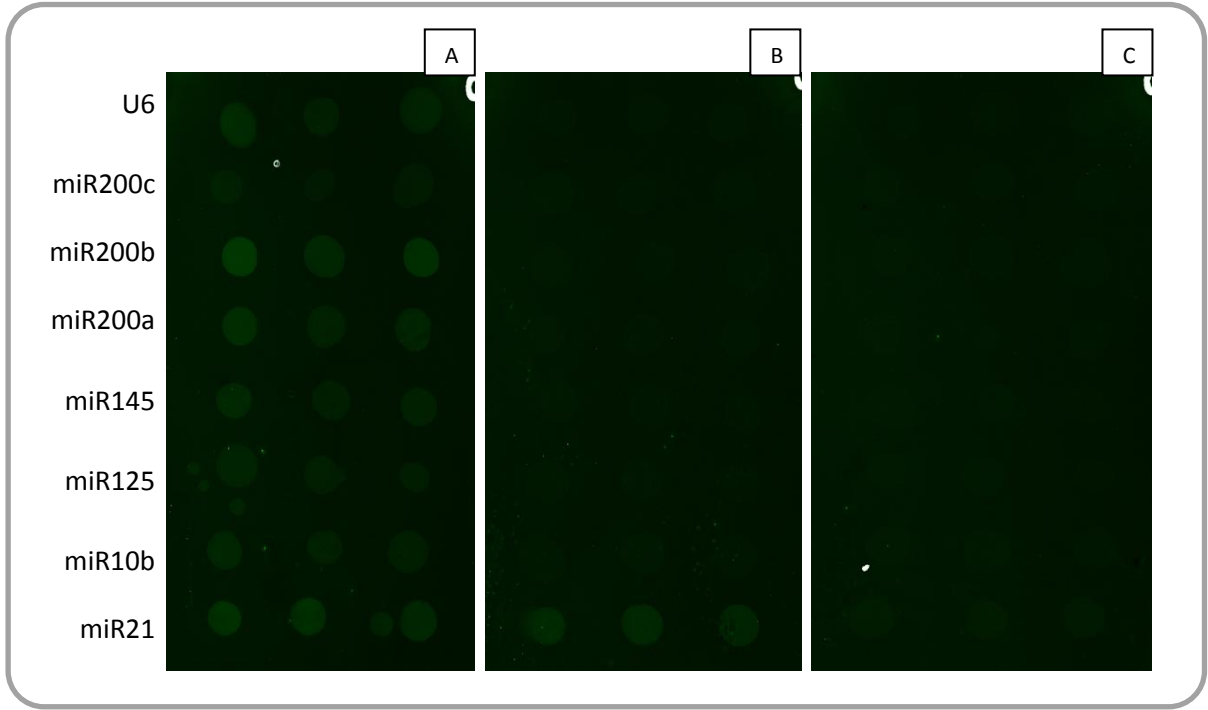
Hibridizasyon sıcaklığı 35°C'ye çıkartıldığında P1-A-P2 bağlanması güçlense de negatif kontrol slaytında istenmeyen bağlanmalar görülmeye devam edilmiştir. Ayrıca miR21 tek başına kullanıldığında diğer prob setlerine de bağlanmaktadır. Bu sebeple 35°C hibridizasyon sıcaklığının da oluşturulan platform için uygun olmadığına karar verilmiştir.



Şekil 33: 40°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar A) Sekiz prob setinden oluşan miRNA platformu, B) Sadece miR21 Adaptörü C) Negatif kontrol

Hibridizasyon sıcaklığı arttıkça negatif kontroldeki istenmeyen bağlanmalar azalmıştır. Ayrıca hibridizasyon 40°C’de tekrarlandığında (Şekil 33) P1-A-P2 bağlanma oranı 30°C (Şekil 31) ve 35°C ‘lerde (Şekil 32) yapılan tekrarlara göre oldukça artmıştır.

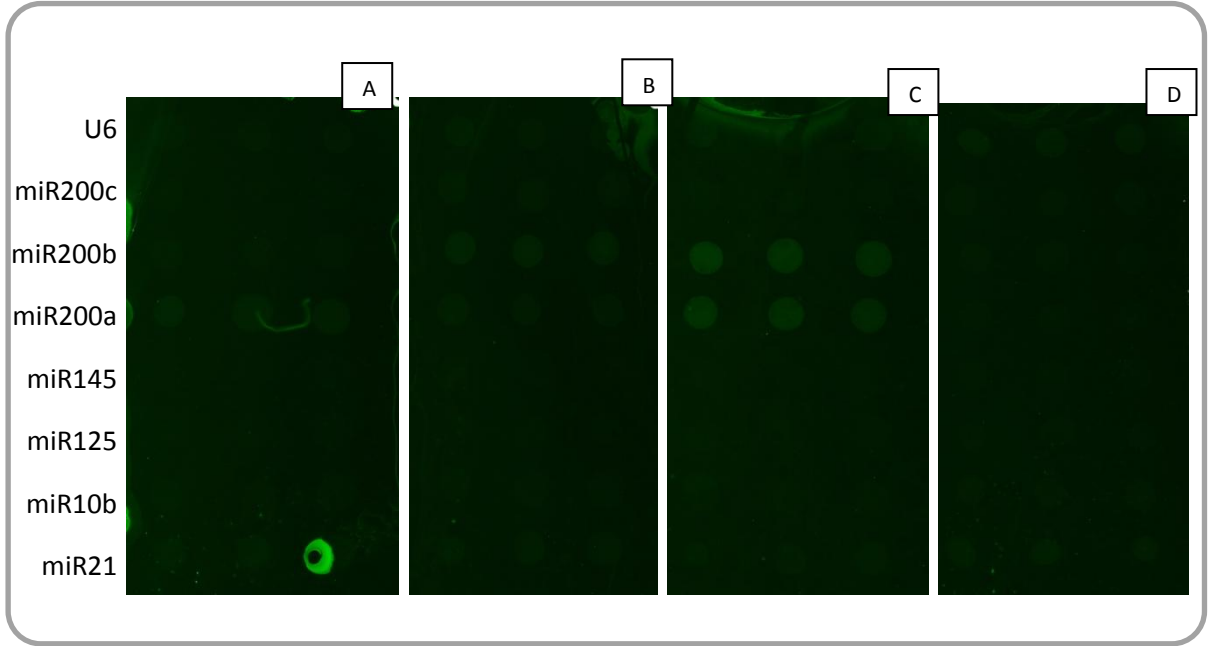
Çalışmada son olarak 45°C hibridizasyon sıcaklığı denenmiştir. Şekil 34’den de görülebileceği gibi hibridizasyon sıcaklığı 45°C’ye çıkartıldığında P1-A-P2 bağlanmaları artmış, miR21 adaptörünün kendi problemlerine özgünlüğü artmış, ayrıca negatif kontroldeki istenmeyen bağlanmalar da en aza inmiştir. Bu sebeple hibridizasyon sıcaklığı 45°C olarak belirlenmiş ve çalışmanın devamında bu sıcaklık kullanılmıştır.



