

Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş miRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi

Ellagic acid induced expression of miRNAs in breast cancer stem cells and effect of ellagic acid on apoptosis

Hasan Onur Çağlar¹ Sunde Yılmaz Süslüer² Şebnem Kavaklı³ Cumhuriyet²
Biray Ertürk⁴ Ferda Özkınay⁴ Ayfer Haydaroglu⁵

¹Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Östrojen bağımlı meme kanseri tümör oluşumunda etkili miRNA'lar elajik asit (EA) uygulaması ile baskılanmaktadır. Ancak, EA uygulamasından sonra meme kanseri kök hücrelerindeki (MKKH) miRNA'ların ifade profillerinin düzenlenmesi hala belirsizdir. Bu çalışmada, MKKH'lerde EA-indüklenmiş apoptozun gösterilmesi ve EA uygulamasından sonra değişen miRNA ifade profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: EA'nın MKKH'lerdeki sitotoksik etkisi WST-1 testi ile incelendi. EA uygulamasından sonra apoptoz ve hücre döngüsü analizleri flow sitometri ile yapıldı. EA uygulamasından sonra, MKKH'lerin miRNA ifade profilleri *RT-PCR miRNA array* ile tanımlandı.

Bulgular: MKKH'ler üzerinde EA'nın sitotoksik etkisi saptandı. 48. ve 72. saatlerde EA'nın IC50 konsantrasyonu 24.8 µM'di. EA, MKKH'lerde apoptozu indüklemedi. Bununla beraber, EA'nın 24., 48. ve 72. saat uygulamalarında S fazı bloğu gözlemlendi. Toplamda 84 miRNA geninin 76'sının ifade profili belirlendi. hsa-miR-125b-1-3p'nin ifadesi EA uygulanmasıyla 3.59 kat arttı. Let-7 ve miR-200 aileleri dahil diğer tüm miRNA'ların ifade profili EA uygulaması nedeniyle azalış gösterdi.

Sonuç: Bu çalışmada, EA'nın MKKH'de apoptozu etkilemediği ve hsa-miR-125b-1-3p'in ifadesini artırırken, başta hsa-miR-485-5p ve hsa-miR-328-3p olmak üzere diğer miRNA'ların ifadesinde düşmeye neden olduğu görüldü. Anormal miRNA ifade profili nedeniyle MKKH'lerin EA uygulamasına direnç gösterebileceği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Elajik asit, meme kanseri kök hücreleri, miRNA, apoptoz.

Abstract

Aim: miRNAs which are associated with estrogen dependent tumorigenesis of breast cancer are suppressed by ellagic acid (EA) treatment. However, modulation of expression profiles of miRNAs in breast cancer stem cells (BCSCs) after EA treatment is still unclear. In this study, it was aimed to show EA-induced apoptosis in BCSCs and to determine altered expression profiles of miRNAs after EA treatment.

Materials and Methods: Cytotoxic effects of EA on BCSCs were examined by WST-1 reagent test. Apoptosis and cell cycle analysis after EA treatment were detected by flow cytometry analysis. After EA treatment, miRNA expression profiles of BCSCs were determined by RT-PCR miRNA array.

Results: Cytotoxic effect of EA on BCSCs was found. IC50 concentration of EA at 48th and 72nd hours was 24.8 µM. EA did not induce apoptosis in BCSCs. In addition, S phase arrest was observed at 24th, 48th, 72nd hours of EA treatment. Expression profiles of 76 of totally 84 miRNA genes were detected. Expression of hsa-miR-125b-1-3p was increased as 3.59 folds by EA treatment. Expression profiles of all the others miRNAs, including members of Let-7 and miR-200 families, showed a decrease due to EA treatment.

Yazışma Adresi: Hasan Onur Çağlar

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 08.09.2016 Kabul Tarihi: 14.12.2016

Conclusion: In this study, it was observed that EA leads to upregulated expression of hsa-miR-125b-1-3p in contrast to downregulated expression of all other miRNAs, especially hsa-miR-485-5p and hsa-miR-328-3p, and does not induce apoptosis in BCSCs. It was suggested that BCSCs may show resistance to EA treatment due to aberrant expression profiles of miRNAs.

Keywords: Ellagic acid, breast cancer stem cells, miRNAs, apoptosis.

Giriş

Meme kanseri kadınlar arasında en sık gözlenen kanserlerden biridir. Solunum yolu ve akciğer kanserlerinden sonra, meme kanseri kadınlar arasında kanser ilişkili ölümlerin başında yer almaktadır (1). Meme kanseri tümörleri uygulanan tedaviye karşı direnç gösterebilmektedir (2-4). Direnç oluşumu ile birlikte, meme kanseri hastalarında tümör yalnızca primer bölge ile sınırlı kalmamakta ve farklı bölgelere metastaz yapabilmektedir (5). Meme kanserinin insidans ve mortalite oranlarının yüksek olması ayrıca tedavi etkinliğindeki sınırlılıklar nedeniyle yeni kimyasal ajanlarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel doğal fenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki bölünmeyi durdurucu etkisi, bu tür bileşiklerin uygulanan mevcut kanser tedavisine ek olarak kullanılabilme potansiyeline dikkat çekmektedir.

Elajik asit (*ellagic acid*, EA) *Myrciaria cauliflora*, *Juglans regia*, *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Punica granatum* gibi bitkilerin yaprak, meyve ve tohumlarından elde edilebilen fenolik bir bileşiktir (6-10). Bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan elajitaninler'in (*ellagitannins*) hidrolizi sonucu oluşan EA, anti-inflamatuar ve anti-oksidan özelliklere sahiptir (11-13). Birçok çalışma, EA içeren bitki ekstraktlarının birçok farklı kanser hücresi için proliferasyonu baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (6,10). EA'nın MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanması apoptozu indüklediği gibi hücre döngüsünü de bloke etmektedir (14). Meme kanseri hücrelerinde, EA TGF- β /Smads ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları ile ilişkili genlerin ifadesini yeniden düzenleyerek hücre bölünmesine etki etmektedir (14-16). Hücre bölünmesini baskılayıcı özelliğine ek olarak, EA vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün aktivesini inhibe ederek meme kanseri tümör hücrelerinin göçünü ve yeni damar oluşumunu engellemektedir (17). Bir kimyasal bileşiğin etkisi tümör dokusu içerisindeki farklı popülasyonlara göre değişebilmektedir. EA'nın etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak meme kanseri hücrelerinde gösterilmiş olmasına rağmen meme kanseri kök hücrelerindeki etkinliği hala belirsizdir.

