



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**İLERİ EVRE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE Let-7a VE
miR-335'İN miRNA TEMELLİ GEN TEDAVİDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Havva TEZCAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2017





T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**İLERİ EVRE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE Let-7a
VE miR-335'İN miRNA TEMELLİ GEN TEDAVİDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Havva TEZCAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER**

115Z701- TÜBİTAK

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum

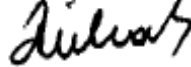


“İleri Evre Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Let-7a ve miR-335’in miRNA Temelli Gen Tedavideki Rolünün Araştırılması” adlı çalışmamın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Hayva TEZCAN
08.08.2017



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Havva TEZCAN tarafından hazırlanan “İleri Evre Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Let-7a ve miR-335’in miRNA Temelli Gen Tedavideki Rolünün Araştırılması” konulu Yüksek Lisans tezi 14/08/2017 günü, 14.00-15.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER	
Üye	Prof. Dr. Berrin TUNCA	
Üye	Doç. Dr. Mete YILMAZ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...15.08.2017..... tarih ve2017/24..... sayılı toplantısında alınan34..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

08/08/2017

Adı Soyadı: Havva TEZCAN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: İleri Evre Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Let-7a ve miR-335'in miRNA Temelli Gen Tedavideki Rolünün Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:
Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

İmza: 

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Yapısı.....	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	8
2.3.1. Histopatolojik Sınıflandırma	8
2.3.2. Biyolojik Sınıflandırma	9
2.3.2.1. Meme Kanseri Hastalarında ER ve PR Durumu	10
2.3.2.2. Meme Kanserinde HER2 Durumu ve HER2/Anti-HER2 Terapilerin Tedavi Yanıtını Tahmindeki Rolü	11
2.3.2.3. Meme Kanseri Hastalarında Ki67 Durumu	12
2.3.3. Moleküler Sınıflandırma	13
2.3.3.1. Luminal A Alt Tipi	13
2.3.3.2. Luminal B Alt Tipi.....	13
2.3.3.3. HER2 Alt Tipi	14
2.3.3.4. Bazal Benzeri Alt Tipi	15
2.4. Triple Negatif Meme Kanseri	16
2.4.1. Triple Negatif Meme Kanseri Alt Tipleri.....	17
2.4.1.1. Luminal Androjen Reseptörü (LAR) Alt Tipi	18
2.4.1.2. Mezenkimal (MES) Alt Tip.....	18
2.4.1.3. Bazal Benzeri Bağışıklık Baskılamalı (BLIS) Alt Tip	19
2.4.1.4. Bazal Benzeri İmmün-aktive (BLIA) Alt Tipi	19
2.5. Triple Negatif Meme Kanserinde Etkili Sinyal Yolakları	19
2.5.1. Triple Negatif Meme Kanserinde Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	20
2.5.2. Meme Kanserinde AR Sinyal Yolağı	23
2.5.3. NF- κ B Sinyal Yolağı	24
2.5.4. MAPK Sinyal Yolağı	26

2.5.5. PI3K/Akt Sinyal Yolağı.....	28
2.6. Triple Negatif Meme Kanseri ve Kanseri Kök Hücreler	30
2.7. MikroRNA'ların Kanserde Biyogenezi, İşlevi ve Rolü	31
2.7.1. Kanserde miRNA'ların Rolü	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Gereç	38
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	38
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	39
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Hücre Kültürü.....	42
3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini.....	42
3.2.1.2. Hücre Hatları ve zellikleri.....	42
3.2.1.2.1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı.....	42
3.2.1.2.2. HCC1937 Meme Kanseri Hücre Hattı.....	42
3.2.1.3. Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi	42
3.2.1.3.1. Hücrelerin Stoklanması.....	43
3.2.1.3.2. Hücre Sayımı	43
3.2.1.4. Kök Hücrelerin Manyetik Ayrımı.....	43
3.2.1.4.1. CD24- Hücrelerin Ayrımı.....	44
3.2.1.4.2. CD44+ Hücrelerin Ayrımı.....	44
3.2.1.4.3. CD24-/CD44+ Hücrelerin, Floresan Aktive Hücre Sıralama zelliđi Olan Akım Sitometri Cihazı ile Ayrımı.....	45
3.2.1.5. Meme Kanseri Kök Hücrelerinde mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	46
3.2.1.5.1. Hücreden Total RNA İzolasyonu	46
3.2.1.5.2. cDNA Sentezi.....	46
3.2.1.5.3. Real Time PCR Aşaması	47
3.2.1.5.4. Gen ve miRNA Primerlerinin Dizayını.....	49
3.2.1.6. Vektör Seçimi	50
3.2.1.7. Klonlama.....	52
3.2.1.7.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	52
3.2.1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	52
3.2.1.7.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi	53
3.2.1.7.4. Agaroz Jelden DNA saflaştırılması	54
3.2.1.7.5. Enzimle Kesim İşlemi	54