Şekil 34: 45°C hibridizasyon sıcaklığında platform için elde edilen sonuçlar A) 8 prob setinden oluşan miRNA platformu, B) Sadece miR21 Adaptörü C) negatif kontrol

4.2.8 miR200 ailesinin özgünlüğünün test edilmesi

Şekil 30'dan da görüldüğü gibi aynı aileden olan miR200c, miR200b ve miR200c problemleri birbirinin problemlerine bağlanabilme özelliği göstermiştir. Bu sebeple bu üç adaptor seti için hibridizasyon sıcaklığı 50°C'ye çıkartılarak Tablo 25'de verilen koşullarla deney tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 35'de verilmektedir.



Şekil 35: 50°C hibridizasyon sıcaklığında miR200 ailesine ait adaptörlerin seçiciliğinin test edilmesi A) miR200a, B) miR200b C) miR200c D) negatif kontrol

Yukarıdaki şekilden de görülebileceği gibi hibridizasyon sıcaklığının artırılması adaptörlerin seçiciliğini arttırmamıştır.

4.2.9 miR200c adaptörünün bağlanma koşullarının optimizasyonu

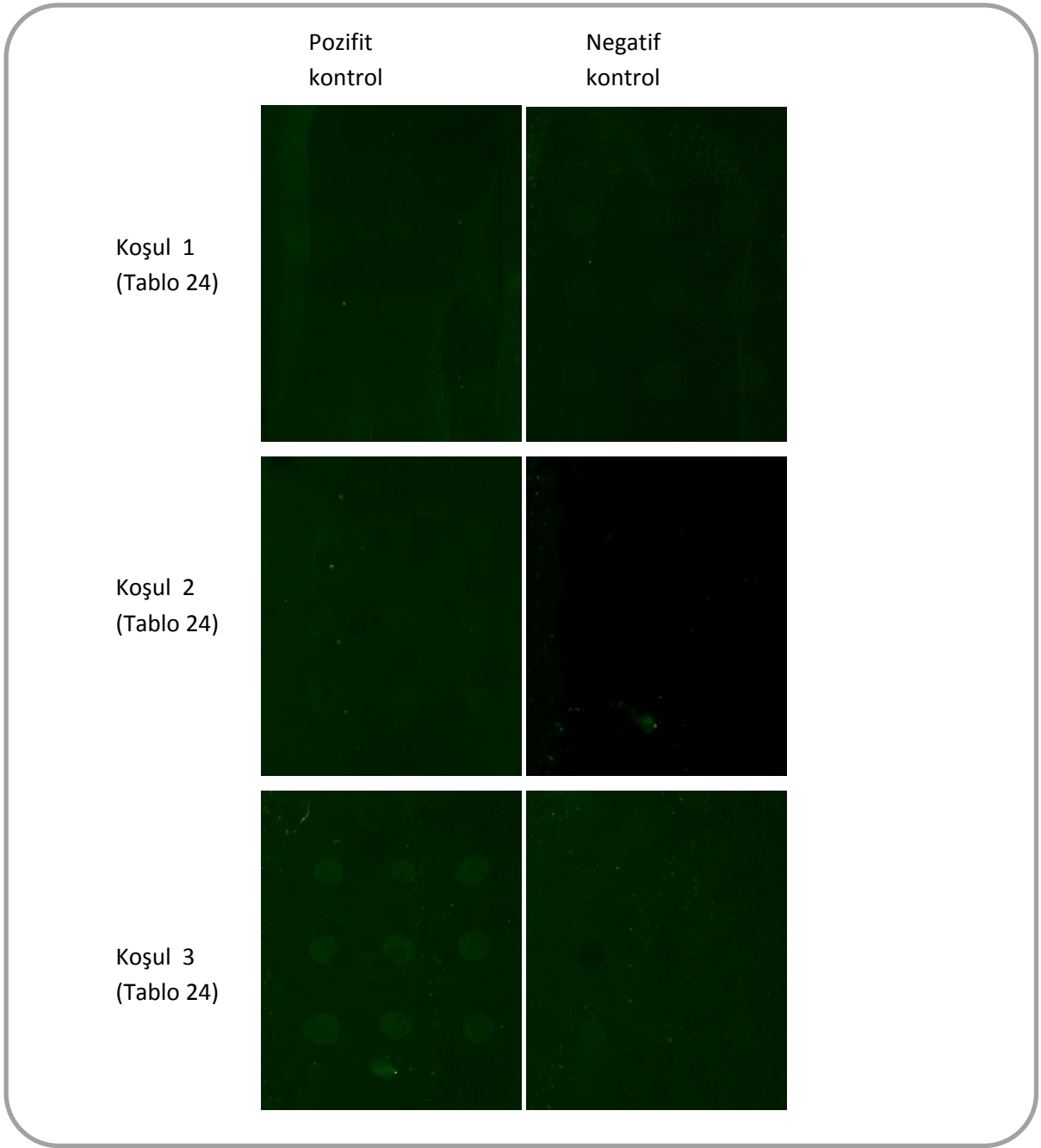
Çalışma başından itibaren yapılan tüm denemelerde miR200c çok silik spotlar vermiştir. Bir başka deyişle denenen koşullar ile miR200c için sandviç hibridizasyon platformu verimli bir şekilde elde edilememiştir. Bu sebeple miR200 prob konsantrasyonları artırılarak farklı hibridizasyon sıcaklığı koşullarında denemeler yapılmıştır. Denenen koşullar Tablo 26'da verilmektedir.

