



**GLUT-1 (SLC2A1) ve GLUT-3 (SLC2A3) GENLERİNİN VE BU
GENLERİ HEDEFLEYEN MİKRORNA
EKSPRESYONLARININ FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT)
KARŞILAŞTIRILMASI**

Burcu DUNDAR



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUT-1 (SLC2A1) ve GLUT-3 (SLC2A3) GENLERİNİN VE BU GENLERİ
HEDEFLEYEN MİKRONA EKSPRESYONLARININ FARKLI MEME
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT)
KARŞILAŞTIRILMASI**

Burcu DUNDAR

Yrd. Doç. Dr. Elif UZ
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

Bursa-2017
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Burcu DUNDAR tarafından hazırlanan “GLUT-1(SLC2A1) ve GLUT-3(SLC2A3) Genlerinin ve Bu Genleri Hedefleyen miRNA Ekspresyonlarının Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında(SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) Karşılaştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç Dr. Elif UZ

Başkan: Yrd. Doç Dr. Elif UZ

Uludağ Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER

Acıbadem Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

imza

Üye: Yrd. Doç Dr. Figen ERSOY

Uludağ Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

imza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

09/06/2017

İmza

Burcu DUNDAR



ÖZET

Yüksek Lisans

GLUT-1 (SLC2A1) ve GLUT-3 (SLC2A3) GENLERİNİN VE BU GENLERİ HEDEFLEYEN MİKRORNA EKSPRESYONLARININ FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) KARŞILAŞTIRILMASI

Burcu DÜNDAR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Elif UZ

Meme kanseri, kadın kanserlerinin % 25-32' sini, kansere bağlı ölümlerin % 19' unu oluşturur. Ailesel olarak ortaya çıkan meme kanserlerinin yanı sıra, özellikle sporadik meme kanserinin ortaya çıkmasına farklı genler ve genetik mekanizmalar sebep olabilmektedir. Kanserin ilerlemesi ve proliferasyona sebep olan en önemli genlerden birisi GLUT (Glucose Transporter) gen ailesidir. GLUT genleri kodladıkları membran transport proteinleri sayesinde heksos taşıyıcıları olarak işlev görürler. Meme kanser hücreleri birçok kanser hücresinde olduğu gibi yüksek düzeyde glukoz alımı ve metabolizmasına sahiptir. GLUT-1 ve GLUT-3 genleri meme kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin yanı sıra mikroRNA' ların ekspresyon düzeyleri de kanserleşmede önemli rol oynamaktadır. mikroRNA' ların keşfinden bu yana, kanserle olan ilişkileri ciddi bir araştırma konusu olmuştur.

Bu çalışmanın amacı; farklı moleküler özellikteki meme kanseri alt tiplerinde GLUT gen ekspresyonları ve ilgili miRNA' ların ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasıdır. MiRNA veri tabanları kullanılarak, GLUT-1 ve GLUT-3 genlerini hedefleyen tahmini miRNA' lar mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, farklı moleküler alt tip özelliğine sahip üç farklı meme kanseri hücre hattı ve bir normal meme hücre hattından, total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra, qRT-PCR yöntemi ile QIAGEN rotorgene cihazında SYBER GREEN kullanılarak ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen ekspresyon seviyelerine ait veriler kendi aralarında karşılaştırılarak, meme kanseri alt grupları arasındaki ekspresyon farklılıkları ortaya konmaya çalışılmıştır. Yapılan gen ifade analizlerinde mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107' de üç hücre hattında azalma gözlenmiştir. Yalnızca MDA-MB-231' de mir-107 ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış söz konusu olmuştur. GLUT-1 ekspresyonu üç hücre hattında artış göstermiş, GLUT-3 ise SKBR-3 ve MCF-7 hücre hatlarında kaydedeğer bir azalış gösterirken, MDA-MB-231 hücre hattında artış göstermiştir.

Çalışma sonucunda meme kanseri; GLUT, miRNA genleri ve hormon reseptörler ile ilişkilendirilip, farklı meme kanseri hücre tiplerine sahip bireylerin tedavilerine yeni yöntemlerin eklenmesine ve kişiye özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: GLUT geni, mikroRNA, kanser, onko-mir, ts-mir, meme kanseri.

2017, ix + 93 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

Comparing The GLUT-1 (SLC2A1) and GLUT-3 (SLC2A3) Genes and Their Targeted miRNA Expression of Different Breast Cancer Cell Lines (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT)

Burcu DUNDAR

Uludağ University
Graduate School of Natural And Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elif UZ

Breast cancer constitutes 25-32% of female cancers and 19% of cancer-related deaths. In addition to familial breast cancers, different genetic mechanisms can lead to the emergence of sporadic breast cancer. One of the most important genes that cause cancer progression and proliferation is the GLUT (Glucose Transporter) gene family. GLUT genes encode membrane transport proteins and function as hexose carriers. Breast cancer cells have high levels of glucose uptake and metabolism as in many cancer cells. GLUT-1 and GLUT-3 genes are expressed at high levels in breast cancer cells. Expression levels of these genes, as well as expression levels of microRNAs play an important role in development of cancer. Since the discovery of microRNAs, their relationship with cancer has been the subject of substantial research projects.

The aim of this study is to compare the expression levels of GLUT gene and related miRNAs in different molecular subtypes of breast cancer. Using miRNA databases, the predicted miRNAs targeting the GLUT-1 and GLUT-3 genes were found to be mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107. In this study, total RNA isolation and cDNA synthesis were performed in three different breast cancer cell lines in different molecular subtypes and normal breast cancer cell line. After, cDNA synthesis, qRT-PCR method was used and expression levels were examined using SYBER GREEN in QIAGEN rotorgene device. The expression differences of mRNAs and miRNAs among the breast cancer subgroups were determined. According to the results, a decrease in the three cell line was observed in mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107. There was a significant increase in expression of mir-107 only in MDA-MB-231. GLUT-1 expression was increased in three breast cancer cell lines, while GLUT-3 showed a significant decrease in the SKBR-3 and MCF-7 and increase in MDA-MB-231 cell line.

The significance of this study is to show the relationship between the expression levels of GLUT mRNA, their candidate miRNAs and the hormone receptor profile in different types of breast cancer cell lines. Improving new methods in treatment of different cancer types using personalized treatment strategies will help to overcome the disease and our results together with similar findings all over the World will definitely have role in development of strategies in medical cure of breast cancer.

Key words: GLUT gene, microRNA, cancer, onco-mir, ts-mir, breast cancer.
2017, ix + 93 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan, kendisinden hem bilimsel olarak hemde hayata dair çok şey öğrendiğim, genetik bilimini en güzel şekilde öğrenmem için her türlü imkanı bana sunan ve zorlu geçen bu süreçte beni yalnız bırakmayarak bana hertürlü desteği sağlamak için tüm imkanlarını seferber eden değerli danışmanhocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif UZ' a emeklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kurucumuz ve bölüm başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL' e hem lisans eğitimimde hemde yüksek lisans eğitimimde bana kattığı tüm değerlerin ve bu bölümü kurarak bizim bilime gönül vermemizi sağladığı için çok teşekkür ederim.

En zor anlarımda yanımda olan ve beni her an dinlemeye desteklemeye hazır olan, yüksek lisans sürecinde her türlü sıkıntımı paylaşan, zorlu tez sürecim boyunca bıkmadan beni şevklendiren ve herşeye inandıran Sayın Can DEĞİRMENCİ' ye çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım ve eğitim sürecimde yanımda olan beni hertürlü zorluğa rağmen bugünlere getiren her zaman bana inanan ve güvenen, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen canım ailem; canım annem Çiğdem DÜNDAR' a, canım babam Hüseyin DÜNDAR' a ve canım ağabeyim Burak DÜNDAR' a çok teşekkür ederim

Yüksek lisans tezim TUBİTAK 2210-c Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TUBİTAK' a teşekkür ederim.

Burcu DUNDAR
09/06/2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. MikroRNA.....	6
2.1.1. Olgun miRNA Biyosentezi.....	8
2.1.2.MiRNA Transkripsiyonunun Düzenlenme Mekanizmaları.....	11
2.1.3. Olgun miRNA' nın işlevleri ve Hedef mRNA'yı Düzenleme Mekanizmaları.....	12
2.1.4. MiRNA'ların Hedef mRNA İle Eşleşmesi ve Uyuşum Dizileri.....	14
2.1.5. MiRNA'ların Kansere İlişkisi.....	15
2.1.6. Hsa-mir-22-3p.....	18
2.1.7. Hsa-mir-103a-3p.....	20
2.1.8. Hsa-mir-107.....	22
2.2. GLUT Genleri ve İşlevleri.....	24
2.2.1. GLUT Genlerinin Kansere İlişkisi.....	26
2.2.2. GLUT-1 (SLC2A1) (Glucose Transporter 1).....	27
2.2.3. GLUT-3 (SLC2A3) (Glucose Transporter 3).....	29
2.3. Meme Kanseri.....	30
2.3.1. Meme Kanserinde Moleküler Altgruplar.....	33
2.3.2. Hormon Reseptörleri ve HER2/neu (cerbB2) Proteini.....	37
2.3.3. Meme Kanserinin TNM Sistemine Göre Sınıflandırılması ve Evrelemesi... 2.3.4. Meme Hücre Hatları.....	38 40
2.3.4.1. SKBR-3.....	41
2.3.4.2. MCF-7.....	41
2.3.4.3 MDA-MB-231.....	42
2.3.4.4. hTERT (CRL4010).....	43
2.3.5. Meme Kanserinde GLUT Genlerinin Önemi.....	44
2.3.6. Meme Kanseri ve MiRNA'lar.....	47
2.3.7.Mir-22, Mir-103 ve Mir-107'nin Meme Kanserinde Hedeflediği Düşünülen GLUT-1 ve GLUT-3 ile Uyuşum Dizileri.....	49
2.3.8. Meme Kanseri Tedavi Stratejileri.....	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	52
3.1. Hücre Kültür Aşaması.....	52
3.2. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	52
3.3. MiRNA'lar İçin cDNA Sentezi.....	53
3.4. MRNA'lar İçin cDNA Sentezi.....	54
3.5. MiRNA'lar için qRT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR).....	56
3.6. MRNA'lar için qRT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR).....	57
4. BULGULAR.....	59

4.1. Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107'nin İfade Seviyelerinin Sonuçları.....	59
4.2. GLUT- 1 ve GLUT-3 genlerin İfade Seviyelerinin Sonuçları.....	62
4.3. Hücre Hatları Arasında GLUT Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	65
4.4. Hücre Hatları Arasında miRNA Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	66
4.5. MiRNA'lar ve GLUT Genlerinin İfade Seviyelerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	93



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
kDa	Kilo Dalton
μ l	Mikrolitre
ng	Nanogram
rpm	Revolutions per Minute
$^{\circ}$ C	Santigrad
cm	Santimetre
mm	Milimetre
%	Yüzde
$2^{-\Delta\Delta CT}$	2üssü -delta delta ct

Kısaltmalar	Açıklama
AGO2	Argonaute2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AML	Akut miyelooid lösemi
AMO	Anti-miRNA oligonükleotidleri
ASO	Antisense oligonükleotitleri
BRCA1,2	Breast cancer1,2
cDNA	Komplementer DNA
CD147	Cluster of differentiation 147
CGIs	CpG island
Ct	Cycle Threshold
DEVİVO	Glukoz transporter protein sendrom
DGCR8-Di	George syndrome critical region gene8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonukleikasit
DNMT	DNA metiltransferaz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
erb-b2	Receptor tyrosine kinase 2
ER	Estrogen reseptör
F	Forward
FISH	Fluorescent in situ hybridization
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz Alanin
gDNA	Genomik DNA
Glut	Glukoz transporter
GW182	Glysin triptofan protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HER2	İnsan epidermal büyüme factor reseptörü2
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase N-Asetil
hTEP1	Human telomerase associated protein 1
hTR	İnsan telomeraz RNA

Kısaltmalar

Açıklama

KLL	Kronik Lenfositik Lösemili
LNA	Nükleik asit kilitleyicileri
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mRNA	Messenger RNA
miRNA	MikroRNA
ncRNA	Noncoding RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Onko-miR	Onkogen miRNA
ORF	Open reading frame
PABP	Poli A binding protein
PDG	Fluorodeoxyglucose
PER3	Period circadian clock 3
PET	Positron emission tomography
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pol	Polimeraz
PR	Progesteron reseptör
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Q-RT-PCR	Quantitation Real-time Polymerase Chain Reaction
R	Reverse
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonükleikasit
RNAi	RNA interference
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
RT	Reverse Transcription
SGLT	Sodium-glucose co-transporter
SLC2A	Solute carrier 2A
TNM	Tümör-nod-metastaz
TSmir	Tümör süpresör miRNA'lar
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UICC	International Union for Cancer Control
UTR	Untranslated region
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Olgun miRNA'nın biyosentezi ve işlevleri	10
Şekil 2.2. MicroRNA'nın transkripsiyonunun düzenlenmesi.....	12
Şekil 2.3. MicroRNA'ların Hedeflediği mRNA'ları Düzenleme Mekanizmaları	14
Şekil 2.4. Hedef mRNA ve miRNA'ların seed (tohum) dizileri	15
Şekil 2.5. SLC2A1 (GLUT-1) geninin kromozoma yerleşimi	29
Şekil 2.6. SLC2A3 (GLUT-3) geninin kromozoma yerleşimi	30
Şekil 2.7. SKBR-3 hücre hattının morfolojisi.....	41
Şekil 2.8. MCF-7 hücre hattının morfolojisi.....	42
Şekil 2.9. CRL-4010 (HTERT-HMEI) hücre hattının morfolojisi.....	43
Şekil 2.10. MDA-MB-231 hücre hattının morfolojisi.....	44
Şekil 2.11. Glukoz taşıyıcı proteinlerin (Glut) işlevlerinin şematik gösterimi.....	45
Şekil 2.12. Mir-22-3p' nin tahmin hedefi ve uyuşum dizileri.....	49
Şekil 2.13. Mir-103a-3p ve mir-107' nin tahmin hedefleri ve uyuşum dizileri.....	50
Şekil 4.1. Mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ve U6' nın MCF-7 ve SKBR-3 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları.....	60
Şekil 4.2. Mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ve U6' nın MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları.....	60
Şekil 4.3. Mir-22-3p ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi.....	61
Şekil 4.4. Mir-103a-3p ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi.....	61
Şekil 4.5. Mir-107 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi.....	62
Şekil 4.6. GLUT-1, GLUT-3 ve GAPDH'in MCF-7 ve SKBR-3 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları.....	63
Şekil 4.7. GLUT-1, GLUT-3 ve GAPDH'in MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları.....	63
Şekil 4.8. GLUT-1 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi	64
Şekil 4.9. GLUT-3 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi.....	64
Şekil 4.10. GLUT-1 ve GLUT-3 ifade seviyelerinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kendi aralarında karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.11. Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107 ifade seviyelerinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.12. Mir-22-3p, ifade seviyesinin meme kanseri hücre hatlarında GLUT-1'in ifade seviyesi le karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.13. Mir-103a-3p ve mir-107' nin ifade seviyelerinin meme kanseri hücre hatlarında GLUT-3' ün ifade seviyesi le karşılaştırılması.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hsa-mir-22-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şekli.....	20
Çizelge 2.2. Has-mir-103a-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şekli.....	22
Çizelge 2.3. Has-mir-107'nin dizilimi ve sap ilmik şekli.....	24
Çizelge 2.4. Meme kanseri moleküler özelliklerine göre sınıflandırılması.....	34
Çizelge 2.5. Meme kanserinin TNM sistemi ile sınıflandırılması.....	39
Çizelge 2.6. Meme kanserinde evreleme.....	40
Çizelge 3.1. MiRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	54
Çizelge 3.2. MiRNA RT-PCR tepkime koşulları.....	54
Çizelge 3.3. MRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	55
Çizelge 3.4. MRNA RT-PCR tepkime koşulları.....	55
Çizelge 3.5. MRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	55
Çizelge 3.6. MRNA RT-PCR tepkime koşulları.....	56
Çizelge 3.7. MiRNA için qRT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	56
Çizelge 3.8. MiRNA qRT-PCR tepkime koşulları.....	57
Çizelge 3.9. QRT-PCR'da kullanılan miRNA primerleri ve dizileri.....	57
Çizelge 3.10. MRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	58
Çizelge 3.11. MRNA qRT-PCR tepkime koşulları.....	58
Çizelge 3.12. QRT-PCR'da kullanılan mRNA primerleri ve dizileri.....	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, tüm insanlarda akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı açısından ikinci sırada olan kanser türüdür ve kadınlarda en sık görülen kanserdir (Parkin ve ark. 2002).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre de 184 ülkenin 140' ında kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir.

(<http://www.losev.org.tr/v2/tr/losemiddeguncelyenilikler.asp?ctID=826&RecID=5740>, 201).

Ülkemizdeki verilere göre meme kanseri sıklığının, doğu bölgelerinde 20/100.000, batı bölgelerinde ise 40-50/100.000 oranında olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakamlardan yola çıkılarak, Türkiye' de her yıl meme kanserine yakalanan kadınların sayısının tahmini olarak 10.000 civarında olduğu hesaplanabilir (Fidaner ve ark. 1993, Özmen ve Anderson 2008).

Meme kanseri histopatolojik ve gen ekspresyon profili açısından heterojen yapı gösteren bir kanser türüdür (Weigelt ve Reis-Filho 2009). Bu farklılık, meme kanserinin tanısını, tanıya göre uygulanacak tedaviyi, tedavinin şeklini ve bunun sonucunda da hastalığın prognozunu etkilemektedir (Buerger ve ark. 1999). Yapılan çalışmalar da aynı şekilde, meme kanserinin hem klinik olarak farklı, hem de moleküler olarak heterojen yapı gösteren bir hastalık olduğunu, ayrıca prognozun belirlenmesinde etkili, birbirinden farklı gen ekspresyon paternleri bulunduran kompleks bir hastalık olduğunu göstermiştir (Eliyatkin ve ark. 2015).

Meme kanser hücrelerinin ve diğer farklı kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden bir tanesi hızlandırılmış bir glikoliz mekanizmasıdır. Ayrıca glikoz metabolizması da çok büyük oranda değişime uğramıştır. Kanser hücrelerinde ana enerji kaynağını oluşturan glikoz alımı ve tüketimi, tümör hücrelerinin devamlı sağkalımları için mutlak bir gereksinim olmasından dolayı, normal dokulara göre çok fazla artmaktadır (Smith 1999, Godoy ve ark. 2006, Kao ve ark. 2006, Cao ve ark. 2007, Meneses ve ark. 2008). Glukoz hidrofilik (suyu seven) bir moleküldür ve plazma membranından, hücre içine alımı bazı şeker taşınımından sorumlu proteinler ile olmaktadır (Wood ve Trayhurn 2003).

Kanser hücrelerinin kandan glukozu, normal hücelere göre 5-10 kat daha fazla almasından sorumlu birçok mekanizma vardır. Bunlardan biri glukoz taşınmasından sorumlu olan GLUT (glukoz transporter) gen ailesidir (Zhang ve ark. 2010). Kanser hücrelerinde artmış glikoz transportu, 13 üyesi bilinen bu glikoz taşıyıcı proteinlerle sağlanmaktadır. Bu grubun üyelerinden olan GLUT-1 ve GLUT-3 genleri de normal ve kanserli dokuda hücre içine glukoz transportunu sağlayan membran transport proteinlerini kodlar (Vaupel ve Mayer 2007).

Malign hücrelerin hızlanmış metabolizmaları, yüksek glikoz ihtiyaçları ve artmış glikoz alımları iyi bilinmektedir. Malign hücrelerde artan glikoz transportu GLUT ailesinin ve özellikle GLUT-1 ve/veya GLUT-3' ün artmış ve kontrolsüz ifade seviyesi ile beraber gitmektedir (Laudański ve ark. 2003, Macheda ve ark. 2005, Kuo ve ark. 2006, Cao ve ark. 2007).

Bazı çalışmalar, meme kanser hücrelerinin çoğalmasında rol oynayan östradiol ve epidermal büyüme faktörü proteinlerinin bu kanser hücrelerinde glikoz tüketimini arttırdığını ve bazı GLUT proteinlerinde artışa yol açtığını göstermiştir (Vaupel ve Mayer 2007). Hem immunokimyasal, hemde moleküler incelemelerde, birçok saldırgan tümör tipinde yüksek GLUT-1 düzeylerinin kötü prognoza sahip olduğunu gözlenmiştir (Vaupel ve Mayer 2007, Özkaya ve ark. 2008). Bu gen ve genetik mekanizmaların yanı sıra, son zamanlarda çok çalışılan ve birçok çalışma ile gösterilen miRNA ekspresyon profillerinin de kanser gibi birçok hastalıkta değişiklik gösterdiği ve kanserle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Nakahara ve Carthew 2004, Aagaard ve Rossi 2007).

MiRNA' lar, hedef mRNA' nın 3'UTR bölgesine dizi spesifik bağlanarak post transkripsiyonel olarak inhibisyon veya mRNA yıkımı ile sonuçlanan gen düzenlemesini yapan, küçük ve kodlama yapmayan gen kümesidir (Bartel 2004, Pasquinelli 2012).

miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri, *C. elegans*' ın gelişimi sırasında gözlenen ve spesifik ifade modelleri sebebiyle küçük geçici RNA' lar olarak tarif edilen lin-4 ve let-7'dir. MiRNA' ların temel işlevleri *D. melanogaster* ve insanda let-7 keşfedilene kadar belirlenememiştir (Reinhart 2000, Takamizawa 2004). MiRNA' ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan gen bölgelerinin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak

genler arası bölgelerde veya eksonlarda da bulunabilirler. MiRNA genlerinin % 50' sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılğan bölgelerde bulunur. Bu durum miRNA' ların neoplazi patojenezinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir (Calin 2004).

mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabildiğinden dolayı miRNA' lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (Ambros 2004, Bartel 2007).

Bir çok çalışma miRNA' ların, hücre çoğalması (Enerly ve ark. 2011), apoptoz (Hwang ve Mendell 2006), strese yanıt, tumorigenesis (Ventura ve Jacks 2009, Leung ve Sharp 2010) ve gelişim gibi birçok biyolojik süreçte önemli roller oynadığını göstermiştir (Alvarez-Garcia ve Miska 2005, Zhao ve Srivastava 2007).

Anormal miRNA ekspresyonları meme kanserinde içeren bir çok solid tümörlerde gösterilmiştir (Blenkiron ve ark. 2007, Van der Auwera ve ark. 2010). Farklı miRNA seviyeleri, meme kanserinde, özellikle de normal ve kanserli dokular arasında, farklı prognoza sahip, farklı moleküler alt gruplar arasında da farklıdır (Foekens ve ark. 2008, Tavazoie ve ark. 2008).

Belirli miRNA' ların düzensiz ekspresyon seviyeleri hem solid hem de hematopoietik maligniteleri de içeren çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Berdasco ve Esteller 2010, Vasilatou ve ark. 2010).

Çeşitli kanserlerde bazı miRNA' ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA' ların düzenleyici olarak rol aldığını göstermektedir (Nicoloso ve ark. 2009).

Mikroarrayler ve diğer metodlar kullanılarak yapılan miRNA ekspresyon profillemeye çalışmaları, normal dokuların kanser dokularından ayırt edilmesinde ve farklı tümör tiplerini sınıflandırmak için kullanılabilir (Ma ve ark. 2012). Ayrıca, spesifik miRNA' ların ekspresyon seviyelerinin kanserin prognozuyla ilişkili olduğu bulunmuştur ve bu nedenle tedavinin seyrini belirlemek için kullanılabileceği düşünülmektedir (Ruimin ve ark. 2012, Sarkar ve ark. 2010).

Son çalışmalarda, mikroRNA-22' nin (miR-22), prostat kanseri, meme kanseri gibi çeşitli kanserlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Patel ve ark. 2011, Kong ve ark. 2014, Chen ve ark. 2015, Pasqualini ve ark. 2015). MiR-22' nin önemli bir rol oynadığı ve kanserde umut verici bir terapötik hedef olabileceği rapor edilmiştir. Bazı çalışmalar, mir-22' nin GLUT1' i hedef alarak meme kanserinin proliferasyon ve invazyonunda etkili olduğunu da göstermiştir (Chen ve ark. 2015). Bazı çalışmalarda ise mir-22' nin meme kanseri hücrelerinde down regülasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Zhang ve ark 2010).

Çalışmalarla kanserde önemli olduğu düşünülen bir diğer miRNA ise mir103-mir107' dir. Martello ve ark., mir-103/107 mikroRNA ailesinin yüksek ekspresyonu metastaz ve kötü sonuç ile ilişkilendirilmiştir (Anonim 2015, Martello ve ark. 2010). Mir-103 ve mir-107' nin tahmini hedef geni GLUT-3 olarak bulunmuştur (www.targetscan.org, 2004). Fakat bununla ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. MiR-107' nin ilerlemiş meme kanseri hastalarının malign dokularında yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2011).

Mir-22, mir-103 ve mir-107' nin meme kanseri ile ilişkili olduğu ve GLUT-1 ile GLUT-3 genlerini hedef aldığı düşünülmektedir. Bazı çalışmalarla da bu gösterilmiştir. Mir-22, mir-103 ve mir-107' nin tahmini hedef genleri www.targetscan.org veri tabanı kullanılarak GLUT-1 ve GLUT-3 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, GLUT genleri ve seçilen miRNA ekspresyon seviyelerini belirleyerek farklı moleküler alt grup özelliklerine sahip meme kanseri hücre hatlarında, normal meme hücre hattı ile karşılaştırılarak ortaya çıkacak farklılıkları göz önüne sermek araştırma konumuzu oluşturmaktadır. İlk aşamada SKBR-3, MCF-7, MDA-MB-231 ve hTERT hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapılarak bu RNA' lardan cDNA elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen cDNA' lar üzerinden qRT-PCR (kantitatif gerçek zamanlı real time PCR) yöntemi kullanılarak miRNA ve GLUT genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Sonuçlar analiz edildi ve farklı hücre hatları arasındaki GLUT-1, GLUT-3, mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ifade farklılıkları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, farklı moleküler özelliklere sahip meme kanseri hücrelerinde, GLUT-

1 ve GLUT-3 gen ekspresyonu ve bunları hedeflediği düşünölen seçili miRNA' lar ile hormon reseptör özellikleri arasında anlamlı bir ilişki bulunursa, bu yolak; gen ve hormon reseptörler ile ilişkilendirilip, farklı hücre tiplerine sahip meme kanseri olan bireylerin tedavilerine yeni yöntemlerin geliştirilebilmesinde katkıda bulunmaktır. Uygulanacak yeni tedavi yöntemlerine yönelik, hormon reseptör özelliğine göre farklı yöntemler geliştirilebileceği hedeflenmektedir, bu da kişiye özel tedavi seçenekleri ile ilgili yapılan güncel çalışmalara katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu genlerin mekanizmaları üzerinden oluşan kanser türlerinde etkili miRNA' lar kullanılarak gen susturma ile tedavi seçeneklerinin alt yapısı araştırılacaktır.

Gelecek çalışmalarda, bu genlerin mekanizmaları üzerinden oluşan kanser türlerinde etkili miRNA' ların seviyelerine göre, bu miRNA' ların spesifitesini test etmek için bunlara özgü mimic yada inhibitörler kullanılarak bunların düzenlenmesini yapmak ve bu şekilde gen susturma ile tedavi seçeneklerinin alt yapısını araştırmak birincil amacımızı oluşturmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA

Memeli genomunun sadece % 3' lük kısmı protein dönüştürülen mRNA (mesajcı RNA)' ları kodlar. Genomun geri kalan % 97' lik kısmının çoğu uzun ve kısa protein kodlamayan RNA' ları (ncRNA) kodlamaktadır (Birney 2007). NcRNA' lar, biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden hücre sel savunmaya, gelişimsel süreçlerden hücre sel cevaba kadar pek çok metabolik süreçte görev almaktadır (Carninci 2005, Kapranov 2007). ncRNA' ların işlevleri arasında en önemlisi transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturumudur (RNA *interference*-RNAi) ve bunu mikroRNA' lar (miRNA' lar) gerçekleştirmektedir (Mette ve ark. 2000). Günümüzde artık, RNAi mekanizmasının gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli hayati süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Voinnet 2009). MicroRNA' lar *Caenorhabditis elegans*' da gelişimsel sürecin kontrolü çalışmaları sırasında keşfedilmiştir (Ambros ve Horvitz 1984, Lee ve ark. 1993).

MiRNA' lar, hedef mRNA' lara dizi-spesifik olarak bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülen yaklaşık 22 nukleotid, kodlanmayan RNA' lardır (Bartel 2004). Bugüne kadar binlerce miRNA, yuvarlak solucanlar, sinekler, balıklar, kurbağalar, memeliler, çiçekli bitkiler, yosunlar ve hatta virüsler gibi genetik, moleküler klonlama ve biyoinformatik tahminler kullanarak çeşitli organizmalarda tespit edilmiştir (Llave ve ark. 2002, Reinhart ve ark. 2002, Lim ve ark. 2003, Pfeffer ve ark. 2004, Arazi ve ark. 2005, Axtell ve Bartel 2005, Watanabe ve ark. 2005).

miRNA' lar hedef mRNA' ya bağlanarak ilgili genin protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA' nın yıkılmasına sebep olur (Shenouda ve Alahari 2009). MikroRNA, hedef mRNA' nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesi (untranslated region-UTR) ya da hedef mRNA' nin ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır. 3'UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği gösterir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA' nın

yıkımı ile sonuçlanır. Ayrıca, mikroRNA' ların her biri birden fazla mRNA'yı düzenlemektedir ve mRNA' ların her biri de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenmektedir (Pillai 2005, Sun ve ark. 2010).