Kanser kök hücreleri, tümör dokusu içerisinde oldukça az bir oranda bulunan ve kök hücre benzeri davranış sergileyen hücrelerdir (18). Kanser hücrelerine kıyasla, kanser kök hücrelerinin immün sistemi baskılanmış farelerdeki tümör oluşturma kapasitesi daha yüksektir. Hücre döngüsü, DNA onarımı, ilaç metabolizması gibi

çeşitli hücrel mekanizmalarla ilişkili genlerin ifadesi kanser kök hücreleri ve kanser hücreleri arasında farklılıklar göstermektedir (18,19). Hücre sinyal yolları ile ilişkili gen ifadelerinin kanser kök hücrelerinde yeniden düzenlenmesi, tedavi ajanlarına karşı daha fazla direnç gözlenmesine neden olmaktadır (18,19). Bu nedenle, konvansiyonel kanser tedavisine ek olarak kullanılacak ajanların kanser kök hücreleri üzerindeki etkinliğinin araştırılması gereklidir.

Hücre sinyal yolları ile ilişkili genlerin ifadesi çeşitli mekanizmalar yoluyla yeniden düzenlenmektedir. miRNA'lar 11~22 nükleotid uzunluğundaki protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA'lar hedefindeki mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanarak protein ürününe dönüşmesini engellemektedir. Protein kodlayan genlerin ifade kontrolünde rol oynayan miRNA genleri, normal meme dokusu ve meme kanseri hücreleri arasında ifade farklılıkları sergilemektedir (19). Bununla birlikte, bu farklılık meme kanser hücreleri ve kanseri kök hücreleri arasında da gözlenmektedir (20). Meme kanseri kök hücrelerinde, hücre apoptozunu indükleyici ve hücre bölünmesini inhibe eden miRNA ifadelerinin azaldığı bilinmektedir (21). Fare meme karsinogenez modelinde, EA'nın östrojen ilişkili tümör oluşumunda etkili olan anormal miRNA ifadelerini tersine çevirdiği gösterilmiştir (22). EA'nın meme kanseri kök hücrelerindeki miRNA ifadesini nasıl düzenlediği henüz bilinmemektedir. Meme kanseri kök hücrelerinde sinyal yollarının farklı düzeydeki aktivasyonu, EA'nın bu hücrelerdeki miRNA ifadesi üzerinde daha farklı bir etki oluşturmaya neden olabilir. Bu çalışma, EA uygulamasına bağlı olarak meme kanseri kök hücrelerindeki miRNA ifade değişimlerini ortaya çıkartmayı amaçlamıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü

İnsan kökenli meme kanseri kök hücreleri 75 cm²lik flask içerisinde direkt kültüre hazır bir şekilde *CelProgen* firmasından (San Pedro, CA, USA) temin edildi. Temin edilen meme kanseri kök hücreleri CD113, CD44, SSEA3/4, Oct-4, alkalın fosfataz ve aldehid dehidrogenaz gibi kök hücre belirteçleri bakımından pozitif özellik göstermektedir (*CelProgen*, Kat No: 36102-29-T75, San Pedro, CA, USA). Meme kanseri kök hücrelerinin kültürü için serum ve diğer büyüme faktörlerini içeren *Human Breast Cancer Stem Cell Complete Growth Media* ortamı (*CelProgen*, San Pedro, CA, USA) kullanıldı. Meme kanseri kök hücreleri %5

CO₂ içeren nemli atmosferde 37°C sıcaklıkta inkübe edildi.

WST-1 testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

EA'nın, meme kanseri kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için WST-1 testi (Boster Biological Technology, CA, USA) kullanıldı. Çalışma öncesinde 96'lık kuyucuklu plakalara hücreler her bir kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde aktarıldı. EA'nın, meme kanseri kök hücreleri üzerindeki sitotoksitesi doz ve zaman bağımlı olarak ölçüldü. EA (50 mg, Fluka, Sigma, USA) 165 µL DMSO içerisinde çözülerek 1M ana stok hazırlandı. EA'nın farklı konsantrasyonları (100 µM-1,6 µM) 24, 48 ve 72 saat boyunca meme kanseri kök hücrelerine uygulandı. İnkübasyon süresi dolduğunda, hücrelere WST-1 karışımından 10 µL eklendi. Bir saat boyunca kuyucuklu plakalar inkübatörde inkübe edildi. WST-1 ajanı ile inkübasyondan sonra, örneklerin 450 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ELISA okuyucu (Thermoscientific, Multiskan FC, Finland) ile alındı. Referans dalga boyu 620 nm olarak belirlendi. EA'nın uygulanmadığı hücrelerden elde edilen absorpsiyon değerleri kontrol olarak veri normalizasyonunda kullanıldı.

Flow sitometri ile apoptozun belirlenmesi

Flow sitometri ile apoptozun belirlenmesi için meme kanseri kök hücreleri 6'lı kuyucuklu plakalara her bir kuyusunda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. EA için saptanan IC₅₀ konsantrasyonu apoptoz çalışmasında hücrelere uygulandı. EA uygulanmayan hücreler ise kontrol grubu olarak kullanıldı. EA uygulanan ve uygulanmayan hücreler tripsin ile kaldırılarak steril falkon tüplerine alındı. Tripsin inaktivasyonu için tüplere serum içeren ortam eklendi. Hücreler 1000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Hücreler 1X PBS ile iki kez yıkandıktan sonra örnekler 1X bağlanma tamponu eklendi. Bağlanma tamponu çekilmeden, örnekler 5 µL Annexin-V/PE eklendi (BD bioscience, pharmingen, USA). Örnekler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Örnekler 1 saat içerisinde flow sitometride (BD Accuri C6 flow cytometry, Becton–Dickinson, USA) okundu. Analiz için *Cell Quest Software* (Becton-Dickinson, USA) yazılımı kullanıldı.