Tablo 26: miR200c bağlanma koşullarının iyileştirilmesi için yapılan denemeler

Koşul	Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çöztisi	Hibridizasyon Çöztisi	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
1	SMPEG ₂	P1 = 10 µM P2 = 10 µM A = 10 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 °C	30 dakika	1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH ₂ O
2	SMPEG ₂	P1 = 10 µM P2 = 10 µM A = 10 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	45 °C	30 dakika	1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH ₂ O
3	SMPEG ₂	P1 = 20 µM P2 = 20 µM A = 20 µM	2%BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	45 °C	30 dakika	1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH ₂ O

Denemeler sırasında sadece miR200c prob ve adaptör seti kullanılmıştır. Slaytlar hazırlanırken 9 spot oluşturulmuş ve her deneme için bir negatif kontrol slaydı hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 36'da verilmektedir.

Şekil 35'den de görüleceği gibi hibridizasyon sıcaklığının değişmesi miR200c adaptörünün bağlanma oranını arttırmamıştır. Öte yandan konsantrasyonun artması sonucu pozitif yönde etkilemiştir. Buna rağmen farklı koşullar denenmesine rağmen T_m değeri diğer prob-adaptör setlerinden farklı olmayan miR200c prob-adaptör seti diğer setlerinden çok daha silik spotlar vermiştir. Bunun miR200c adaptör ve/veya prob setindeki bir bozulmadan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple yeni bir miR200c adaptör-prob seti sipariş edilmiş ve bu setle deney tekrarlanmıştır, ancak yine miR200c için istenilen spotlar elde edilememiştir.



Şekil 36: miR200c için bağlanma koşullarının test edilmesi

4.2.10 Platformun hassasiyetinin belirlenmesi

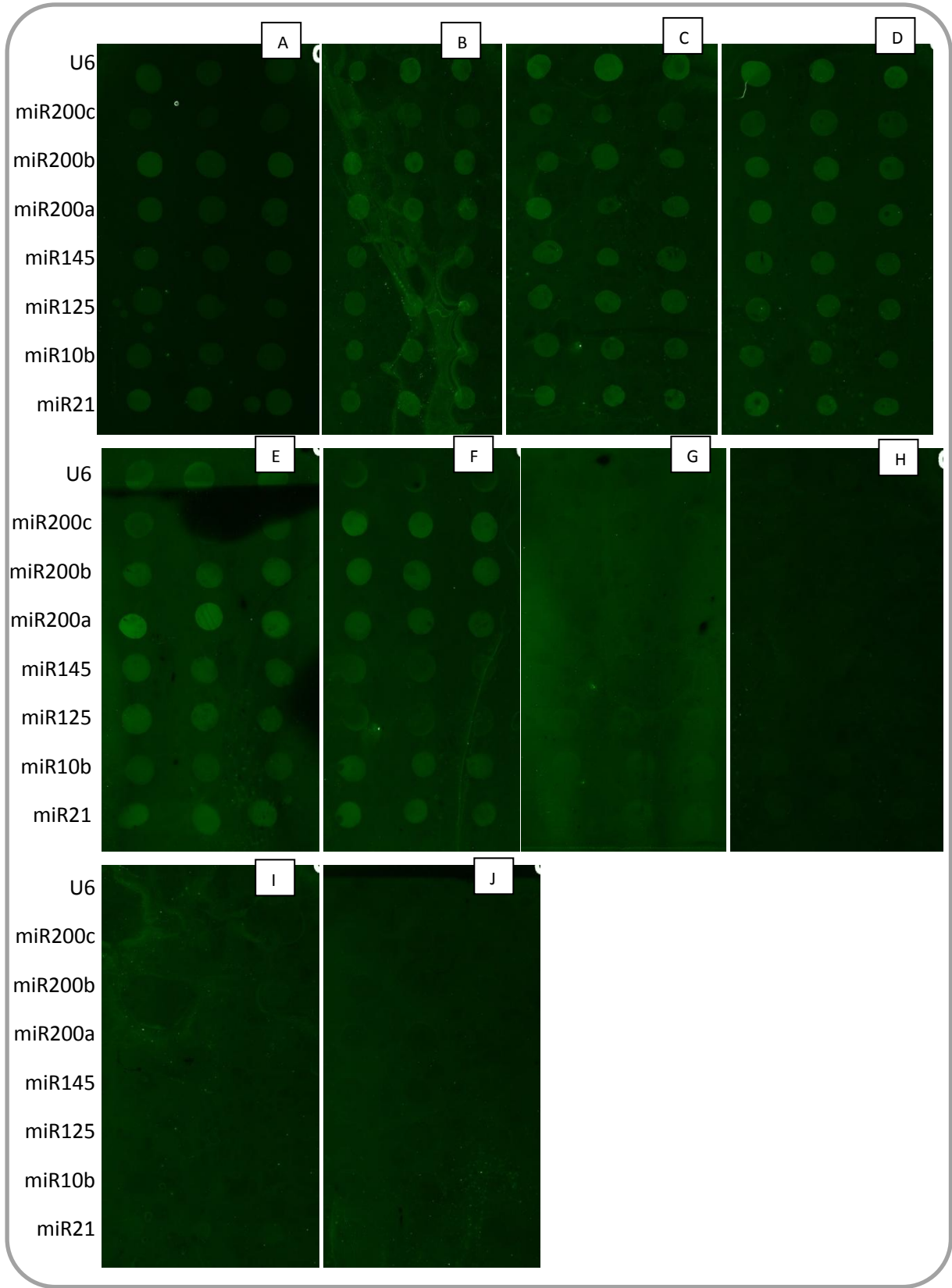
Dizi platformlarında platformun hassasiyetinin yüksek olması çok önem taşımaktadır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA dizisi (A) ile gerçekleştirilen deneylerde,

geliştirilen miRNA dizi platformunun tespit edebileceği minimum adaptör konsantrasyonu yani oluşturulan platformun hassasiyeti belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla adaptör için 0.0001 μM , 0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM , 5 μM ve 10 μM derişimleri denenmiştir. Hassasiyetin belirlenmesi çalışmalarımda tüm prob ve adaptörler kullanılarak sandviç hibridizasyon platformu oluşturulmuştur.