3.2.1.7.6. Ligasyon İşlemi	55
3.2.1.7.7. PGL3 Kontrol Vektörü ile <i>MAP2K1</i> 3'UTR / <i>PIK3CA</i> 3'UTR'nin Ligasyonu	55
3.2.1.7.8. Let-7a ve miR-335'in pcDNA™3. 3-TOPO Vektör İçerisine Yerleştirilmesi	56
3.2.1.8. Transformasyon	56
3.2.1.8.1 Pozitif Klonların Seçimi	58
3.2.1.8.2. Klonların Sekanslanması	59
3.2.1.8.3. Yüksek Konsantrasyonda Plazmid DNA izolasyonu (Maxi-Prep işlemi).....	60
3.2.1.9. Transfeksiyon	60
3.2.1.9.1. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	61
3.2.1.9.2. Lusiferaz Gen Aktivitesi Analiz Protokolü	62
3.2.1.9.3. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerden Total RNA İzolasyonu	62
3.2.1.9.4. cDNA Sentezi.....	62
3.2.1.9.5. Real Time PCR Aşaması	62
3.2.1.9.6. Hücre Döngüsü Analizi	63
3.3. İstatistiksel Analizler	63
4.BULGULAR.....	64
4.1. Kök Hücrelerin Manyetik Ayrımı.....	64
4.2. <i>CD44+</i> / <i>CD24</i> (düşük)– Hücrelerin, Floresan Aktive Hücre Sıralama Özelliği Olan Akım Sitometri Cihazı ile Ayrımı Gerçekleştirilen Hücrelerin Tespiti.....	65
4.3. Elde Edilen Kök Hücre Pozitif Hücrelerde Gen Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR ile Validasyonu.....	67
4.4. Vektörlerin Hazırlanması ve Validasyon İşlemi.....	68
4.5. Transformasyon İşlemi Sonucu Elde Edilen Kolonilerin Değerlendirilmesi	69
4.6. Pozitif Klonların Seçimi ve Sekans İşlemi ile Doğrulanması.....	70
4.7. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerdeki Proliferasyonun Belirlenmesi.....	73
4.8. Gen ve miRNA Etkileşiminin Lusiferaz Gen Aktivitesi Analizi ile Belirlenmesi	76
4.9. <i>CD44+</i> / <i>CD24-</i> MDA MB 231 ve <i>CD44+</i> / <i>CD24-</i> HCC1937 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Transfeksiyonun, <i>MAP2K1</i> ve <i>PIK3CA</i> Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	79
5.0 <i>CD44+</i> / <i>CD24-</i> HCC1937 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Transfeksiyonun Hücre Döngüsüne Etkisi	83
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	86
6. KAYNAKLAR	90
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	95
8.TEŞEKKÜR	96

9. ÖZGEÇMİŞ 97



TÜRKÇE ÖZET

İleri Evre Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Let-7a ve miR-335'in miRNA Temelli Gen Tedavideki Rolünün Araştırılması

Meme Kanseri, tüm dünya kadınları arasında en yaygın görülen ve birçok alt tipi bulunan heterojen bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar meme kanserinin, kök hücre özelliği gösteren hücre popülasyonları tarafından geliştiğini ve bu hücrelerin; hastalığın ilerlemesi, nüksü ve ilaç direncini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Meme kanseri gelişiminde rol oynayan mikroRNA'ların ve kök hücre potansiyeli yüksek hücre popülasyonlarını düzenleyen yolaklardaki genlerin aydınlatılmasının, ileri evre meme kanseri tedavisinde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve miRNA temelli yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada, kök hücre potansiyeli yüksek meme kanseri hücre hatları olan HCC1937 ve MDA MB 231'de let-7a ve miR-335'in potansiyel hedefi olan *PIK3CA* ve *MAP2K1* genlerinin 3'UTR bölgeleriyle ilişkisi değerlendirildi. Bu amaçla; HCC1937 ve MDA MB 231 hücreleri, meme kanseri kök hücre yüzey belirteçleri olan *CD44+/CD24-* özelliklerine göre işaretlenerek kök hücre potansiyeli yüksek hücre popülasyonları hücre sıralama özelliği olan akım sitometri işlemi ile elde edildi. *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerine miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin transfeksiyonu sonrasında, miR-335'in *MAP2K1* 3'UTR bölgesine bağlanarak *MAP2K1* geninin ekspresyonunu ($p=0,0429$) baskıladığı belirlendi. Yine bu hücrelerde, miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrasında anlamlı düzeyde ($p=0,002$) hücre ölümü gerçekleştiği gösterildi. *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerinde *PIK3CA* 3'UTR ve let-7a transfeksiyonu ile *PIK3CA* ekspresyonunda anlamlı düzeyde ($p=0,0434$) azalma belirlendi. Ayrıca, let-7a'nın *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerindeki *PIK3CA* gen ekspresyonunu 15,2 kat azalttığı ve bu hücrelerde anlamlı düzeyde ($p=0,0046$) hücre ölümü gerçekleştiği gösterildi.