Yeni çalışmalarda, miRNA' ların, mRNA' ların farklı bölgelerine de bağlanıp gen ifadesini arttırdığına dair çalışmalarda bulunmaktadır (Pasquinelli 2012). Tahminlere göre, İnsan genomu, en az 474 miRNA genini kodlamaktadır (Griffiths-Jones ve ark. 2004, 2006). Eylül 2008' de yayınlanan miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) yayına göre, insan miRNA' larının sayısı 695' dir (Griffiths-Jones ve ark 2008), ancak birkaç çalışma, insan miRNA genlerinin sayısının 1000' in üzerinde olabileceğini işaret etmektedir (Bentwich ve ark. 2005, Berezikov ve ark.2005). MiRNA' ların onkogen veya tümör baskılayıcı gibi görevlere sahip olmalarından ötürü tümör oluşumunda kilit bir rol oynadıkları da düşünülmektedir. Kanserdeki miRNA' ların ifadelerindeki düzensizlikler epigenetik ve genetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Davalos ve ark. 2012). MiRNA' ların ekspresyon profillerinin değişimi çeşitli tümörlerde ve karsinomalarda ayırıcı tanı olarak kullanılmaktadır (Lu ve ark. 2005). MiRNA' ların yarısından fazlası protein kodlayan genlerin intron bölgelerinde bulunmaktadır. Bunun yanı sıra genlerin aralarındaki bölgelerde yada eksonlarda da bulunabilirler. Ayrıca çok büyük bir kısmı kanserle ilişkili bölgelerde veya kırılgen gen bölgelerinde bulunduğundan dolayı kanser ile ilgisi çok önemli bir araştırma konusu olmuştur (Calin ve ark 2004). MiRNA normal biyolojik süreçlerde yer aldığı gibi birçok hastalıkla da ilişkilidir. Kanser, nöroloji, kardiyoloji, viroloji gibi birçok alanda bu konudaki çalışmalar hızla devam etmektedir ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Carè ve ark. 2007, Cameron ve ark. 2008, Xiao ve Rajewsky 2009). Yapılan çalışmalarla miRNA' lar ve bazı kanser tipleri arasında ilişkiler bulunmuştur. Calin ve ark. (2004) miRNA' ların büyük çoğunluğunun kanserle ilişkili genomik bölgelerde bulunduğunu, Lu ve ark. (2005) miRNA ekspresyonlarının kanser hücreleri ile normal doku hücreleri arasında farklılıklar gösterdiğini bildirmiştir.

İleriki çalışmalarda miRNA' ların işlevlerine göre onların teröpetik hedef olarak kullanılabileceği düşüncesi birçok araştırmacı tarafından kabul görmektedir. Ayrıca

miRNA' ların biyobelirteç olarak veya hastalığın gidişatı, evresi vb. hakkında bilgi edinmek içinde kullanılabilceği de düşünölmektedir (Lu ve ark. 2005, Mercer ve ark. 2009).

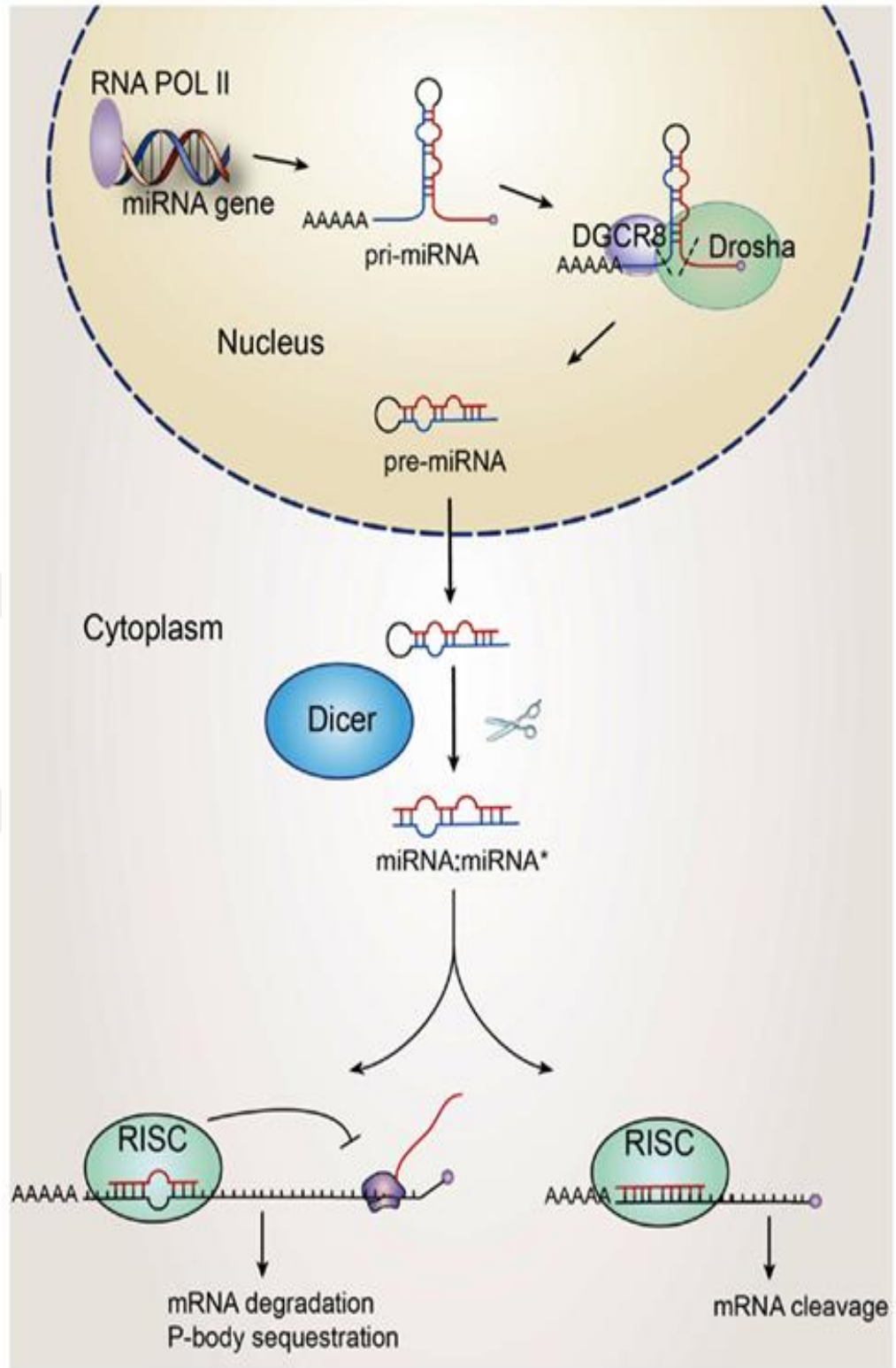
2.1.1. Olgun MicroRNA Biyosentezi

Bir genin intronu bir başka genin ekzonu olabilir. MiRNA' ları kodlayan genler bu kompleks yapının tamamlayıcı parçalarındandır (Frith ve ark. 2005). Memeli miRNA' larının kodlandığı birçok sekans belli bir genin intron bölgeleridir ve hatta bazıları ekzon bölgelerinden de kodlanmaktadır. Bazı miRNA' lar ise genomdaki intergenik bölgelerde kendi transkripsiyon ünitelerine sahiptirler (Kim ve Nam 2006). Birçok çalışma; RNA polimeraz II (Pol II) enzimi tarafından stem-loop yapısında primer miRNA (pri-miRNA) oluşturmak üzere miRNA genlerinin transkripsiyonunun olduğunu ve miRNA biyogenezini başlattığını göstermiştir (Cai ve ark. 2004, Lee ve ark. 2004).

İnsanlarda miRNA' lar miRNA genlerinden, pri-miRNA adı verilen 1 kb' dan daha uzun diziler hâlinde transkribe olurlar ve 5'cap ve 3'poliA kuyrukları vardır (Cai ve ark. 2004, Lee ve ark. 2002). Transkripsiyon işlemini RNA pol II yapar fakat Alu-tekrar bölgeleri olan bazı miRNA' lar biraz farklı olarak, RNA polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir (Borchert ve ark. 2006).

Olgun miRNA oluşumun ilk basamağı, miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi ile öncül miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Olgun miRNA oluşumu Şekil 2.1.' de gösterilmiştir. Saç tokası (hairpin) şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir çeşit RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktasına sahip bir protein olan DGCR8/Pasha (DGCR8-Di George syndrome critical region gene8)' dan oluşan komplekse bağlanır. Daha sonra, pri-miRNA 60 ile 70 nükleotidlik parçalar halinde kesilerek pre-miRNA haline getirilir (Yi ve ark 2003, Bartel 2004, Bohnsack ve ark. 2004, Lund ve ark. 2004, Le Quesne ve Caldas 2010). Nükleusta bu şekilde oluşan pre-miRNA' lar nükleer transport reseptörü Eksportin-5 ve nükleer protein Ran-GTP aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya taşınırlar (Bohn ve ark. 2004, Lund ve ark. 2004). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA RNA-pol III' ün bir türü olan DICER tarafından kesilerek artık 20-25 nükleotidlik olgun miRNA ve onun komplementeri olan miRNA*.dan oluşan çift sarmallı bir hale gelir (Grishok ve ark. 2001, Hutvagner ve ark

2001). Daha sonra miRNA/miRNA* ikilisi helikaz enzimi ile çözülerek, olgun miRNA ve miRNA*'ya ayrılır (Lin ve ark. 2005, Gregory ve ark. 2007). Argonaat protein (AGO2), olgun miRNA'yı 5' ucundan seçer. AGO2, miRNA ve çeşitli proteinler, kısaca RISC kompleksi olarak tanımlanan RNA ile uyarılmış susturma kompleksini oluştururlar. miRNA'yı içeren RISC kompleksi, mRNA'yı hedefleme yeteneğindedir (Chen dria ve ark. 2005, Le ve Caldas 2010). Bu kompleks hedef miRNA'yı hedef mRNA'lara yönlendirirken, olgun miRNA'nın diğer komplementer ipliği degrade olur (Hammond ve ark. 2000, Schwarz ve ark. 2003). MiRNA'lar, hedefledikleri mRNA'larına, farklı canlı türlerine ait aynı miRNA ailesinde yüksek oranda korunmuş ve tohum (çekirdek-seed) adı verilen 6-8 nükleotidlik bir bölge aracılığı ile tanınır ve bağlanırlar (Kargi ve ark.2007). Bunun yanısıra, miRNA'ya da mRNA'lara bağlanan proteinlerinde hedef seçimini etkilediği bilinmektedir (Forman ve Collier 2010).



Şekil 2.1. Olgun miRNA'nın biyosentezi ve işlevleri (Guo ve ark.2010)

2.1.2. miRNA Transkripsiyonunun Düzenleme Mekanizmaları

MiRNA genlerinin transkripsiyonu, normal protein kodlayan gen transkripsiyonuna benzer bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenleme doku spesifik yada gelişime özgüdür (Davis ve Hata 2009, Turner ve Slack 2009). MiRNA genlerinin promoter bölgeleri çok yüksek oranda protein kodlayan genlerinkiyle benzerlik göstermektedir. CpG adalarının bulunması, TATA box sekansları, başlangıç elementlerinin bulunması, histon modifikasyonları, miRNA promoter bölgelerinin tfs, susturma elementleri ve kromatin modifikasyonları ile kontrol edildiğini işaret eder ve protein kodlayan genlerle benzerliğini gösterir. MiRNA transkripsiyonunun düzenleme mekanizmaları üç başlıkta incelenebilir (Ozsolak ve ark. 2008, Corcoran ve ark. 2009, Breving and Esquela-Kerscher 2010).

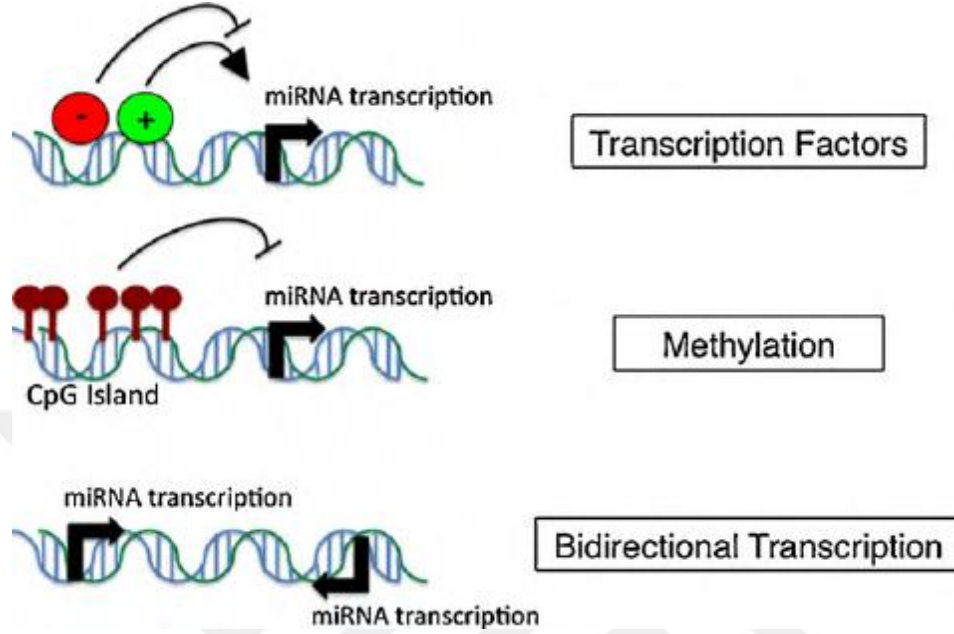
- 1-DNA bağlanma faktörleri,
- 2-Metilasyon ve epigenetik kontrol,
- 3-MiRNA' nın çift taraflı transkripsiyonu.

İlk olarak direk promotora bağlanıp miRNA ekspresyonunu düzenleyen az sayıda düzenleyici faktör tanımlanmıştır. MiRNA transkripsiyonu promoter seviyede düzenlenir. Örneğin transkripsiyon faktörleri olan c-myc ve p53 miRNA promotor bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu değiştirebilir (Breving and Esquela-Kerscher 2010).

İkinci olarak miRNA gen bölgeleri epigenetik kontrol altındadır ve DNA metiltransferazlar tarafından (DNMT1, DNMT3b) hücre tipine ve belirli şartlara göre CpG adalarından metilenirler (Breving and Esquela-Kerscher 2010, Krol ve ark. 2010). Son çalışmalar göstermiştir ki, memeli miRNA' larının yaklaşık % 5-10' u epigenetik olarak kontrol edilmektedir (Brueckner ve ark 2007, Han ve ark. 2007, Lujambio ve ark. 2008, Saito ve ark. 2006, Toyota ve ark. 2008).

Üçüncü olarak da, son çalışmalar göstermiştir ki miRNA genlerinin çift taraflı transkripsiyonu onların biyolojik aktivitelerini düzenlemede katkıda bulunmaktadır. Zıt zincirden tek miRNA lokusunun eş zamanlı transkripsiyonu, polimeraz komplekslerinin çarpışmasıyla transkripsiyonal susturmaya neden olabilir yada büyük RNA-RNA

birleşmeleri ile transkripsiyon sonrası susturmaya sebep olabilmektedir (Breving and Esquela-Kerscher 2010).



Şekil 2.2. MicroRNA' nın transkripsiyonunun düzenlenmesi (Breving ve ark. 2010)

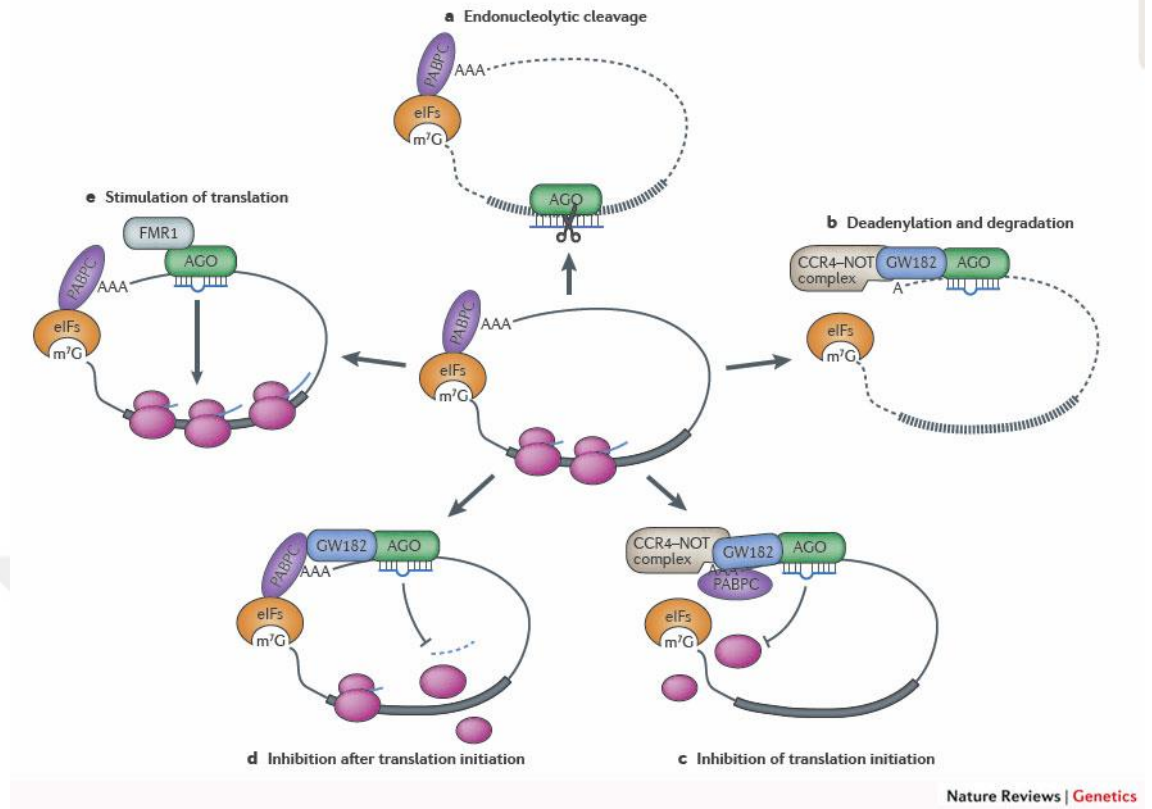
2.1.3. Olgun MiRNA' nın işlevleri ve Hedef mRNA' yı Düzenleme Mekanizmaları

MiRNA' lar hedef mRNA' ları ile, yüksek oranda korunmuş ve tohum (seed) adı verilen 6-8 nükleotidlik bir bölge sayesinde etkileşirler (Karginov ve ark. 2007). Hedef mRNA ile miRNA' nın komplementerlik oluşturması, miRNA' nın 5' ucunun 2. ve 8. nükleotitleri arasında eşleniklik olması hedefin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Lewis ve ark. 2003). MiRNA' lar hedef mRNA' ya kısmi komplementerlik veya tam komplementerlik şeklinde bağlanırlar. Hedef mRNA' nın translasyona uğramayan 3' bölgesi (3'UTR- 3'untranslated region) bölgesi ile miRNA tohum dizisi arasındaki eşlenikliğin düzeyi miRNA' nın mRNA' ya nasıl bağlanacağını belirler (Hutvagner ve Zamore 2002). MiRNA' ların hedef mRNA üzerinde bağlanma bölgeleri genellikle 3'UTR' dedir, ama 5'UTR' yi veya açık okuma çerçevesini (ORF- open reading frame) hedef aldıkları durumlarda söz konusudur ve bu şekilde de gen ifadesi baskılanır (Lewis ve ark. 2005). ORF bölgesi içine bağlanma tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2)' nin katalitik bölgesi tarafından

mRNA' nın içsel yıkımı ile sonuçlanır (Pillai 2005, Saydam ve ark. 2011). MiRNA' ların bu mekanizması bitkilerde çok yaygın olarak görülmektedir (Pasquinelli 2012).

Memelilerde genellikle miRNA' lar hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesine kısmi komplementerlikle bağlanır. Bu bağlanma, translasyonun baskılanması yada deadenilasyon vasıtasıyla mRNA degradasyonu ile sonuçlanır. Eğer bağlanma 3'UTR değilde ORF bölgesinde ise bağlanma tam komplementerlik şeklindedir ve mRNA yıkımı ile sonuçlanır (Liebman ve ark. 1984). GW182 proteini (glysin triptofan protein of 182 kDa) amino ucuyla AGO2 proteinine karboksil ucuyla ise PABP (poli A binding protein) ile etkileşir ve bu etkileşimin sonucunda deadenilaz olan CCR4-NOT ve CAF1 proteinlerini çağırır. Bu proteinlerinde mRNA'ya bağlanması ile mRNA' nın poly A kuyruğu kaldırılır ve mRNA ekzonkleazlara açık hale gelerek degrade olur. Ayrıca GW182 proteini translasyonun baskılanmasında görev alır (Eulalio ve ark. 2009, Krol ve ark. 2010, Pasquinelli 2012). Yani özetle, diziler arası eşleşme kısmi ise, translasyonel bir baskılama olur ve bu, aynı zamanda P cisimcikleri adı verilen yapıların oluşumuyla mRNA'ların degradasyonuna ile sonuçlanır, bağlanma tam ise mRNA' nın yıkımı ile sonuçlanır (Zamore ve ark. 2000).

Translasyonun baskılanma mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsada, hedef genin mRNA seviyesi artarken, protein seviyesinin değişmediği gözlenmiştir, bu nedenle de baskılamanın translasyonel seviyede gerçekleştiği düşünülmektedir (Wightman ve ark. 1993, Olsen ve Ambros 1999). Bir çok çalışma, translasyonel seviyede düzenlemenin, translasyonun başlangıcında gerçekleştiğini göstermiştir (Humphreys ve ark. 2005, Mathonnet ve ark. 2007, Thermann ve Hentze 2007, Wakiyama ve ark. 2007). MiRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelliyor olması muhtemel gözükmemektedir (Nissan ve Parker 2008).

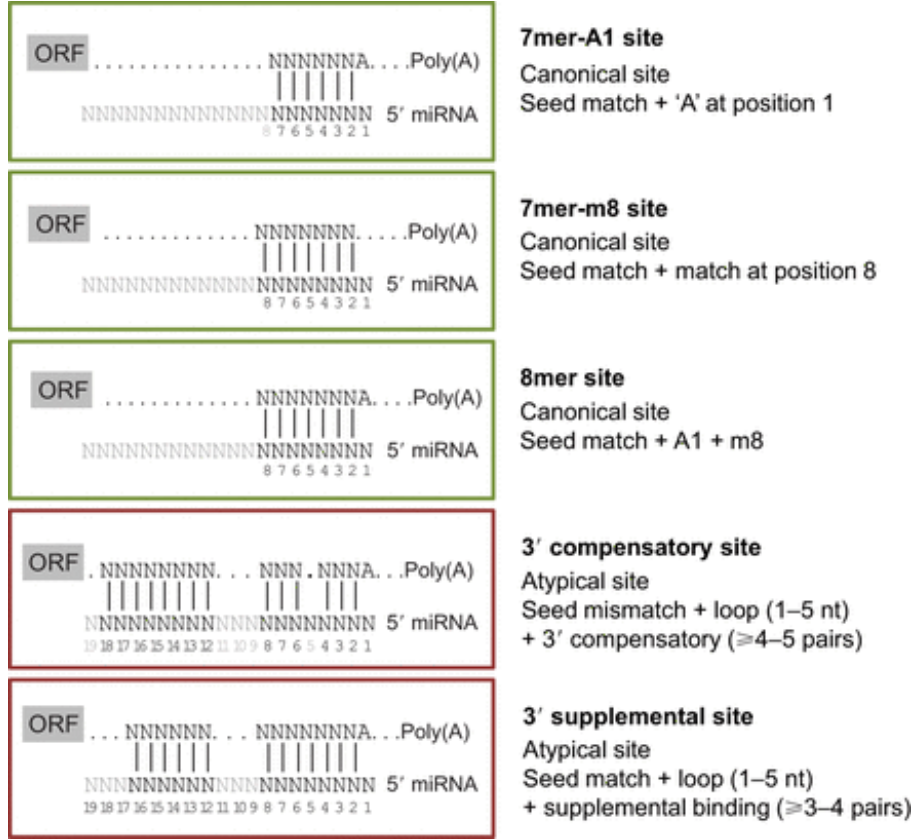


Şekil 2.3. MicroRNA'ların hedeflediği mRNA'ları düzenleme mekanizmaları(Pasquinelli 2012)

2.1.4. MiRNA'ların Hedef mRNA İle Eşleşmesi ve Uyuşum Dizileri

Olgun mikroRNA'lar, hedef mRNA'larına 5' uçlarındaki 2 ve 7. nükleotitler arasındaki altı nükleotitlik sekansları aracılığı ile bağlanırlar. Bu bölgeye seed (tohum) adı verilir. Hedef mRNA'yı baskılamak için seed bölgesindeki 6-8 nükleotidlik komplementer sekansın yeterli olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. 6 nükleotitten oluşan seed bölgesinin, mRNA ile komplementer olma durumuna göre 4 farklı bağlanma tipi bulunmaktadır (Barbarotto ve ark. 2008). 6mer dizi sadece seed bölgesindeki 6 nükleotitlik eşleşme ile karakterizedir. 7mer-A1 dizide seed bölgesinde nükleotit eşleşmesi ve miRNA'nın 1. nükleotitinin karşısında A nükleotitin bulunması gerekir. 7mer-m8 dizide seed bölgesindeki nükleotit eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması gereklidir. 8mer dizide seed bölgesindeki nükleotit eşleşmesi ile miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması ve miRNA'nın 1.nükleotitinin karşısında A nükleotitin olması ile karakterizedir (Barbarotto ve ark. 2008, Takaya ve Pal 2010).

Genelde miRNA' lar mRNA' ların 3'UTR bölgesine bağlanmayı tercih ederler fakat mRNA' nın ORF bölgesine yada daha farklı bölgelerine bağlanan miRNA' larda vardır. Genelde AU açısından zengin ve katlanmaların olmadığı yerlere bağlanmayı seçerler (Pasquinelli 2012).



Şekil 2.4. Hedef mRNA ve miRNA' ların seed (tohum) dizileri (Friedman ve ark. 2009)

2.1.5. MicroRNA' ların Kansere İlişkisi

MiRNA' ların kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu ile ilgili yapılan ilk çalışma Calin ve ark. (2001) KLL' li hastalar ile yaptıkları çalışmadır. Michael ve ark. (2003) ilk olarak insanlardaki katı tümörlerde, normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA' ları raporlamışlardır. Yapılan birçok çalışmayla miRNA' lar ile bazı kanser tipleri arasında ciddi ilişkiler bulunmuştur. Calin ve ark. (2004) miRNA' ların büyük çoğunluğunun kanserle ilişkili genomik bölgelerde lokalize olduğunu, Lu ve ark. (2005) miRNA ekspresyonlarının kanser hücreleri ile normal hücreler arasındafarklı olduğunu bildirmiştir. Son yapılan çalışmalar miRNA ekspresyon profillerinin kanser gibi birçok hastalıkta da değişiklik gösterdiğini

bildirmiştir (Nakahara ve Carthew 2004, Aagaard ve Rossi 2007). Günümüzde yapılan bir çok çalışmanın sonucuda, neredeyse tüm kanserlerde miRNA' ların anormal ekspresyonlarına işaret etmektedir (Guarnieri ve DiLeone 2008).

Schrauder ve ark. (2012) kontrol olarak 57 sağlıklı birey ile birlikte 48 meme kanseri hastasından tam kanda mikroarray temelli miRNA profillemesi yaptılar. Kanserli hastalardaki 59 mikroRNA sağlıklı kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında tam kanda, anlamlı şekilde farklı miktarlarda eksprese edildiğini buldular. Bunun yanı sıra, son zamanlarda solid tümörler ile normal dokular arasındaki miRNA ekspresyon profillerinin mikrodizin yöntemiyle karşılaştırılması sonucunda karsinogenez süreci ile ilişkili olabileceği düşünülen birçok miRNA tanımlanmıştır. Volinia ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada, altı solid tümör (Meme, Kolon, Akciğer, Pankreas, Prostat, Mide) ile kendi normal dokularından oluşan 540 örneğin miRNA ekspresyon profillerinin mikrodizin ile karşılaştırılması sonucunda en az üç solid tümör tipinde regülasyonu artan 21 miRNA genini rapor etmişlerdir.

Marie-Charlotte ve ark. (2014), hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, metastatik kanser hücreleri ile primer tümör arasında miRNA ekspresyon profillerinde farklılıklar olduğunu rapor ettiler. Bu durum karsinogenez sürecinin farklı aşamalarında da farklı miRNA ekspresyon seviyelerinin olabildiğini gösterdi (Bağcı 2014).

Bunun yanı sıra yine yapılan bazı çalışmalar, miRNA' lar ile bazı kanser türlerinin yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Lu ve ark. (2005) yaptıkları birçok çalışma ile normal dokular ile kanser dokuları arasında miRNA ekspresyon profillerinin farklı olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalar, meme kanseri olan insan ve farelerde, mikroçip teknolojisini kullanarak miRNA gen seviyelerini profilemişler ve meme kanseri örnekleri, normal dokuyla karşılaştırıldığında, anormal miRNA ekspresyonunun olduğunu rapor etmişlerdir (Liu ve ark. 2004, Shenouda ve Alahari 2009, Yu ve ark. 2010).

Calin ve ark. (2004), her bir dokunun kendine özgü bir miRNA gen ekspresyon profili olduğunu bildirmişlerdir. Bilinen insan matür miRNA' ların yarısının kanserle ilişkili

genomik bölgede veya fragil bölgelerde lokasyon göstermesinin kanserle yakından ilişkili olabileceğini bildirmiştir.