Tablo 27: Platformun seçiciliğinin test edilmesi sırasında kullanılan kullanılan koşullar

Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çözeltisi	Hibridizasyon Çözeltisi	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
SMPEG ₂	miR21 = 5 μM		0.6X SSC,		1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1%
	miR10b = 5 μM	2%BSA	0.5% SDS,	30 dakika	SDS
	miR125 = 10 μM		2% BSA		1X / 5 min / 1X SSC
	miR145 = 10 μM				3X / 1 min / dH ₂ O
	miR200a = 5 μM				
	miR200b = 5 μM				
	miR200c = 20 μM				
	U6 = 5 μM				

Hassasiyet çalışmalarımda miR200c (20 μM) dışındaki adaptörler için 5 μM prob konsantrasyonu ile başlanmıştır. Ancak bu prob konsantrasyonları ile adaptör konsantrasyonu düşürüldüğünde miR125 ve miR145 için spotların çok silik hale geldiği görülmüştür. Bu sebeple hassasiyet çalışmalarımda Tablo 27’de belirtilen koşullar kullanılmıştır.



Şekil 37: Dizi platformunun hassasiyeti A) 10µM B) 5µM C) 1µM D) 0.5µM E) 0.1µM F) 0.01µM G) 0.001µM H) 0.0001µM I) 0.00001µM J) Ank (negatif kontrol) P1-P2 (negatif kontrol)

Farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA dizileri ile gerçekleştirilen deneylerde, geliştirilen miRNA dizi platformunun tespit edebileceği minimum adaptör konsantrasyonu yani oluşturulan platformun hassasiyeti belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 37'den görülebileceği gibi çalışmamız kapsamında geliştirilen dizi platformu 0.01 µM adaptör konsantrasyonunu net bir şekilde belirleyebilmektedir. Bu konsantrasyonun altında spotlar çok silik hale gelmektedir.

4.3 Aşama III: Platformunun çalışabilirliğinin total RNA örnekleri kullanılarak araştırılması.

Çalışmamız kapsamında ilk iki aşamada optimize hale getirilen nükleik asit tabanlı miRNA dizi platform, üçüncü aşamada gerçek total RNA örnekleri ile denenmiş ve platformun performansı araştırılmıştır. Bu amaçla daha önce belirtildiği gibi immortal ama tümörigenik olmayan meme hücre hatlarını (MCF10A ve MCF12A), metastas negatif (MCF7) ve metastas pozitif (MDA-MB-231) hücre hatları ile ticari olarak satılan tumorigenic ve normal dokulardan elde edilmiş total RNA örnekleri kullanılmıştır.

Çalışmada öncelikli olarak immortal ama tümörigenik olmayan meme hücre hatları (MCF10A ve MCF12A), metastas negatif (MCF7) ve metastas pozitif (MDA-MB-231) hücre hatları Tablo 8'de belirtilen mediumlar kullanılarak büyütülmüştür.

4.3.1 Total RNA izolasyonu

Büyütülen hücre hatlarından trizol yöntemi kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre hücre hatları üzerine trizol eklenerek 15 °C'den 30 °C'ye 5 dakika inkübasyonda tutulmuş ve homojenize edilmiştir. Chloroform ile faz ayrımı gerçekleştirilmiş supernatant üzerine izopropil alkol eklenerek inkübe edilmiştir. Sentrifüjün ardından etanol ile yıkanan RNA'lar su eklenerek 55 °C – 60 °C'de 10 dakika inkübe edilerek çalışmanın devamında kullanılmak üzere saklanmıştır.

İzolasyonun ardından elde edilen total RNA miktarları nanodrop ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar tablo 28’de verilmiştir.

Tablo 28: Total RNA konsantrasyonu

Hücre Hatları	Total RNA konsantrasyonu
MCF 10A	425.9 ng/µl
MCF 12A	1064.4 ng/µl
MCF 7	230.9 ng/µl
MDA-MB-231	54 ng/µl

4.3.2 cDNA Analizi

Elde edilen total RNA örnekleri kullanılarak ters transkripsiyon yöntemi ile cDNA örnekleri hazırlanmıştır. Bu amaçla kullanılan koşullar Tablo 29’da belirtilmiştir. Her bir miRNA için hazırlanan mikro tüpler 5 dakika buz üstünde bekletildikten sonra 16 °C ‘de 30 dakika, 42 °C’de 30 dakika, 85 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. PZR cihazından çıkartılan mikrotüpler 1-2 dakika yine buz üstünde bekletilip santrifuj yapıldıktan sonra çalışmanın devamında kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 29: Ters Transkripsiyon analizleri için kullanılan koşullar

Kimyasal	%	
10X RT, buffer	1x	1.5 µl
dNTP (100mM)	1 mM	0.15 µl
RT enzim (50µl/ml)	1µl/ml	1 µl
Rnase inhibitor		0.19 µl
Primer	5 µM	3 µl
Total RNA	100 ng	5 µl
Su		4.16 µl
Toplam		15 µl