Mevcut çalışmada, meme kanseri kök hücrelerine let-7a ve miR-335'in transfeksiyonu ve hedef aldıkları *PIK3CA* 3'UTR ve *MAP2K1* 3'UTR gen bölgeleri ile etkileşimleri ilk kez araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, *PIK3CA* ve *MAP2K1*'nin ifadesinin let-7a ve miR-335 temelli gen tedavi yaklaşımı ile değiştirilebileceğini, let-7a ve miR-335'in ileri evre meme kanserinin tedavisinde potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: İleri evre meme kanseri, Kanser kök hücre, mikroRNA, Let-7a, miR-335, Gen tedavi

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of miRNA-Based Gene Therapy Roles of Let-7a and miR-335 in Advanced Stage Breast Cancer Stem Cells

Breast cancer is one of the most common types of cancer among women and has many subtypes. Recent studies have shown that breast cancer is developed by cell populations with stem cell potential and these cells directly affect the progression, relapse and drug resistance of the disease. It is believed that shedding light on the little-known genes in the pathways that regulate the microRNAs which play a role in the development of breast cancer may be useful in identifying novel therapeutic targets for advanced breast cancer treatment and in developing innovative miRNA based treatment strategies.

The interaction between 3'UTR sites of PIK3CA and MAP2K1 genes that are potential target for let-7a and miR-335 in HCC1937 and MDA MB 231 cell lines with a high level of stem cell potential, was investigated. For this purpose; HCC1937 and MDA MB 231 cells were labeled according to their *CD44+/CD24-* characteristics and cell populations with high stem cell potential were obtained. After the transfection of miR-335 and *MAP2K1* 3'UTR into *CD44+/CD24-* MDA MB 231 cells, it was shown that miR-335 binds to the *MAP2K1* 3'UTR region and suppresses the expression ($p=0,04292$) of the *MAP2K1* gene. In these cells, significant cell death ($p=0,002$) was detected after miR-335 and *MAP2K1* 3'UTR transfection. A significant decrease in PIK3CA expression ($p=0,0435$) was detected with *PIK3CA* 3'UTR and let-7a transfection in *CD44 +/CD24-* MDA MB 231 cells. However, let-7a decreased the expression of PIK3CA gene in *CD44+/CD24-* HCC1937 cells by 15,20-fold and cell death was significant ($p=0,0046$) in these cells.

In the current thesis study, the binding properties of miR-335 and *MAP2K1* 3'UTR regions together with let-7a and *PIK3CA* 3'UTR and the cytotoxic effect of this binding in breast cancer stem cells were investigated for the first time. In the context of our findings, we think that let-7a and miR-335 may be new therapeutic tools in advanced breast cancer treatment.

Keywords: Advanced stage breast cancer, Cancer stem cell, miRNA, Let-7a, miR-335, Gene therapy

1. GİRİŞ

Meme kanseri, farklı biyolojik davranış gösteren, farklı klinik-patolojik ve moleküler karakteristik özelliklere sahip çok sayıda alt tipi bulunan heterojen bir hastalıktır. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir. Ülkemizde de kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. İnsidansı ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte, her yıl yaklaşık 1.000.000 kadına meme kanseri teşhisi konulmakta, yine her yıl 370.000 kadın bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu nedenle, tümör hücrelerini hedef alan modern ve kişiye özel tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

İleri evre meme kanserleri arasında yer alan triple negatif tümörler; kötü prognoz gösteren, yüksek histolojik evreye sahip, invazyon riski yüksek, sağkalım oranı düşük ve genellikle *BRCA* mutasyonu taşıyan tümörlerdir. ER, PR ve HER2'yi hedefleyen günümüz tedavilerinden yararlanamayan bu grup hastaların yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaçları bulunmaktadır. Bu bağlamda, yapılan araştırmalar, güncel tedavilere yanıt vermeyen meme kanserlerinin, kök hücre özelliği gösteren hücreler tarafından geliştiğini savunmaktadır. Bu hücreler kendini yenileyebilme özelliğine sahip, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gösteren, dolayısıyla metastatik potansiyeli kanıtlanmış hücrelerdir. Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında mikroRNA (miRNA) molekülleri önemli bir yere sahiptir. miRNA'lar; 17-25 nükleotit büyüklüğünde, RNA kodlamayan, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve hedef genlerin 3'*untranslated region* (3'UTR) bölgesine bağlanarak mRNA degradasyonu ya da translasyonel inhibisyon yoluyla gen ekspresyonun düzenlenmesini sağlayan moleküllerdir. miRNAların genlerin regülasyonunda görev yaptıklarının belirlenmesini takiben hem potansiyel terapötik hedef olarak hem de aday diagnostik ve prognostik indikatör olarak kullanılabilirlikleri gündemdedir. Sonuçta meme kanseri gen ekspresyon profillerine dayanan alt tiplendirmeye benzer olarak miRNA ekspresyonlarının da tümörlerin sınıflandırılmasında biyobelirteç ve prognostik indikatör olarak kullanılmasının yakın gelecekte mümkün olabileceği ve bireysel tedavilerin sağlanabileceği tartışılmaktadır.