Hücre döngüsünün belirlenmesi

Meme kanseri kök hücreleri 6'lı kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücre döngüsünün belirlenmesinde, EA'nın belirlenen IC₅₀ konsantrasyonu hücrelere uygulandı. EA uygulanmayan hücreler kontrol olarak kullanıldı. Hücreler tripsin ile kaldırılarak steril falkon tüpüne alındı ve tripsin inaktivasyonu için serum içeren ortam eklendi. Hücre barındıran falkon tüpleri 300 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Geride kalan hücre pelleti üzerine 1 mL yıkama tamponu eklenerek örnekler yıkandı. Santrifüj ve yıkama basamakları tekrarlandı. Yıkama işlemi

tamamlandıktan sonra, hücrelere 125 µL A solüsyonu eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildi. A solüsyonu örneklerden çekilmeden, 100 µL B solüsyonu eklendi ve inkübasyon basamağı tekrarlandı. 100 µL soğuk (2-8 °C arasında) C solüsyonu örnekler eklenerek buzdolabında (+4 °C) inkübe edildi. Örnekler flow sitometride 3 saat içerisinde okutuldu.

miRNA ifadesinin belirlenmesi

EA'nın saptanan IC₅₀ konsantrasyonu 72 saat uygulanan ve herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmayan meme kanseri kök hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu için *Qiagen miRNeasy* mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Deney basamakları üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. EA uygulanan ve uygulanmayan hücrelerden izole edilen total RNA miktarı *Thermo Nanodrop 1000* spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ile ölçüldü. İzole edilen total RNA'ların yalnızca olgun miRNA'ları cDNA'ya sentezlendi. Total RNA örneklerindeki olgun miRNA'ların cDNA'ya çevrimi için *miScript II reverse transcriptase RT kit* (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. cDNA sentez basamağında reaksiyon içeriği ve deney basamakları üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. cDNA sentezini gerçekleştirmek için örnekler 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ters transkriptaz (*revers transcriptase*) enziminin inaktivasyonu için sıcaklık 95°C'ye yükseltildi ve örnekler 5 dakika boyunca inkübe edildi.

Olgun miRNA'lardan cDNA kalıpları elde edildikten sonra RT-PCR array aşamasına geçildi. EA uygulamasına bağlı olarak gözlenecek miRNA ifade profili değişimi *miScript miRNA PCR Array Human Breast Cancer* (kat no: MIHS-109Z, Qiagen, Germany) ile tanımlandı. RT-PCR array kuyucuklu plakaları meme kanseri ile ilişkili fonksiyonu bilinen 84 miRNA'ya göre tasarlandı. Her bir kuyucuk farklı bir miRNA'ya ait PCR primerini içermektedir. PCR reaksiyon karışımı 1.375 mL 2X Quanti Tect SYBR Green PCR, 0.275 mL 10X miScript Universal solüsyonu, 1 mL RNase içermeyen su ve 40 µL cDNA ile hazırlandı. PCR karışımı hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Ardından RT-PCR reaksiyonu başlatıldı. RT-PCR reaksiyonunun ısı koşulları Tablo-1'de yer almaktadır. Veri analizinde 2^{-ΔΔCt} formülü kullanıldı. *SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96A* ve *RNU6-2* miRNA genleri normalizasyon için kontrol genleri olarak seçildi. İfade profili saptanan miRNA'ların sinyal yolları içerisindeki ortak etkisi *DIANA miRPath v2.0* veri tabanı ile incelendi (23). Kullanılan veri tabanı, *Tarbase* veri tabanı üzerinden olası miRNA-mRNA ilişkisini göstermekle birlikte miRNA hedefindeki sinyal yollarını da KEGG veri tabanı üzerinden sergilemektedir (23). Çoklu miRNA sayısının ortak hedef aldığı sinyal yolağına ilişkin p değeri, veri tabanı tarafından Fisher'in kombine olasılık yöntemi (*Fisher's*

combined probability method) ile bulundu (23). p değeri 0.05'den küçük olan sinyal yolağı-miRNA sayısal etkileşimi anlamlı olarak kabul edildi.

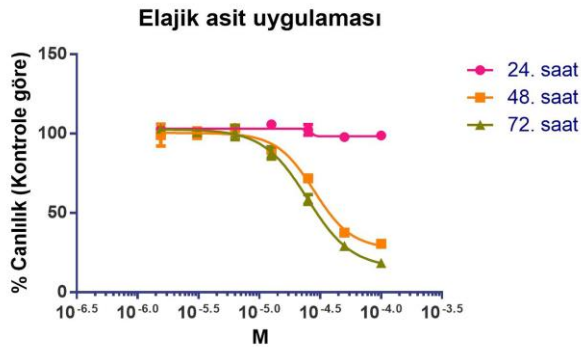
Tablo-1. RT-PCR İçin Uygulanan Isı Koşulları

Basamak	Süre	Sıcaklık
Ön inkübasyon	15 dakika	95°C
Döngü (45X)		
Denatürasyon	15 saniye	94°C
Bağlanma	30 saniye	55°C
Sentez	30 saniye	70°C

Bulgular

Elajik asidin sitotoksik etkisi

EA'nın 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM ve 1.6 µM'lık konsantrasyon aralıklarındaki sitotoksik etkisi (24, 48 ve 72 saatlik) meme kanseri kök hücre hattında araştırılmıştır. İlk 24 saatlik uygulamada, EA'nın meme kanseri kök hücreleri üzerinde her hangi bir sitotoksik etkisi bulunmadı. Bununla birlikte, 48. ve 72. saatlerde meme kanseri kök hücreleri üzerinde sitotoksik etki gözlemlendi. EA'nın 48. ve 72. saatlerde saptanan IC₅₀ konsantrasyonu 24.8 µM'dır (Şekil-1).



Şekil-1. Elajik asidin meme kanseri kök hücrelerinde 24., 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkisi. Elajik asidin 48. ve 72. saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyonu 24.8 µM'dır.