Yakın tarihli iki yeni çalışma da bu görüşleri doğrular nitelikte; insan meme kanserinde bir dizi miRNA' nın düzensiz olduğunu göstermiştir (Iorio ve ark 2005, Volinia ve ark. 2006). Üçüncü bir çalışma, bir dizi miRNA' nın meme tümörü biyopsilerinde farklı şekilde eksprese edildiğini ve miRNA ekspresyonunun HER2 ve östrojen reseptör (ER) durumuyla korele olduğunu rapor etmiştir (Mattie ve ark. 2006). Tüm bu çalışmalar ışığında, daha yeni keşfedilmelerine rağmen, miRNA' lar ve insan kanseri arasındaki kuvvetli bağlantılar ortaya çıkmıştır (Miska 2005).

Meme kanserinde eksprese olan miRNA' lardan bazılarının tümör süpresör (TB-miR) olarak görev yaparken, bazılarının ise onkogenik (Onko-miR) olarak görev yaptığı yapılan profillemeye çalışmalarıyla ortaya konulmuştur. Dolayısıyla, tümör oluşumu ya tümör süpresör miRNA' ların redüksiyonu (baskılanması) veya down-regülasyonu ya da onkogenik miRNA' ların amplifikasyonu veya overekspresyonuyla oluşur. Ayrıca tümör metastazında da miRNA' ların etkisi olduğu düşünülmektedir. Tümör oluşumu prometastatik miRNA' ların artmış ekspresyonuyla ve/veya anti-metastatik miRNA' ların downregülasyonu ile gerçekleşmektedir (O'Day ve Lal 2010). Bu da miRNA' ların tümör progresyonu, metastazı ve invazyonunda, modülatör (düzenleyici) olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Nicoloso ve ark. 2009). Tümör süpresör miRNA' ların aksine, onkogenik miRNA' lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı yönde fonksiyon gösterirler (Tam ve ark. 1997). MikroRNA' lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA' ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir (Cowland ve ark. 2007).

Çoğu miRNA' ların genom üzerinde bulunduğu bölgeler ve ifadenme profilleri göz önüne alındığında karsinogenezde kilit rollere sahip olabileceği öngörülmüştür (Sevignani ve ark. 2006, Calin 2009). Belirli bir tümörde birçok genin ifadenme profili robotik teknolojiler kullanılarak (microarray) çıkarılabilmekte ve neredeyse çalışılan tümörün imzası (parmak izi) belirlenebilmektedir (Aqeilan ve ark. 2009). Ayrıca, değişime uğramış miRNA ekspresyon düzeyleri, tümörün oluşum aşamaları,

gelişim aşamaları, proliferasyon kapasitesi ve invazyon gibi önemli özellikleri için biyomarker olarak kullanılabilir. MiRNA' lar, kanserin erken tanısında ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli faydalar sağlayacağı ortaya konmuştur (Faruk ve ark. 2011).

Kanserdeki miRNA düzensizlikleri epigenetik ve genetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Davalos ve ark. 2012). MiRNA' ların ekspresyon profillerindeki değişimler çeşitli tümörlerde ayırıcı tanı olarak kullanılmaktadır (Lu ve ark. 2015). Ayrıca 200 adet miRNA' nın kanserlerin sınıflandırılmasında kullanılabileceği ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Meme ve diğer birçok kanserin tanısında, bu hastalıklarla ilişkili ncRNA' lar tanının konmasına yardımcı olabilecek araçlar olarak kullanılabilecektir (Swanton ve Caldas 2009). NcRNA' lar ile farklı birçok hastalık arasındaki ilişki ve ilkel hayvanlarda RNAi temelli çalışmalar sayesinde gelişen gen susturuma çalışmaları, RNA' ların tedavi ajanları olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Taft ve ark. 2010). RNA temelli ilk tedavi çalışmaları in vitro insan hücre hatlarında yapılmıştır (Elbashir ve ark. 2001). MiRNA' ların onkogen olarak görev yaptığı hastalıklarda, miRNA antisense oligonükleotitleri (ASO) kullanılır ve böylece miRNA ekspresyonu azalır veya fonksiyonu baskılanır. MiRNA ekspresyonunu arttırmak için tümör baskılayıcı olarak işlev gören ncRNA' lar üzerindeki epigenetik susturmanın kaldırılması düşünülmektedir. Bunun sonucunda ifadesi artan miRNA' ların tumor gelişimini durdurduğu ve programlı hücre ölümünü tetiklediği rapor edilmiştir (Saito ve ark. 2006).

2.1.6 Mir-22-3p

Oldukça korunmuş olan insan miR-22 geni, kromozom 17 nin c17orf91 olarak adlandırılan bölgesinin 5'UTR bölgesinde lokalizedir. Burası kırılğan, kansere bağlı bir genomik bölgedir (Lagos-Quintana ve ark 2001, Calin ve ark. 2004, Chang ve ark. 2008). Yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğundadır ve hedef mRNA' nın 3' UTR bölgesine bağlanarak post transkripsiyonal gen susturmada görev alır. Meme kanserinde downregülasyon gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve ark. 2010).

Önceki yapılan çalışmalara göre, çalışılan sınırlı sayıda meme kanser örneklerinde HER2+ ile HER 2- meme kanseri örnekleri karşılaştırıldığında mir-22 ekspresyonunun HER 2 +’ de HER 2-‘ e kıyasla daha düşük olduğu, ER+ ve PR+ meme kanseri örneklerinde ER- ve PR- meme kanseri örneklerine kıyasla ekspresyonunun daha yüksek olduğu, basal tip ve triple negatifte ise ekspresyon seviyesinin bilinmediğini göstermiştir (Mattie ve ark. 2006).

Son dönemlerde araştırmacılar mikroRNA’ ların kanser gelişiminde çok önemli roller oynayabileceklerini bulmuşlardır. Birçok klinik örnekte mir-22 ekspresyonu ile ER protein ekspresyonu arasında ters ilişki olması bunu doğrulamıştır. Estrojen reseptör, çeşitli genlerin ifadesini düzenler, hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini uyararak kanserin oluşmasına sebep olmaktadır. Şimdiye kadar yapılan bütün çalışmalar ve deneysel veriler, ER α ’ nın mir-22’ nin direk hedefi olduğunu göstermektedir (Zhu ve ark. 2012). Mir-22, ER α pozitif insan meme kanseri hücre hatlarında sıklıkla downregülasyon göstermektedir. Meme kanseri hücre hatları arasında yapılan incelemelerde mir-22 ekspresyonu ER α -pozitif hücre hatlarında (MCF-7 gibi), ER α -negatif hücre hatlarına göre (MDA-MB-231, SKBR-3) daha düşük bulunmuştur (Xiong ve ark 2010).

Tümör supresör Mir-22’ nin ekspresyonu sürekli olarak metastatik meme kanser hücrelerindedeki down regülasyon göstermektedir (Patel ve ark. 2011, Zhu ve ark. 2012). Yapılan bir çalışmada, mir-22, estrojen reseptörün önemli bir regülatörü olarak düşünülmüştür ve ER-pozitif insan meme kanseri hücre hatlarında ve klinik örneklerde down regülasyon göstermesi bu durumu kanıtlamıştır (Xiong ve ark. 2010). Önemli bir şekilde, hsa-miR-22’ nin ER’ yi düzenlediği gösterilmiştir (Pandey ve Picard 2009).

Ayrıca, mir-22’ nin yüksek ekspresyonu meme kanser hücrelerinin, metastasını, invazyonunu ve proliferasyonunu CD147’ yi hedefleyerek, in vivo ve in vitro olarak baskılar (Kong ve ark. 2014). Bu nedenle, mir-22 tümör supresör olarak fonksiyon gösterebilmektedir (Xiong ve ark. 2010). Ayrıca mir-22 farklı kanser türlerinde farklı ekspresyonlar göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, prostat kanserinde over ekspresyon gösterirken meme kanseri ve diğer bazı kanser türlerinde downregülasyon gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve ark. 2010).

Ayrıca, Mir22' nin kanserde önemli bir tedavi edici hedef olabileceği bildirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda GLUT-1' in mir-22' nin direk hedefi olduğu bulunmuştur. Mir-22' nn ektopik ekspresyonu GLUT-1' i hedefleyerek meme kanser proliferasyonu ve invazyonunu inhibe etmektedir. Meme kanseri doku örneklerinde, mir-22 ve GLUT-1 ekspresyonları arasında ters bir korelasyon gözlenmiştir (Chen ve ark. 2015).

Çizelge 2.1. Hsa-mir-22-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şekli (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000078, 2017)

Hsa-mir-22-3p Dizilimleri	
Mir-22	GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUAUGUCCUGACCCAG CUAAAGCU GCCAGUUGAAGAACUGUUGCCCUCUGCC
Mir-22-3p	aagcugccaguugaagaacugu
Mir-22-5p	aguucuucaguggcaagcuua
Mir-22 sap ilmik dizilimi (pre-miR-22)	
	u cc - a u ccu
5'	ggc gag gcagu <u>aguucuucaguggcagcuua</u> gu g
	a
3'	cgc cuc cgugucaagaaguuaccgucgaaau cg c
	u -c g - - acc

2.1.7. Mir-103a-3p

Mir-103a-3p (mir-107 ile paralog) gen regülasyonunda görev alan bir noncoding RNA' dır. Mir-103a-3p ve mir-107' nin insanda tahmini ve deneysel olarak bulunduğu teyit edilmiştir. (Mourelatos ve ark. 2002). Mir103a-3p evrimsel olarak korunmuş önemli bir miRNA' dır ve birçok hücrel süreçlerle örneğin; hücrel bölünme, hücrel metabolizma, angiogenesis vs. ilişkilidir (Finnerty ve ark. 2010).

Mir-103-3p' nin değişmiş ekspresyonu çeşitli kanser, Alzheimer hastalığı, ve diabet gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Martello ve ark. 2010, Yao ve ark. 2010, Trajkovski ve ark. 2011). Mir-103a-3p ayrıca hücre çoğalması ile ilişkili bulunmuştur

(Liao ve Lönnerdal 2010). MiR103a-3p' nin fonksiyonları çeşitli kanser hücre hatlarında incelenmiştir. Mir103a-3p' nin ekspresyonu farklı kanser türlerinde farklı ifade seviyeleri göstermektedir (Boren ve ark. 2008, Zhu ve ark. 2012, Liu ve ark. 2013, Chakraborty ve ark. 2013, Wang ve ark. 2014, Scheffer ve ark. 2014). Kolorektal kanser hücrelerinde, mir103a-3p' nin apoptozu teşvik eden bir gen olan PER3' ü (Hong ve ark. 2014) ve tümör süpresör genlerden olan DICER ve PTEN' i hedeflediği bulunmuştur (Geng ve ark. 2014). Martello ve ark. (2010) mir103a-3p ve mir-107 ailesinin, DICER' i kodlayan mRNA' nın direk hedefi olduğunu rapor etmişlerdir.

MiR-103/107 ve DICER' in ekspresyon seviyelerinin birkaç kanser hücre hattında ve direk olarak meme kanseri hastalarından alınmış ve üretilmiş doku örneklerinde ters korelasyon gösterdikleri bulunmuştur. Bu bulgular şunu ima eder, mir103/107 birden fazla gene etki ederek hala tanımlanmamış ve metastasla ilişkili diğer mRNA moleküllerinin fonksiyonlarını düzenliyor olabilir. Araştırmacılar ayrıca, hareketliliği artmış in vitro meme kansinom hücrelerinde mir103/107' nin overekspresyonunu keşfetmişlerdir ve ayrıca, mir103/107' nin inhibisyonu yada DICER' in overekspresyonu in vitro da agresif meme kanser hücre hatlarının hareketliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Martello ve ark. 2010). Bu; mir103a-3p ve mir-107' nin DICER' in ekspresyonunu azaltarak hücre hareketliliğini arttırdığını ima eder. Martello ve ark. (2010) çalışmaları sonucunda DICER post transkripsiyonel olarak mir103/107 tarafından baskılanıyor olabilir. Mir-103a-3p özellikle meme kanserinde proliferasyon ve tümöregenezisin kontrolünde görev almaktadır (Iliopoulos ve ark. 2010, Martello ve ark. 2010, Farazi ve ark. 2011). Ayrıca mir-103a-3p meme kanserinde agresiflik ve antineoplastik (antikanser) terapilere dirençlilikte etkileyici rol alır (Di Leva ve ark. 2010, Iliopoulos ve ark. 2010, Martello ve ark. 2010, Farazi ve ark. 2011).

Kanser hastalarında yüksek mir-103a-3p seviyesi önemli ölçüde klinik aşama ve lenf nodu metastası ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, kanser hastalarındaki Mir-103a-3p' nin serumdaki ekspresyon seviyesi normal hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bundan yola çıkarak, serum mir-103a-3p potansiyel diagnostik bir marker olarak meme kanserinde işlev görebilir ve hastaların klinikpatolojik özellikleri hakkında faydalı bilgiler verilebilir (Wang ve ark. 2012).

Çizelge 2.2. Has-mir-103a-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şekli
(http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000101, 2017)

Hsa-mir-103a-3p Dizilimleri
Mir-103 UACUGCCCUCGGCUUCUUACAGUGCUGCCUUGUUG CAUAUGGAUCAAGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGAAGGCAUUG
Mir-103a-3p agcagcauguacagggcuauga
Mir-103 sap ilmik dizilimi (pre-miR-103)
uac c -- u u c u g a 5' ugcc uc ggcu cu uacagucugc uug u c u 3' acgg agucgggauguacgacgaac a g a guu a ua - c - u g u

2.1.8. Mir-107

Mir-107 geni 10. kromozomda bulunur ve 87 bp uzunluğundadır Has-mir-107 ENSG00000198997 geninin bir ürünüdür ve bir ENST00000362127 transkripti vardır. Precursor mir-107 81 bp uzunluğunda olup, bu gen tarafından transkribe edilir. Mature miRNA ise 23 bp'lık bir uzunluğa sahiptir ve intronları yoktur (Sharma ve Sharma 2013). Mir-107' nin ileri meme kanserli hastalardan alınan malign dokularda yüksek ekspresyon gösterdiği rapor edilmiştir (Chen ve ark. 2011).

İnsan meme kanserinde miR-103/107' nin yüksek seviyesi metastaz ve kötü sonuç ile ilişkilidir. Mir-103/107' nin vitro da göç kapasitesi sunar ve in vivo olarak agresif olmayan hücrelerin metastatik yayılmasına izin verir. Mir 103/107' nin inhibisyonu malign hücrelerin migrasyon ve metastasına engel olur (Martello ve ark. 2010).

mir103 ve 107 premetastatik miRNA' larıdır ve bu nedenle de yüksek ekspresyon seviyeleri meme kanserinde metastas ve kötü sonuç ile ilişkilendirilmiştir (Martello ve ark. 2010).

Martello ve ark (2010) mir-107' nin upregülasyonunun beklendiği gibi DICER' ın knockdown edilmesi ile global hücrel miRNA' larda düşüşe sebep olduğunu gösterdi. DICER enziminin transkripsiyonunun mir-103a-3p ve mir-107 ile düzenlendiği çalışmalarla gösterilmiştir (Blenkiron ve ark. 2007, Cheng ve ark. 2009, Grelier ve ark. 2009).

Mir-107 meme kanserinde kötü sonuç ve metastazla ilişkilidir. Mir-103a-3p ve mir-107 tarafından down regülasyona uğrayan DICER-1 enzimi, non metastatik meme kanser hücrelerinin metastaz potansiyelini arttıran önemli bir anahtar olarak bulunmuştur (Martello ve ark. 2010).

Mir-103 ve mir-107' nin inhibisyonu malign hücrelerde inhibisyon ve metastaza son vermektedir (Ventura ve ark. 2008).

Martello ve ark. (2010) miR-103/107' nin DICER' i kodlayan geni hedefleyerek global miRNA biyosentezini zayıflattığını ve bunda miRNA' ların tamamının down regülasyonuna yol açtığı bulmuşlardır.

Çizelge 2.3. Has-mir-107' nin dizilimi ve sap ilmik şekli
(http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000114, 2017)

Hsa-mir-107 Dizilimleri
Mir-107 CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCCUUGUGGCAUGGAGUUCA AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCAAAGCACAGA
Mir-22-3p agcagcauuguacagggcuauca
Mir-107 sap ilmik dizilimi (pre-miR-107)
<pre> c c --c u u c u a 5' ucu ugcuuu agcu cu uacaguguugc uug ggc u g 3' aga acgaaaucgggaauguuacgacgaac uug g - c cua - c - - a</pre>

2.2. GLUT Genleri ve İşlevleri

Lipid içerikli hücre membranı glukoza geçirgen değildir. Glukozun polar yapılı hücre membranından geçebilmesi için değişik taşıyıcılara ihtiyaç vardır. Bu nedenle glukoz hücre içerisine protein yapısındaki değişik taşıyıcılar ile girer ve çıkar. Bu taşıyıcı proteinler sodium-glucose co-transporter (SGLT) ve glucose transporters (GLUT) olarak adlandırılır (Marsenic ve ark. 2009).

Glukozun plazma membranından geçişi glukoz metabolizması için ilk hız sınırlayıcı adımdır ve kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları (GLUTs) tarafından gerçekleştirilir. Protein sembolü GLUT gen sembolü SLC2 (Henderson 1993). Glukoz transporter ailesinin 14 tane üyesi tanımlanmıştır. Bu genler, çözülmüş madde taşıyıcıları ailesi (solute carrier) SLC2A içinde yer almaktadır. Glukoz taşıyıcıları doku dağılımlarına göre farklılık gösterir ve her taşıyıcı protein glukoz ve diğer hekzoslara karşı (örneğin fruktoz) farklı afiinitelere sahiptir (Macheda ve ark. 2005, Thorens ve Mueckler 2010). GLUT ailesi 3 alt gruba ayrılır. Sınıf I glukoz taşıyıcılar; GLUT1-GLUT4' ü içerir. Sınıf II fruktoz taşıyıcılar; GLUT5 (SLC2A5) ve GLUT7 (SLC2A7), 9 (SLC2A9), 11 (SLC2A11)'i

içerir. Sınıf III GLUT6 (SLC2A6), 8 (SLC2A8), 10 (SLC2A10), ve 12 (SLC2A12) ve ayrıca H⁺/myoinositol taşıyıcısı HMIT (SLC2A13)' ü içerir (Uldry ve Thorens 2004). Farklı glukoz taşıyıcıları dokuya özgüdür ve dokudan dokuya farklı dağılımlar gösterir. Genelde hücreye özgüdür (Thomas de Montpréville ve ark. 2015).

Glukozun bir bölgeye bağlanması, taşınımıyla ilgili şekilsel bir değişime neden olur ve glukoz membranın diğer tarafına bırakılır ve taşınmış olur. İçerde ve dışardaki glukoz bağlanma bölgeleri transmembran segmentlerde lokalizedir (Gorga ve Lienhard 1981, Lowe ve Walmsley 1989, Carruthers ve ark. 2009).

GLUT-1 taşıyıcısının varlığı tümör ve inflamatuvar dokuların FDG (Fluoro 2 Deoxy Dglucose)' yi tutup görüntülenmesi açısından önemlidir. Çünkü FDG temel olarak GLUT-1 tarafından taşınmaktadır (Bachelard 1972).

Kanser hücrelerinin metabolizması ile normal hücre metabolizması arasındaki fark Otto Warburg tarafından 1920' li yıllarda araştırılmaya başlanmıştır (Warburg 1930, 1956). Kanser hücrelerinde artan glukoz alımı ve glikolitik metabolizma normal hücrelerle karşılaştırılmıştır (Young ve Anderson 2008, Ganapathy ve ark. 2009). Bu gözlem ilk olarak Otto Warburg tarafından yıllar önce yapılmış ve rapor edilmiştir (Warburg 1930, 1956).

Normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki bu fark, daha sonra "Warburg fenomeni" olarak adlandırılmıştır. Warburg fenomenine göre normal hücreler sadece anaerobik şartlarda glikolizis yolağını kullanarak laktat üretirken, tümör hücreleri oksijen varlığından bağımsız olarak temel besin olarak glukozu kullanıp, bundan aerobik şartlar altında glikolizis yaparak laktat üretmektedir. Birçok doku için en önemli ve temel enerji kaynağı glukozdur (Vander Heiden 2011). İnsüline duyarlı dokularda glukozu asıl taşımada görevli olan GLUT-4 iken, kanser hücreleri ve diğer tüm insüline duyarlı olmayan dokularda hücre içine glukoz taşınmasını GLUT-1, GLUT-2 ve GLUT-3 sağlar. Taşıyıcı proteinler glukozu affiniteleri ve taşıma kapasitelerine göre farklılaşırlar (Kroemer ve Pouyssegur 2008, Vander Heiden 2011). GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 tanskriptlerinin miktarları çoğu kanser dokusunda yüksektir (Rivenzon-Segal ve ark. 2003).

Tümör hücrelerine has olan bu glukoz metabolizması normal hücelere göre fazla kullanım metabolizması, tümör büyümesi ve gelişmesi açısından da önemli faydalar sağlamaktadır (Kroemer ve Pouyssegur 2008, Vander Heiden 2011).

2.2.1. GLUT Genlerinin Kanslerle İlişkisi

Kanser hücrelerinde genellikle glukoz taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu gözlenir. Bu muhtemelen gelecek süreçlerde gerçekleşecek olan kontrolsüz çoğalma ve metastaz için gerekli olacak enerjiyi sağlamak için olan bir mekanizmadır (Joost ve Thorens 2001). Kanser hücrelerinin büyümesi enerji gereksinimi olan bir durumdur. Glukoz alımında artış gereklidir. Glukoz taşıyıcıları ile ilgili yapılan birçok çalışmada bugüne kadar tanımlanan 13 adet glukoz taşıyıcısı transmembran GLUT (SLC2A; glukoz transporter) proteinleri halen 3 grup halinde sınıflandırılmakta ve bunlardan en yaygını GLUT-1 olarak kabul edilmektedir (Salas-Burgos ve ark. 2004, Vander Heiden 2011). GLUT-1, en fazla bulunan üyedir ve dokuya özgüdür ve çoğu fetal ve erişkin memeli hücre ve dokusunda bulunmaktadır. GLUT-1 mRNA ekspresyonu tüm erken gelişim evrelerinde gösterilmiştir. Daha sonraki evrelerde dağılım dokuya göre değişir (Castello' ve ark 1994, Thomas de Montpréville ve ark. 2015). Meme, akciğer, kolon, serviks, over ve mide karsinomu gibi birçok kanser türünde GLUT-1' in yüksek ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (Brown ve Vahl 1993, Ogawa ve ark. 1997, Haber ve ark. 1998, Rudlowski ve ark. 2004, Cantuaria ve ark. 2001). Bunlardan bazılarında ekspresyon artışı, kötü prognoz, lenf nodu metastazı ve mortalitede artış ile ilişkilendirilmiştir (Younes ve ark. 1996, Roh ve ark. 2009).

Tüm bunlardan yola çıkılarak meme kanser hücre hatlarında, normal ve insan meme kanser dokularında glukoz taşıyıcılarının ifadeleri ve fonksiyonları araştırılmıştır (Salas-Burgos ve ark. 2004).

Sadece tümör hücrelerine özgü olan bu glukoz metabolizması, tümör büyümesi için önemli avantajlar sahiptir. Bu avantajlar şunlardır; hücreler, değişen oksijen düzeyinden etkilenmeden yaşamlarını ve gelişimlerini devam ettirebilirler. Anaerobik glikolizis ile tümör hücreleri, laktat oluştururlar. Bu oluşturulan laktik asit tümör mikroçevresinde

asidik bir ortam oluşturur ve böylelikle tümör invazyonunu kolaylaştırır. Ayrıca tümör hücrelerinin oluşturduğu laktik asit, ortamda stromal hücreler tarafından alınarak pürivata çevrilir. Stromal hücreler tarafından oluşturulan piruvat başka işlevlerde kullanılacağı gibi, besin olarak kanser hücresine de verilebilir. Böylece tümörün büyümesi ve gelişmesi için gerekli enerji sağlanır. Kanser hücresi, glukozu pentoz fosfat yolağı ile metabolize edebilmektedir. Tümör hücreleri bu sayede hücreyi kemoterapötiklere karşı koruyan bir antioksidan olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oluşumunu sağlamaktadır (Kroemer ve Pouyssegur 2008, Vander Heiden 2011).

2.2.2. GLUT-1 (SLC2A1)

Glukoz transporter-1 GLUT-1 ya da SLC2A1 olarak da bilinen ve insanda SLC2A1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Mueckler ve ark. 1985). En yaygın eksprese olan heksoz transporterı birçok hücre tipinde temel glukoz taşıma görevini sürdüren GLUT-1 dir (Manolescu ve ark. 2007, Zhao ve Keating 2007). GLUT-1 memelilerde glukozun plazma membranından hücre içine kolaylaştırılmış transportundan görevlidir (Olson ve Pessin 1996).

Fizyolojik olarak sentez edilen ve immünohistokimyasal olarak, glukoz kullanan tüm hücre ve dokularda saptanabilir (Zimman ve ark. 2002, Froehner ve ark. 1998). Glikoliz kanser hücresinde normal hücreye göre çok daha fazla artmıştır. Kanser hücrelerinde glukoz ihtiyaç seviyesine göre glukoz taşıyıcılarının değişik derecelerde artmış ekspresyon seviyeleri gözlenir (Cantuaria ve ark. 2000). İnsan meme kanserinde GLUT ekspresyon seviyeleri artmıştır, bu da bu hücrelerin potansiyel göç yeteneğini artırır. Yüzey GLUT-1 ekspresyonunun invazivlik yeteneği ile ilişkili olduğu görülmüştür (Grover-McKay ve ark. 1998).

GLUT-1 glukoz alımının yanı sıra vitamin C' ninde alımından sorumlu bir reseptördür (Montel-hagen ve ark. 2008). Meme kanserinde GLUT-1 ekspresyonu çok yaygın olarak çalışılmıştır (Brown ve Wahl 1993, Younes ve ark. 1995, Brown ve ark. 1996, Binder ve ark. 1997, Alo ve ark. 2001, Avril ve ark. 2001, Bos ve ark. 2002, Brown ve ark. 2002, Kang ve ark. 2002, Ravazoula ve ark. 2003).

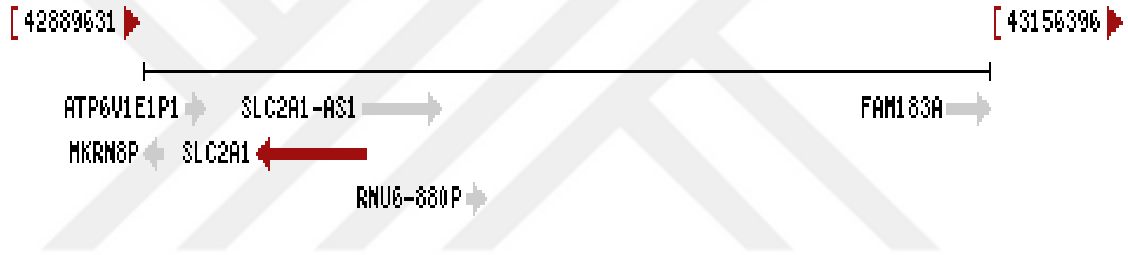
GLUT-1 ekspresyonu bir çok tümörün özellikleri ve nitelikleri ile ilişkilendirilmiştir (Younes ve ark. 1995, Ravazoula ve ark. 2003).

Birçok çalışma GLUT-1 ekspresyonunun birçok tümörde, tumor gelişimi, karsinogenez ve kötü prognozla çok yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Younes ve ark. 1996, Haber ve ark. 1998, Airley ve ark. 2001).

Meme tümör dokularında, GLUT-1 ve GLUT-3' ün yüksek seviyeleri önemli kötü sağkalım (tumor sağkalımı) göstergeleridir (Baer ve ark. 1997, Ogawa ve ark. 1997, Younes ve ark. 1997, Haber ve ark. 1998, Cantuaria ve ark. 2001, Kang ve ark. 2002). GLUT-1 malign hücrelerde poliferasyon aktivitesinin, enerji gereksinimleri ve agrasif davranışları açısından olumlu yönde etkilidir. GLUT-1 ayrıca meme kanserde dahil birçok kanser hücre tiplerinde en etkili glukoz transporter olarak görünür (Boado ve ark. 1994, Younes ve ark. 1995, 1997, Kang ve ark. 2002, Godoy ve ark. 2006, Amann ve ark. 2009).