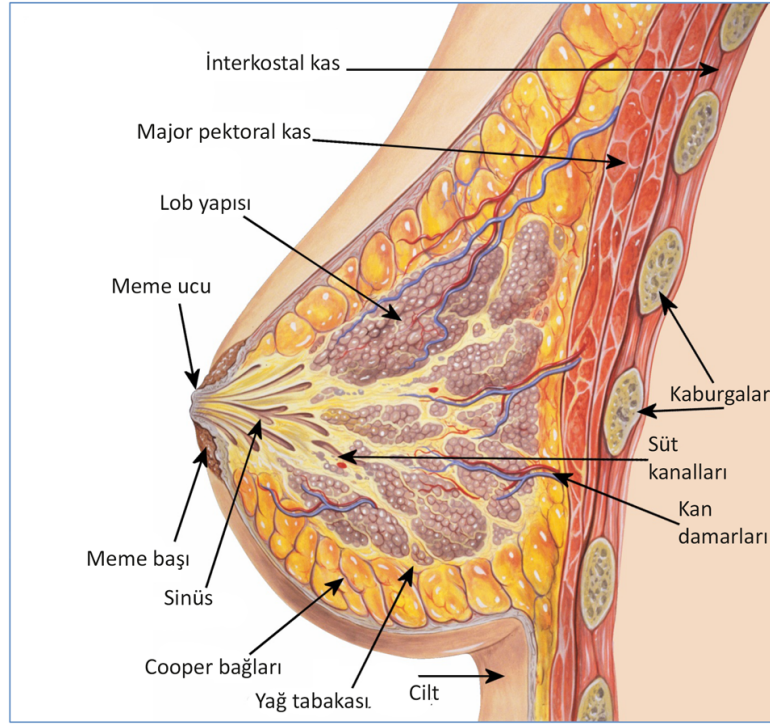
Kanser kök hücrelerin bölünmesinin düzenlenmesinden sorumlu anahtar genlerin ekspresyonunu negatif şekilde etkileyerek kök hücre yenilenmesi ve farklılaşmasında temel rol oynayabilecek miRNA'ların belirlenmesiyle bu miRNA'ların terapötik potansiyellerinin ortaya çıkarılmasını hedefleyen çalışmalar ciddi önem teşkil etmektedir. Bu amaçla; yaptığımız araştırmalar sonucunda meme kanserinde önemini belirlediğimiz let-7a ve miR-335 adlı mikroRNA moleküllerinin kanser kök hücrelerindeki rolünün araştırılması, ileri evre meme kanserlerinde miRNA temelli etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

Mevcut tez çalışmasında; meme kanseri kök hücrelerindeki let-7a ve miR-335'in rolünün anlaşılabilmesi için fonksiyonel analizler gerçekleştirilmiş ve bu mikroRNA'ların hedef aldıkları *PIK3CA* ve *MAP2K1* genlerinin ifadesine etkisi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Yapısı

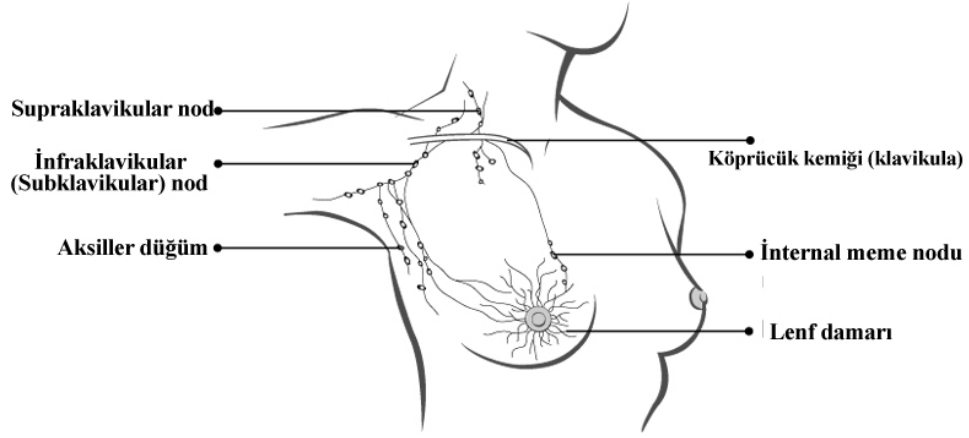
Meme dokusu (glandula mammaria, Mamma); temelde vücut ter bezlerinden türemiş, apokrin bez yapısında bir çift organdır. Meme dokusu, yapısı bakımından majör pektoral kası üzerinde konumlanır ve dış kısmı cilt ile kaplıdır. İç yapısı ise kadınlarda; loblar (süt bezleri), kanallar (meme lobüllerinden süt taşıyan küçük tüpler) ve stromadan (yağ dokusu, kanallar, lobları çevreleyen bağ dokusu, kan damarları ve lenf damarları) oluşur (Drake ve ark., 2005). Normal meme yapısı hakkındaki temel bilgiler, Şekil 1’de şematize edilmiştir.



Şekil-1 Sağlıklı bir kadının meme anatomisi (Patrick J. Lynch., 2006)

Meme bezindeki lenf damarları ve venöz drenaj yapısı, meme kanserinin yayılmasında büyük bir öneme sahiptir. Meme bezindeki lenf damarlarının 3/4'lük kısmı, koltuk altında yer alan aksiller lenf düğümleriyle (aksiller düğümler) bağlantılıdır. Bazı lenfatik damarlar, meme içindeki lenf düğümlerine (iç meme düğümleri) bağlanırken diğer lenf nodları klavikula kemiğinin (supraklaviküler veya infraklaviküler düğümler) üstünde veya altında bağlantılı bir hat şeklinde konumlanır (McGuire ve ark., 2015).