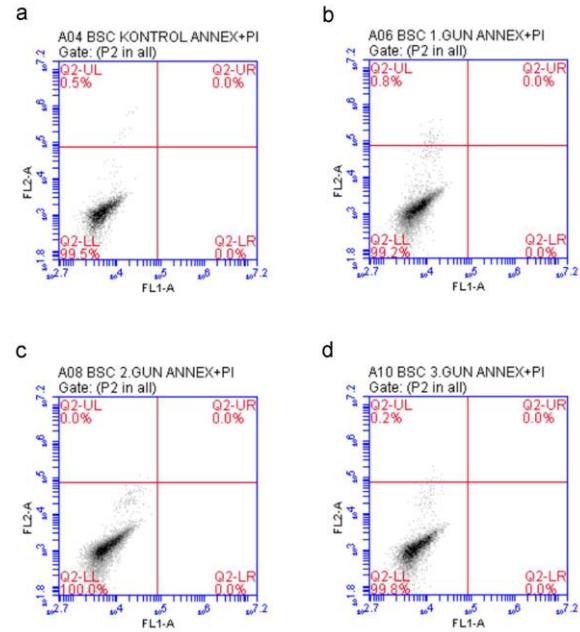
Elajik asit apoptozu indüklemeyiz

Meme kanseri kök hücrelerine 25 µM EA uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdeleri flow sitometri ile ölçüldü. EA uygulanmayan kontrol grubunda canlı hücre yüzdesi %99.5 iken apoptotik hücre yüzdesi %0.5 olarak saptandı. 25 µM EA uygulanan meme kanseri kök hücrelerinde 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda canlı hücre yüzdeleri sırasıyla %99.2, %100 ve %99.8 olarak saptandı. EA meme kanseri kök hücrelerinde apoptozu indüklememektedir (Şekil-2).

Elajik asit S fazı bloğu etkenidir

Hücre döngüsünün belirlenmesinde 25 µM EA 24, 48 ve 72 saatlik zaman periyodlarıyla meme kanseri kök hücrelerine uygulanmıştır. EA uygulanmayan hücreler

kontrol grubu olarak belirlendi. EA uygulanan hücrelerin G1 evresi yüzde oranı azalırken S evresi yüzde oranı arttı. Kontrol grubunda hücrelerin S evresi yüzdesi %14.5 iken, EA uygulanan hücrelerde 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda S evresi yüzdeleri sırasıyla %26.8, %28.5 ve %35.3 olarak saptandı. EA'nın meme kanseri kök hücrelerinde S evresi bloğuna neden olduğu bulundu (Şekil-3).



Şekil-2. Elajik asit uygulamasının 1. gün (b), 2. gün (c) ve 3. gün (d)deki apoptotik etkisi. Elajik asit uygulanmayan meme kanseri kök hücreleri (a) kontrol grubu olarak kullanıldı. Elajik asidin apoptozu indükleyici etkisi gözlemlenmedi.

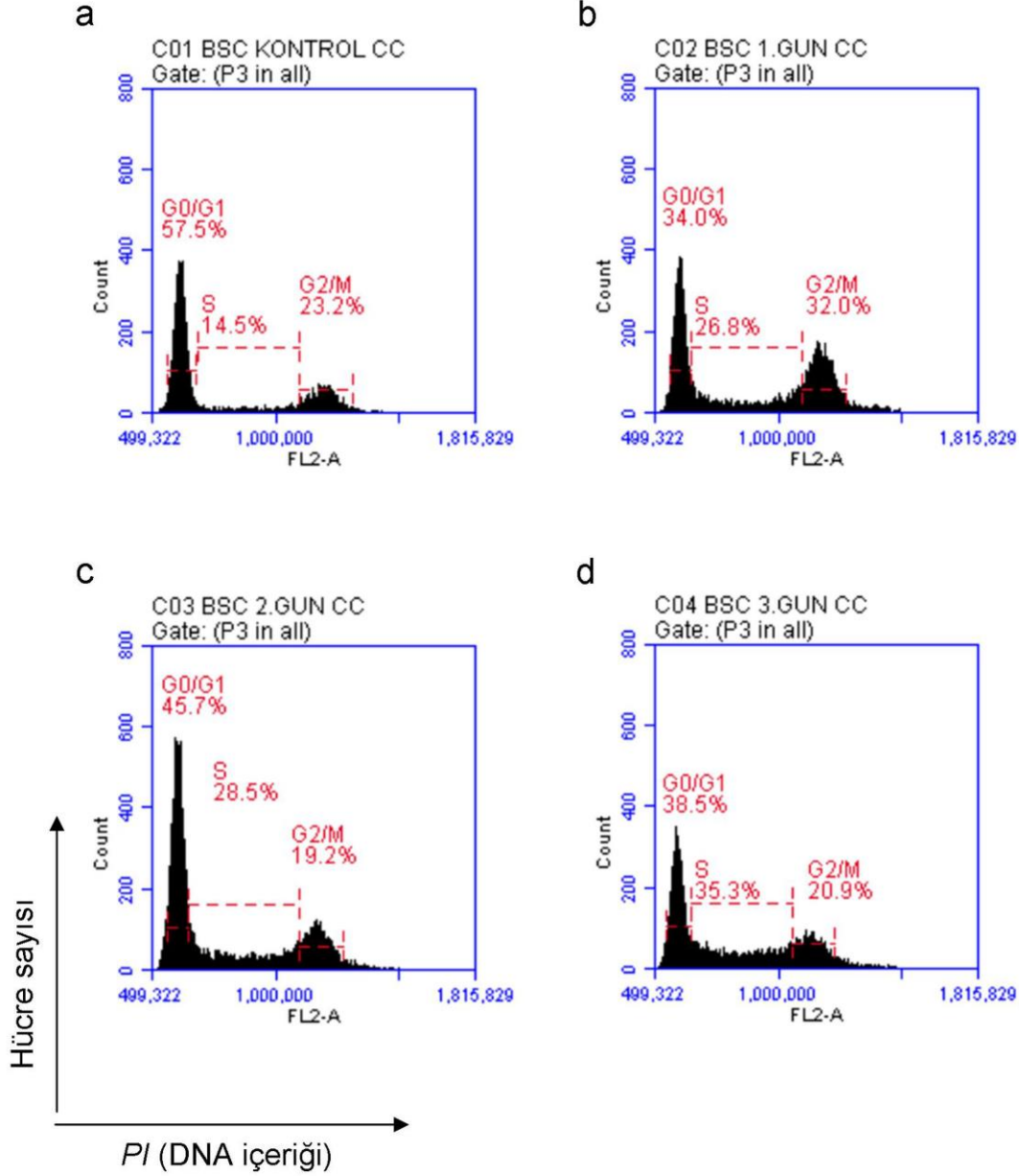
Elajik asit uygulaması sonrası değişmiş miRNA ifade profili

Yirmi beş µM EA uygulanan meme kanseri kök hücrelerinde 72 saat sonrasında elde edilen miRNA ifade profili saptanmıştır. EA uygulanmayan hücreler ise kontrol olarak kullanılmıştır. hsa-miR-1, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-607 ve hsa-miR-96-5p miRNA genlerinin ifadesi saptanamadı. Bu nedenle 84 miRNA geninin 76'sının ifade profili saptandı. Bu miRNA genlerinden yalnızca hsa-miR-125b-1-3p'nin ifadesinde artış gözlemlendi.