4.3.3 Gerçek zamanlı RT-PZR çalışmaları

Çalışma kapsamında farklı hücre hatlarındaki miRNA varlığı gerçek zamanlı RT-PZR analizleri ile doğrulanmıştır. Çalışmalarda daha önce belirtildiği gibi Taqman probları kullanılmıştır. Yapılan analizlerde ticari olarak satılan ve normal dokudan elde edilmiş total RNA örnekleri kalibrasyon için kullanılmıştır. Her tip hücre hattı için üç replika hazırlanmıştır. Çalışmalarda U6 ise referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 30: Gerçek zamanlı RT-PZR

Taqman universal mix	5 µl
20x taqman	1X
cDNA	0.665µl
dH ₂ O	3.835 µl
toplam	10 µl

Elde edilen sonuçlar literatürde belirtildiği gibi miRNA konsantrasyonlarının tumor ve normal hücre hatları arasında farklılık gösterdiğini desteklemektedir. Örneğin Literatürde özellikle meme kanserinde miR21'in ekspresyonunun arttığı belirtilmektedir (Romero-Cordoba ve ark., 2012; Frankel ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2007). Çalışmamızda da gerçekleştirilen gerçek zamanlı RT-PZR çalışmalarında tumorigenic metastas negatif (MCF7) ve metastas pozitif (MDA-MB-231) hücre hatlarını ticari olarak satılan normal meme dokusundan elde edilen total RNA örnekleri ile karşılaştırdığımızda her iki hücre tipinde de miR21 ve miR10b'nin arttığı gözlemlenmiştir. Öte yandan ticari olarak satılan normal meme dokusundan elde edilen total RNA sonuçları tümörigenik olmayan hücre hatları ile karşılaştırdığımızda bu artış görülmemiştir. Örneğin miR21 ticari olarak satılan ve tümörigenik olmayan hücrelerden elde edilen total RNA ile karşılaştırıldığında tümörigenik olmayan MCF10A hücre hattında sadece 0.22 kat artış gösterirken, tümörigenik MCF7 hücre hattında 6.7 kat artmıştır. miR125, ve miR145 için literatürde tumorigenic hücre hatlarında ekspresyonlarının azaldığı belirtilmektedir (Romero-Cordoba ve ark., 2012). Öte yandan gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bu azalma gözlemlenememiştir.

4.3.4 DNase Uygulaması

Daha önce belirtildiği gibi hücre hatlarından elde edilen total RNA örnekleri platforma uygulanmadan önce olabilecek herhangi bir DNA varlığını engellemek için bu örneklerle DNase işlemi uygulanmıştır. DNase uygulaması ardından nanodrop ile ölçüm yapılmış, elde edilen sonuçlar Tablo 31’de verilmiştir

Tablo 31: Total RNA konsantrasyonu

Hücre Hatları	Total RNA konsantrasyonu
MCF 7	87.9 ng/μl
MDA 231	54.7 ng/μl
MCF 12A	73.5 ng/μl
MCF 10A	108.1 ng/μl

Bu işlemden sonra GAPDH primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. Yapılan PCR çalışmalarında kullanılan koşullar Tablo 32 ve 33’de verilmektedir.

Tablo 32: GAPDH PZR solüsyonu

10X PCR Buffer	1X	3 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2.4 μl
dNTP (2.5 mM)	0.25mM	3 μl
GAPDH F (5μM)	0.5 μM	3 μl
GAPDH R (5μM)	0.5 μM	3 μl
template		1 μl
Taq polymerase (5U/μl)	0.04U/ μl	0.25 μl
dH ₂ O		14.35 μl
Toplam		30 μl

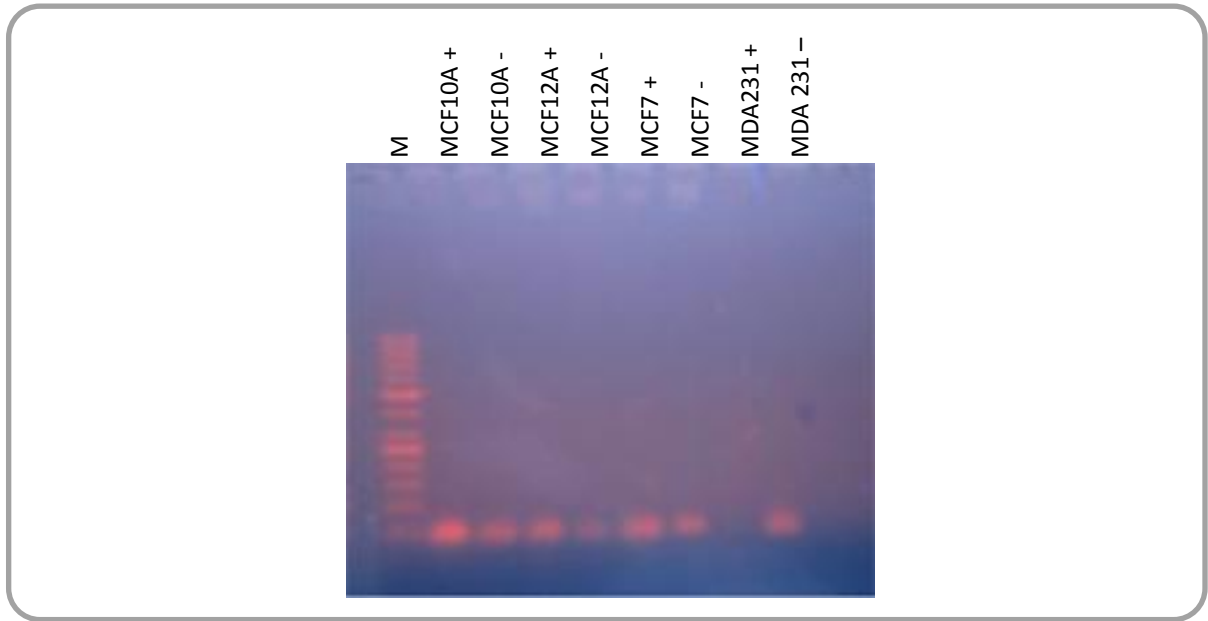
Tablo 33: GAPDH PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
95 °C	2 dak	
95 °C	30 sn	35
56 °C	30 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	10 dak	

PZR'dan alınan ürünler %1.5 agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Jellerde çok hafifte olsa bant gözlemlendiği için bir kez daha DNase işlemi yapılmasına karar verilmiştir. İkinci DNase işleminden sonra örnekler tekrar nanodrop ile ölçülmüş (Tablo 34) ve PZR yapılmıştır (Şekil 38). PZR ürünleri 1.5% agaroz jelde yürütüldüğünde jelde herhangi bir bant gözlemlenmemiştir.