Meme Lenf Nodları



Şekil-2 Meme bezindeki lenf damarları ve lenf düğümlerinin şematik gösterimi (Martini ve ark., 2009)

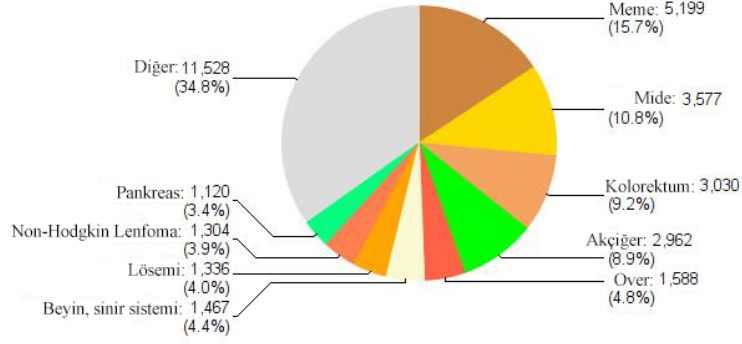
Kanser hücreleri lenf bezlerine yayılırsa, hücrelerin kan dolaşımına karışması ve vücudun diğer bölgelerine yayılma (metastaz) olasılığı artar. Bu durum tedavi planını etkilemektedir. Meme kanserli hücelere sahip lenf düğümleri, kanserin diğer organlara yayılma olasılığını artırır. Bununla birlikte, lenf düğümlerinde kanser hücresi bulunan kadınların tümünde metastaz gelişmediği gibi, bazı kadınların lenf düğümlerinde kanser hücresi bulunmamasına rağmen sonraki süreçte metastaz gelişebilmektedir (Rizwan A.,2015).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, tüm dünya kadınları arasında en yaygın görülen kanser tipidir (Bucerus J ve ark., 2012). Bu kanser türünün sebep olduğu ölümler, dünya çapında toplam kanser vakalarının %23'ü ve tüm kanser sebepli ölümlerin %14'ünü oluşturmaktadır. İnsidansı ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte, her yıl dünyada yaklaşık 1.000.000 kadına meme kanseri teşhisi konulmakta, yine her yıl 370.000 kadın bu hastalık nedeniyle kaybedilmektedir (Bucerus J ve ark., 2012). Günümüzde sağlıklı bir kadının meme kanserine yakalanma riski 1/8 oranındadır. (McGuire ve ark., 2015). Türkiye'de ise meme kanseri görülme sıklığı, kadınlar arasında %34 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ülkemizdeki kadınların %15,7'lik bir kısmı meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Bu veriler, ülkemizdeki kadınların tüm kanser tipleri içerisinde en çok meme kanseri nedeniyle kaybedildiğini göstermektedir (Şekil 3 ve Şekil 4). Meme kanserine dair güncel

istatistiksel veriler Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı GLOBOCAN 2012 sitesinden güncel olarak analiz edilmiştir (<http://globocan.iarc.fr>).

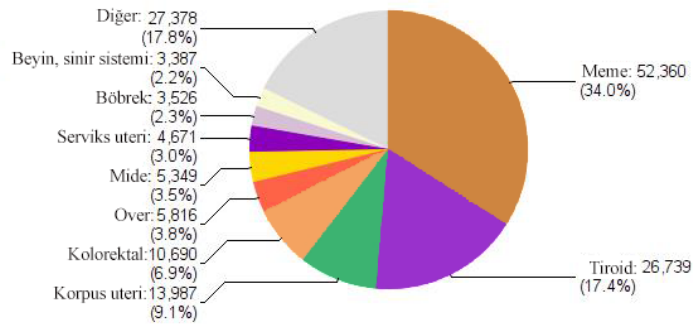
Türkiye: Kadın
Hesaplanan kanser ölümleri, tüm yaşlar (toplam: 33.111)



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 21.4.2017

Şekil-3 Farklı kanser tiplerine göre ülkemizdeki kadınların ölüm oranları

Türkiye: Kadın
Hesaplanan 5 yıllık yaygın kanser vakaları, yetişkin popülasyon (toplam: 153.903)