EA uygulamasına bağlı olarak hsa-miR-125b-1-3p'nin ifadesi 3,59 katlık artış gösterdi. Diğer miRNA genlerinin tamamında ifade azalışı saptandı. hsa-miR-485-5p ve hsa-miR-328-3p miRNA genlerinin en fazla azalan ifadeye sahip olduğu saptandı. miRNA genlerinin listesi ve EA uygulaması sonrası oluşan ifade profilleri Şekil-4'de verilmiştir. İfade azalışı gösteren miRNA'ların (10 kat ve üstü ifade azalışı) hedefindeki sinyal yollarının belirlenmesinde DIANA miRPath v2.0 veri tabanı kullanıldı. Veri analizi için endotelial büyüme faktörü

(hsa04012), kanser ilişkili (hsa05200), hücre döngüsü (hsa04115), p53 (hsa04115), insülin reseptör (hsa04910) ve TGF-beta sinyal (hsa04350) yolları seçildi. Veri tabanında incelenen miRNA genlerinin 36'sından 17'sinde kanser ilişkili sinyal yolağındaki

genleri hedeflendiği saptandı ($p=0.0000534$). Biyoinformatik analize ilişkin veriler Şekil-5 ve Şekil-6'da sunulmuştur.



Şekil-3. Elajik asidin meme kanseri kök hücrelerinde hücre döngüsü üzerine yaptığı etki. Elajik asit uygulanmayan hücreler (a) kontrol olarak kullanıldı. Elajik asidin 24 saat (b), 48 saat (c) ve 72 saat (d) uygulandığı çalışmada S fazı hücre yüzdeleri artmıştır.

a

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-495-3p
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-497-5p
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-613
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-202-3p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-7-5p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-203a	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-328-3p	hsa-miR-98-5p
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-340-5p	
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-199b-3p	hsa-miR-206	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-424-5p	
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-485-5p	
hsa-miR-107	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-489-3p	

b

-1,44	-22,08	-7,92	-9,95	-5,79	-21,78	-7,18	-10,16
-3,77	-13,04	-8,66	-4,48	-1,92	-21,18	-2,58	-9,68
-23,50	-12,77	-2,59	-9,41	-20,89	-25,36	-6,94	-29,75
-11,51	3,59	-18,70	-9,48	-1,91	-1,28	-7,59	-13,59
-1,34	-4,91	-8,78	-5,44	-14,67	-17,20	-20,60	-18,06
-1,85	-11,35	-16,28	-8,25	-12,77	-15,61	-71,74	-6,52
-17,57	-27,00	-24,00	-2,32	-12,77	-25,90	-9,35	
-2,42	-4,87	-31,23	-21,93	-8,84	-16,28	-37,65	
-10,44	-28,14	-12,25	-1,28	-4,24	-5,56	-91,43	
-27,00	-3,08	-6,04	-8,37	-3,15	-3,42	-6,25	

Azalış Artış

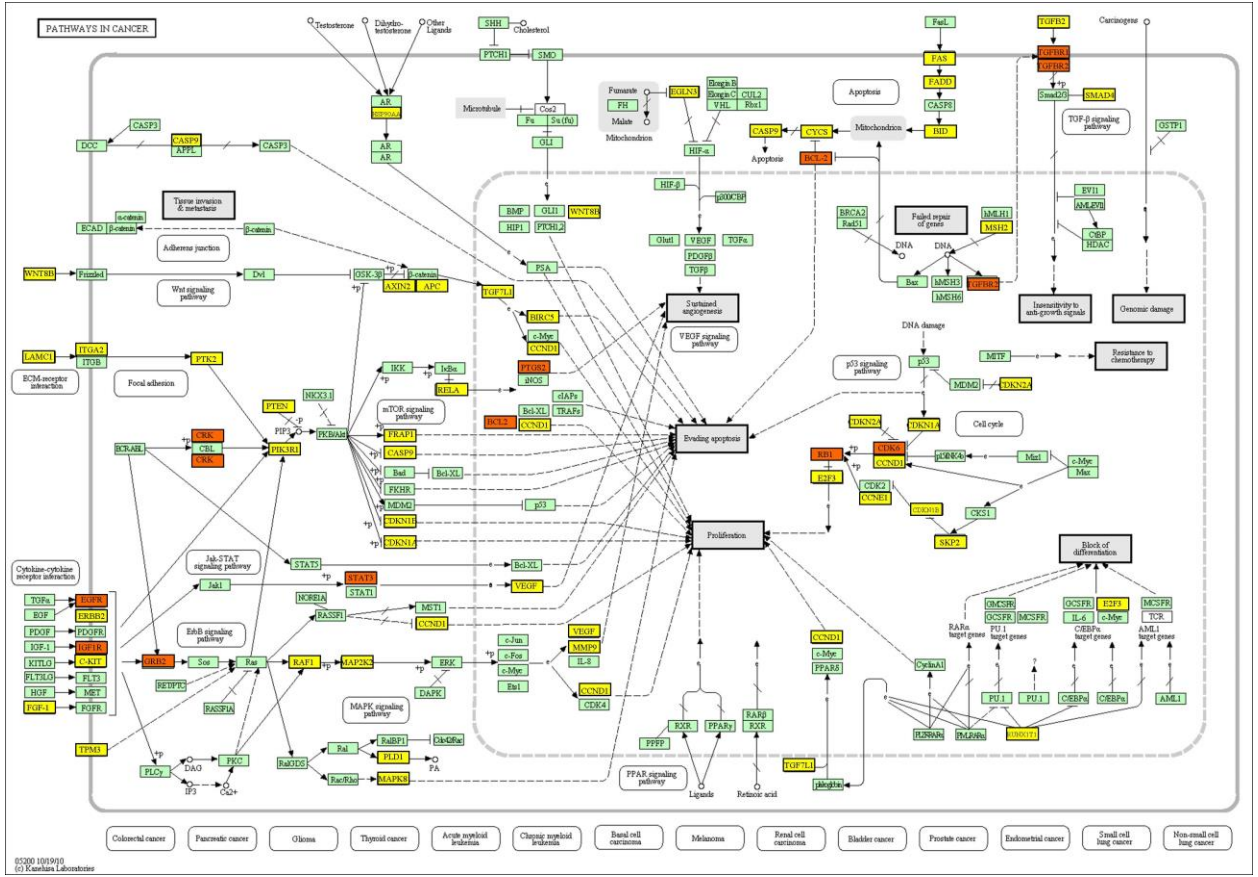
Şekil-4. miRNA ifadelerinin elajik asit 72 saat uygulamasından sonra meme kanseri kök hücrelerindeki ifade profilleri. Kırmızı renk ifade azalışını, yeşil renk ise ifade artışını temsil etmektedir.