GLUT-1 baş ve boyun yassı hücreli karsinomlarında (squamous cell carcinoma) en baskın ve en yaygın olarak eksprese olan üyedir (Kunkel ve ark. 2003). GLUT-1 geninde oluşacak mutasyonlar GLUT-1 defektine yada daha az olarak otozomal dominant bir hastalık olan DEVİVO (glukoz transporter protein sendrom) hastalığına sebep olmaktadır (Seidner ve ark. 1998). GLUT-1 patolojide sıkça kullanılan bir markerdir. Onun ekspresyonu bebeklik döneminde oluşan vasküler tumor ile diğer vasküler lezyonları ayırmak için kullanılır. GLUT-1 ayrıca perineurial (sinir liflerinin oluşturduğu demeti saran zar tabakası) hücrelerinin ve perinöra tümörlerin tanınmasında kullanılır. GLUT-1 malign mesothelioma (asbestos nedenli akciğer kanseri) da reaktif mesothelial lezyonlardan daha çok eksprese olduğu görülmüştür. Ayrıca GLUT-1' in onkolojide teröpetik hedef olabileceği önerilmiştir (Thomas de Montpréville ve ark. 2015). GLUT-1 ekspresyonu insan meme kanserinde bilinen diğer prognostik markerlarla ilişki içindedir (Younes ve ark. 1995). GLUT-1' in yüksek seviyesi beyin, meme, baş ve boyu, mesane, böbrek, kolorektal, akciğer ve over kanserlerini içeren hemen hemen tüm kanser türlerinde gösterilmiştir (Macheda ve ark. 2005). GLUT-1 ekspresyonu, akciğer, kolorektal, gastrik ve over kanserlerinde artan malignite, invazyon ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Younes ve ark. 1997, Haber ve ark. 1998, Kawamura ve ark. 2001, Sakashita ve ark. 2001, Kalir ve ark. 2002). Daha ileri

evre kanserlerinde ve poliferatif indeksi daha yüksek ve farklılaşma derecesi daha düşük derecede olan kanserlerde GLUT-1 ekspresyonu kısmen daha yüksektir. Meme kanserlerinde GLUT-1 ve GLUT-3 protein ekspresyonu çalışmaları değişken sonuçlar vermiştir. Bazı immunohistokimyasal çalışmalar, meme tümörlerinin yaklaşık % 50' sinde GLUT-1 ekspresyonu ve GLUT-3 ekspresyonu ise sadece % 25' inde tespit etmiştir (Younes ve ark 1995, Kang ve ark. 2002, Schmidt ve ark. 2010). 118 meme kanserli hastada yapılan bir çalışma tümörlerin % 42' sinde GLUT-1 ekspresyonu ve artan ekspresyonla birlikte kanserin daha yüksek derecesi ve poliferatif aktivite ile ilişkisi ispat edilmiştir (Younes ve ark 1995). Ayrıca Kang ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada GLUT-1' in östrojen ve progesteron hormon reseptörleri ile arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.5. SLC2A1 (GLUT1) geninin kromozoma yerleşimi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6513>)

2.2.3. GLUT-3 (SLC2A3)

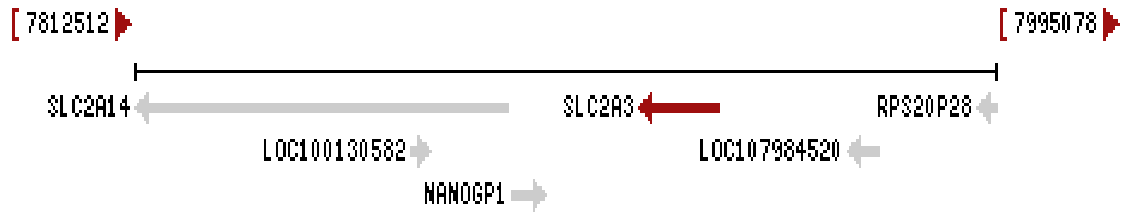
GLUT-3 keşfedilen 3. Glukoz taşıyıcısıdır, 1988' de fetal kas iskelet hücrelerinden klonlanan ilk glukoz transporterdir. GLUT-1 ile % 64.4' lük bir benzerliği paylaşmaktadır. Glukoz transporter-3 (GLUT-3), ayrıca sıvı taşıyıcı-2 ailesinin kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcı üyesi 3 (SLC2A3) olarak da bilinir. SLC2A3 geninden kodlanır (Kayano ve ark. 1988).

GLUT-3 nöron spesifik bir glukoz taşıyıcısıdır ve beyinde glukoz homeostazinden sorumludur (Lund-Andersen 1979, Pardridge 1983, Duelli veKuschinsky 2001). GLUT-3 en sık olarak nöronlarda ve plasentada eksprese olur (Illsley ve ark. 1998, Khan ve ark. 1999).

GLUT-3 memeli plazma membranından glukozun transportunu kolaylaştırır. GLUT-3 ayrıca insan malign hücrelerinde eksprese olur fakat GLUT-1 kadar sık değildir (Boado

ve ark. 1994). Oligonükleotid microarray analizleri SLC2A3' ün yüksek ekspresyonunun tümör büyüklüğü, patolojik evre ve dilde kanserin nüksetmesi ile aralarında bağlantı olduğunu ortaya çıkartmıştır (Estilo ve ark. 2009). Immunohistokimyasal olarak değerlendirilen GLUT-3 protein ekspresyonu küçük hücreli akciğer kanserinde, ağız yassı hücre kanserinde ve laringal kanserlerde kötü prognoz indikatörüdür (Younes ve ark. 1997, Ayala ve ark. 2010, Baer ve ark. 2002).

Yapılan bir çalışmada GLUT-1 ve GLUT-3 mRNA ekspresyonu meme kanser vakalarında sırasıyla % 50 (35/70) ve % 40 (28/70) olarak bulunmuştur. Normal meme dokularında ise GLUT-1 ve GLUT-3 mRNA ekspresyonu % 41.7 (15/36) ve % 13.9 (5/36) örnekte gözlenmiştir (Krzeslak ve ark. 2012). Farklı çalışmalar farklı sonuçlar vermiştir. Younes ve ark. (1997), meme kanserinde GLUT-3 ekspresyonunu ispat edememiştir. Yüksek GLUT-3 ekspresyonu meme kanserinde kötü tümör (histoloji) derecesi ile yakından ilişkilidir (Godoy ve ark. 2006). Bazı çalışmalarda ise önemli bir şekilde GLUT-3 ekspresyonu GLUT-1' e göre östrojen ve progesteron reseptör pozitif kanserlerde negatif kanserlere göre daha yüksektir. Bu sonuçlar kanserde hormonal regülasyon ve glukoz transporterlar arasındaki ilişki açısından önemlidir (Krzeslak ve ark. 2012).



Şekil 2.6. SLC2A3 (GLUT3) geninin kromozoma yerleşimi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6515>)

2.3. Meme kanseri

Meme bezi, süt üretimi görevi olan modifiye bir apokrin ter bezidir (Ellis ve Cox 1984, Weinstein 1990, MacNoughton ve ark. 1992, Hammond ve ark. 1994). Erişkin kadın normal meme dokusu epitelyal ve stromal elemanlardan oluşur. Dallanan duktus yapıları ile birleşen lobüller epitelyal komponenti oluştururken, değişik oranlardaki

adipoz ve fibröz bağ dokusu stromal komponenti meydana getirir. Yaş ve hormonal ile bağlantılı olarak meme dokusunun belirgin bir iç dinamiği vardır (Hammond ve ark. 1994).

Meme kanseri kompleks ve birkaç sebebe bağlı bir hastalıktır (Bertos ve Park 2011). Kalıtsal, ailesel ve sporadik olarak 3 gruba ayrılır. Ailede bir veya birden fazla bireyde meme kanseri görülmesi durumunda buna ailesel meme kanseri denilmektedir. Meme kanseri ile doğrudan ilişkisi bulunmuş olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon olması, ailede kişilerde kanserin erken yaşta görülmesi, ailede erkeklerde de meme kanserinin ortaya çıkması hastalığın kalıtsal olduğunu işaret etmektedir. Kalıtsal meme kanseri sahip kişilerin yaşamlarında meme kanserine yakalanma riskleri % 85 gibi çok yüksek orandır. Ailesel ve kalıtsal bir bağlantısı olmayan bu iki grubun dışında kalanlar ise sporadik (tesadüfi/rastlantısal) meme kanserlerdir (<http://www.cancer.org>, 2017). Amerikan Kanser Derneği'nin son istatistiklerine göre her 8 kadından 1 tanesinde invaziv meme kanseri gelişmektedir ve meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür, akciğer kanserinden sonra kadınlarda kanser ölümlerinde ikinci sıradadır (Rakha ve ark. 2010).

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalardır fakat yaklaşık % 5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanserleride ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumuna birçok gen eşlik eder (<http://www.expertreviews.org>, 2017). Tümör hücre anjiyogenez, dolaşımında bulunması, intravazyonu ve sürekli büyümesi metastatik sürecin içindedir. Bu süreçlerdeki moleküler ihtiyaçlar ise doku spesifik olabilmektedir. Meme karsinomlarında daha çok kemik ya da akciğer metatazı sözkonusudur (Shenouda ve Alahari 2009). Özellikle anne veya kız kardeşlerinde meme kanseri olan kadınlarda risk normale göre çok daha fazladır. Bu kişilerde hastalık yaklaşık 10-12 yıl daha erken çıkar. Kan grubu "0" olan kadınlarda benign over kistleri, meme hastalıkları ve genç yaşlarda meme kanseri gözlenmektedir diğerlerine göre daha fazla gözlenmiştir (Topuz Erkan ve ark. 1997)

Hereditör bazı sendromların ortaya çıkmaından dolayıda meme kanserinin oluşma sıklığı artar. Bu sendromların bazıları: Li-Fraumeri sendromu, Hereditör meme-over

kanseri sendromu, Cowden Sendromu, bölgeye spesifik herediter meme kanseri, Muir Sendromu vb. (Çetin ve Demirci 1995, Topuz Erkan ve ark. 1997). 20 yaş sonrasında meme kanser insidans artar ve 45-55 yaşlar arasında plato yapar, 55 yaşından sonra insidanda hızlı bir şekilde yükselme göstermektedir (Topuz Erkan ve ark. 1997)

Endojen kaynaklı östrojen fazlalığının da anlamlı bir rol oynadığı düşünülmektedir (Wittliff 1984). Özellikle obezite de menapoz sonrası için, kadınlarda meme kanseri için risk faktörüdür (Harvie ve ark 2003). Obeziteye bağlı hormonal değişimlerin özellikle östrojen üretimindeki yükselişe bağlı bir yan etki olduğu düşünülmektedir (Stephenson ve Rose 2003) Yüksek endojen östrojen seviyesinin memede menapoz sonrası karsinomanın ilerlemesini arttırdığı rapor edilmiştir. Obez kadınlarda östrojen artar, menapoz sonrası dönemde ise plazmadaki östrojen konsantrasyonu da yükselir. Östrojenlerin artışı, meme kanseri riskini arttırabilmekte, östrojen reseptör pozitif meme kanserlerinin ilerlemesini arttırmaktadır (Rose ve ark. 2004).

Yıllar geçtikçe meme kanseri görülme sıklığı artış göstermekle birlikte erken tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde ölüm oranlarında azalma görülmektedir. Sağlık Bakanlığı' nın verilerine göre Türkiye' de meme kanseri insidansının kadınlar arasında yaklaşık % 35 olduğu görülmüştür (Tuncer 2008). Ayrıca yine Sağlık Bakanlığı' nın verileri ve Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu' nun veri tabanına bakıldığında da ülkemizin batısındaki meme kanseri insidansının doğuya göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu görülmektedir (Özmen ve ark. 2009).

Östrojen hormonuna maruz kalınan süre ne kadar fazla ise meme kanseri oluşum ve gelişim riskide okadar artar, östrojene maruz kalınan süre ne kadar azalır ise risk de azalır (Hsieh ve ark. 1990, Colditz ve Rosner 1997). Özellikle 10-14 yaş arasında meme aktif olarak gelişim sürecindedir. Radyasyona maruz kalmak meme kanseri riskini arttırmaktadır. 45 yaşından sonra ise radyasyona maruz kalınırsa veya radyoterapi meme kanseri riskini etkilememektedir (John ve Kelsey 1993).

Alkol kullanımının östradiol serum seviyelerini yükselttiği bilinmektedir. Birçok çalışmada orta düzeyde alkol alımının meme kanseri insidansında % 30-50 oranında artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Terry ve ark. 2006). Yakın zamanda bu konu ile ilgili

yapılan toplum bazlı bir çalışmada, artmış alkol alımının östrojen reseptör pozitif meme kanser gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Suzuki ve ark. 2005).

2.3.1. Meme kanserinde Moleküler Subgruplar

Meme kanseri klinik, histopatolojik, steroid hormon reseptörü vb. biyolojik özellikleri ve tedaviye yanıtına göre farklılık gösteren heterojen bir tümördür (Fulford ve ark. 2006). Meme kanserinin gruplandırılmış alttipleri iki esas epitel hücre tipinde görülen gen ifade profiline göre isim almışlardır. Lüminal epitel hücreler normal meme dokusunda kanal veya lobüllerin lümenini kaplayan tek sıralı hücrelerdir. Bazal miyoepitelyal hücreler ise lüminal hücreleri çevreleyen sekonder hücrelerdir (Valentin ve ark. 2012).

Uzun yıllardır histoloji ve morfolojinin baz alındığı bir klasifikasyon kullanılmaktaydı. Fakat günümüzde aynı tedaviyi alan ve aynı histoloji ve klinik evredeki hastaların seyirlerinin farklı olabildiği görülmüş, ve bundan yola çıkılarak moleküler farklılıkların prognoz üzerine etkileri araştırmacıların yeni konusu olmaya başlamıştır. Q-RT-PCR ve mikroarray teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde artık meme kanserlerinin moleküler olarak gen ifade profilleri çıkartılmış ve bu heterojen tabloya göre de meme kanseri alt sınıfları oluşturulmuştur (Sorlie ve ark. 2001, 2003, Gusterson ve ark. 2005).

Meme kanseri, Perou ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan kapsamlı ve çok etki yaratan gen ifade analizi çalışmasıyla önce 4 gruba ayrılmıştır (Perou ve ark. 2000). Daha sonra ise luminal tip de kendi arasında luminal A ve luminal B'ye ayrılarak sonuçta 5 alt tip oluşturulmuştur (Sorlie ve ark. 2003). Son olarak 2007 yılında yapılan çalışma ile bu alt tiplere claudin low eklenmiştir. Böylece moleküler özelliklere göre meme kanseri 6 alt tipe ayrılmıştır (Herschkowitz ve ark. 2007). Klasifikasyon şu özelliklere dayanmaktadır; histolojik tip, tumor gradi, lenf nodu boyutu ve tahmini markerların örneğin ER ve HER2' nin varlığıdır (Perou ve ark. 1999, 2000).

Bu şekilde tanımlanmış subgrupların daha ileri seviyede gruplandırılıp ayrımlaştırılması da olasıdır ve buna ihtiyaçta vardır. Son yapılan çalışmalarla, HER-2+ alt grubu, klinik olarak farklı davranış biçimleri sergileyen 3 gruba ayrılmıştır, bunlardan birisi çok

agresif davranış sergilemektedir. Bu farklılık nedeniyle, HER-2 hastalarının prognozlarındaki farklılıkları açıklayabilecek belirleyiciler geliştirilmeye çalışılmıştır (Staaf ve ark. 2010).

Meme kanseri moleküler alt tipler, özellikleri ve bu özelliklere sahip farklı hücre hatları hücre hatları Çizelge 2.4' de gösterilmiştir (Neve ve ark. 2006, Prat ve ark. 2010).

Çizelge 2.4. Meme kanseri moleküler özelliklerine göre alt tiplerinin sınıflandırılması (Neve ve ark. 2006, Prat ve ark. 2010)

Classification	Immunoprofile	Other characteristics	Example cell lines
Luminal A	ER ⁺ ,PR ^{+/-} , HER2 ⁻	Ki67 düşük, genellikle kemoterapiye duyarlı	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ ,PR ^{+/-} , HER2 ⁺	Ki67 yüksek, kemoterapiye değişken olarak duyarlı, HER2 ⁺ olanlar trastusumab duyarlı	BT474, ZR-75
Basal Tip	ER ⁻ ,PR ⁻ , HER2 ⁻	Genellikle kemoterapiye duyarlı	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-low	ER ⁻ ,PR ⁻ , HER2 ⁻	Ki67, E-cadherin, claudin-3, claudinin-4 and claudinin-7 düşük. Orta derecede kemoterapiye duyarlı	BT549,MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER ⁻ ,PR ⁻ , HER2 ⁺	Ki67 yüksek, trastusumab duyarlı, chemoterapiye duyarlı	SKBR3, MDA-MB-453

Aşağıda meme kanseri moleküler alttiplerin kısaca özellikleri verilmiştir.

1-Luminal A

Estrojen reseptörü (ER) genleri yüksek ekspresyon gösterir. Progesteron reseptörü (PR) pozitifte olabilir negatif de. Ki-67 ile zayıf boyanırlar bundan dolayı proliferasyon hızları düşüktür. Luminal A human epidermal growth factor receptor (HER2) negatifirler. Luminal A grubu tümörler hormonoterapi alabilirler ve en iyi prognozlu grupturlar (Perou ve ark. 1999, 2000). Bu alt-tipteki meme kanseri hastaları diğer alt-tiplere göre ciddi biçimde düşük relaps oranına sahiptir. Relapslar farklı organ metastazları ile ortaya çıkabilir. Yüksek oranda kemik metastazı, düşük oranlarda ise merkezi sinir sistemi, karaciğer ve akciğer metastazları görülebilir (Eroles ve ark. 2012).

2-Luminal B

Luminal B tümörlerde ER+ olmakla birlikte PR pozitifde olabilir negatif de. HER2 pozitifdir ve bazal benzeri tipe daha yakındır. Luminal B tip, hormon reseptörü pozitif olan tipler içinde kötü prognozlu olan gruptur. Luminal A ve luminal B tipi kanserler meme kanserlerinin yaklaşık $\frac{3}{4}$ ' ünü oluşturmaktadır (Brenton ve ark. 2005). Ki 67 değeri yüksektir. Luminal A' da ER genleri daha fazla ifade edilirken, Luminal B' de proliferatif genlerin ifadesi daha fazladır. Luminal B grubunda ER genlerinin ifade seviyesi orta düzeydedir. Her ne kadar HER-2 negatif olsa da Ki 67 %14' den daha yüksek ise luminal A'dan ayrılır (Goldhirsch ve ark. 2011). Sağkalım açısından luminal A tümörlerinden daha kötüdür (Cheang ve ark. 2008).

ER ve/veya PR pozitif olan (luminal) tümörlerde, nüks ve mortalite riski, hormon reseptör negatif olanlardan daha düşüktür (Prat ve ark. 2013). Lumina A ve B tümörlerin her ikisinde endokrin tedavilerden fayda görseler bile, luminal A' nın prognozu luminal B' den daha iyidir (Kim ve ark. 2012, Prat ve ark. 2013).

3-Bazal tip ve/veya Triple Negatif

ER ve PR reseptörleri ve HER-2 negatiftir. Çoğunlukla Epidermal growth factor receptor (EGFR) pozitif bulunur (Cheang ve ark. 2008). Ki-67 boyanması iyi, genellikle büyük çaplı tümörlerdir. Erken uzak metastaz yapmaya eğilimlidirler. Kemoterapiye duyarlıdır, ancak prognozları kötüdür (Spitale ve ark. 2009).

Aralarında bire bir örtüşme olmasa da bazen üçlü negatif (triple negatif) tümörler olarak da adlandırılırlar. Bu isimlendirme ER, PR ve HER2 negatifliğinden dolayıdır. Üçlü negative meme kanserlerinin %80'i bazal tip özellik taşır. Proliferasyon hızları yüksektir (Nielsen ve ark. 2004).

4-HER-2 Pozitif:

HER2-pozitif alt tipte HER-2 gen ifadesi yüksektir. ER ve PR reseptörler negatiftir. Ki67 boyanması yüksektir. Lenf bezi tutulumu sıklıkla gözlenir. Kemoterapiye ve anti HER-2 tedavilere iyi yanıt verirler (Peppercorn ve ark. 2008).

HER2 gen ifade seviyesi luminal B 'ye göre çok daha fazladır. Agresif tümörlerdir.

HER2 + meme kanserinde prognoz diğer alt tiplere göre daha kötüdür. Bunun nedeni proliferasyon hızının daha yüksek olması ve metastaz potansiyelinin fazla olmasıdır (Tagliabue ve ark. 2003).

5-Normal meme benzeri

Bu grup, tümör hücre içeriği az, normal doku komponenti fazla olan örnekleri temsil ediyor gibi görünmektedir (Perou ve ark 2000).

Meme kanserlerinin % 5-10' unu normal meme-benzeri alt-tip oluşturur. Adipoz doku genlerinin ekspresyonuyla karakterizedir. Normal meme benzeri alttipinin prognozu lüminal alttiplere göre daha kötü, bazal benzeri alttiplere göre ise daha iyidir. Bunlarda bazal benzeri alttiplerdeki gibi 3' lü negatiftirler. Ancak, bazal benzeri alttipinde olduğu gibi CK5 ve EGFR genlerini eksprese etmezler. Bazı araştırmacılara göre çalışmalar esnasında tümör dokusunun adipoz doku ile fazla kontaminasyonu nedeniyle bu grubun belirlendiğini düşünmektedir (Eroles ve ark. 2012).

6-Claudin-low

2007 yılında Claudin-low adlı ayrı bir grup tanımlanmıştır. Bu tipte de üçlü negatiflik durumu vardır ancak bunlar farklı olarak meme kanseri kök hücresi özelliklerini taşır (Herschkowitz ve ark. 2007).

Bu alttip; claudin 3, 4, 7 ve e-cadherin gibi transmembran proteinleri ve adezyon moleküllerinin azlığı ile karakterizedir; buna karşılık yüksek oranda mezankimal ve meme kök hücresi benzerliği gösterirler. Çoğunun prognozu kötüdür. ER-, PR-, HER2-tümörlere de benzediği belirtilmiştir. Claudin düşük alt tip meme kanserlerinin % 5-7'sini oluştururlar (Prat ve ark. 2010).

2.3.2. Hormon Reseptörleri ve HER2/neu (cerbB2) Proteini

Reseptörler tumor hücre yüzeyinde bulunan protein molekülleridir. Bir radyo anteni gibi işlev görürler. Bu moleküller sinyal aldıkça hücreler aldıkları sinyale uygun cevabı verirler. ER ve PR reseptörleri östrojen ve progesteron hormonlarından büyüme için sinyal alır. Yapılan tedavi, hormon üretimini durdurmayı ya da reseptörlere gelen sinyalleri bloke etmeyi böylelikle kanseri kontrol altına almayı hedefler.

(<http://www.tnbcfoundation.org/State-of-the-Art%20Treatment%20for%20TNBC.pdf>).

Meme kanserlerinin gelişmesinde hormonların çok büyük rolü olduğu ve hormonların etkisi olmadan meme kanseri olmayacağı rapor edilmiştir. Reseptör pozitif tümörler hormonal tedaviye daha iyi cevap verirler ve daha iyi prognoz gösterirler. Nüks ve metastaz yönünden reseptör pozitifliğin öneminin olmadığı gösterilmiştir. Tümörde östrojen reseptörü yanı sıra progesteron reseptörünün de pozitif olması hormonal tedaviye cevabı arttırmaktadır (Meites ve ark. 1972, Cuzick ve ark. 1986). Hastalığın oluşmasında östrojenler çok önemli bir role sahiptir (Meites ve ark.,1972). Buyüzden meme kanseri kadınlarda erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir (Santen ve ark. 2007).

HER2, epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin 4 üyesinden bir tanesidir. Bu ailedeki diğer üyeler EGFR (HER1), HER3 ve HER4'tür. HER2 reseptörleri aktif hale

gelince hücre içindeki sinyal ileti yollarını aktif hale getirerek hücrenin değişimine ve proliferasyonuna neden olurlar (Sorlie ve ark. 2001, 2003). Meme kansinonlarının % 10-30' unda FISH (fluorescent in situ hybridization) ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein overekspresyonu vardır. HER-2/neu overekspresyonu kötü prognostik parametredir, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (Ilvan 2006).

2.3.3. Meme Kanserinin TNM Sistemine Göre Sınıflandırılması ve Evrelemesi

1954 yılında tüm kanserler için uygulanabilecek bu evreleme sisteminin prensipleri geliştirilmeye başlanmış International Union Against Cancer (IUCC) tarafından yayınlanmıştır (Donegan 1995, Compton ve ark. 2002). The American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM sistemine göre evreleme oluşturulmuştur. Bu sistem 2002 yılında modifiye edilmiştir (Engin ve Erişen 2003, Çavuşoğlu ve ark. 2009).

Fakat Klinik olarak en kullanışlı evreleme sistemi "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) ve "International Union for Cancer Control" (UICC) tarafından birlikte geliştirilen tümör-nod-metastaz (TNM) sistemidir (Compton ve ark. 2002).

Tedavi kararlarında lenf nodu tutulumu, tümör boyutu, tümörde östrojen ve progesteron reseptörlerinin olup olmaması, HER2/neu durumu, menapoz durumu ve hastanın genel durumu dikkate alınmaktadır. Bu nedenle evreleme çok önem taşımaktadır. Son dönemlerde meme kanserinin tanısında, evrelendirilmesinde ve tedavisinde elde edilen gelişmeler, hastaların sağkalımlarında, önemli ölçüde fayda sağlanmıştır (Rosen 1995, Hoover 1996).

Çizelge 2.5. Meme kanserinin TNM sistemi ile sınıflandırılması (Edge ve ark. 2010)

Primer Tümör (T)

Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümörün en büyük boyutu ≤ 20 mm
T1mik	Tümörün en büyük boyutu ≤ 1 mm
T1a	Tümörün en büyük boyutu >1 mm fakat ≤ 5 mm
T1b	Tümörün en büyük boyutu > 5 mm fakat ≤ 10 mm
T1c	Tümörün en büyük boyutu > 10 mm fakat ≤ 20 mm
T2	Tümörün en büyük boyutu > 20 mm fakat ≤ 50 mm
T3	Tümörün en büyük boyutu > 50 mm
T4	Tümör herhangi bir boyutta fakat göğüs duvarı ve/veya cilt tutulumu (ülserasyon veya cilt nodülleri) var Not: Sadece dermis invazyonu T4 olarak değerlendirilmez
T4a	Göğüs duvarına yayılım var fakat pektoral kas tutulumu yok
T4b	İnflamatuvar kanser özelliklerini içermeyen ciltte ülserasyon ve/veya aynı taraf memede satellit nodüller ve/veya ödem (peau d'orange-portakal kabuğu görünümü)
T4c	Hem T4a hem de T4b
T4d	İnflamatuvar karsinom

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor (örneğin önceden çıkarılmış)
N0	Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok
N1	Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında hareketli metastatik lenf nodları
N2	Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında birbirine yapışık veya fikse lenf nodları; veya klinik olarak tespit edilmeyen aksiller lenf nodlarında metastaz olmaksızın klinik olarak tespit edilen internal mammaryan lenf nodlarında metastaz
N3	Aynı taraf düzey I ve II aksiller lenf nodlarında metastaz olsun ya da olmasın aynı taraf infraklavikuler lenf nodu metastazı (Düzyey III); veya klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı ile birlikte klinik olarak tespit edilmiş aynı taraf internal mammaryan lenf nodlarında metastaz; veya aksiller ya da internal mammaryan lenf nodlarında metastaz olsun ya da olmasın aynı taraf supraklavikuler lenf nodlarında metastaz

Uzak Metastaz(M)

M0	Uzak metastaza ait klinik veya radyolojik bulgu yok
cM0	Uzak metastaza ait klinik veya radyolojik bulgu yok, fakat metastaza ait (i+) semptom ve bulgusu olmayan hastada kanda, kemik iliğinde veya bölgesel olmayan lenf nodlarında 0,2 mm'den büyük olmayan moleküler veya mikroskopik olarak saptanmış tümör hücreleri
M1	Klinik ve radyolojik olarak tespit edilen uzak metastaz ve/veya histolojik olarak 0,2 mm'den büyük uzak metastaz

Çizelge 2.6. Meme kanserinde evreleme (Singletary ve ark. 2002)

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M<1/td>

2.3.4. Meme Kanseri Hücre Hatları

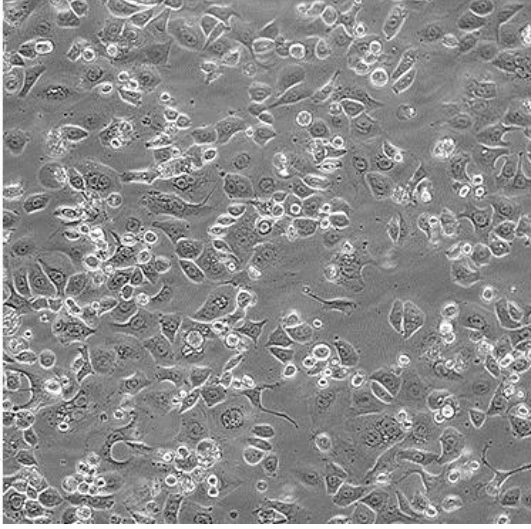
1900' lerin ortalarına doğru laboratuvarında hayvansal hücre kültürü teknikleri uygulanmaya başlanmış fakat 19. yy ortalarına doğru doku kaynaklarından ayrılarak sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı ortaya konmuştur. 1951 yılında Baltimore labratuvarında George Gey tarafından İlk kanser hücre hattı oluşturulmuştur (Gey ve ark. 1952).

Kanser araştırmaları yapmak için meme kanseri hücre hatları sık sık tercih edilmektedir. Bunun yanında hTERT ölümsüzleştirilmiş meme epitelyum hücre hattıda kontrol olarak kullanılmaktadır (Holliday ve Speirs 2011).

İnsan meme kanser hücre hatları mükemmel deneysel modellerdir ve hem in vivo hem in vitro koşullarda doku gibi büyütüldüğünde, klinik önemi olan miRNA' ların araştırılmasında kullanılabilen yenilenebilir kaynaklardır (Hwang ve Mendell 2006, Voorhoeve ve ark. 2006, Miller ve ark. 2008, Farazi ve ark. 2011, Ryu ve ark. 2011).

2.3.4.1. SKBR-3

SKBR-3 hücre hattı ilk olarak 1970 de 43 yaşında beyaz ırktan maling meme adenokarsinomu olan bir kadından alınmıştır (Trempe 1976). SKBR-3, HER-2 (Neu/ErbB-2) geninin yüksek ekspresyonunu gösteren insan meme kanser hücre hattıdır. Bu hücreler doku kültüründe epitel morfoloji gösterir ve immun sistemi baskılanmış farelerde kötü huylu tümörler oluşturma yetisine sahiptirler. Bu hücre hattını HER-2' yî hedef alan teroaptik ajanları görmek için ve HER-2 hedefine yönelik terapiler için dirençlilik mekanizmasını görmek için klinik öncesinde kullanılan bir modeldir (Fogh 1975, Hudziak ve ark. 1997). SKBR-3 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü şekil 2.7.' de gösterilmiştir.