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 21.4.2017

Şekil-4 Ülkemizde, kadınlar arasında son 5 yılda görülen yaygın kanser tipleri

Meme Kanseri; genetik, biyolojik, davranışsal, çevresel ve sosyal faktörleri içeren karmaşık bir etiyojiye sahiptir ve ana risk faktörleri; kadın olmak, yaşlanma, ırk, etnik köken, genetik gibi değiştiremeyeceğimiz faktörlerin yanı sıra diyet, fiziksel hareketsizlik, ekzojen hormonlar ve bazı kadın üreme faktörleri gibi değiştirilebilir durumlardan oluşmaktadır (Vanitha ve ark., 2014). Bu faktörler meme kanseri riskini arttırmakla birlikte, sahip olunan bir veya daha fazla etken, meme kanseri gelişeceği anlamı taşımamaktadır. Bir diğer önemli faktör olan yaş ve meme kanserine yakalanma riski arasında da önemli bir bağlantı bulunmaktadır. Günümüzde, 30'larında bir kadın için meme kanseri riski yaklaşık olarak 250'de 1 iken, 70'lerinde bir kadın için bu risk 30'da 1 olarak ölçümlenmektedir (Severi ve ark., 2009). Çoğu meme kanseri vakası menopozdan sonra teşhis edilir ve meme kanseri vakalarının yaklaşık %75'i 50 yaşından sonra ortaya çıkar (Severi ve ark., 2009). Yaş, yaşam boyunca birikmiş DNA hasarı için olası bir kümülatif araç olarak düşünülmektedir.

Tüm bu etmenlerin yanında daha düşük riskin öngörüldüğü faktörler: Geç menopoz (55 yaş üstü), menstrüasyonun 12 yaşından önce başlaması, dolaşımdaki androjen seviyesinin yüksek oluşu, ilk doğumun erken yaşlarda gerçekleşmesi (<25 yaş), doğum sayısının ≥ 4 olması, insülin benzeri büyüme faktörlerinin dolaşımdaki yüksek seviyesi olarak tanımlanmaktadır (Kamińska ve ark., 2015).

Meme kanseri, kadınlar arasında görülen bir hastalık olarak bilinse de erkeklerde de %1'den daha düşük oranda gözlemlenmektedir. (Perkins ve ark., 2003). Ancak bu hastalık, meme kanseri hücre büyümesini teşvik eden östrojen ve progesteron gibi kadınlarda yüksek miktarda bulunan hormonların erkeklerde daha nadir bulunması nedeniyle kadınlarda erkeklerden yaklaşık 100 kat daha yaygın görülmektedir (Severi ve ark., 2009). Ayrıca kadınlardan farklı olarak erkek meme tümörlerinde diajnoz yaşı daha geç olmakla birlikte hastalığın %50'si agresif özellik göstermektedir (Perkins ve ark., 2003).

Meme kanseri vakalarının yaklaşık %5-10'unun kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Bu tip hastalarda bir ebeveyninden gelen gen kusurları, hastalığın gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. Meme kanseri riskiyle ilgili olduğu bilinen genetik faktörler yaklaşık 30 gen içerir (Collins ve ark., 2011) Bunlara, penetrasyonu yüksek erken başlangıçlı meme kanseri genleri, *BRCA1* ve *BRCA2* ile nadir bulunan kanser

sendromu genleri ve nispeten daha düşük penetransyona sahip genler de dahildir. *BRCA1* mutasyonları olan bazı ailelerde, meme kanseri yaşam boyu riski %80'e kadar yükselebilmektedir ancak ortalama olarak bu risk %55-65 aralığında gözükmetedir. *BRCA2* mutasyonları için risk ise yaklaşık %45 oranındadır (Howlander ve ark., 2016). Buna ek olarak *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonu taşıyan aile hikayesine sahip meme kanseri hastalarının over kanserine yakalanma riski de yüksektir çünkü bu genler aynı zamanda over kanseri ile de ilişkilidir (Antoniou ve ark., 2003).

Tüm bu kompleks etmenler değerlendirildiğinde meme kanserinin etkin tedavisi için, hastalığa sahip bireylerin hastalığın prognozunu düzenleyebilecek kullanışlı parametreler ile sınıflandırılması, etkin biyolojik belirteçler kullanılarak klinik uygulamaların düzenlenmesi ve bununla birlikte hastaların gen profillerine göre yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son 10 yılda, tüm genom profillemeye teknolojilerinin kullanılması, meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesiyle ilişkili genler ve genetik yollar hakkındaki bilgimizi büyük ölçüde genişletti. Yakın zamanda, bir dizi ticari multigen analizi, prognostik ve prediktif testler, meme kanseri teşhisinin karmaşık ve genişleyen alanına yönelik yeni çalışmaların önünü açmıştır.

Meme kanserinde uygulanacak terapiye yanıtı veya prognozu öngören bu multigen öngörü analizleri, çeşitli başlıklar altında incelenmeye başlanmıştır (Ross ve ark., 2008). İmmünohistokimyasal (IHC), floresan in-situ hibridizasyon (FISH), kantitatif revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ve mikroarray çalışmalarının baz alındığı çeşitli analiz sistemleri geliştirilmiştir. İmmünohistokimyasal temelli parametrelerin doğruluğunu artırarak verilere bir standart getirmeyi hedefleyen ProEx™Br ve Mammostrat analizi ile, FISH temelli öngörü sistemi eXagenBC™'nin yanı sıra, RT-qPCR temelli multigen öngörü sistemleri; oncotype DX™, The TAILORx Clinical Trial, Breast Cancer Two-Gene Expression Ratio (H/I™), Celera Metastasis Score™, The Breast BioClassifier, EndoPredict® ve son olarak genomik mikroarray temelli multigen öngörü testleri içerisinde yer alan MammaPrint, MINDACT Trial, Invasiveness Gene Signature, NuvoSelect™, Rotterdam signature, Roche AmpliChip (cytochrome P450 CYP2D6) testleri kullanılmaya başlanmıştır (Ross ve ark., 2008).