Sinyal yollarında hedeflenen gen sayısı

miRNA	I	II	III	IV	V	VI
hsa-let-7d-5p	2	2	1			2
hsa-miR-107	1	1	1			
hsa-miR-10a-5p	2	3	1		3	1
hsa-miR-125b-5p	1	2	1			
hsa-miR-132-3p	2	5	3	2	1	1
hsa-miR-15a-5p		1				
hsa-miR-15b-5p		1				
hsa-miR-16-5p	7	22	13	7	12	8
hsa-miR-17-5p	1	2	2	1		
hsa-miR-200c-3p	1	1			1	
hsa-miR-205-5p	2	1	2			1
hsa-miR-21-5p	3	18	6	10	7	6
hsa-miR-212-3p		1	3	1		
hsa-miR-22-3p		2	2	1	1	1
hsa-miR-222-3p	1	2	2			
hsa-miR-7-5p	8	12	1	1	8	2
hsa-miR-93-5p	1	8	4	2	4	3

Sinyal yolağı (KEGG pathway database)	P değeri	miRNA
I. ErbB (EGF) sinyal yolağı (hsa04012)	0,0000119	11
II. Kanser ilişkili sinyal yolağı (hsa05200)	0,0000534	17
III. Hücre döngüsü (hsa04110)	0,0003888142	14
IV. p53 sinyal yolağı (hsa04115)	0,00369382	10
V. İnsülin reseptör ilişkili sinyal yolağı (hsa04910)	0,005266395	8
VI. TGF-beta sinyal yolağı (hsa04350)	0,01245914	9

Şekil-5. On kat ve üstü ifade azalışı sergileyen miRNA'ların hedeflediği sinyal yolağı. Şekilde mor kutucuk içerisindeki rakamlar her bir miRNA'nın belirtilen sinyal yolağı içerisindeki protein sentezleyen hedef gen sayısını vermektedir. Bazı miRNA'lar sentez yolağı içerisinde birden fazla mRNA'yı hedefleyebilmektedir. Şekildeki p değeri listedeki sinyal yolağı ve sinyal yolağını hedefleyen miRNA sayısı ilişkisini belirtmektedir.



Şekil-6. Elajik asit uygulamasına bağlı olarak ifadesi azalan miRNA'ların kanser ilişkili sinyal yolağı (hsa05200) içerisindeki gen hedefleri. Yeşil renk genlerin miRNA hedefi olmadığını göstermektedir. Sarı renk, sinyal yolağındaki genin analiz edilen miRNA'lardan sadece birinin hedefi olduğunu göstermektedir. Turuncu renk, sinyal yolağındaki genin analiz edilen miRNA'lardan birden fazlasının hedefi olduğunu göstermektedir.

Tartışma

Çeşitli çalışmalarda, bitkisel kökenli doğal bir fenolik molekül olan EA'nın hücreler üzerinde anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu vurgulanmaktadır (11,13,24). EA ve diğer fito-kimyasalları içeren bitki ekstraktları meme kanseri hücrelerinde bölünmeyi durdurmakta ve apoptozu indüklemektedir (10,14). Ekstrakt içeriklerinin HPLC metodu ile incelenmesi, EA'nın diğer moleküllere göre daha fazla bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (6,25). EA'nın tek başına meme kanseri hücrelerine uygulandığı çalışmalarda da hücre döngüsünün baskılandığı ve apoptozun meydana geldiği bildirilmiştir (14). Meme kanseri hücrelerinin aşırı bölünmesinden sorumlu aromataz ve telomeraz enzimlerinin aktiviteleri de EA tarafından düşürülmektedir (26,27). Buna ilaveten, EA meme kanseri hücrelerine uygulandığı çalışmalarda da hücre döngüsünün baskılandığı ve apoptozun meydana geldiği bildirilmiştir (14). Meme kanseri hücrelerinin aşırı bölünmesinden sorumlu aromataz ve telomeraz enzimlerinin aktiviteleri de EA tarafından düşürülmektedir (26,27). Buna ilaveten, EA meme kanseri hücreleri üzerinde kemopreventif ajan etkisi göstermesine rağmen, ilaç direnci mekanizmasına sahip meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkisi farklı veya sınırlı olabilir.

Bu çalışmada, EA'nın meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. EA'nın 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandığı sitotoksik deneyinde, 24. saatte herhangi bir sitotoksik etki saptanmadı. Meme kanseri kök hücrelerinde uygulama zamanının artmasına bağlı olarak EA'nın sitotoksik etki gösterdiği bulundu. 48. ve 72. saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyonu 24,8 µM olarak saptandı. Chen ve ark. (14), EA'nın ilk 24 saat içerisinde MCF-7 meme kanseri hücreleri için sitotoksik (IC₅₀ = 66.18 µM; 20 µg/mL) etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Dai ve ark. (28), wnt-1 genini içeren fare meme tümör virüsü (*mouse mammary tumor virus*) yardımıyla fare meme kanseri kök hücresi elde etmişlerdir. Fare meme kanseri kök hücrelerinde ise, EA 24. saatte sitotoksik etki oluşturmamasına karşın 48. ve 72. saatlerde sitotoksik etki oluşturmuştur (28). Bu bakımdan, EA meme kanseri hücreleri ve meme kanseri kök hücreleri arasında farklı sitotoksik etkiye sahip olabilir. Chen ve ark. (14), çalışmasına benzer bir şekilde, Dai ve ark. (28) da EA'nın fare meme kanseri kök hücrelerinde apoptozu ve G0/G1 hücre bloğunu artırmasının sitotoksik etkiye neden olduğunu savunmaktadır.