Tablo 34: Hücre Hatları RNA konsantrasyonu

Hücre Hatları	RNA konsantrasyonu
MCF 7	61.3 ng/ μ l
MDA 231	29.7 ng/ μ l
MCF 12A	49.1 ng/ μ l
MCF10A	73.1 ng/ μ l



Şekil 38: DNase işlemi uygulanmış örnekler

Elde edilen bu RNA örneklerinin platforma uygulanabilir saflıkta olduğu kabul edilmiştir.

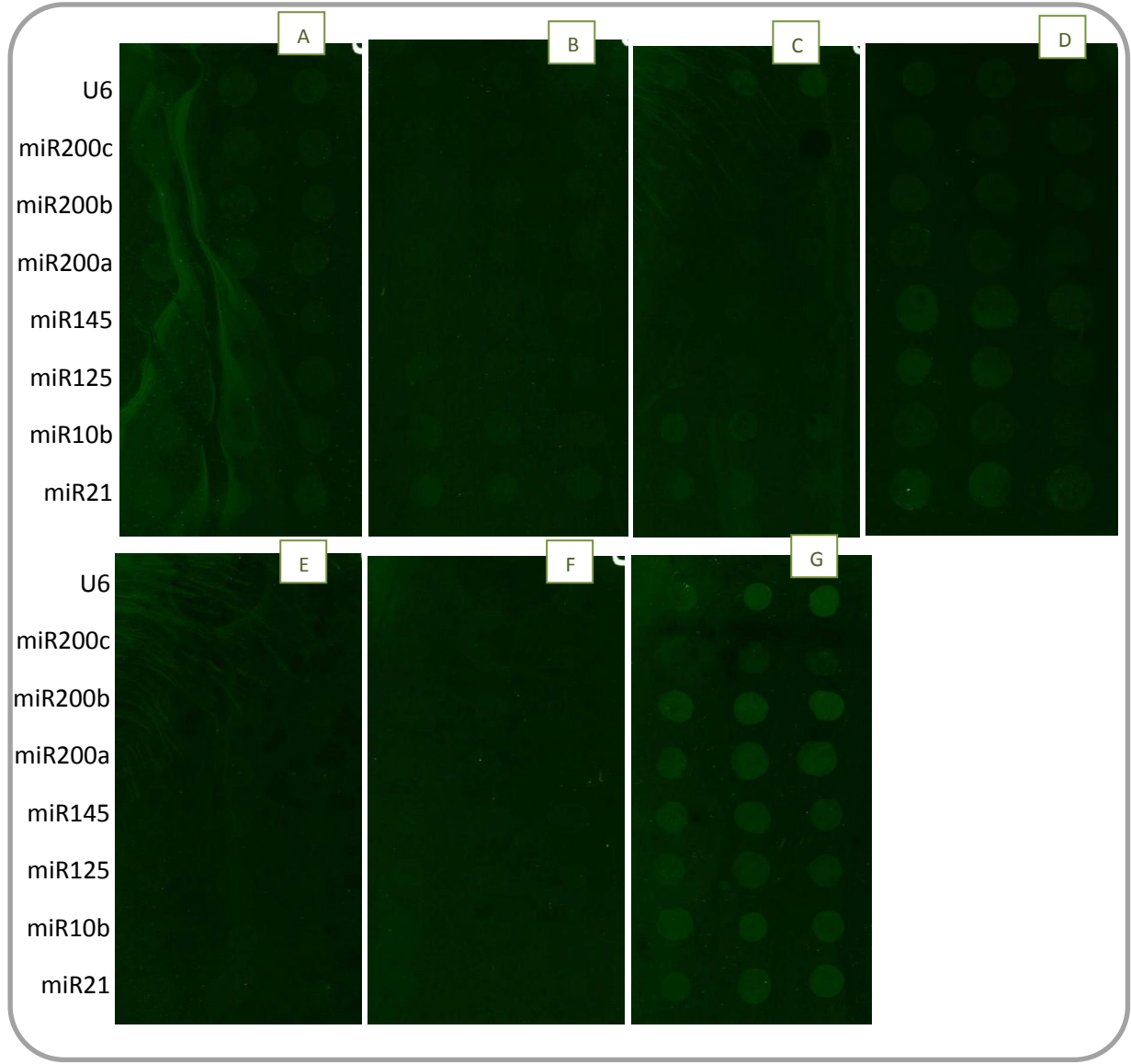
4.3.5 Total RNA Örneklerinin miRNA Platformuna Uygulanması

Sentetik miRNA adaptörleri ile optimize edilen koşullar kullanılarak DNase uygulanmış total RNA örnekleri platform üzerinde denenmiştir. Bu aşamada izole edilen RNA miktarı nanodrop ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 34’de verilmiştir. Nanodrop ile ölçülen total RNA örnekleri konsantrasyonlarına göre orantılanarak platform uygulanmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan koşullar Tablo 35’de verilmiştir.