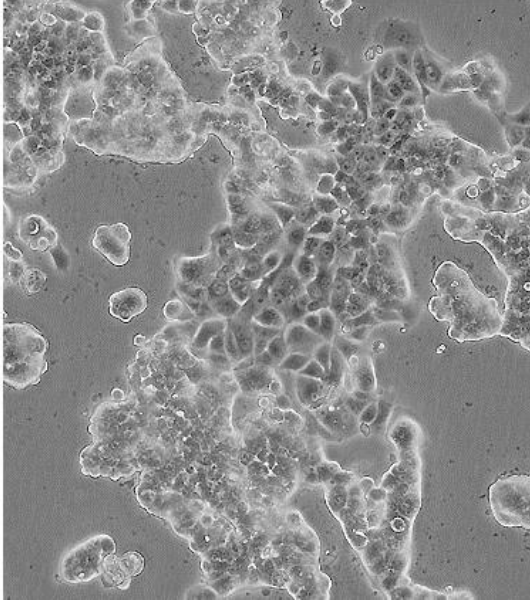
Şekil 2.7. SKBR-3 hücre hattının morfolojisi

(<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/7/C/7/0/25937.ashx>, 2017)

2.3.4.2. MCF-7

İnsan meme kanseri modellerinden biri olan MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında 69 yaşında beyaz ırk bir kadından izole edilmiştir (Kars ve ark. 2006). MCF-7 hücre hattının ismi 1973' de Herbert Soule ve arkadaşları tarafından Detroit' de kurulan hücre hattı enstitüsüne ithafen Michigan Cancer Foundation-7' nin baş harflerinden gelmektedir. The Michigan Cancer vakfı şuan Barbara Ann Karmanos Cancer Institute olarakta bilinmektedir (Glodek 1990, Levenson ve Jordan 1997).

Östrojen bağımlı insan meme kanser hücre hattıdır. Yani ER+, PR +/-, HER2 - ' dir (Levenson ve Jordan 1997). Bu hücreler şuan ki meme kanseri hakkındaki birçok bilginin kaynağıdır. MCF-7 hücrelerinin karakteristik özellikleri şunlardır; invaziv meme duktal karsinom (süt bezerinde), pleural efüzyon, ER+, PR+/-, Her2/neu protein overekspresyonu yok, farelerde tümör oluşturabiliyor fakat yalnızca östrojen ilavesi ile ve fenotipi lüminal epitel hücre tipindedir (Soule ve ark. 1973, Brandes ve Hermonat 1983, Osborn ve ark. 1987, Bacus ve ark. 1990, Bahia ve ark. 2002, Nugoli ve ark. 2003). MCF-7, büyük ölçüde östrojen reseptör luminal epitel hücre tipindedir. ER aracılığı ile hormon duyarlılığının olması sebebiyle hormonal yanıt çalışmalarında çokca kullanılan ideal bir model olarak büyük öneme sahiptir (Levenson ve Jordan 1997). MCF-7 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü Şekil 2.8.' de gösterilmiştir.



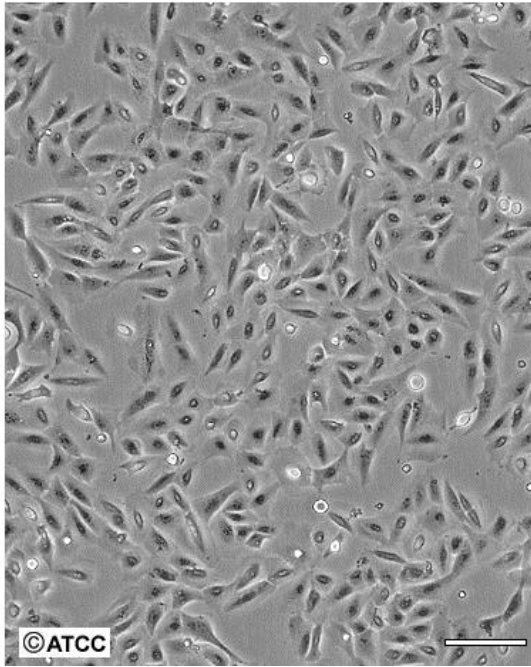
Şekil 2.8. MCF-7 hücre hattının morfolojisi
(<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/0/E/E/2/1980.ashx>, 2017)

2.3.4.3. HTERT-HME1 (crl-4010)

İnsan telomeraz proteini RNA altünitesinden (insan telomeraz RNA (hTR) (Feng ve ark. 1995), bir protein bileşeni (human telomerase associated protein 1'den (hTEP1) (Harrington ve ark. 1997), ve katalitik alt ünite HTERT (human telomerase reverse

transcriptase)’ dan meydana gelir (Nakamura ve ark. 1997, Weinrich ve ark. 1997, Yang ve ark. 2001).

hTERT-HME1 normal memeli primer epitelyum hücelerinden elde edilmiştir. Bu hücreler bir retroviral pBabepuro+hTERT vektörü ile enfekte edilmiştir ve istikrarlı (ölümsüz) klonlar seçilene kadar büyütme ortamında kültüre edilmiştir. hTERT-HME1 hücreleri bir çok çalışmada normal kontrol olarak kullanılmaktadır (Nakamura ve ark. 1997, Meyerson ve ark. 1997, Nakayama ve ark. 1998, Simonsson 2003, Yang ve ark. 2007). HTERT, 127-kDa telomeraz aktivitesi ile yakından ilişkili bir proteindir (Harrington ve ark. 1997).

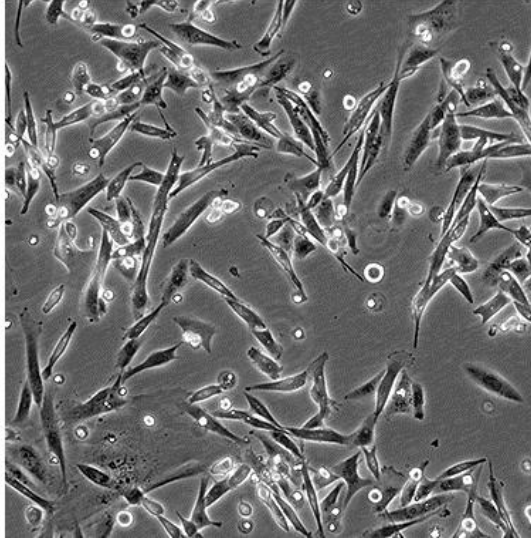


Şekil 2.9. CRL-4010 (HTERT-HME1) hücre hattının morfolojisi (<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/5/F/1/1/1935.ashx>, 2017)

2.3.4.4. MDA-MB-231

MDA-MB-436 ve MDA-MB-468’ nin aksine, MDA-MB-231 yüksek derecede metastatik bir hücre hattıdır (Cailleau ve ark. 1978, Brunner ve ark. 1994, Yang ve ark. 1997). MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinin metastası, iyi karakterize hayvan modelleri kullanılarak çalışılmıştır (Sasaki ve ark. 1995, Mbalaviele ve ark. 1996, Yoneda ve ark. 1997). MDA-MB-231 dişi nude farelerde özellikle kemik metastası yaparken, bazende beyin, over, adrenal bezlere metaztasda yapabilmektedir (Yoneda ve

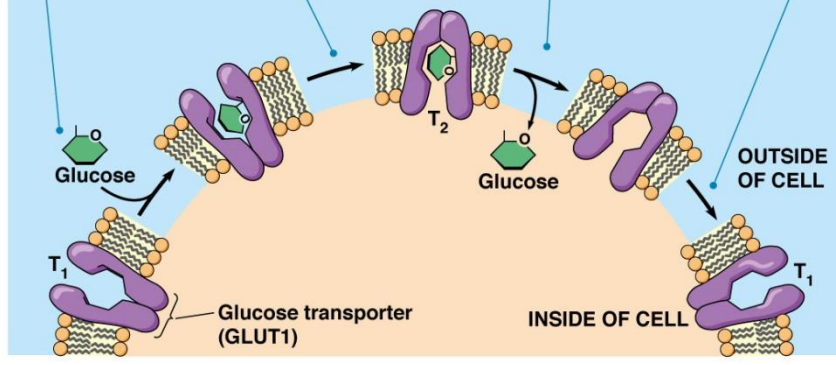
ark. 1994, Yoneda 1997, 1998). İnsan östrojen-bağımsız meme kanser hücreleri olarak rapor edilmiştir ve 3'lü negatif meme kanser hücre hatlarıdır (Cailleau ve ark. 1974).



Şekil 2.10. MDA-MB-231 hücre hattının morfolojisi (<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/5/C/3/0/25935.ashx>, 2017)

2.3.5. Meme Kanserinde GLUT Genlerinin Önemi

Kanserde hücrelerin hızlanmış metabolizmaları, artmış glikoz ihtiyaçları ve artmış glikoz alımları çok iyi bilinmektedir. Malign hücrelerde artmış olan glikoz alımı GLUT ailesinin artmış ve kontrolsüz ifadesi ile gitmektedir (Cao ve ark. 2007). Glikoz taşıyıcısı (GLUT) ailesi glukozun hücre içine alımını sağlayan membran transport proteinleridir (Macheda ve ark. 2005, Zhao ve Keating 2007). Hücrenin yapı ve fonksiyonuna bir hücre çeşidinde birden fazla GLUT alt tipi bulunabilir (Klip ve ark. 1994). Glikoz taşıyıcısı 1, GLUT ailesinin en çok çalışılan aynı zamanda en yaygın bulunan alt tipidir ve glikoz alımı yönünden önem taşımaktadır. Meme kanserinde yapılan çalışmalarda GLUT-1 varlığı ve tümörün gelişim aşamalarında ifade seviyesindeki değişimi gösterilmiştir (Zamora-León ve ark. 1996, Laudański ve ark. 2003, Kuo ve ark. 2006). Şekil 2.11.' de glukoz taşıyıcı proteinlerin glukoz alımı gösterilmiştir.



© 2012 Pearson Education, Inc.

Şekil 2.11. Glukoz taşıyıcı proteinlerin (GLUT) işlevlerinin şematik gösterimi (Hardin ve ark. 2012)

Glukoz transportu in vitro çeşitli kanser hücrelerinde çalışılmıştır, fakat en yaygın olarak meme kanseri hücre hatlarında çalışılmıştır. GLUT-1 sürekli olarak kültüre edilmiş meme kanseri hücrelerinde overekspresyon gösterir ve ayrıca GLUT-2 ve GLUT-5' in de tespit edildiğinde rapor edilmiştir. GLUT genlerinin ekspresyon paternleri farklılık göstermektedir (ZamoraLeon ve ark. 1996, Binder ve ark. 1997, Grover-McKay ve ark. 1998).

Grover-McKay ve ark. (1998) üç insan meme kanser hücre hattının in vitroda invazyon potansiyelini saptadı ve GLUT-1 protein seviyesinin invazyon potansiyeliyle birlikte arttığını gösterdi. Bunun yanında, GLUT-2 ve GLUT-5 protein seviyeleri invazyon potansiyeli ile birlikte azalmıştır.

Artmış tumor glukoz alımı glukoz transporter proteinlerinin over ekspresyonu tarafından kolaylaştırılmıştır, bu birçok tumor dokusunda gözlenmiştir. Yüksek GLUT-1 ekspresyonu hepatik, pankreatik, meme, özofaringal, beyin, renal, akciğer, deri, kolorektal, endometrial, over, ve servikal gibi birçok kanserde tanımlanmıştır (Yamamoto ve ark. 1990, Nishioka ve ark. 1992, Brown ve Wahl 1993, Nagase ve ark. 1995, Baer ve ark. 1997, Ogawa ve ark. 1997, Haber ve ark. 1998, Wang ve ark. 2000, Cantuaria ve ark. 2001, Rudlowski ve ark. 2003).

GLUT-1 ekspresyonu morfolojik değişiklikler başta olmak üzere meme epitel hücre metabolizmasında değişikliklere neden olabilmektedir (McDermott ve ark. 1990). GLUT-1 ekspresyonu birçok tumor özelliği ile ilişki halindedir. GLUT-1 Ekspresyonun artmasıyla kanserde de daha yüksek grad ve poliferatif aktivite görülür (Younes ve ark. 1995). Bir çok çalışmada bu bulguları desteklemiştir (Ravazoula ve ark. 2003). Akciğer ve over kanserinde, artan GLUT-1 ekspresyonu ayrıca daha yüksek derece ve tumor farklılaşması ile ilişkilidir (Younes ve ark. 1997, Higashi ve ark. 2000, Cantuaria ve ark. 2001).

GLUT-1 ekspresyonu ayrıca hastaların sağkalımı ile de ilişkilidir. Akciğer, kolorektal, over, larigial ve meme kanserlerinde, tümörlerdeki GLUT-1 ve GLUT-3' ün yüksek seviyesi sağkalımın azalmasında önemli bir indikatördür (Baer ve ark. 1997, Ogawa ve ark. 1997, Younes ve ark. 1997, Haber ve ark. 1998, Cantuaria ve ark. 2001, Kang ve ark. 2002). Malign hücrelerde sadece temel GLUT genlerinin ekspresyonu yoktur, spesifik dokularda sık bulunmamakla birlikte izoformlarının da ekspresyonları olabilir. örneğn, GLUT-3 proteini akciğer, over ve gastrik kanserlerde eksprese olur fakat ilişkili normal dokularda ekspresyonu görülmez (Younes ve ark. 1997). Fruktoz taşıyıcısı GLUT-5 ekspresyonu da insan meme kanser dokularında tanımlanmıştır, fakat normal meme dokusunda bulunmamaktadır (Zamora-Leon ve ark. 1996).

Tümör tarafından fazlaca glukoz alımının arttığını açıklayan bir diğer mümkün olabilecek açıklama, diğer bilinmeyen transporterların ekspresyonudur. Yapılan birkaç çalışma GLUT-1 ekspresyonunu sadece meme kanserlerinin % 50' sinde göstermiştir. Bilinmeyen taşıyıcılar muhtemelen GLUT-1 eksprese etmeyen meme kanserlerinde glukoz alımından sorumludur (Younes ve ark. 1995, Binder ve ark. 1997, Kang ve ark. 2002). 10 insan meme kanserinde yapılan bir çalışmada 9 invaziv tümörde ve ayrıca invazv olmayan duktal karsinomun komponentlerinde GLUT-12 immun boyanma gösterdi. Bunlara komşu normal dokularda ise çok az yoğun yada hiç boyanma göstermemiştir (Rogers ve ark. 2003).

Glut-12 diğer kanserlerde glukoz metabolizmasını düzenliyor olabilir. Bir çalışmada glukoz transporter ekspresyonuna bakılmıştır ve insan prostat kanserinde GLUT-12 boyanma göstermiştir. GLUT-1 benign prostatik neoplazide boyanma gösterirken,

prostat tümörlerinde zayıf yada çok silik boyanma göstermiştir (Chandler ve ark. 2003). Son zamanlarda, Rogers ve ark. (2002) GLUT-12 proteininin meme kanseri hücre hattı MCF-7' de eksprese edildiğini göstermiştir. MCF-7 serum olmayan besiyerinde büyütüldüğünde konfokal immunofloresan mikroskopunda GLUT-12' nin perinükler boşlukta lokalize olduğu görülmüştür (Rogers ve ark. 2002).

2.3.6. Meme Kanseri ve MikroRNA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroRNA' ların bulunması ve hücrede çok önemli işlevler üstlendiklerinin gösterilmesi bu molekülleri meme kanseri ve diğer kanserlerin oluşumuna ve gelişimine sebep olanlar arasına eklemiştir. Son yapılan çalışmalar ile meme kanserine sebep olabilecek hedef miRNA' lar bulunmaya başlanmıştır (Romero-Cordoba ve ark. 2012). Kanser gelişim sürecine mikroRNA' ların katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, Calin ve ark. (2001) tarafından, Kronik Lenfositik Lösemili hastalarda yaptıkları moleküler çalışmayla gösterilmiştir. Kanserli ve normal dokular arasındaki ifade farklılıklarının belirlenmesi, miRNA' ların kanser gelişimindeki rollerini daha da güçlendirmiştir (Calin ve ark. 2002, Saydam ve ark. 2011). Daha sonraki yıllarda katı organ tümörleride değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri farklı kanser türlerinde (meme, lenfoma, beyin, tiroid, akciğer, prostat ve hepatosellüler karsinoma) bulunmuştur (Murakami ve ark. 2006, Le Quesne ve Caldas 2010). Bazı miRNA'lar "tümör süpresör miRNA' lar" (TSmir) olarak işlev görmektedirler. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA' ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olacaktır. Bunun aksine, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA' ların kanser gelişimini hızlandırdığı görülmektedir. Sonuç olarak mikroRNA' lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA' ların her ikisini de hedef olarak görüp, fonksiyonlarını bu mRNA' lar üzerinden gösterirler (Cowland ve ark. 2007, Le Quesne ve Caldas 2010, Saydam ve ark. 2011). NcRNA' lar çok önemli işlevlere sahiptir bu nedenle bu RNA' larda meydana gelen bozukluklar hastalıklarla direkt olarak ilişkilidir (Voinnet 2009). miRNA' lar meme kanseri dahil birçok kansere sebep olmaktadır (Visone ve Croce 2009, Pang ve ark. 2009). Meme, akciğer ve kolon kanserlerinin tanısında, bu hastalıklarla sıkı ilişkili ncRNA' lar tanının konması aşamasında yardımcı araçlar olarak başlanmıştır (Swanton ve Caldas 2009). Michaelve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, insanlardaki katı organ tümörlerini normal dokular ile

karşılaştırdıklarında ekspresyon seviyeleri farklı olan miRNA' ları rapor ettiler. Daha sonraki yıllarda katı organ tümörlerinde ifade değişikliğine uğramış miRNA seviyeleri farklı kanser türlerinde (meme, lenfoma, beyin, tiroid, akciğer, prostat ve hepatosellüler karsinoma) bulunmuştur (Murakami ve ark. 2006, Le Quesne ve Caldas 2010).

miR-29' ün 3 adet izoformu vardır, tümör süpresör özellik gösteren mikroRNA' lar arasındadır (Johnson ve ark. 2005, Lee ve Dutta 2007, Sampson ve ark. 2007). MikroRNA-143' ünde birçok tumor türünde, fazla büyümeyi baskıladığı görülmüştür. Birçok kanser türünde miR-143' ün tümör süpresör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Mott ve ark. 2007, Bruchova ve ark. 2008, Bruchova ve ark. 2008).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-155' in B hücreli lenfoma, akciğer, pankreas, meme ve Hodgkin lenfoma gibi kanserlerde aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (Iorio ve ark. 2005, Lin ve ark. 2010, Saydam ve ark. 2011). Mir21' in AML, KLL gibi hematolojik malignitelere, birçok katı tümörde ve birçok kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyon olduğu görülmüştür (Calin ve ark. 2005, Garzon ve ark. 2008). MiR-17-92 gen kümesi üyelerinin çok çeşitli solid organ tümörlerinde, hematolojik malignansilerde ve birçok kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyonu gözlenmiştir. Yüksek seviyesi, proliferasyonu artırır, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezini tetikleyerek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (He ve ark. 2005, Mendell 2008).

Mir-22 kansere özgü birçok miRNA içinde en çok bilinen tumor süpresör miRNA' lardan biridir ve ekspresyonu genelde meme kanserinde düşüktür (Meng ve ark. 2007, Zhu ve ark. 2007, Frankel ve ark. 2008, Qi ve ark. 2013). Sınırlı sayıda meme kanseri örneklerinden yapılan son çalışmalar göstermiştir ki, mir-22 ekspresyonu ERBB2-positif meme kanserinde ERBB2-negatif meme kanserine göre daha düşüktür ve mir-22 ekspresyonu ER+ and PR+ tümörlerde ER- and PR- tümörlere göre daha yüksektir. Fakat mir-22' nin ekspresyon durumu bazal tip ve triple negatif meme kanserlerinde bilinmemektedir (Mattie ve ark. 2006).

Son çalışmalar, mir-21' in meme kanseri hastalarının serumlarında ekspresyonunun yüksek olduğunu bulmuştur (Wang ve ark. 2010, Asaga ve ark. 2011).

Mir-155 sıkça meme tumor dokularında upregüledir (Kong ve ark. 2010).

Mir-10b meme kanseri hücrelerinde invazyon ve migrasyona önemli bir katkı yapmaktadır. (Moriarty ve ark. 2010, Haque ve ark. 2011). Let-7' nin yüksek ekspresyonu meme kanseri gelişiminin gecikmesinde etklidir yani tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (Yu ve ark. 2007).

Mir-205 insan meme kanseri tümör dokularında down regülasyon gösterir (Gregory ve ark. 2008, Radojicic ve ark. 2011). In vitro yapılan deneylerde, mir-205' in meme kanser hücrelerindeki ektopik ekspresyonu ve HER-3 ve VEGF-A' yı hedefleyerek hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir (Wu ve ark.2009; Wang ve ark. 2013). Tavazoie ve arkadaşları mir-335' in meme kanseri migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığını rapor etmişlerdir (Tavazoie ve ark. 2008).

miRNA' lar için en iyi anlayış özellikle meme kanseri tedavisi için kullanılabilceğinin düşünülmesidir. MikroRNA' ların klinik yaklaşımlara uygulanmaları, özellikle onların potansiyel bir diagnostik, prognostik ve terapötik markır olmalarını mümkün kılmıştır (Iorio ve ark. 2005, Iorio ve Croce, 2009, Andorfer ve ark. 2011, Melo ve Esteller 2011).

2.3.7. Mir-22, Mir-103 ve Mir-107' nin Meme Kanserinde Hedeflediği Düşünülen GLUT-1 ve GLUT-3 ile Uyuşum Dizileri

Meme kanserinde ve diğer birçok kanserde etkiili olduğu bilinen GLUT-1 ve GLUT-3' ü hedef aldığı düşünülen miRNA' lar targetscan veritabanı aracılığı ile bulunmuştur.

Targetscaan veritabanına göre mir-22, mir-103a-3p ve mir-107' nin GLUT-1 ve GLUT-3' ü hedeflediği düşünülmektedir. Şekilde mir-22-3p, mir-103 ve mir-107' nin GLUT-1 ve GLUT-3 ile tahmini hedef bölgeleri ve uyuşum dizileri Şekil 2.12. ve Şekil 2.13.' de gösterilmiştir.

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 62-68 of SLC2A1 3' UTR	5' ... UCUCUCAGGAGCACAGGCAGCUG ... 	7mer-m8
hsa-miR-22-3p	3' UGUCAAGAAGUUGACCGUCGAA	

Şekil 2.12. Mir-22-3p' nin tahmin hedefi ve uyuşum dizileri

(http://www.targetscaan.org/cgi-bin/targetscaan/vert_71/view_gene.cgi?rs=ENST00000426263.3&taxid=9606&members=miR-130-3p/301-3p/4543p&showcnc=0&shownc=0&showncf1=&showncf2=&subset=1#miR-22-3p, 2017)

ekspresyon seviyeleri gösteren bazı miRNA' ların, ameliyat sonrasındaki hastalarda ameliyat öncesindeki hastalara göre seviyeleri düşmüştür. Bu bulguların hepsi, serumda sirkülasyon içinde bulunan miRNA' ların meme kanserinde bir diagnostic ajan olarak hizmet edeceğini desteklemektedir (Wang ve ark. 2010, Cuk ve ark. 2013, Ng ve ark. 2013). MiRNA' lar hem hedef hem araç olarak kullanılarak, mikroRNA bazlı tedavilerin mümkün olacağı düşünülmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültür Aşaması

Bu çalışmada, SKBR-3, MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve kontrol olarak HTERT-HME1 normal meme epitel hücre hattı kullanılmıştır.

MCF-7, MDA-MB-231, ve HTERT-HME1 için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), SKBR-3 için ise RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerleri içerisine ısı ile inaktifleştirilmiş fetal sığır serum, % 10 FBS (fetal bovine serum) ve 50 U/ml penisilin/streptomisin eklenmiştir ve % 5 CO₂' li ortamda 37 °C' de kültüre edilmiştir. Karbondioksitli inkübatörde tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirilmiştir. Tüm hücreler 25 cm² kültür flasklarında medium içinde % 70-90 olunca pasajlanarak 75' lik flasklara alınmıştır. Çoğalmasız duran yada yavaşlayan flasklar var ise l-glutamin eklenmiştir. Hücreler yaklaşık % 70-90 lık bir yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Saf kültür elde edilene kadar pasajlama işlemi devam ettirilmiştir. Yeterli pasajlama işlemi yapıldıktan sonra (yaklaşık 3-4 pasajdan sonra) hücreler konfluent olduğunda, hücrelerin üzerindeki mevcut besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra , hücreler 5 ml HBSS solüsyonu ile yıkanmış ve 3-5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Tripsinin etkisiyle hücreler kalkmaya başlayınca, hücrelerin üzerine bir miktar besiyeri eklenerek her biri 50 ml' lik falkon tüplere izolasyon yapılmak üzere alınmıştır.

3.2. Hücrelerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy mini kit (Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Bu kit hücredeki miRNA' larda dahil tüm RNA' ları izole etmektedir. Kültür aşamasından sonra 50 ml' lik falkona alınan hücre sıvısı iyice homojenize edildikten sonra bir kısmı (yaklaşık ¼'ü) ile kültür aşaması devam ettirilmiştir, kalanı ise izolasyon için kullanılmak üzere 1,5 ml' lik ependorf tüpe konulmuştur. Tüpler +4 °C' de 3000 rpm' de 3 dk santrifüj edilmiştir ve hücreler çöktürülmüştür. Daha sonra supernatant atılarak üzerlerine 700 µl Qiazol eklenmiştir .Tüpler 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerlerin 140 µl kloroform eklenmiştir. 15'er sn vorteks yapıldıktan sonra 2-3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra +4 °C' de 12.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra 3 faz olutuğu

görülmüştür ve oluşan 3 fazdan, üst faz yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Üzerlerine %100' lük etanolden (1,5 katı kadar) yaklaşık 525 µl eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojenize edildikten sonra bu karışımdan 700 µl alınıp filtrelili tüplere aktarılmıştır. 12.000 rpm' de 15 sn santrifüj edilmiştir. RNAaz mini kolon, altındaki toplama tüpü atılmış ve yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 700 µl RWT buffer konarak 15 sn 12.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Tekrar altındaki toplama tüpü atılmıştır ve RNAaz mini kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılarak üzerine 500 µl RPE buffer eklenmiştir ve 15 sn 12.00 rpm' de santrifüj edilmiştir. Tekrar toplama tüpü değiştirilerek ve tekrar 500 µl RPE buffer eklenerek 2 dk 12.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü değiştirilip ve 14.000 rpm' de 1 dk boş olarak çevrilmiştir. Daha sonra RNAaz mini kolonlar 1,5 ml' lik ependroflara aktarılmıştır ve filtrelerin tam ortasına denk gelecek şekilde 30-50 µl RNAaz free water konularak 1 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1 dk 14.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA' lar saklanmak üzere -80 buzdolabına kaldırılmıştır.

3.3. MiRNA' lardan cDNA Elde Edilmesi

MicroRNA' lardan cDNA (kalıp, complementary DNA) sentezi için Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) II Kit (Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Çizelge 3.1.' deki miktarlara göre, örnek sayısı kadar RT-PCR miksi soğuk blok üzerinde hazırlanmıştır. RNA örnekleri -80' den çıkartılarak çözdürülmüştür. RT-PCR miksi 19' ar µl pcr tüplerine dağıtılmıştır. Üzerlerine konsantrasyonları ortalama 500 ng olan RNA örneklerinden 1' er µl eklenmiştir. Kısa bir vorteks ve santrifüj yapıldıktan sonra tüpler pcr chazına konularak ve Çizelge 3.2.' deki pcr protokolüne göre cDNA sentezi başlatılmıştır. Sonrasında cDNA' lar spektrofotometre cihazında ölçülerek konsantrasyonları 10 mikrolitrede 500 ng olacak şekilde ayarlanmıştır ve hepsinin konsantrasyonu eşitlenmiştir.

Çizelge 3.1. MiRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
miScript HiSpec Buffe 5x	4 µl
miScript Nucleic Mix	2 µl
RNase free water	11 µl
miScript Reverse Transcriptase	2 µl
Template RNA	1 µl

Çizelge 3.2. MiRNA RT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre
37 °C	60dk
95 °C	5 dk

3.4. MRNA' lardan cDNA Elde Edilmesi

MRNA' lardan cDNA' ların (kalıp, complementary DNA) sentezi için Qiagen QuanTitect Reverse Transcription (RT) Kit (Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Çizelge 3.3.' deki miktarlara göre, örnek sayısı kadar RT miksi soğuk blok üzerinde hazırlanmıştır. RNA örnekleri -80' den çıkartılıp çözdürülmüştür. RNA örnekleri ölçülerek ve hepsi 500 ng' a eşitlenmiştir. Kitin uygun gördüğü protokol doğrultusunda iki aşamalı bir pcr protokolü izlenmiştir. İlk pcr için 13' er µl miks tüplere dağıtılmıştır ve üzerlerine 500 ng konsantrasyonda olan RNA örneklerinden 1'er µl konulmuştur.