Bu çalışmada, saptanan IC₅₀ konsantrasyonundaki EA meme kanseri kök hücrelerine 24, 48 ve 72 saat uygulandıktan sonra apoptoz ve hücre döngüsü analizi yapıldı. Sitotoksik konsantrasyon uygulanmasına rağmen, meme kanseri kök hücrelerinin apoptotik hücre yüzdesinde artış meydana gelmedi. Bununla birlikte, EA'nın hücre döngüsünü S fazında durdurduğu saptandı. Dai ve ark. (28) aksine, EA'nın apoptozu indüklediği ve sadece hücre döngüsünde etkili olduğu saptandı. Dai ve ark. (28), sitotoksite dışındaki diğer çalışmalarını, nar bitkisinden elde edilen bitki ekstraktını fare meme kanseri kök hücrelerine uygulayarak gerçekleştirmiştir. EA'nın bitki ekstraktı içerisindeki farklı fito-kimyasallar ile sinerjistik etki gösterdiği bilinmektedir (29,30). Dolayısıyla, EA'nın tek başına meme kanseri kök hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olmayabilir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, EA'nın meme kanseri kök hücrelerinde sitotoksik etkisinin değil sitostatik etkisi olabileceğini göstermektedir.

Hüresel farklılaşma, hücre invazyonu ve göçü, ilaç direnci, apoptozis ve kök hücre özelliklerinin korunması gibi birçok farklı mekanizmada miRNA'lar hedefindeki genlerin ifadesini düzenleyerek rol oynamaktadır (31-35). miRNA'ların ifadesi meme kanseri hücreleri ve meme kanseri kök hücreleri arasında farklılıklar sergilemektedir (20). Bu nedenle, meme kanseri kök hücrelerindeki miRNA'ların anormal ifadeleri EA'nın etkinlik farklılığının bir nedeni olabilir. EA'nın 72 saat uygulanmasına bağlı olarak meme kanseri ilişkili miRNA'ların ifade profilleri saptandı. EA uygulamasına bağlı olarak sadece hsa-miR-125b-1-3p'nin ifadesi artış gösterdi. Diğer miRNA genlerinin tamamında ise ifade azalışı saptandı. İfadesi 10 kat ve üstü azalış sergileyen 36 miRNA'nın hedefledikleri sinyal yolları DIANA miRPath v2.0 veri tabanı ile incelendi. Bioinformatik inceleme sonucunda, 36 miRNA'dan 11'inin ErbB sinyal yolağı (p=0.0000119), 17'sinin kanser ilişkili sinyal yolağı (p=0.0000534), 14'ünün hücre döngüsü (p=0.00038), 10'nunun p53 sinyal yolağı (p=0.0036), 8'inin insülin reseptör sinyal yolağı (p=0.0052) ve 9'unun TGF-β sinyal yolağındaki (p=0.012) ilişkili genleri hedeflediği saptandı.

Let-7 ailesi miRNA'ların kötü prognoz gösteren meme kanseri hastalarında daha düşük ifade edildiği bulunmuştur (36). Kanser kök hücreleri, tümör içerisindeki diğer hücre popülasyonlarına göre Let-7 ailesi miRNA'ları daha düşük düzeyde ifade etmektedir (20). Bununla birlikte, Let-7 ailesi miRNA'ların düşmesi normal meme kanseri hücrelerini kanser kök hücrelerine transforme etmektedir (37,38). Let-7 ailesine ait miRNA'lar *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* ve *Tcf3* gibi genlerin mRNA ifadelerini düzenleyerek kök hücrelerin farklılaşmasını düzenlemektedir (39). Yapılan bu çalışmada, let-7 ailesine ait tüm olgun miRNA'ların (let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p gibi) ifadesi EA'ya bağlı olarak düşmüştür. EA, Let-7 ailesi miRNA'ların ifadesini düşürerek meme kanseri kök

hücre özelliklerinin korunmasına neden olabilir. Let-7 miRNA'ları siklin D1 ifadesini baskılayarak Akt1'in fosforilasyonunu azaltmaktadır (40). Bu nedenle, Let-7 radyasyon ile indüklenmiş tümör baskılanmasını arttırmaktadır (40). EA'nın Let-7 ailesine ait olgun miRNA'ların ifadelerini düşürmesi ayrıca radyoterapiye karşı direncin oluşmasında da etkili olabilir.

TGF-β sinyal yolağı, ErbB sinyal yolağı gibi diğer sinyal yollarıyla ilişkili bir biçimde epitelyal-mezenkimal geçiş, apoptoz, hücre göçü ve metastazda rol oynamaktadır (41). miRNA-200 ailesi (miR-200a/b/c) miRNA'ların TGF-β sinyal yolağını düzenleyerek hücre transformasyonu, hücre proliferasyonu, hücre göçü, tümör büyümesi ve metastaz üzerinde güçlü baskılayıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (42). miRNA-200 ailesi üyelerinin meme kanserinde epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının baskılayıcıları olduğu bilinmektedir. miRNA ailesi üyelerinin ifadesi, kök hücre fonksiyonunun devamlılığının korunabilmesi için meme kanseri kök hücrelerinde düşüktür (21,43-45). Bu çalışmada, EA uygulaması meme kanseri kök hücrelerinde miRNA-200 aile üyesi olan miR-200b-3p ve miR-200c-3p'nin ifadelerini düşürmüştür. EA'nın meme kanseri kök hücrelerindeki genel etkisi kanser kök hücre özelliklerinin korunmasını sağlamak olabilir. Kanser kök hücreleri, tümör dokusu içerisindeki diğer alt popülasyonlara göre kemoterapi ajanlarına daha fazla direnç oluşturduğu bilinmektedir. miR-200c, miR-27a, miR-181a, miR-328 ve miR-145 hücrelerde direnç mekanizmasından sorumlu ATP bağlayan kaset proteinleri ABCB1 ve ABCG2'yi baskılamaktadır (34). Bu çalışmada, bu miRNA'ların olgun formlarının ifadesi EA'ya bağlı olarak düşmüştür.