Büyük bir kısmı parafin doku ile çalışmaya uygun olarak dizayn edilmiş bu sistemler, sirküle tümör hücresinden elde edilmiş DNA ve RNA'nın düşük maliyetli sekansı ve hızlı-güvenilir mikroRNA (miRNA) kantifikasyonu da dahil olmak üzere yüksek verimli teknoloji platformlarının son zamanlarda yaygınlaşmış olması, genişletilmiş öngörü modelleri oluşturmak için yeni fırsatlar sunmaktadır (Györrfy ve ark., 2015).

Bu amaçla hem prognostik bir biyobelirteç hem de teröpatik bir ajan olarak kullanılabilirlikleri araştırılan miRNA'ların meme kanseri gen ekspresyon profillerine dayanan alt tiplendirmeye benzer olarak miRNA ekspresyonlarının da tümörlerin sınıflandırılmasında biyobelirteç ve prognostik indikatör olarak kullanılmasının yakın gelecekte mümkün olabileceği ve bireysel tedavilerin sağlanabileceği öngörülmektedir (Györrfy ve ark., 2015).

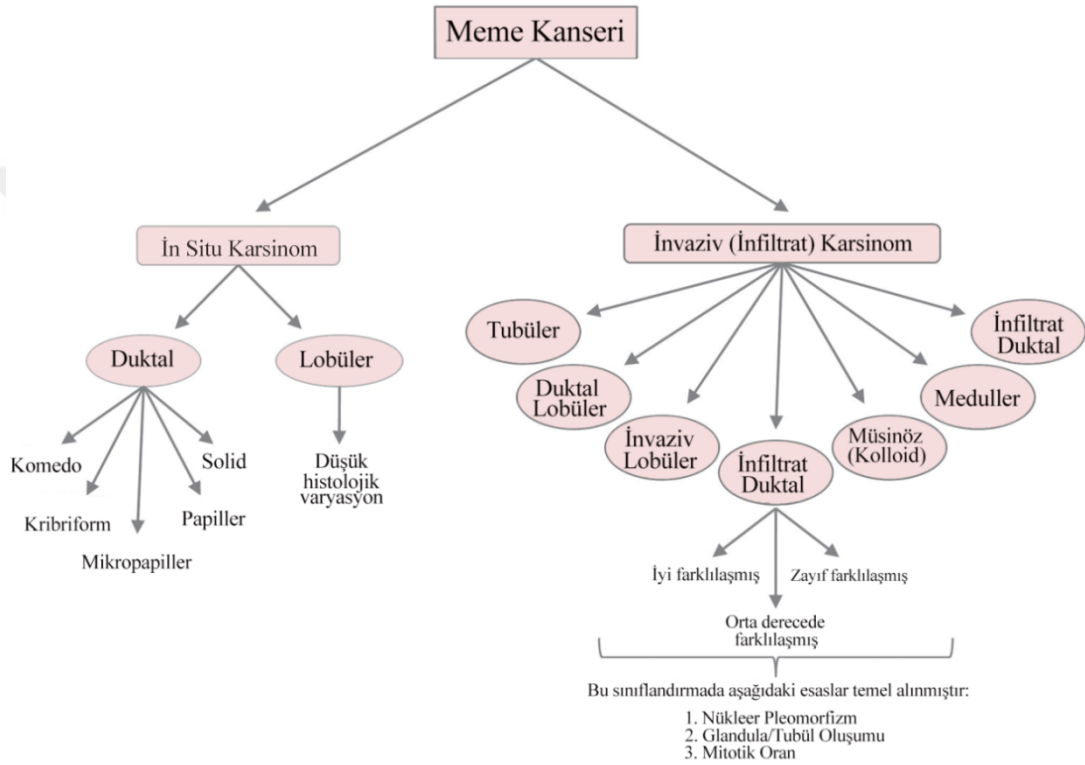
Meme kanserinde gerçekleştirilen biyolojik belirteç araştırmaları ve uygulanan multigen öngörü analizlerinden elde edilen veriler, triple negatif meme kanserinde (TNMK) klinik olarak yarar sağlayabilecek prognostik belirteçlerin belirlenmesindeki güçlükleri ortaya koymuştur (Györrfy ve ark., 2015). TNMK tedavisi için en önemli klinik gereksinim daha etkili yeni ilaçların geliştirilmesi ve prognostik belirteçlerin ortaya konulmasıdır.