Tablo 35: Platformun meme kanseri hücre hatlarının total RNA örnekleri ile test edilmesi sırasında kullanılan koşullar

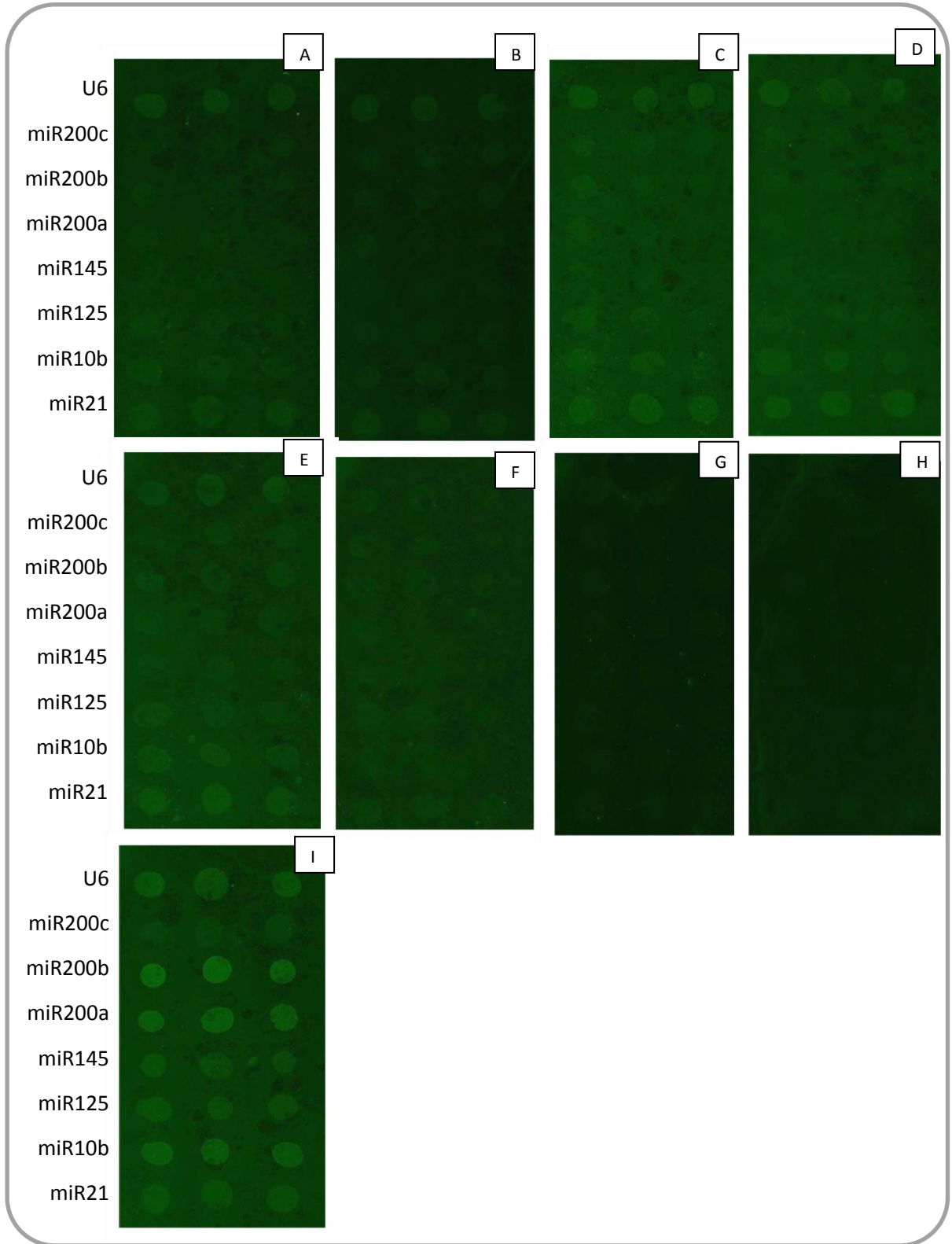
Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çözeltisi	Hibridizasyon Çözeltisi	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
SMPEG ₂	P1 = 5 µM P2 = 5 µM	2%	0.6X SSC,	30 dakika	45 °C	1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH2O
	MCF 7 = 2.39 µl MDA231=4.92 µl MCF12A = 3 µl MCF10A = 2 µl	BSA	0.5% SDS, 2% BSA			

Total RNA örneklerinin platform uygulanması sonucunda elde edilen deney sonuçları Şekil 39’ da verilmektedir.



Şekil 39: Hücre hatları A) MCF7 B) MDA231 C) MCF 12A D)MCF10A E) P1+Ank +P2 F) P1 +P2 G) Pozitif Kontrol

Şekil 39'dan da görüleceği gibi total RNA örnekleri platform uygulandığında kanserli hücre hatları ile gerçekleştirilen denemelerde normal hücre hatlarına göre daha fazla bağlanma görülmüştür. Öte yandan tüm denemeler göz önüne alındığında spotlar siliktir. Bu sebeple daha yüksek total RNA konsantrasyonu ile koşullar sabit tutularak deneyler tekrarlanmıştır. Bu denemelerde kullanılan koşullar Tablo 36'da elde edilen sonuçlar Şekil 40'da verilmektedir.



Şekil 40: Hücre hatları A) MCF12A B) MCF10A C) MCF 7D) MDA-MB-231 E) tümör total RNA F) meme total RNA G) Negatif kontrol (P1+Ank+P2) H) Negatif kontrol (P1 + P2) I) Pozitif kontrol

Tablo 36: Platformun meme kanseri hücre hatlarından alınan total RNA örnekleri ile test edilmesi sırasında kullanılan koşullar

Çapraz Bağlayıcı	Prob ve adaptör derişimi	Bloklama Çözeltisi	Hibridizasyon Çözeltisi	Hibridizasyon Zamanı	Hibridizasyon Sıcaklığı	Hibridizasyon sonrası yıkama koşulları
SMPEG ₂	P1 = 10 µM P2 = 10 µM MCF 7 = 4.78 µl MDA231=9.84 µl MCF12A = 6 µl MCF10A = 4 µl	2% BSA	0.6X SSC, 0.5% SDS, 2% BSA	30 dakika	45 °C	1X/ 10 min/ 5X SSC + 0.1% SDS 1X / 5 min / 1X SSC 3X / 1 min / dH2O

Şekil 40'dan da görülebileceği gibi, total RNA konsantrasyonunun arttırılması sandviç tabanlı miRNA dizi platformunun performansını arttırmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan U6 tüm slaytlarda (normal ve kanserli hücre hatlarından elde edilen total RNA'lar ile çalıştırılan) gözlemlenmiştir. Gerçek zamanlı qPCR sonuçlarına paralel olarak miR21 ve miR10b için elde edilen spotlar kanserli hücre hatlarından elde edilen total RNA'lar kullanılarak elde edilen slaytlarda normal olanlara göre çok daha belirgindir. Literatür çalışmalarında kanserli hücrelerde azaldığı belirtilen miR125 ve miR145 için spotlarda bir azalma gözlemlenmemiştir.