Sonuç

Bu çalışmada, EA'nın meme kanseri kök hücrelerindeki miRNA ifade değişimleri üzerine etkisi ilk kez gösterilmiştir. EA meme kanseri hücrelerinde etkili olsa da aynı etkiye meme kanseri kök hücreleri üzerinde sahip değildir. EA meme kanseri kök hücrelerini farklılaşmadan koruyabileceği gibi bu hücreleri kemoterapi ve radyo terapiye karşı daha dirençli bir hale getirebilir. Bu nedenle, kanser tedavisi gören meme kanseri hastalarında günlük diyetle EA içeren besinlerin çıkartılması önerilebilir.

Çıkar çatışması

Yazarlar bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını belirtmektedir.

Açıklamalar

Bu çalışma finansal olarak EBİLTEM-TTO teknoloji transfer ofisi proje destek birimi tarafından desteklenmiştir (proje numaraları: 13-KSUAM-001 ve 13-KSUAM-002). Belirtilen projeler Ege Üniversitesi Kanserle Savaş Araştırma ve Uygulama Merkezi (KSUAM) adına desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65(1):5-29.
2. Liu H, Liu Y, Zhang JT. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: Fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther* 2008;7(2):263-70.
3. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: Mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* 2014;16(2):209.
4. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: An overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Res* 2015;17:40.
5. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):591-602.
6. Lee J, Kim YS, Lee J, et al. Walnut phenolic extract and its bioactive compounds suppress colon cancer cell growth by regulating colon cancer stemness. *Nutrients* 2016;8(7):E439.
7. Ambigaipalan P, de Camargo AC, Shahidi F. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 2016;64(34):6584-604.
8. Hacke AC, Granato D, Maciel LG, et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: Chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *J Food Sci* doi: 10.1111/1750-3841.13405.
9. Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacol* 2002;81(3):327-36.
10. Wang Z, Loo WT, Wang N, et al. Effect of *Sanguisorba officinalis* L on breast cancer growth and angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16 (Suppl 1):79-89.
11. Guruvayoorappan C, Kuttan G. (+)-Catechin inhibits tumour angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF-alpha in LPS-stimulated macrophages. *Innate Immunity* 2008;14(3):160-74.
12. Iniguez-Franco F, Soto-Valdez H, Peralta E, Ayala-Zavala JF, Auras R, Gamez-Meza N. Antioxidant activity and diffusion of catechin and epicatechin from antioxidant active films made of poly(L-lactic acid). *J Agric Food Chem* 2012;60(26):6515-23.
13. Siraj MA, Shilpi JA, Hossain MG, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Acalypha hispida* leaf and analysis of its major bioactive polyphenols by HPLC. *Adv Pharm Bull* 2016;6(2):275-83.
14. Chen HS, Bai MH, Zhang T, Li GD, Liu M. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-beta/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol* 2015;46(4):1730-8.
15. Shi L, Gao X, Li X, et al. Ellagic acid enhances the efficacy of PI3K inhibitor GDC-0941 in breast cancer cells. *Curr Mol Med* 2015;15(5):478-86.
16. Zhang T, Chen HS, Wang LF, et al. Ellagic acid exerts anti-proliferation effects via modulation of Tgf-beta/Smad3 signaling in MCF-7 breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(1):273-6.
17. Wang N, Wang ZY, Mo SL, et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134(3):943-55.
18. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: Implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)* 2014;28(12):1101-7.
19. Salvador MA, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E, Ginestier C. Breast cancer stem cells programs: enter the (non)-code. *Brief Funct Genomics* 2016;15(3):186-99.
20. Yu F, Yao H, Zhu P, et al. Llet-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007;131(6):1109-23.
21. Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. *J Clin Med* doi: 10.3390/jcm5010002.
22. Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention. *Cancer Lett* 2013;339(2):175-84.
23. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, et al. DIANA miRPath v.2.0: Investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 2012 [cited 04 Sept 2016]. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/content/40/W1/W498.long>
24. Atta Ur R, Ngounou FN, Choudhary MI, et al. New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. *Planta Med* 2001;67(4):335-9.
25. Venkataramanamma D, Aruna P, Singh RP. Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel. *J Food Sci Technol* 2016;53(5):2497-503.
26. Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res* 2010;3(1):108-13.
27. Strati A, Papoutsis Z, Lianidou E, Moutsatsou P. Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) alpha+beta+transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Clin Biochem* 2009;42(13-14):1358-62.
28. Dai Z, Nair V, Khan M, Ciolino HP. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. *Oncol Rep* 2010;24(4):1087-91.
29. Kumar D, Basu S, Parija L, et al. Curcumin and ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2016;81(1):31-7.
30. Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 2005;218(2):141-51.
31. Garofalo M, Croce CM. Role of microRNAs in maintaining cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;81:53-61.
32. Ali Hosseini Rad SM, Bavarsad MS, Arefian E, Jaseb K, Shahjehani M, Saki N. The Role of microRNAs in Stemness of Cancer Stem Cells. *Oncol Rev* 2013;7(1):e8.
33. Zhou N, Mo YY. Roles of microRNAs in cancer stem cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012;1(4):810-8.
34. Gomes BC, Rueff J, Rodrigues AS. MicroRNAs and cancer drug resistance. *Methods Mol Biol* 2016;1395:137-62.
35. Chen W, Zhou S, Mao L, et al. Crosstalk between TGF-beta signaling and miRNAs in breast cancer metastasis. *Tumour Biol* 2016;37(8):10011-9.

36. Hu X, Guo J, Zheng L, et al. The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer. *Mol Cancer Res* 2013;11(3):240-50.
37. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009;139(4):693-706.
38. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(4):1397-402.
39. Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2010;463(7281):621-6.
40. Sun H, Ding C, Zhang H, Gao J. Let7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2016 doi: 10.3892/mmr.2016.5656
41. Zhao B, Chen YG. Regulation of TGF-beta Signal Transduction. *Scientifica* 2014;2014:874065.
42. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget* 2015;6(9):6472-98.
43. Gill JG, Langer EM, Lindsley RC, et al. Snail and the microRNA-200 family act in opposition to regulate epithelial-to-mesenchymal transition and germ layer fate restriction in differentiating ESCs. *Stem cells* 2011;29(5):764-76.
44. Wang G, Guo X, Hong W, et al. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(8):2858-63.
45. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009;138(3):592-603.