Çizelge 3.3. MRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 µl
RNase free water	11 µl
Template RNA	1 µl
Total Hacim	14 µl

Çizelge 3.4. MRNA RT-PCR tepkime koşullar

Sıcaklık(°C)	Süre
42 °C dk	2 dk

Daha sonra ikinci pcr için hazırlanan miksdan tüplere 6' şar µl dağılmıştır ve üzerlerine 14 µl olan ilk pcr ürünü eklenerek ve RT-PCR reaksiyonu tepkime koşullarına göre başlatılmıştır. cDNA' lar spektrofotometre cihazında ölçülmüş ve konsantrasyonları 500 ng olacak şekilde eşitlenmiştir.

Çizelge 3.5. MRNA için RT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Template RNA(1. Pcr ürünü)	14 µl
Total Hacim	20 µl

Çizelge 3.6. MRNA RT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre
42 °C	15dk
95 °C	3 dk

3.5. MiRNA' lar İçin qRT-PCR

MiRNA' lardan sentez edilen cDNA' lardan qRT-PCR için, Qiagen miScript SYBR Green PCR Kit (Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca 3 miRNA için 3 farklı Qiagen Primer Assay sentez ettirilip kullanılmıştır. Her bir hücre hattındaki mirna seti için üç biyolojik ve iki teknik tekrar yapılmıştır. Bunların yanında kontrol için Qiagen Primer Assay RNU6B (U6) gen primeri kullanılmıştır. qRT-PCR miksi Çizelge 3.7.' deki miktarlara göre reaksiyon sayısı kadar soğuk blok üzerinde hazırlanmıştır ve 11,25' er µl 0.2' lik tüplere dağıtılmıştır. Üzerlerine 1,25' er µl, konsantrasyonları eşitlenen cDNA' lar eklenmiştir. Aşağıda Çizelge 3.8.' deki tepkime koşullarına göre mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ve kontrol olarak kullanılan RNU6B (U6) housekeeping genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Bunun için qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.7. MiRNA için qRT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
QuantiTect SYB Green PCR Master Mix 2x	10 µl
miScript Universal Primer 10x	2 µl
miScript Primer Assay 10x	2 µl
RNase free water	4 µl
Template cDNA	2 µl
Total hacim	20 µl

Çizelge 3.8. MiRNA qRT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre	
95 °C	15dk	} 40 döngü
94 °C	15sn	
55 °C	30sn	
70 °C	30sn	

Çizelge 3.9. QRT-PCR’da kullanılan miRNA primerleri ve dizileri

Mir-22-3p

5'- ACACTCCAGCTGGGAAGCTGCCAGTTGAAG -3' F
5'- GGTGTCGTGGAGTCGGCAA -3' R

Mir-103a-3p

5'-CGAGCAGCAUUGUACAGGGCTATGA-3' F
5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' R

Mir107

5'-CGAGCAGCAUUGUACAGGGCTATCA-3' F
5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' R

RNU6

5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'F
5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'R

3.6. MRNA’ lar İçin qRT-PCR

MRNA’ lardan sentez edilen cDNA’ lardan qRT-PCR için, Qiagen SYBR Green PCR Kit (Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca 2 mRNA için 2 farklı Qiagen Primer Assay kullanılmıştır. Ayrıca kontrol gen olarak da Qiagen Primer Assay GAPDH housekeeping gen primeri kullanılmıştır. Her bir hücre hattındaki gen seti için üç biyolojik ve iki teknik tekrar yapılmıştır. QRT-PCR miksi Çizelge 3.10’ daki miktarlara göre reaksiyon miktarı kadar soğuk blok üzerinde hazırlanmış ve 49’ ar µl 0.2’ lik tüplere dağıtılmıştır. Üzerlerine 1’ er µl daha öncede sentez edilen konsantrasyonları 500’ e eşitlenmiş cDNA’ lar eklenmiştir. Aşağıda Çizelge 3.11’ deki tepkime koşullarına göre SLCA1(GLUT1), SLCA3(GLUT3) ve kontrol olarak GAPDH housekeeping

genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Bunun için qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.10. MRNA için qRT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 2x	25 µl
RNase free water	19 µl
QuantiTect Primer assay	5 µl
Template cDNA	1 µl
Total Hacim	50 µl

Çizelge 3.11. MRNA qRT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre	
95 °C	15dk	
94 °C	15sn	} 40döngü
55 °C	30sn	
72°C	30sn	

Çizelge 3.12. QRT-PCR’da kullanılan mRNA primerleri ve dizileri

SLC2A1
5'-TATGTGGAGCAACTGTGT-3' F
5'-TGAAGTAGGTGAAGATGAAGA-3' R
SLC2A3
5'- TTCGTCTCTAGCCTGCACTG -3' F
5'- ACACAACCTTCTCCGGGTGAC -3' R
GAPDH
5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3' F
5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3' R

4. BULGULAR

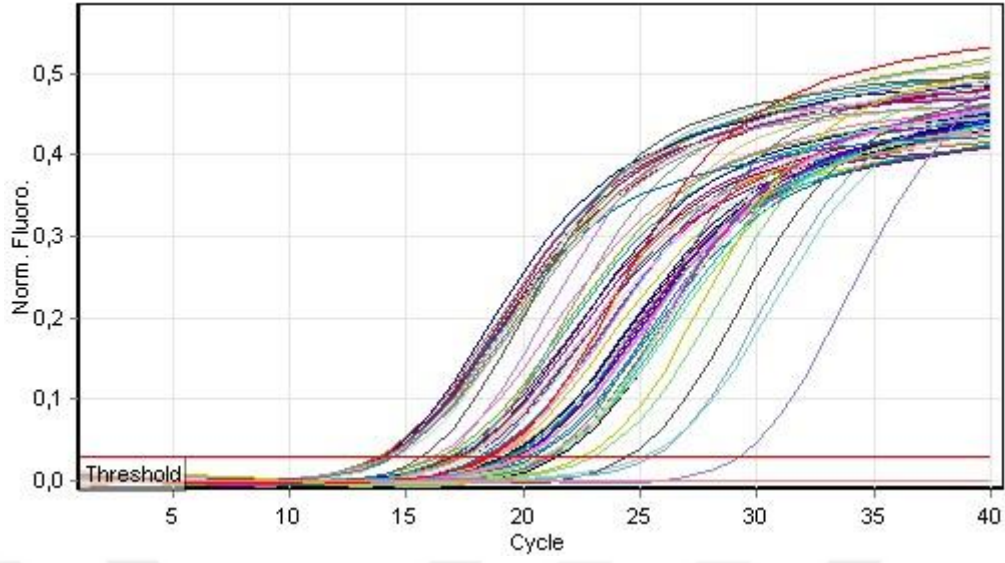
4.1. Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107' nin İfade Seviyelerinin Sonuçları

Bu çalışmada öncelikle, meme kanseri hücre hatları (MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231) ve kontrol olarak normal epitelyum (HTERT-HME1) hücre hattı kullanılarak mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir107 genlerinin farklı meme kanseri hücre hatlarındaki ifade seviyeleri karşılaştırılmak istenmiştir. Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir107 ifade seviyelerine qRT-PCR (kantitatif real-time pcr) yöntemi ile bakılmıştır. MiRNA' lar için qRT-PCR analiz sonucu Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.' de gösterilmiştir. MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231) ve (HTERT-HME1) hücre hatlarında mir-22, mir-103 ve mir107' nin q-RT-PCR anilzinden elde edilen Ct değerleri alınarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile ifade seviyeleri hesaplanmış, U6 geni ile normalize edilmiştir. HTERT-HME1 hücre hattı ile karşılaştırılarak kat değişimleri (fold change) hesaplanmıştır. HTERT-HME1 hücre hattı kontrol grubu olduğu için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 1 olarak kabul edilmiştir. Sırasıyla miRNA' ların ifade seviyelerinin sonuçları aşağıdaki gibidir;

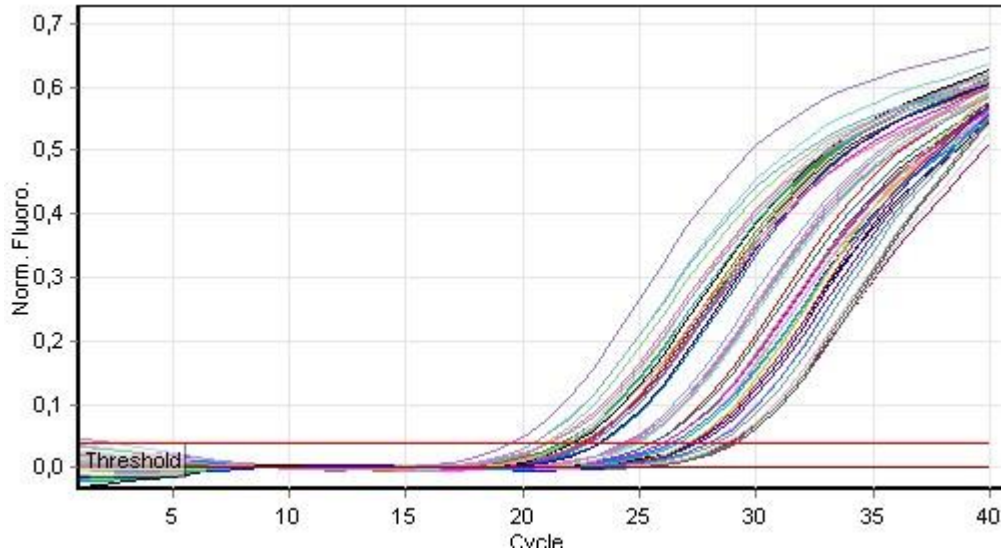
Mir22' nin ifade seviyesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7' de normal epitelyum hücre hattına göre $1,6\pm 0,36$ kat azalmıştır. SKBR-3' de normal epitelyum hücre hattına göre $2\pm 0,11$ kat azalmıştır. MDA-MB-231' de normal epitelyum hücre hattına göre ise $5\pm 0,21$ kat azalmıştır.

Mir-103' nin ifade seviyesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7' de normal epitelyum hücre hattına göre değişim yoktur ($\pm 0,44$). SKBR-3' de normal epitelyum hücre hattına göre $1,75\pm 0,08$ kat azalmıştır. MDA-MB-231' de normal epitelyum hücre hattına göre ise $20\pm 0,03$ kat azalmıştır.

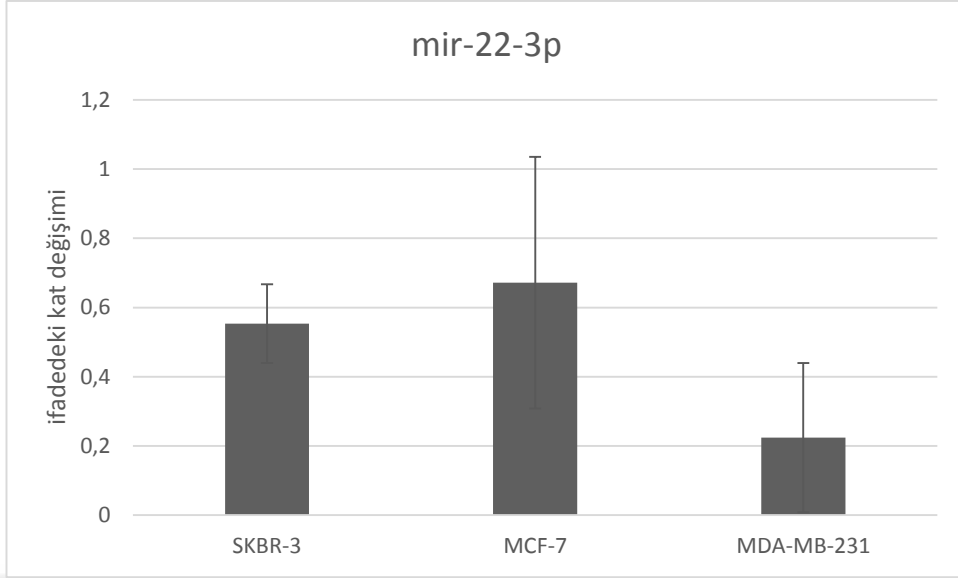
Mir-107' nin ifade seviyesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7' de normal epitelyum hücre hattına göre $1,7\pm 0,45$ kat artmıştır. SKBR-3' de normal epitelyum hücre hattına göre hemen hiç değişmemiştir ($\pm 0,39$). MDA-MB-231' de normal epitelyum hücre hattına göre ise $1,1\pm 0,59$ kat azalmıştır. Mir-22-3p, mir-103-3p ve mir-107' nin ekspresyon seviyelerini gösteren sütun grafikleri de Şekil 4.3, Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.' de gösterilmiştir.



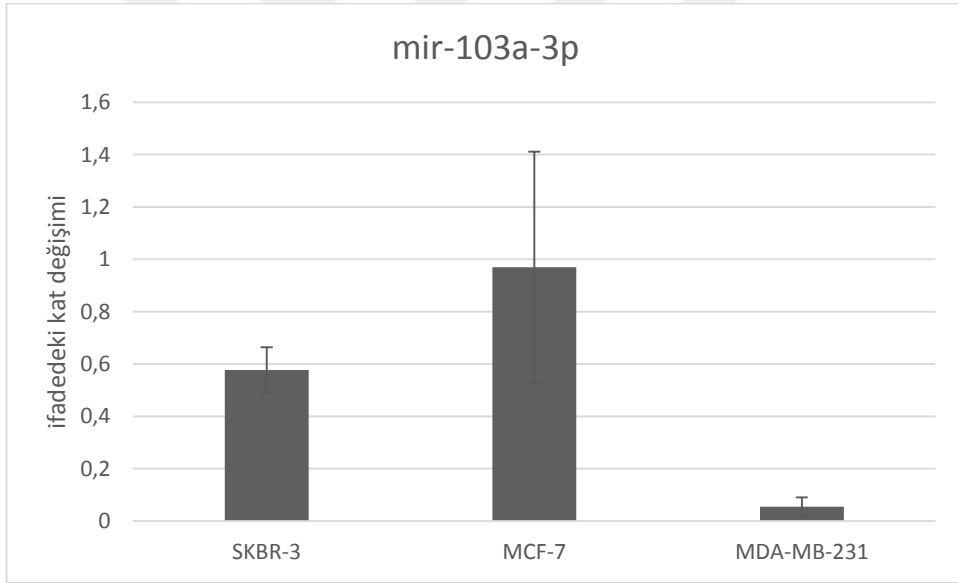
Şekil 4.1. Mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ve U6'nın MCF-7 ve SKBR-3 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları



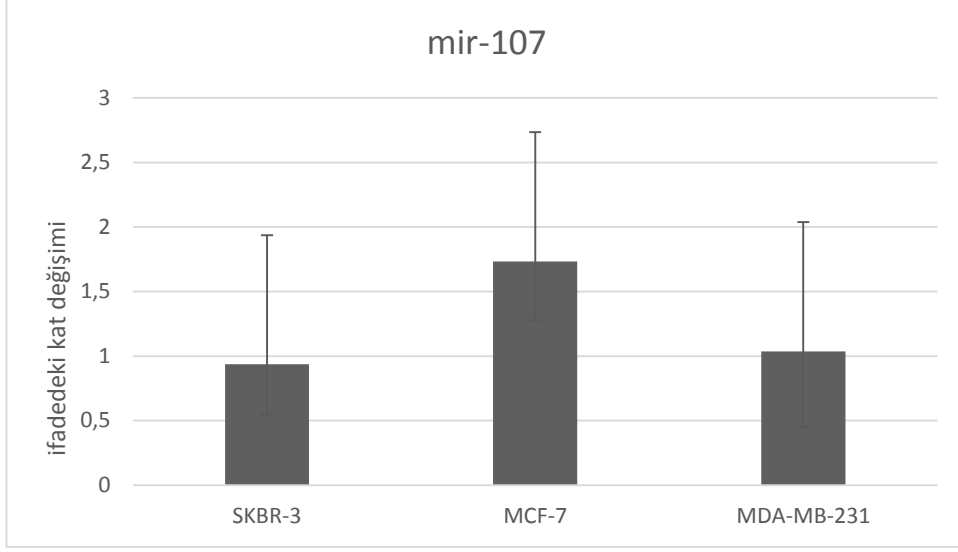
Şekil 4.2. Mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 ve U6'nın MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları



şekil 4.3. Mir-22-3p ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi



şekil 4.4. Mir-103a-3p ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi



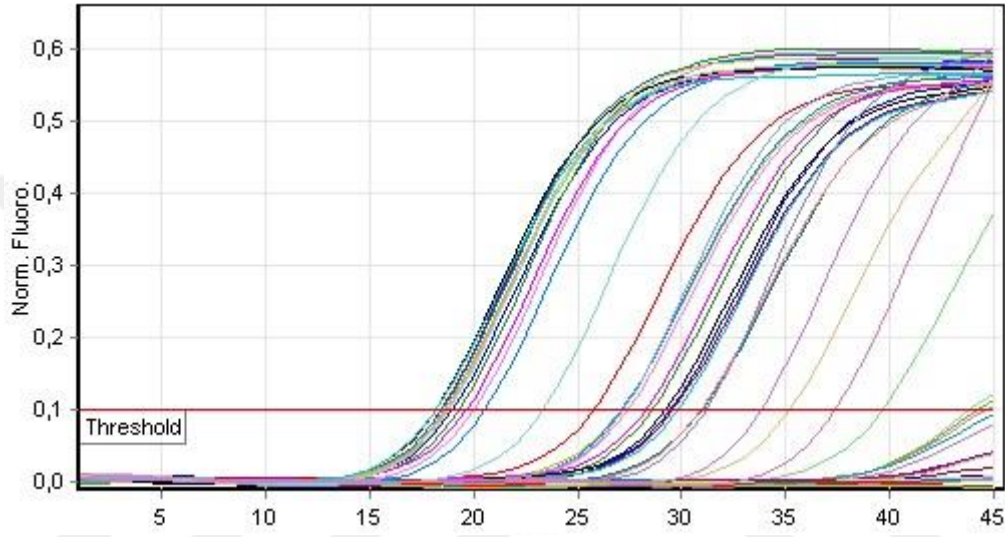
Şekil 4.5. Mir-107 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi

4.2. GLUT-1 ve GLUT-3' ün İfade Seviyelerinin Sonuçları

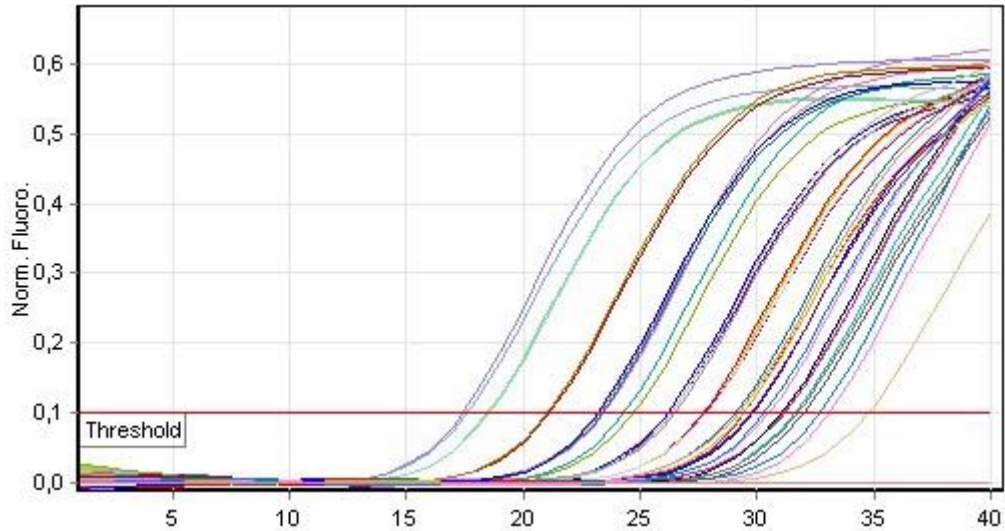
Bu çalışmada mir-22, mir-103, mir-107' nin ve GLUT genlerinin meme kanserindeki etkileri araştırılmak istenmiştir. Bu miRNA' ların tahmini hedefleri olabilecek GLUT genleri "www.targetscan.com" veri tabanı kullanılarak GLUT-1 ve GLUT-3 olarak bulunmuştur. GLUT-1 ve GLUT-3 genlerinin ifade seviyeleri qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazı kullanılarak, q-RT-PCR yöntemi ile bakılmıştır. Kontrol gen olarak GAPDH housekeeping geni kullanılmıştır. QRT-PCR analizinden elde edilen Ct değerleri alınarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile ifade seviyeleri hesaplanmış, GAPDH geni ile normalize edilmiştir. HTERT-HME1 hücre hattı ile karşılaştırılarak kat değişimleri (fold change) hesaplanmıştır. HTERT-HME1 hücre hattı kontrol grubu olduğu için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 1 olarak kabul edilmiştir. MRNA' lar için qRT-PCR analiz sonucu Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.' de gösterilmiştir. Burada yine MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231 hücre hatları, HTERT-HME1 normal meme epitelyum hücre hattı ile karşılaştırılarak normal hücrelere göre kanserli hücrelerin GLUT-1 ve GLUT-3 genlerindeki ifade seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Sırasıyla mRNA' ların ifade seviyelerinin sonuçları aşağıdaki gibidir.

GLUT-1' in ifade seviyesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7' de normal epitelyum hücre hattına göre $1,7 \pm 1,06$ kat artmıştır. SKBR-3' de normal epitelyum hücre hattına

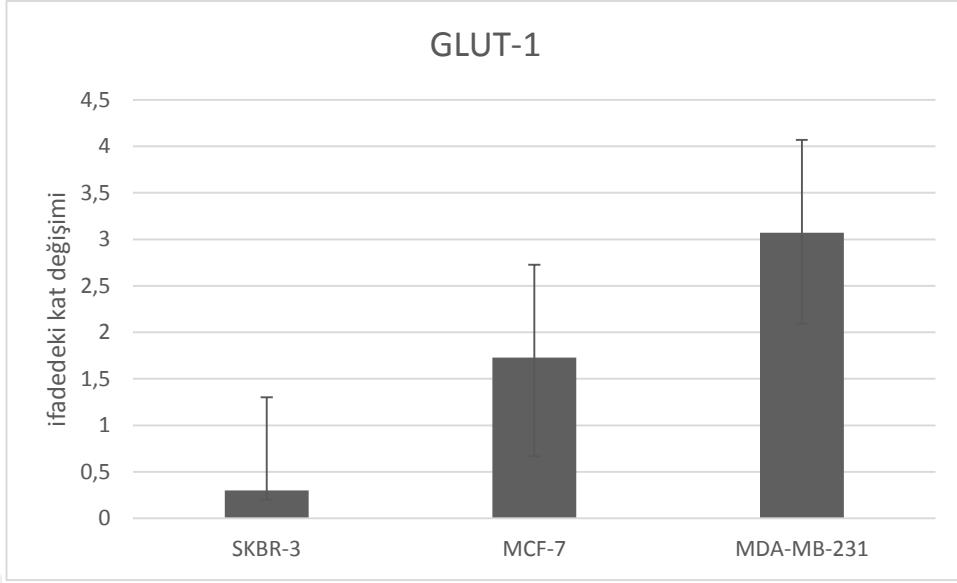
göre $3,3\pm 0,1$ kat azalmıştır. MDA-MB-231’ de normal epitelyum hücre hattına göre ise $3,0\pm 0,97$ kat artmıştır. GLUT-3’ nin ifade seviyesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7’ de normal epitelyum hücre hattına göre $10\pm 0,02$ kat azalmıştır. SKBR-3’ de normal epitelyum hücre hattına göre $43\pm 0,006$ kat azalmıştır. MDA-MB-231’ de normal epitelyum hücre hattına göre ise $5,5\pm 5,7$ kat artmıştır. GLUT-1 ve GLUT-3’ ün ekspresyon seviyelerini gösteren sütun grafikleri de Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’ da gösterilmiştir.



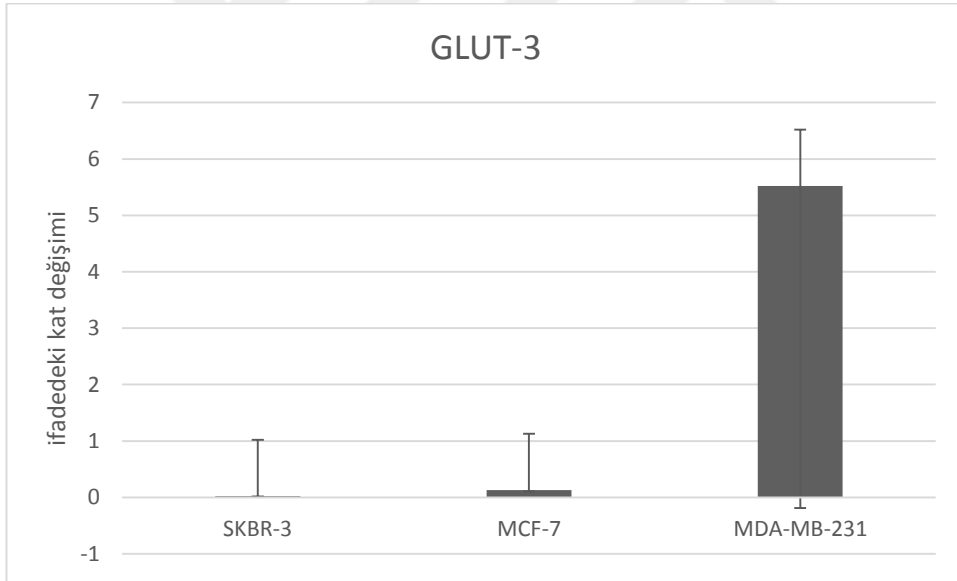
Şekil 4.6. GLUT-1, GLUT-3 ve GAPDH’ in MCF-7 ve SKBR-3 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları



Şekil 4.7. GLUT-1, GLUT-3 ve GAPDH’in MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarında q-RT-PCR gen ifadesi analiz sonuçları



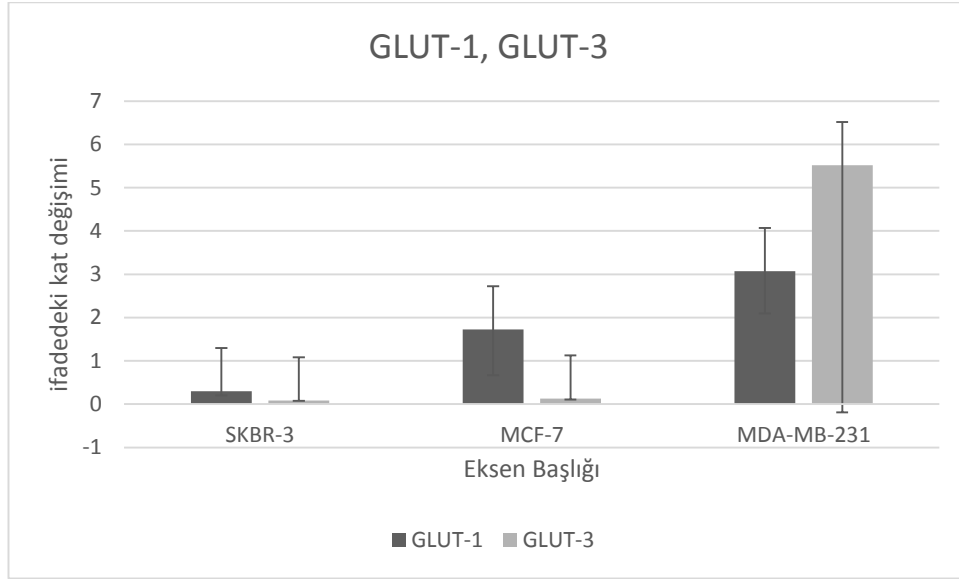
şekil 4.8. GLUT-1 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi



şekil 4.9. GLUT-3 ifade seviyesinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının normal hücre hattına (CRL-4010) göre değişimi

4.3. Hücre Hatları Moleküler Özellikleri ile GLUT Genleri İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması

MCF-7 meme kanseri hücre hattı moleküler özellikleri bakımından östrojen reseptör pozitif ve bazen de progesteron reseptör pozitif özellik gösterirken HER2 ekspresyonu bakımından negatiftir. MCF-7 hücre hattında, GLUT-1 ekspresyonu $1,7\pm 1,06$ kat artmış, GLUT-3 ekspresyonu ise $10\pm 0,02$ kat azalmıştır. SKBR-3 meme kanseri hücre hattı moleküler özellikleri bakımından östrojen reseptör negatif ve progesteron reseptör negative özellik gösterirken HER2 ekspresyonu bakımından pozitiftir. GLUT-1 ekspresyonu $3,3\pm 0,1$ kat azalırken, GLUT-3 ekspresyonu $43\pm 0,006$ kat azalmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı moleküler özellikleri bakımından östrojen reseptör, progesterone reseptör ve HER2 ekspresyonu bakımından negatiftir. GLUT-1 ekspresyonu $3,0\pm 0,97$ kat artarken, GLUT-3 ekspresyonu ise $5,5\pm 5,7$ kat artmıştır. GLUT1 ve GLUT-3 genlerinin ekspresyon seviyelerinin hücre hatları arasında karşılaştırılması Şekil 4.10' da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. GLUT-1 ve GLUT-3 ifade seviyelerinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kendi aralarında karşılaştırılması

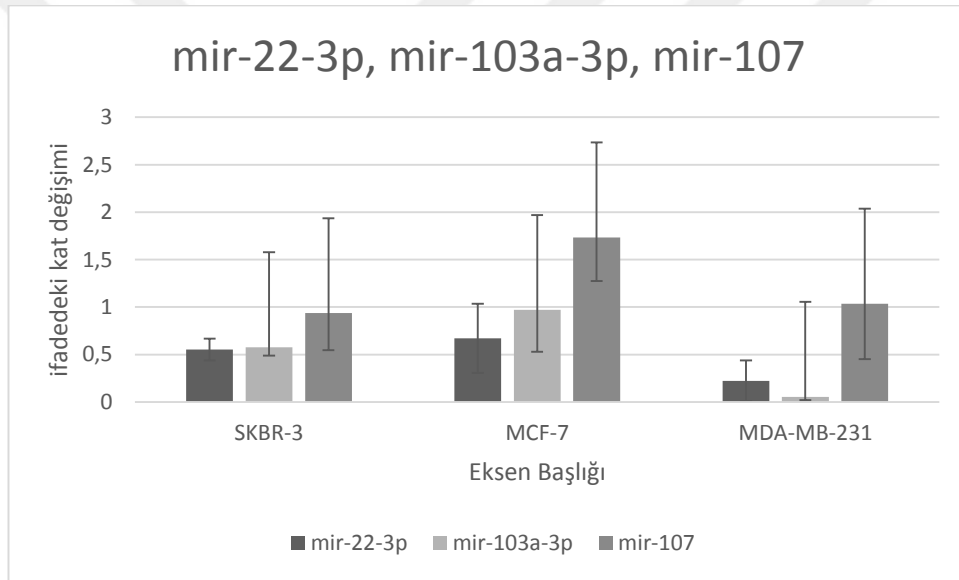
4.4. Hücre Hatları Moleküler Özellikleri ile miRNA Genleri İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması

MCF-7 meme kanseri hücre hattında mir-22 $1,6\pm 0,36$ kat azalmıştır, mir-103 değişim yoktur ($\pm 0,44$), mir-107 $1,7\pm 0,45$ kat artmıştır

SKBR-3 meme kanseri hücre hattında, mir-22 $2\pm 0,11$ kat azalmıştır, mir-103 $1,75\pm 0,08$ kat azalmıştır, mir-107 göre hemen hiç değişmemiştir ($\pm 0,39$).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, mir-22 $5\pm 0,21$ kat azalmıştır, mir-103 $20\pm 0,03$ kat azalmıştır, mir-107 $1,1\pm 0,59$ kat azalmıştır.