5 Tartışma ve Sonuç

Projemiz kapsamında sandviç hibridizasyon temelli miRNA tayininde kullanılabilecek bir dizi platformunun geliştirilmesi önerilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda proje başvurusunda öngörülen tüm çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Dizi platformu sentetik miRNA dizileri ile çalıştırılmış, platformun total RNA'lar ile çalışabilme potansiyeli farklı hücre hatlarından elde edilen total RNA örnekleri ile test edilmiştir. Bu bağlamda öngörülen hedeflerin tümüne ulaşılmış ve bahsi geçen dizi platformu için konsept doğrulama çalışmaları başarı ile sonuçlandırılmıştır.

Yapılan alışmalar FAM işaretli problar kullanılarak sandviç hibridizasyon yöntemi ile miRNA sekanslarının geliştirilen dizi platformu ile belirlenebildiğini göstermektedir. Öte yandan total RNA içinde miRNA konsantrasyonu çok düşük olduğundan elde edilen sinyal açısından düşük verim alınmıştır. Sinyal seviyesini arttırmak için farklı görüntüleme yöntemlerinin araştırılması faydalı olacaktır.

Proje alışmaları sonucunda ulaşılan nokta laboratuvarlarımızda yeni Ar-Ge faaliyetlerini başlatacak niteliktedir ve bu konudaki faaliyetlerimiz devam etmektedir.

6 REFERANSLAR

Ambros V, Lee R, Lavanway A, Williams P, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 13(10):807-18 (2003).

Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281-97 (2004).

Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk R, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120(1):21-4 (2005).

Calin G, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K and others. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15524-9 (2002).

Calin G, Sevignani C, Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and others. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2999-3004 (2004).

Cimmino A, Calin G, Fabbri M, Iorio M, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S, Aqeilan R, Zupo S, Dono M and others. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39):13944-9 (2005).

Du, P., Li H., Cao W. Construction of DNA sandwich electrochemical biosensor with nanoPbS and nanoAu tags on magnetic microbeads. *Biosensors and Bioelectronics*. 24: 3223–3228 (2009).

Erson A, Petty E. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet*. 74: 296–306 (2008).

Frankel L, Christoffersen N, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund A. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283(2):1026-33 (2008).

Griffiths-Jones S, Saini H, van Dongen S, Enright A. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue):D154-8 (2008).

Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan D, Li A, Huang G, Klein-Szanto A and others. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 10(2):202-10 (2008).

Iorio M, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M and others. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65(16):7065-70 (2005).

Lee R, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294(5543):862-4 (2001).

Liu J, Carmell M, Rivas F, Marsden C, Thomson J, Song J, Hammond S, Joshua-Tor L, Hannon G. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437-41 (2004).

Krek A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**: 495-500 (2005).

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R. 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449(7163):682-8.

Mattie, M.D., Benz, C.C., Bowers, J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G.K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R., and Haqq, C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol. Cancer* 5: 24 (2006).

Muyal J.P., Singh S.K., Fehrenbach H. 2008. DNA-Microarray Technology: Comparison of Methodological Factors of Recent Technique Towards Gene Expression Profiling. *Critical Reviews in Biotechnology.* 28:239–251.

Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, Bautista-Piña V, Arellano-Llamas R, Hidalgo-Miranda A. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One.* 7(3):e31904 (2012).

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270: 467–470.

Si M, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y. 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26(19):2799-803.

Tavazoie S, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos P, Gerald W, Massagué J. 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451(7175):147-52.

Wang, Z., Yang, Y., Leng, K., Li, J., Zheng, F., Shen, G., Yu, R. 2008. *Anal. Lett.* 41 (1): 24–35.

Zhu S, Si M, Wu H, Mo Y. 2007. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 282(19):14328-36.

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109M488
Proje Başlığı: Nükleik Asit Tabanlı Sandviç Formatında mikroRNA Dizi Platformunun Geliştirilmesi ve Meme Kanseri Çalışmalarında Kullanım Potansiyelinin Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Hüseyin Avni Öktem Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif Erson Bensan Dr. Can Özen
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Destek sağlayan bir kuruluş yoktur.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/03/2010 – 01/09/2012
Öz (en çok 70 kelime) İfadeleri bozulan miRNA'lar kanser başta olmak üzere pek çok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple günümüzde miRNA'ların tespitine yönelik birçok teknik geliştirilmektedir. Projemiz kapsamında mevcut sistemlere alternatif oluşturabilecek sandviç hibridizasyona dayalı bir miRNA dizi platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda yedi miRNA için geliştirilmiş ve normal ve kanser hücre hatları ile test edilmiş olan platform RNA'nın direkt olarak kullanılmasına olanak sağlayarak, mevcut dizi sistemlerinde gerekli olan cDNA sentezi ve/veya işaretlenmesi olmadan çalışabilmektedir.
Anahtar Kelimeler: miRNA, dizi platform, meme kanseri, sandviç hibridizasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: ÖKTEM HA, BERKMAN CC., ATILGAN S., ERSON BENSAN AE. A Sandwich Hybridization Base miRNA Detection Chip. 15 th European Congress on Biotechnology, İstanbul 2012. <i>New Biotechnology</i> 29S : 33(2012).
Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.