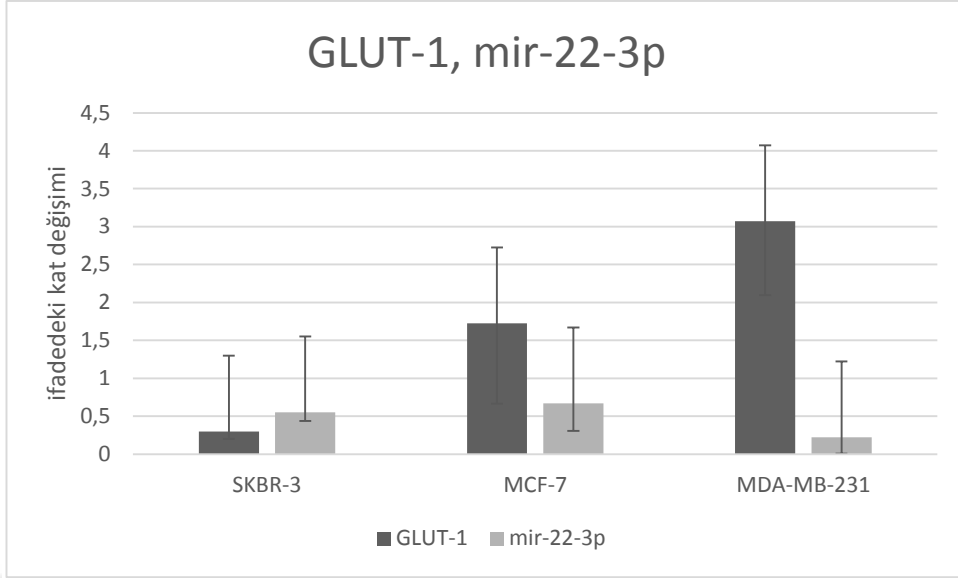
Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107 genlerinin ekspresyon seviyelerinin hücre hatları arasında karşılaştırılması Şekil 4.11' de gösterilmiştir.



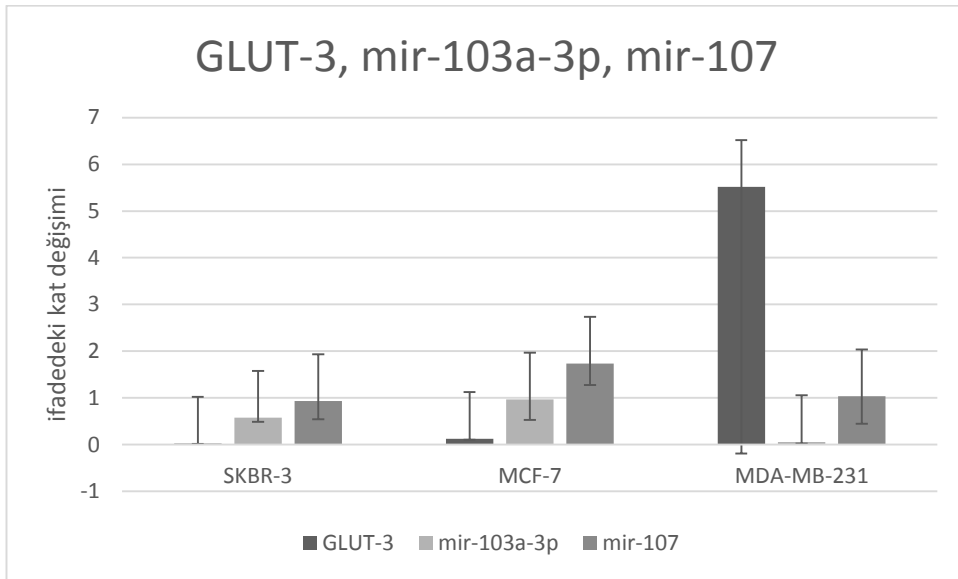
Şekil 4.11. Mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107 ifade seviyelerinin MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kendi aralarında karşılaştırılması

4.5. MiRNA' lar ve Hedef Genleri İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması

Targetscan veri tabanına göre mir-22-3p' nin tahmini hedef geni SLC2A1 (GLUT1), mir-103a-3p ve mir-107' nin tahmini hedef geni ise SLC2A3 (GLUT3) olarak bulunmuştur. Bu nedenle bu miRNA' lar ve bu genler birbirleri ile karşılaştırılmak istenmiştir. MiRNA' lar ve hedef mRNA' larının ifade seviyelerinin birbirleri ile ve farklı hücre hatlarında karşılaştırılması Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Mir-22-3p, ifade seviyesinin meme kanseri hücre hatlarında GLUT-1' in ifade seviyesi le karşılaştırılması



Şekil 4.13. Mir-103a-3p ve mir-107' nin ifade seviyelerinin meme kanseri hücre hatlarında GLUT-3' ün ifade seviyesi le karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, ölümlerle sonuçlanabilen, genetik bir hastalıktır. Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser tipidir ve ölüm ile sonuçlanan kanserlerin başında gelmektedir. Meme tümörleri; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi ve tedaviye yanıtlarına göre farklı özellikleri olan, heterojen tümörlerdir. Meme kanseri görülme sıklığı, ülkeden ülkeye değişmekle birlikte, dünyada kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin % 32' sini ve kansere bağlı ölümlerin % 18' ini meme kanseri oluşturmaktadır (Darendeliler ve Ağaoğlu 2003). Ülkemizde tüm kanserlerin % 24.1' ini meme kanserinin oluşturduğu söylenmektedir. Meme kanseri sıklığı fazla olmasına rağmen sağ kalımı yüksek bir kanser türüdür. Bu nedenle erken teşhisi önem taşımaktadır ([http:// www. saglik.gov.tr](http://www.saglik.gov.tr), 2017).

Erken evrede meme kanseri teşhisi için biyobelirteçler önem taşımaktadır (Knight ve ark. 1977, Sekar ve ark. 2013). Meme kanserinde bu amaçlarla yapılan birçok miRNA çalışması yer almaktadır (Chen ve ark. 2012, Slaby ve ark. 2012, Redova ve ark. 2012, Tahiri ve ark. 2014). Kanser oluşumunda kodlama yapan gen bölgelerinin yanısıra kodlama yapmayan gen bölgeleride son zamanlarda en çok çalışılan konulardan birisi olmuştur. Kodlama yapmayan RNA' lar içinde en çok çalışılanı ve önem taşıyanı mikroRNA' lardır (Calin ve Croce 2006). ncRNA' ların kompleks canlılarda çok önemli bir genetik düzenleyici olduklarını gösteren çalışmaların ve buluşların artışıyla beraber bu RNA' ların hastalıkların biyobelirteci olarak kullanılabilceği fikri oldukça önem kazanmıştır. miRNA' ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler farklı tümörlerde ve karsinomalarda ayırıcı tanı olarak kullanılmaktadır (Lu ve ark. 2005).

MikroRNA' lar tüm kanser türleri için önem taşımaktadır. Kanser tanınması, ilerleyiş ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde mikroRNA' lardan yararlanılması düşünülmektedir. Erken teşhisin zor olduğu kolon kanseri ve diğer kanser türlerinde ise, hastanın tükürük, serum, plazma ve doku örneklerinden çıkarılacak miRNA profillerinin erken teşhiste kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir (Cortez ve Calin 2009). MiRNA' ların sadece erken tanı bağlamında biyobelirteç olarak değil, kanserin tedavisinde de kullanılabilcekleri düşünülmektedir (Gonzalez-Alegre 2007). MiRNA' ların gen ekspresyonundaki önemli rolü, kanser için yeni bir umut olmuştur. MiRNA' ların

onkogenleri susturma, metastazı önleme, metastazı tetikleme, kemoterapiye dayanıklılık kazandırma gibi rolleri vardır (Iorio ve ark. 2005).

Kanserde miRNA' nın ifadesinin az olması tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiğini onkogen veya hücre farklılaşmasını ya da apoptozu kontrol eden genleri düzenleyerek kanseri engelleyebileceğini düşündürmüştür. Kanserde miRNA' nın gereğinden fazla eksprese olması, onkogen olarak işlev gösterdiğini ve apoptozu kontrol eden genleri ya da tümör baskılayıcı genleri baskılama şeklinde düzenleyerek kanser gelişmesinde çok önemli bir etken olarak işlev gördüğünü ve bu bilgilerin tedavide kullanılabileceğini göstermiştir (Wiemer 2007). Birçok farklı hastalığın patogenezinde miRNA' ların rol oynadığı gösterilmiştir (Ruvkun 2001). Bu amaç ile kanser gelişiminde onkogen ve tümör baskılayıcı genler gibi davrandıkları deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Lotterman ve ark. 2008).

Meme kanserinin glukoz alımı normal hücrelere göre çok yüksek düzeydedir. Glukoz galaktoz ve fukroz birçok hücre için temel enerji kaynağını oluşturmaktadır. Bu moleküller hücre içine girmek için taşıyıcılara ihtiyaç duyarlar. İşte kanser gelişiminde kalıtsal ve ailesel oluşum dışında katkıda bulunan gen veya genetik mekanizmalardan biride GLUT gen ailesidir (Gould ve Holman 1993). Glukoz transporterlar enerjiye ihtiyaç duymadan plazma membranından hücre içine glukoz taşırlar. Doku dağılımlarına ve glukozla olan affinitelerine göre farklılık gösterirler (Olson ve Pessin 1996, Ito ve ark. 2002). Glukoz metabolizmasının arttığı insan malignitelerinin, normal hücrelere göre GLUT-1 düzeylerini daha yüksek seviyede ifade ettiğine dair kanıtlar vardır. Özellikle, insan GLUT-1 malign hücrelerde ve meme, pankreas, serviks, endometriyum, akciğer, mezotelyum, kolon, mesane, tiroid, kemik, yumuşak dokular ve ağız boşluğunu içeren çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edilir (Chang ve ark. 2000, Wang ve ark. 2006, Grover-McKay ve ark. 1998, Ashton-Sager ve ark. 2006, Kato ve ark. 2007, Wincewicz ve ark. 2007, Yasuda ve ark. 2005, Tateishi ve ark. 2006). Özellikle, GLUT-1 ekspresyonu artmış malign potansiyel, invazivlik ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Kunkel ve ark. 2007, Ito ve ark. 1998, Sakashita ve ark. 2001). GLUT-3 de insan malign dokusunda eksprese edilir, ancak bildirilen sonuçlar arasında tutarsızlıklar vardır (Brown ve Vahl 1993, Markert ve ark. 2001).

Meme kanserinde tedaviye yanıtta en önemli basamak ve belirteç kanserin moleküler özelliğidir. Heterojen bir yapıya ve moleküler profile sahiptir. Meme kanseri gelişiminde belirgin bir yolak veya histolojik gösterge belirlenmemiştir (Stingl ve Caldas 2007).

Yeni tanı konulan meme tümörlerinde östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) gen ekspresyon özelliği rutinde kullanılan önemli belirteçlerdir. Son yıllarda ileri moleküler teknolojik yöntemlerin uygulanması ile meme tümörlerinin sınıflandırılması gen ekspresyon profiline göre yapılmaktadır (Bauer ve ark. 2007). Gen mikrodizin analizlerine göre; meme kanseri östrojen reseptörü ER-pozitif ve ER-negatif olmak üzere iki temel alt tipe ayrılmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 75' i ER ve/veya PR pozitifliği gösterir. ER-pozitif tümörler tipik olarak lüminal epitel hücrelere özgü genleri eksprese ederler. Bu nedenle, bu alt-grup "Lüminal" olarak adlandırılmıştır. Lüminal grup kendi arasında Lüminal A ve Lüminal B şeklinde iki alt gruba daha ayrılır (Valentin ve ark. 2012).

Endojen kaynaklı östrojen fazlalığının kanser gelişiminde anlamlı bir rol oynadığı düşünülmektedir (Wittliff 1984). Meme displazilerinin nedeninin over aktivitesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde en çok kabul edilen görüş, östrojenin, özellikle östrodiol fraksiyonunun artışı veya progesteron seviyesinin düşüşü ile östrojen-progesteron arasındaki dengenin progesteron aleyhine bozulmasıdır. Bu nedenle hormon reseptör özellikleri önem taşımaktadır (Ünal 1995).

Yapılan bu çalışmada, mir-22, mir-103a, mir-107' nin ifade seviyeleri ve targetscan veritabanı kullanılarak hedeflediği düşünülen kanserli hücrelerde glukoz alımını sağlayan GLUT-1 ve GLUT-3 genlerinin ifade seviyelerine qRT-PCR yöntemi ile farklı meme kanseri hücre hatlarında normal epitel hücre hattı ile karşılaştırmalı olarak bakılmıştır. Farklı meme kanseri hücre hatlarındaki ifade seviyeleri, farklı moleküler alt tip özelliklerinde etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar analiz edilip karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

Mir-22 ile ilgili yapılan bazı çalışmalara göre, meme kanser örneklerinde mir-22 ekspresyonunun HER2+ de HER2- e kıyasla daha düşük, ER+ ve PR+ meme kanseri

örneklerinde ER- ve PR- meme kanseri örneklerine göre ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Mattie ve ark. 2006). Genel olarak mir-22' nin meme kanserinde downregülasyon gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve ark. 2010). Yapılan bir çalışmada, Mir-22 östrojen reseptörün regülatörü olarak tespit edilmiştir ve ER-pozitif insan meme kanseri hücrelerinde down regülasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Xiong ve ark. 2010). Yakın tarihli bir çalışmada ayrıca, miR-22' nin GLUT-1' i hedefleyerek bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiğini ve meme kanseri hastalarının TNM evresi, uzak metastaz ve sağkalım ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Pandey ve ark. 2015).

Ayrıca, bazı çalışmalara göre mir-22' nin yüksek ekspresyonu meme kanser hücrelerinin invazyonunu, metastasını ve proliferasyonunu baskılar (Kong ve ark. 2014). Mir-22 tümör supresör olarak fonksiyon gösterebilmektedir (Xiong ve ark. 2010). Mir-22' nin ER' yi düzenlediği ve ER + hücre hatlarında miR-22 ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Başka bir çalışmada MDA-MB-231 metastatik hücre hattındaki miR-22 inhibisyonunun, hücrenin göçünde ve invazyonda azalmaya neden olduğunu, bunun aksine MCF-7 hücre hattındaki aşırı ekspresyonu ise hücre göçünün ve invazyonun artmasına neden olmuştur (Koufaris ve ark. 2016).

Bizim sonuçlarımızda; mir-22 ekspresyonu, 3 hücre hattında azalış göstermiştir. En fazla azalışı MDA-MB-231 hücre hattında ($5\pm 0,21$ kat), sonra SKBR-3 hücre hattında ($2\pm 0,11$ kat), en az azalışı ise MCF-7' de göstermiştir ($1,6\pm 0,36$ kat). Fakat bu anlamlı bir azalış değildir. Bu sonuçlar ışığında mir-22 diğerlerine göre daha agresif hücre hattında, daha fazla azalış göstermiştir. Buda mir-22' nin yüksek ekspresyonunun tümör supresör olarak işlev görebileceğini düşündürebilmektedir ki yapılan bir çok çalışmada bu yönde sonuçlar vermiştir. Mir-22' nin daha düşük ekspresyonlarında agresiflik, invazyon potansiyeli ve metastatik özelliklerin artıyor olması muhtemeldir. Moleküler özellikler ile karşılaştırılacak olursa, bazı çalışmalar da ER+ hatlarda mir-22' nin ekspresyonunun azaldığını kanıtlamıştır. Bizim çalışmamızda da ER+ hücre hattı olan MCF-7' de mir-22' nin ekspresyonunda azalış gözlenmiştir fakat bu çok anlamlı bir azalış değildir. Buna karşılık, hormon reseptör ve HER2 yönünden negatif hücre hattında (MDA-MB-231) diğerlerine göre daha fazla bir azalış gözlenmiştir.

Meme kanseri vakalarından alınmış doku örnekleriyle yapılan bazı çalışmalarda, miR-103/107 ve DICER' in ekspresyon seviyelerinin ters ilişkili oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular şunu ima eder, mir-103/107 birden fazla gene etki ederek hala tanımlanmamış ve metastasla ilişkili diğer mRNA moleküllerinin fonksiyonlarını düzenliyor olabilir. Araştırmacılar ayrıca, invazyon potansiyeli artmış olan in vitro meme karsinom hücrelerinde Mir-103/107' nin overekspresyonunu keşfettiler. Yapılan çalışmalara göre; insan meme kanserinde miR-103/107' nin overekspresyonu metastaz ve kötü sonuca sebep olmaktadır. Mir-103/107' nin inhibisyonu malign hücrelerin invazyon, göç ve metastasına engel olur (Martello ve ark. 2010).

Serumda bulunan mir-103 potansiyel tanısal bir marker olarak meme kanserinde kullanılabilir ve hastaların prognostik özellikleri hakkında faydalı bilgiler verebilir (Wang ve ark. 2012).

Bir çalışmada mir-107' nin meme kanseri olan hastaların malign dokularında yüksek ekspresyon gösterdiği ifade edilmiştir (Chen ve ark. 2011).

Bizim çalışmamızda, mir-103a-3p ekspresyonu 3 hücre hattında da normal epitelium hücre hattına göre azalış göstermiştir. En fazla azalışı MDA-MB-231 hücre hattında göstermiştir ($20 \pm 0,03$ kat). En az azalış ise MCF-7 ($1,1 \pm 0,03$ kat) ve SKBR-3 ($1,75 \pm 0,08$ kat) hücre hatlarında göstermiştir. Fakat bu hücre hatlarındaki azalış anlamlı değildir. Bizim çalışmamızda diğerlerine göre daha agresif olan hücre hattında (MDA-MB-231) diğerlerine göre yüksek bir farkla mir-103a-3p geninde azalış söz konusudur. Bu nedenle mir-103a-3p, mir-22' nin tersine tümör suppresör olarak değil onkogen olarak görev yapıyor olabilir. Bazı çalışmalar bunun aksine mir-103a-3p' nin yüksek ifadesinin invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğunu söylemektedir. DICER' in direk hedefi olduğu düşünülmektedir. DICER' i (tümör supresor gen) baskılayarak hücre hareketliliğini ve kötü pronozu arttırmaktadır. Fakat bizim çalışmamızda daha agresif ve invaziv hücre hattında daha az agresif olan hücre hatlarına göre 20 kata yakın daha az eksprese edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bunun nedeni; DICER mir-103a-3p tarafından değil farklı miRNA' lar tarafından da baskılanıyor olabilir bu nedenle invazyon kapasitesi yüksek hücre hattında mir-103a-3p' ninde ekspresyonunu baskılayacak çevresel yada organizma içinde gerçekleşen bilinmeyen etkiler olmuş olabilir. Ayrıca

moleküler özelliklere bakıldığında hormon reseptör ve HER2- hücre hattında diğerlerine göre anlamlı bir azalış gözlenmiştir. ER+ ve PR+’ de ise ekspresyonda daha az bir azalış görmemiz bunları hedefleyebileceğini düşündürebilir. Buradan yola çıkılarak, mir103a-3p’ nin ekspresyonu artırılarak yada azaltılarak bunları hedefleyip hedeflemediğine dair çalışmalar yapılabilir.

Mir107 ise 3 hücre hattında anlamlı bir artış yada azalış göstermemiştir. MDA-MB-231’ de ve SKBR-3’ de değişmezken MCF-7’ de $1,7\pm 0,45$ katlık bir artış göstermiştir. Neredeyse hiçbir hücre hattında, mir-107’ nin ekspresyonunda anlamlı bir değişim yoktur. Mir107’ de mir-103 gibi yapılan bazı çalışmalarda metastaz ve kötü sonuçla ilişkili bulunmuştur ve meme kanserinde overekspresyonunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fakat bizim çalışmamızda anlamlı bir artış yada azalış gözlenmemiştir. Moleküler özellikleri kendi içlerinde kıyaslayacak olursak sadece ER+ hücre hattında arttığını görmekteyiz. Sadece MCF-7’ de bir artış söz konusudur. Buda mir-107’ nin ER reseptörü hedef alıyormu sorusunu akla getirebilir.

Malign hücrelerin glukoz alımındaki artışın glukoz transport proteinlerinin artmış ekspresyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle GLUT-1 ve GLUT-3 temel taşıyıcılardır (Macheda ve ark. 2005, Joost ve Thorens 2001, Joost ve ark. 2002). İn vitro olarak, meme kanseri hücre hatlarında GLUT ekspresyon paternleri çok kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu ailenin en sık çalışılan ve yaygın alt tiplerinden biri olan GLUT-1, özellikle hücrenin bazal glikoz ihtiyacı yönünden önem taşımaktadır. Malign hücrelerin hızlı metabolizmaları sonucu glikoz ihtiyaçları artmaktadır. Erken evre meme kanserinde GLUT-1 ekspresyonunun prognostik önemi iyi bilinmemektedir (Ravazoula ve ark. 2003, Mueckler ve ark. 1994, Laudański ve ark. 2003, Cao ve ark. 2007). Kang ve ark. (2002) GLUT-1’ in ekspresyonunun östrojen ve progesteron reseptör durumuyla anlamlı şekilde korele olduğunu gösterdi. Fakat bazı çalışmalar bunun aksini göstermiştir. GLUT-1 ekspresyonunun böyle bir korelasyon göstermediği, ancak östrojen ve progesteron reseptör pozitif kanserlerde GLUT-3 ekspresyonunun reseptör negatif karsinomlara göre anlamlı olarak daha yüksek oranda olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, GLUT-1’ in ekspresyonunun, endometriyal ve meme karsinom hücreleri tarafından glikoz alımını sağladığı ve bunun yanında GLUT-3’ ünde glukoz alımına katkıda

bulunduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar ışığında GLUT-1 ve GLUT-3 endometrial ve meme tümörlerinin farklılaşmasında önemli biyobelirteç olabilirler (Krzslak ve ark. 2012).

Grover-McKay ve ark. (1998) hücre yüzeyindeki GLUT-1 ekspresyonunun MCF-7, MDA-MB-435 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücre hatlarının invaziv kabiliyeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Zamora-Leon ve ark (1996), meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-468' in glukoz taşıyıcısı GLUT-1' i eksprese ettiğini göstermiştir.

Kang ve ark. (2002) GLUT-1 ekspresyonunun negatif ER, negatif PR, yüksek nükleer derece ve kötü sağkalım ile korele olduğunu buldular. Ovarian hormonlar, özellikle de östrojen, GLUT regülasyonunda etkili gibi gözükmemektedir (Medina ve Owen 2002). GLUT-1 seviyesinin yükselmesi, beyin, meme, kafa, boyun, mesane, böbrek, kolorektal, akciğer ve yumurtalık gibi hemen hemen tüm kanser türlerinde gösterilmiştir (Macheda ve ark. 2005). GLUT-1 ekspresyonu artmış habis potansiyel, invazivlik ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Haber ve ark 1998, Sakashita ve ark. 2001, Kalir ve ark. 2002). Bu açıdan bakılacak olursa kanserin erken teşhisinde GLUT-1 seviyeleri belirleyici görev görebilir. Kanser daha ileri evreye gelmeden GLUT seviyesi ile kanserin evresi ve prognozu hakkında bilgi edinilebilir ve erken teşhis ile tedavi ve sağ kalım oranları arttırılabilir.

Meme kanserlerinde GLUT-1 ve GLUT-3 protein ekspresyonu çalışmaları değişken sonuçlar vermiştir. Bazı immunohistokimyasal çalışmalar, meme tümörlerinin yaklaşık %50' sinde GLUT-1 ekspresyonu ve sadece %25' inde GLUT-3 ekspresyonu tespit etmiştir (Younes ve ark. 1995, Kang ve ark. 2002, Schmidt ve ark. 2010).

SLC2A3 (GLUT-3) aşırı ekspresyonu, oral dil karsinomasında tümör boyutu, patolojik evre ile korelasyon göstermiştir (Estilo ve ark. 2009). İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen GLUT-3 protein ekspresyonu, küçük olmayan akciğer karsinomasında, oral skuamöz hücreli karsinomada ve laringal karsinomda kötü prognozun bir göstergesidir. Bu kanserlerde GLUT-3 yine prognostik bir marker olarak görev görebilir (Ayala ve ark. 2010, Baer ve ark. 2002).

Bunun yanı sıra, GLUT-3 mRNA veya protein ifadeleri, tiroid ve over kanserlerinde klinikopatolojik parametrelerle korelasyon göstermemiştir (Matsuzu ve ark. 2004, Rudlowski ve ark. 2004, Tsukioka ve ark. 2007).

Bazı çalışmalar meme kanserinde GLUT-3 ekspresyon varlığını göstermiş bazıları ise gösterememiştir. Bu konu hala netlik kazanmış gibi gözükmemektedir. Örneğin; Younes ve ark. (1997) meme kanserinde GLUT-3 ekspresyonunu çalışmalarında ortaya koyamamıştır. Fakat bunun aksine Godoy ve ark. (2006) GLUT3' ün sadece Invaziv duktal karsinom olan 33 vakanın 3' ünde çok az bir şekilde eksprese edildiğini göstermiştir ve 12 normal dokuda GLUT-3 ekspresyonuna rastmamışlardır (Godoy ve ark. 2006). Bununla birlikte bazı çalışmalarda, meme karsinomlarında göreceli olarak GLUT-3 mRNA seviyesi GLUT-1' den çok daha düşük bulunmuştur. Daha yüksek GLUT-3 ekspresyonu, meme kanserlerinin kötü histolojik derecesi ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (Godoy ve ark. 2006). Yapılan bir çalışmada meme kanseri vakalarının % 40' ında GLUT-3 mRNA ekspresyonunun mevcut olduğu gösterilmiştir (Krzeslak ve ark. 2012).

Yaptığımız çalışmada, mir-22, mir-103 ve mir-107' nin hedeflediği düşünülen ve glukoz alımı ile ilişkili olan GLUT-1 ve GLUT-3 genlerinde bu meme kanseri hücre hatlarında ekspresyonlarına bakılmıştır. Mir-22' nin hedeflediği düşünülen GLUT-1 geninin ekspresyonu 3 hücre hattında artış göstermiştir. GLUT-1 geni, MCF-7 hücre hattında anlamlı bir artış göstermezken ($1,7\pm 1,06$ kat), SKBR-3 ($3,3\pm 0,1$ kat) azalmış ve MDA-MB-231 ($3,0\pm 0,97$ kat) hücre hatlarında anlamlı artış göstermiştir. Bu sonuçlara istinaden GLUT-1' in agresiflik ve kötü prognozla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü MCF-7 ve SKBR-3' e göre daha agresif olan MDA-MB-231 hücre hatlarında GLUT-1 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bunun yanında mir-22 ile ters bir korelasyon gözlenmiştir. Mir-22 en fazla azalışı MDA-MB-231' de ($5\pm 0,21$ kat) gösterirken GLUT-1 en fazla artışı ($3,0\pm 0,97$ kat) MDA-MB-231 de göstermiştir. Mir-22 SKBR-3' de $2\pm 0,11$ kat azalış gösterirken GLUT-1 SKBR-3' de $3,3\pm 0,1$ katlık bir azalış göstermiştir. Mir-22 MCF-7' de $1,6\pm 0,36$ lik anlamlı olmayan bir azalış gösterirken GLUT-1 MCF-7' de $1,7\pm 1,06$ lik anlamlı olmayan bir artış göstermiştir. Sonuç olarak diğerlerine göre daha agresif olan hücre hattında (MDA-MB-

231), mir-22 ekspresyonunda en fazla azalışı, GLUT-1 ekspresyonunun ise diğerlerine göre en fazla artışı görmekteyiz. GLUT-1 seviyesi bu hücre hatları arasında en agresif olan MDA-MB-231 de artış gösterdiğinden dolayı, yine agresiflik ve kötü pronozla ilişkili olduğunu görülmektedir. Mir103a ve mir107' nin hedeflediği düşünülen GLUT-3 geninin ekspresyonu ise normal epitelyum hücre hattına göre MCF-7 hücre hattında $10\pm 0,02$ katlık, SKBR-3 hücre hattında $43\pm 0,006$ katlık bir azalış göstermiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise $5,5\pm 5,7$ kata yakın bir artış göstermiştir.

Bu sonuçlar ışığında, GLUT-3' ü hedeflediği düşünülen mir103' ün MCF-7 hücre hattında anlamlı bir değişim görülmemiştir ($\pm 0,44$). Fakat aynı hücre hattında GLUT-3 ekspresyonu $10\pm 0,02$ katlık anlamlı bir azalış göstermiştir. Mir-103 seviyesi yine MCF-7 hücre hattında olduğu gibi SKBR-3 hücre hattında da anlamlı olmayan ($1,75\pm 0,08$ kat) bir azalış sergilemiştir. Fakat GLUT-3 seviyesi aynı hücre hattında çok büyük bir farkla $43\pm 0,006$ katlık bir azalış göstermiştir. Bu hücre hatlarında mir-103' ün GLUT-3'ü hedefliyor olabileceği sonucuna varılmamaktadır. Mir-103 ekspresyon seviyesi MDA-MB-231 hücre hattında $20\pm 0,03$ kat azalırken GLUT-3 ekspresyonu aynı hücre hattında $5,5\pm 5,7$ katlık artış göstermiştir. MDA-MB-231 hücre hattında mir-103 ile GLUT-3 arasında ters bir korelasyon gözlenmektedir. GLUT-3 seviyesi de GLUT-1 gibi bu hücre hatları arasında yine en agresif olan MDA-MB-231 de artış göstermiştir ve bu sonuç GLUT-3' ünde yine agresiflik ve kötü pronozla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında baktığımız miRNA' larda genel olarak azalış yada anlamlı olmayan ekspresyon değişimleri gözlenmiş, GLUT-1 ve GLUT-3' de ise yalnızca MDA-MB-231 hücre hattında anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer hücre hatlarında ise anlamlı şekilde azalış göstermişlerdir. Fakat bu tüm sonuçlar gen ifadesindeki artış yada azalışı verip protein hakkında bilgi vermediği için net birşey söylemek zordur. Bunlar sadece tahmini yorumlar olup, ileride yapılacak çalışmalarda protein seviyelerinde bakılarak karşılaştırmalı olarak daha net yorumlar yapmak mümkündür.

Bu çalışma, 3 hücre hattında mir-22-3p, mir-103a-3p, mir-107 genlerinin ekspresyon seviyelerine ve bu miRNA' ların targetscan veri tabanına göre hedefleyebileceği tahmin edilen ve kanser hücrelerinde fazla glukoz alımında önemli rol oynayan GLUT-1 ve

GLUT-3 genlerinin farklı moleküler alt tiplere sahip meme kanser hücre hatlarında birlikte bakıldığı bir çalışmadır. Burada farklı 3 parametre birbiri ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. İleriki çalışmalarda mir-22-3p, mir-103a-3p ve mir-107' nin tahmini hedeflerinin protein seviyeleride ölçülebilir. Mir-22, mir-103 ve mir-107' nin mimic yada antigomirleri hücre hatlarına verilerek bu GLUT' lardaki değişimlere de bakılabilir. Bunun yanı sıra tahmini hedef genlerdeki miRNA' ların uyuşum dizi bölgelerinde mutasyonlar oluşturarak gerçekten tahmin hedefi olup olmadıklarıda araştırılabilir.

Bu ve önceki çalışmalar da göstermektedir ki hücre hatlarında yapılan çalışmalarda GLUT genlerinin ekspresyonunu hedef miRNA' lar etkileyebildiği gibi başka faktörlerin de etkilemesi söz konusu olabilir. Hücre hatlarındaki pasajlamalar sırasında oluşabilecek herhangi bir mutasyon olasılığı da göz önüne alınacak olursa benzer çalışmanın *in vivo* koşullarda da tekrarlanarak bir ileri seviyeye taşınması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Aagaard, L., Rossi, J.J. 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.*,59(2-3):7 5-86.

Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A. 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132(21): 4653-4662.

Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., Agaimy, A., Marienhagen, J., Weiss, TS., Stoeltzing, O., Warnecke, C., Schölmerich, J., Oefner, P.J., Kreutz, M., Bosserhoff, A.K., Hellerbrand, C. 2009. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol.*, 174(4): 1544-1552.

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature.*, 431(7006): 350-5.

Anonim, 2017. SLC2A3
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6515->(Erişim tarihi: 01/01/2017)

Anonim, 2017. SLC2A1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6513->(Erişim tarihi: 01/01/2017).

Anonim, 2014. Mcf-7
<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/0/E/E/2/1980.ashx->(Erişim tarihi:29/01/2017).

Anonim, 2014.SKBR-3
<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/7/C/7/0/25937.ashx->(Erişim tarihi:29/01/2017).

Anonim, 2014. Mda-mb-231
<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/5/C/3/0/25935.ashx->(Erişim tarihi:29/01/2017).

Anonim, 2014. CrI-4010 Erişim tarihi:29.01.2017
<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/5/F/1/1/1935.ashx->(Erişim tarihi:29/01/2017).

Anonim, 2014. Lösemili Çocuklar Vakfı. En Son Dünya Kanser İstatistikler. <http://www.losev.org.tr/v2/tr/losemideguncelyenilikler.asp?ctID=826&RecID=5740->(Erişim Tarihi: 30 Ocak 2014).

Ayala, F.R., Rocha, R.M., Carvalho, K.C., Carvalho, A.L., da Cunha, I.W., Lourenço, S.V., Soares, F.A. 2010. GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules*, 15(4): 2374–2387.

Bachelard, H.S. 1972. Deoxyglucose and brain glycolysis. *Biochem J.*, 127(5): 83.

- Bacus, S.S., Kiguchi, K., Chin, D., King, C.R., Huberman, E. 1990.** Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Mol. Carcinog.*, 3(6): 350-362.
- Bader, A.G., Brown, D., Winkler, M. 2010.** The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res.*, 70(18): 7027-7030.
- Baer, S., Casaubon, L., Schwartz, M.R., Marcogliese, A., Younes, M. 2002.** Glut3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope*, 112: 393-396.
- Bartel, D.P. 2004.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297.
- Bartel, D.P. 2007.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 131:1129.
- Bartel, D.P. 2009.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U. Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., Bentwich, Z. 2005.** Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.*, 37(7): 766-770.
- Berdasco, M., Esteller, M. 2010.** Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell.*, 19(5): 698-711.
- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H., Cuppen, E., 2005.** Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120(1): 21-24.
- Blenkiron, C., Goldstein, L.D., Thorne, N.P., Spiteri, I., Chin, S.F., Dunning, M.J., Barbosa-Morais, N.L., Teschendorff, A.E., Green, A.R., Ellis, I.O., Tavaré, S., Caldas, C., Miska, E.A. 2007.** MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.*, 8(10): R214.
- Boado, R.J., Black, K.L., Pardridge, W.M. 1994.** Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Mol Brain Res.*, 27: 51-57.
- Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Wei, Z., Kamath, S., Chen, D.T. 2008.** Dressman H, Lancaster JM. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol.*, 110: 206–215.
- Brandes, L.J., Hermonat, M.W. 1983.** Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res*, 43(6): 2831-2835.

Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A.A., Caldas, C. 2005. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*, 23(29):7350-60.

Breving, K., Esquela-Kerscher, A. 2010.The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(8): 1316-29.

Brown, R.S., Wahl, R.L. 1993. Overexpression of GLUT-1 glucose transporter in human breast cancer: an immunohistochemical study. *Cancer.*, 72(10): 2979-2985.

Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K.L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Boecker, W. 1999. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol.*, 189(4): 521-526.

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

Cantuaria, G., Fagotti, A., Ferrandina, G. 2001. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer.*, 92(5): 1144-1150.

Cantuaria, G., Magalhaes, A., Penalver, M., Angioli, R., Braunschweiger, P., Gomez-Martin, O., Kanhoush, R., Gomez-Fernandez, C., Nadji, M. 2000. Expression of GLUT-1 glucose transporter in borderline and malignant epithelial tumors of ovary. *Gynecol. Oncol.*, 79(1):33-37.

Cao, X., Fang, L., Gibbs, S., Huang, Y., Dai, Z., Wen, P., Zheng, X., Sadee, W., Sun, D. 2007. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 59(4): 495-505.

Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C. 2006.Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21): 2492-502.

Cascione, L., Gasparini, P., Lovat, F., Carasi, S., Pulvirenti, A., Ferro, A., Alder, H., He, G., Vecchione, A., Croce, C.M., Shapiro, C.L., Huebner, K. 2013.Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One*, 8(2): e55910.

Chakraborty, C., George Priya Doss, C., Bandyopadhyay, S. 2013. miRNAs in insulin resistance and diabetes-associated pancreatic cancer: the 'minute and miracle' molecule moving as a monitor in the 'genomic galaxy'. *Curr Drug Targets*, 14: 1110–1117.

Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., Nielsen, T.O. 2008. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, 14(5): 1368-1376.

Chen, B., Tang, H., Liu, X., Liu, p., Yang, L., Xie, X., Ye, F., Song, C., Xie, X. 2015. miR-22 as a prognostic factor targets glucose transporter protein type 1 in breast cancer. *Cancer letters*, 356(2): 410-417.

Cheng, C., Fu, X., Alves, P., Gerstein, M. 2009. mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Genome Biol.*, 10:R90.

Colditz, G.A., Rosner, B. 2000. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 152: 950-964.

Cookson, V.J., Bentley, M.A., Hogan, B.V., Horgan, K., Hayward, B.E., Hazelwood, L.D., Hazelwood, L.D., Hughes, T.A. 2012. Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours. *Cell Oncol.*, 35: 301-308.

Çavuşoğlu, A.Ç., Saydam, S., Canda, T., Sakızlı, M. 2009. Tümör sınıflamasında yenilik çabaları. *Meme Sağlığı Dergisi*, 5:187-90

Çetin, M., Çetin, R., Tamer, N., Kelekçi, S. 2004. Breast arterial calcifications associated with diabetes and hypertension. *Diabetes and its Complications.*, 18:363-366.

Dalmay, T. 2008. MicroRNAs and cancer. *J.Intern.Med.*, 263(2):366-375.

Dalmay, T., Edwards, D.R. 2006. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*, 25(45): 6170-6175.

D'Ippolito, E., Iorio, M.V. 2013. MicroRNAs and triple negative breast cancer. *Int J Mol Sci.*, 14(11): 22202-20.

Di Leva, G., Gasparini, P., Piovan, C., Ngankou, A., Garofalo, M., Taccioli, C., Iorio, M.V., Li, M., Volinia, S., Alder, H., Nakamura, T., Nuovo, G., Liu, Y., Nephew, K.P., Croce, C.M. 2010. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 102(10): 706-721.

Douglas, H., Robert, A.W. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1): 57-70

Eis, P., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., Dahlberg, J.E. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS*, 102: 3627-3632,

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber K., Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-8.

Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., Vardar, E. 2015. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*, 11(2): 59-66.

Ellis, H., Cox, P. J. 1984. Breast problems in 1,000 consecutive referrals to surgical out - patients. *Postgrad Med. J.*, 60:653.

Enerly, E., Steinfeld, I., Kleivi, K., Leivonen, S.K., Aure, M.R., Russnes, H.G., Ronneberg, J.A., Johnsen, H., Navon, R., Rodland, E., Makela, R., Naume, B., Perala, M., Kallioniemi, O., Kristensen, V.N., Yakhini, Z., Borresen-Dale, A.L. 2011. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors. *PLoS One*, 6(2): e16915

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.*, 38(6): 698-707.

Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(4): 259-269.

Estilo, CL., O-charoenrat, P., Talbot, S., Socci, ND., Carlson, D.L., Ghossein, R., Williams, T., Yonekawa, Y., Ramanathan, Y., Boyle, J.O., Kraus, D.H., Patel, S., Shaha, A.R., Wong, R.J., Huryn, J.M., Shah, J.P., Singh, B. 2009. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*, 9: 11.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J.1995. The RNA component of human telomerase. *Science*, 269(5228): 1236-1241.

Fidaner, C., Eser, S.Y., Parkin, D.M. 2001. Incidence in Izmir in 1993–1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer*, 37(1): 83–92.

Foekens, J.A., Sieuwerts, A.M., Smid, M., Look, M.P., de Weerd, V., Boersma, A.W., Klijn, J.G., Wiemer, E.A., Martens, J.W. 2008. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 105(35): 13021-13026.

Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., Bartel, D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 19: 92-105.

Froehner, S.C., Davies, A., Baldwin, S.A., Lienhard, G.E. 1998. The bloodnerve barrier is rich in glucose transporter. *J. Neurocytol.*, 17(2): 173-78.

Fulford, L.G., Easton, D.F., Reis- Filho, J.S., Sofronis, A., Gillett, C.E., Lakhani, S.R., Hanby, A. 2006. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, 49(1): 22-34.

Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D. 2009. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.*, 121(1): 29-40.

Gaur, A., Jewell, D.A., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J.H., Chen, C., Ambrose, V.R., Israel, M.A. 2007. Characterization of MicroRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 67(6): 2456-2468.

Geng, L., Sun, B., Gao, B., Wang, Z., Quan, C., Wei, F., Fang, X.D. 2014. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. *Int J Mol Sci.*, 15(5): 8458–8472.

Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12: 264-265.

Godoy, A., Ulloa, V., Rodríguez, F., Reinicke, K., Yañez, A.J., García Mde, L. Medina, R.A., Carrasco, M., Barberis, S., Castro, T. 2006. Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT-1-6 and GLUT9 in human cancer: ultrastructural localization of GLUT-1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol.*, 207: 614-27.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D, Thürlimann, B., Senn, H.J. 2011. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breastcancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on thePrimary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of Oncology*, 22(8): 1736–1747.

Grover-McKay, M., Walsh, A.S., Seftor, A.E., Thomas, A.P., Hendrix, J.C.M. 1998. Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 4(2): 115-120.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835–840.

Gusterson, A.B., Ross, T.D., Heath, J.V., Stein, T. 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast cancer reseach*, 7: 143- 8.

Haber, R.S., Rathan, A., Weiser, K.R., Pritsker, A., Itzkowitz, S.H., Bodian, Slater, G., Weiss, A., Burstein, D.E. 1998. GLUT-1 glucose transporter expression in colorecta l carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer.*, 83(1): 34-40.

Hammond, S.M. 2006. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 58: 63-8.

Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., Robinson, M.O. 1997. A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 275(5302): 973-7.

Harvie, M., Hooper, L., Howell, A.H. 2003. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review, *Obese Rev.*, 4: 154-173.

Henderson, P. 1993. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(4): 708-21.

Heneghan, H.M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J., Kerin, M.J. 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist*, 15(7): 673-682.

Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Newell, J., Kerin, M.J. 2010. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg.*, 251(3): 499-505.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usaty J, Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M.G., Yin, Y., Khramtsov, AI., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R.I., Brown, P.H., Green, J.E., Kopelovich, L., Furth, P.A., Palazzo, J.P., Olopade, O.I., Bernard, P.S., Churchill, G.A., Van Dyke, T., Perou, C.M. 2007. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genom Biol*, 8(5): 76.

Hong, Z., Feng, Z., Sai, Z., Tao, S. 2014. PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer *in vitro*. *BMB Rep.*, 47(9): 500–505.

Hong, Z., Feng, Z., Sai, Z., Tao, S. PER3, 2014. A novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer *in vitro*. *BMB Rep.*, 47(9): 500–505.

Hsieh, C.C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K., Yuasa, S. 1990. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int. J. Cancer*, 46: 796-800.

Hwang, H.W., Mendell, J.T. 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 94(6): 776-780..

Illsley, N.P., Sellers, M.C., Wright, R.L. 1998. Glycaemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta*, 19: 517–524.

Inui, M., Martello, G., Piccolo, S. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(4): 252-263.

John, E.M., Kelsey, J.L. 1993. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol. Rev.*, 15: 157-162.

Joost, H.G., Thorens, B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/ polyoltransport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol.*, 18: 247-256.

Kalir, T., Wang, B.Y., Goldfischer, M., Haber, R.S., Reder, I., Demopoulos, R., Cohen, C.J., Burstein, D.E. 2002. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, borderline and malignant ovarian epithelia. *Cancer*, 94(4): 1078–1082.

Kang, S.S., Chun, Y.K., Hur, M.H., Lee, H.K., Kim, Y.J., Hong, S.R., Lee, J.H., Lee, S.G., Park, Y.K. 2002. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.*, 93(10): 1123–1128.

Kawamura, T., Kusakabe, T., Sugino, T., Watanabe, K., Fukuda, T., Nashimoto, A., Honma, K., Suzuki, T. 2001. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer*, 92: 634–641.

Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I. 1988. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem.*, 263(30): 15245–15248

Khan, J.Y., Rajakumar, R.A., McKnight, R.A., Devaskar, U.P., Devaskar, S.U. 1999. Developmental regulation of genes mediating murine brain glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 276: R892–R900

Kong, L.M., Liao, C.G., Zhang, Y., Xu, J., Li, Y., Huang, W., Zhang, Y., Bian, H., Chen, Z.N. 2014. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 74(14): 3764–3778.

Kroemer, G., Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6): 472–82.

Kroemer, G., Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6): 472–82.

Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.*, 11(9): 597–610.

Krzyszak, A., Wojcik-Krowiranda, K., Forma, E., Jozwiak, P., Romanowicz, H., Bienkiewicz, A., Brys, M. 2012. Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers. *Pathology & Oncology Research*, 18(3): 721–728.

Kunkel, M., Reicher, T.E., Benz, P. 2003. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 97(4): 1015–1024.

- Kuo, S.J., Wu, Y.C., Chen, C.P., Tseng, H.S., Chen, D.R. 2006.** Expression of glucose transporter-1 in Taiwanese patients with breast carcinoma--a preliminary report. *Kaohsiung J Med Sci.*, 22(7): 339-45.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T.2001.**Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853–858.
- Laudański, P., Swiatecka, J., Kovalchuk, O., Wolczyński, S. 2003.** Expression of GLUT-1 gene in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Ginekol Pol*, 74(9): 782-5.
- Leung, A.K., Sharp, P.A. 2010.** MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell.*, 40(2): 205-215.
- Leung, A.K., Sharp, P.A. 2010.** MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell.*, 40: 205-215.
- Levenson, A.S., Jordan, V.C.1997.**MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*,57:3071–3078.
- Liao, Y., Lönnnerdal, B. 2010.** Global MicroRNA Characterization Reveals That miR-103 Is Involved in IGF-1 Stimulated Mouse Intestinal Cell Proliferation. *PLoS ONE*. 5(9): e12976.
- Liu, C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. 2004.** An oligonucleotide microchip for genomewide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101(26): 9740-4.
- Liu, X., He, M., Hou, Y., Liang, B., Zhao, L., Ma, S., Yu, Y., Liu, X. 2013.** Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep.*, 29(4): 1415–1420.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck ,D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R. 2005.** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.*, 435(7043):834-8.
- Macheda, M.L., Rogers, S., Best, J.D. 2005.** Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.*, 202(3): 654-62.
- MacNoughton, J., Bonoh, M., Mcloud, P., Hee, J., Burger, H. 1992.** Age related changes in follicle stimulating hormone, Luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol*, 36(4): 336-339.
- Manolescu, A.R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., Cheeseman, C. 2007.** Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology*, 22(4): 234–240.

Marsenic, O. 2009. Glucose control by the kidney: an emerging target in diabetes. *Am J Kidney Dis*, 53(5): 875-83.

Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A.R., Daidone, MG., Biciato, S., Piccolo, S. 2010. A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*, 141(7): 1195–1207.

Meneses, A.M., Medina, R.A., Kato, S., Pinto, M., Jaque, M.P., Lizama, I., Garcia Mde, L., Nualart, F., Owen, G.I. 2008. Regulation of GLUT3 and glucose uptake by the cAMP signalling pathway in the breast cancer cell line ZR- 75. *J Cell Physiol.*, 214(1): 110-6.

Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S. 2009. Long non-coding RNAs insight into functions. *Nature Rev Genet.*, 10(3): 155–9.

Miller, T.E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C.L., Jacob, S., Majumder, S. 2008. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.*, 283(44): 29897-29903.

Montel-hagen, A., Kinet ,S., Manel, N., Mongellaz, C., Prohaska, R., Battini, J.L., Delaunay, Jç, Sitbon, M., Taylor, N. 2008. Erythrocyte Glut1 Triggers Dehydroascorbic Acid Uptake in Mammals Unable to Synthesize Vitamin C. *Cell*, 132 (6): 1039–1048.

Montpréville, V.T., Quilhot, P., Chalabreyse, L., Muret, A.D., Hofman, V., Lantuéjoul, S., Parrens, M., Payan, M.J., Rouquette, I., Secq, V., Girard, N., Besse, B., Marx, A., Molina, T.J. 2015. Glut-1 intensity and pattern of expression in thymic epithelial tumors are predictive of WHO subtypes. *Original Research Article*, 211(12): 996-1002.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229(4717): 941–5.

Nakahara, K., Carthew, R.W. 2004. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.*, 16(2): 127-133.

Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., Cech, T.R.. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277(5328): 955-959.

Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., Calin, G.A. 2009. MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*, 9(4): 293-302.

O'Day, E., Lal, A. 2010. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12(2): 201.

Ogawa, J., I noue, H., Koide, S. 1997. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer.*, 74(2): 189-192.

Olson, A.L., Pessin, J.E. 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 235–56.

Ozmen, V., Anderson, B.O. 2008. The Challenge of Breast Cancer in Low- and Middle-income Countries-Implementing the Breast Health Global Initiative Guidelines, *Asia-Pacific Oncology & Haematology*, 1(1): 31-4

Özkaya, F.C., Koçdor., H. 2008.İskemi-Reperfüzyon ve Kanser Metastazı: Biyokimyasal Bakış. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 22(2): 89-98.

Pandey, D.P., Picard, D. 2009.miR-22 Inhibits Estrogen Signaling by Directly Targeting the Estrogen Receptor α mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 29(13):3783-3790.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. 2005. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.*, 55(2): 74-108.

Pasquinelli, A.E. 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.*, 13(4): 271-282.

Patel, J.B., Appaiah, H.N., Burnett, R.M., Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Mehta, R., Badve, S., Thomson, M.J., Hammond, S., Steeg, P., Liu, Y., Nakshatri, H. 2011. Control of EVI 1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR 22. *Oncogene*, 30: 1290 1301.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797): 747-52.

Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O., Botstein, D. 1999. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(16): 9212-9217.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., Perou, C.M. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12: 68-10

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. 2000. The 21- nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-6.

Rivenzon-Segal, D., Boldin-Adamsky, S., Seger, D., Seger, R., Degani, H. 2003. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int J Cancer*, 107: 177-182.

Roh, J.L., Cho, K.J., Kwon, G.Y., Ryu, C.H., Chang, H.W., Choi, S.H., Nam, S.Y., Kim, S.Y. 2009. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Onco.*, 45: 63-68,

Rose, D.P., Komnionou ,D., Stephenson, G.D. 2004. Obesity, adipocytokines and insulin resistance in breast cancer, *Obesity reviews*, 5:153-165.

Rossi, J.J. 2009. New hope for a microRNA therapy for liver cancer. *Cell*, 137(6): 990-992.

Rudlowski ,C., Moser, M., Becker, A.J., Rath, W., Buttner, R., Schroder, W., Schurmann, A. 2004. GLUT1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer. *Oncology.*, 66(5): 404-410.

Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., Jones, P.A. 2006. Specific activation of microRNA127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatinmodifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9(6): 435–43.

Sakashita, M., Aoyama, N., Minami, R., Maekawa, S., Kuroda, K., Shirasaka, D., Ichihara, T., Kuroda, Y., Maeda, S., Kasuga, M. 2001. Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer.*, 37(2): 204–209.

Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., Vera, J.C., Fischbarg, J. 2004. Predicting the three dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J.*, 87: 2990-9.

Scheffer, A.R., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., von Ruecker, A., Muller, S.C., Ellinger, J. 2014. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? *World J Urol*, 32: 353–358.

Scheffer, A.R., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., von Ruecker, A., Muller, S.C., Ellinger, J. 2014. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? *World J. Urol.*, 32(2): 353–358.

Schmidt, M., Voelker, H.U., Kapp, M., Krockenberger, M., Dietl, J., Kammerer, U. 2010. Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 136(2): 219–225.

Seidner, G., Alvarez, M.G., Yeh, J.I., O'Driscoll, K.R., Klepper, J., Stump, T.S., Wang, D., Spinner, N.B., Birnbaum, M.J., De Vivo, D.C. 1998. GLUT-1

deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.*, 18 (2): 188–91.

Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D., Croce, C.M. 2006. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*, 17(3): 189-202.

Shenouda, S.K., Alahari, S.K. 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.*, 28(3-4): 369-378.

Shi, M., Liu, D., Duan, H., Shen, B., Guo, N. 2010. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29: 785–799.

Simonsson, T. 2003. A substrate for telomerase. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 632–628.

Smith, T.A. 1999. Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue. *Br J Biomed Sci.*, 56: 285-92.

Song ,S.J., Poliseno, L., Song, M.S., Ala, U., Webster, K., Ng, C., Beringer, G., Brikbak, N.J., Yuan, X., Cantley, L.C., Richardson, A.L., Pandolfi, P.P. 2013. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*, 154(2):311-24.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 10869–74.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 8418–23.

Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L., Bordoni, A. 2009. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*, 20:628-35.

Staaf, J., Ringnér, M., Vallon-Christersson, J., Jönsson, G., Bendahl, P.O., Holm, K., Arason, A., Gunnarsson, H., Hegardt, C., Agnarsson, B.A., Luts, L., Grabau, D., Fernö, M., Malmström, P.O., Johannsson, O.T., Loman, N., Barkardottir, R.B., Borg, A. 2010. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J. Clin. Oncol.*, 28(11): 1813-1820.

Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., Kauppinen, S. 2012 Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence*, 3: 1-10.

- Stephenson, G.D., Rose, D.P. 2003.** Breast cancer and obesity an update, *Nutr Cancer.*, 45: 1-16.
- Suzuki, R., Ye, W., Rylander-Rudqvist, T., Saji, S., Colditz, GA., Wolk, A. 2005.** Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 97: 1601-1608.
- Swanton, C., Caldas, C. 2009.** Molecular classification of solid tumours: towards pathway-driven therapeutics. *Br. J. Cancer*, 100(10): 1517–22
- Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S. 2010.** Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol.*, 220(2):126-39.
- Tagliabue, E., Agresti, R., Carcangiu, M.L., Ghirelli, C., Morelli, D., Campiglio, M., Martel, M., Giovanazzi, R., Greco, M., Balsari, A., Menard, S. 2003.** Role of HER2 in wound-induced breast carcinoma proliferation. *Lancet*, 362: 527-533.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. 2004.** Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64(11): 3753-6.
- Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L., Massague, J. 2008.** Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451(7175): 147-152.
- Terry, M.B., Zhang, F.F., Kabat, G., Britton, J.A., Teitelbaum, S.L., Neugut, A.I., Gammon, M.D. 2006.** Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol.*, 16: 230-240.
- Thorens, B., Mueckler, M. 2010.** Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 298: E141-E144.
- Topuz, E., Derin, D., Can, G., Kürklü, E., Cinar, S., Aykan, F., Cevikbaş, A., Dişçi, R., Durna, Z., Sakar, B., Sağlam, S., Tanyeri, H., Deniz, G., Gürer, U., Taş, F., Guney, N., Aydiner, A. 2008.** Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. *Invest New Drugs.*, 26(6): 567-572.
- Trempe, G.L. 1976.** Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res.*, 57: 33-41.
- Tuncer, M. 2008.** Significance of cancer in Turkey, the burden of disease and cancer control policies Ankara, *Onur Press, Health Ministry Publication*, 74: 5-9.
- Uldry, M., Thorens, B. 2004.** The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.*, 447(5): 480-9.

- Valentin, M.D., da Silva, S.D., Privat, M., Alaoui-Jamali, M., Bignon, Y.J. 2012.** Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat*, 134(1): 21-30.
- Van der Auwera, I., Limame, R., van Dam, P., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., Van Laere, S.J. 2010.** Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype. *Br J Cancer*, 103(4): 532-541.
- Vasilatou, D., Papageorgiou, S., Pappa, V., Papageorgiou, E., Dervenoulas, J. 2010.** The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol.*, 84(1): 1-16.
- Vaupel, P., Mayer, A. 2007.** Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.*, 26(2): 225-239.
- Ventura, A., Jacks, T. 2009.** MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136: 586-591.
- Ventura, A., Jacks, T. 2009.** MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell.*, 136(4): 586-591.
- Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L.H., Agami, R. 2006.** A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 124(6): 1169-1181.
- Wang, F., Zheng, Z., Guo, J., Ding, X. 2010.** Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol.*, 119(3): 586-593.
- Wang, H.Y., Yan, L.X., Shao, Q., Fu, S., Zhang, Z.C., Ye, W., Zeng, Y.X., Shao, J.Y. 2014.** Profiling plasma microRNA in nasopharyngeal carcinoma with deep sequencing. *Clin Chem.*, 60: 773-782.
- Wang, X., Wu, X., Yan, L., Shao, J. 2012.** Serum miR-103 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Journal of Southern Medical University*, 32(5): 631-4.
- Warburg, O. 1956.** On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314.
- Weinstein, L. 1990.** Hormonal therapy in the patient with surgical menopause. *obstet gynecol.*, 75: 475-505.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu DUNDAR
Doğum Yeri ve Tarihi : İSTANBUL/Üsküdar - 08/02/1991
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Hatice Bayraktar Lisesi
Lisans : Uludağ Üniversitesi – Biyoloji Bölümü-2014
İletişim (e-posta) : burcuburcud@hotmail.com