2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

2.3.1. Histopatolojik Sınıflandırma

Meme kanseri, farklı fenotipik özellikteki birçok alt tipe sahip, heterojenik bir hastalıktır. Meme kanserinde uygun tedaviye karar vermek ve meme kanserinin prognozunu hesaplamak için bu hastalığa sahip kişileri kategorize etmek amacıyla rutin olarak kullanılan çeşitli klinik ve patolojik faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlere; hasta yaşı, aksiller lenf nodu durumu, tümör boyutu, histolojik özellikler (özellikle histolojik evre ve lenfovasküler invazyon), hormon reseptör durumu ve HER2 durumu dahil edilebilir (Duffy ve ark., 2017). Bu faktörler temelde histopatolojik, biyolojik ve moleküler olmak üzere üç kategoriye ayrılır. Meme kanseri ise histopatolojik olarak invaziv ve in-situ (infiltrat) kanserler olmak üzere ikiye ayrılır (Malhotra ve ark., 2010). İnvaziv meme kanseri, meme kanallarından kaynaklanan invaziv duktal karsinoma (%80) veya meme lobüllerinden kaynaklanan invaziv lobüler karsinoma (%10) şeklinde, 1 (düşük dereceli) ila 3 (yüksek dereceli)

arasında bir değer verilerek derecelendirilir. Her iki tür invaziv karsinom da metastaz yapabilir. İnvaziv meme kanserinin nadir görülen ve agresif seyreden bir diğer türü inflamatuvar (iltihaplı) meme kanseridir ve insidansı %1-3 oranındadır. (Lie ve ark., 2005). İn-situ meme kanseri, kanserli duktal hücrelerin bazal membranı işgal etmediği, erken evre meme kanserinde yaygın olarak görülen ve in-situ duktal karsinom olarak adlandırılan meme kanseri tipidir (Malhotra ve ark., 2010). Meme kanserinin kapsamlı histopatolojik sınıflandırması Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil-5 Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırılmasına ait şema (Malhotra ve ark., 2010)

2.3.2. Biyolojik Sınıflandırma

Biyolojik sınıflandırma, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) durumu ile Ki-67 durumunu ifade etmektedir. Bu biyobelirteçler, meme kanseri prognozunu tahmin etmede ve tedavi konusunda rehberlik etmede kullanılan güvenilir, ucuz ve terapötik karar verme açısından kullanışlı parametrelerdir. Söz konusu belirteçlerin biyolojik önemi, son yıllarda gerçekleştirilen genomik sınıflandırmadan elde edilen verilerin de katkısıyla güçlenmiştir (Joensuu ve ark., 2013).

Ayrıca tekrarlayan lezyonlar ve primer invaziv tümörde ER, PR ve HER2 ölçümü, invaziv meme kanserli hastaların tedavisinde önemli bir role sahiptir. Endokrin tedaviye yanıt verme olasılığı yüksek hastaların seçiminde önemli olan ER ve PR'nin yeni teşhis edilen tüm invaziv meme kanserlerinde ölçülmesi gerekmektedir (Joensuu ve ark., 2013). Öte yandan, her türlü anti-HER2 tedavisinde muhtemel (trastuzumab, pertuzumab, lapatinib veya ado-trastuzumab emtansine) tedavi yanıtını belirlemek için HER2 ekspresyonunun veya gen kopya sayısının belirlenmesi gereklidir. Determinasyonunda metodolojik sorunlar mevcut olmakla birlikte; açıkça belirlenmiş klinik değeri, multi analizler ile karşılaştırıldığında geniş kullanılabilirliğe sahip olması ve düşük maliyetleriyle Ki67, özellikle değerler düşük veya yüksekse, prognozu belirlemek için elverişli bir belirteçtir (Duffy ve ark., 2017).

2.3.2.1. Meme Kanseri Hastalarında ER ve PR Durumu

Östrojen ve progesteron reseptörleri, 20 yıldan daha uzun bir süredir klinik meme kanseri çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu reseptörlerin pozitif olma durumu tümör farklılaşmasının histolojik göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte, düşük hücre proliferasyonu gibi olumlu prognostik özelliklerle de korelasyon göstermektedir (Duffy ve ark., 2017). ER ve PR durumunun klinikteki kullanımı sayesinde; neoadjuvant, adjuvant terapiler ve ileri evre meme kanseri tedavisinin yönlendirilmesi mümkün olmaktadır. ER ve PR durumu; endokrin terapide seçici östrojen reseptör modülatörleri (tamoksifen), üçüncü nesil aromataz inhibitörleri (anastrozol, letrozol ve eksemestan), LH-RH agonistleri (leuprolit, goserelin), saf östrojen reseptörü azaltıcıları (fulvestrant), ooforektomi ve diğer terapilerden sağlanacak yararın öngörülmesinde oldukça önemlidir. Teşhisin ilk birkaç yılında, ER-pozitif tümörlü hastalar daha düşük nüks oranına sahip olmakta fakat bu durum teşhisten sonraki 5-7 yıldaki nüks oranı tarafından dengelendiğinden ER reseptörü klinikte prognostik açıdan daha düşük fayda sağlamaktadır (Duffy ve ark., 2017).

20 randomize klinik çalışma ile ele alınan ve hastalığın erken dönemine ait bireysel verilerin meta-analizlerinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde; ER pozitif hastaların ER negatiflere oranla meme kanseri sebepli ölüm oranı %30 ve hastalığın 15 yıllık nüks oranı %39 azalmıştır (Davies ve ark.2011).

Steroid hormon reseptör pozitif hastalar için standart endokrin tedavisi 5 yıl olmasına karşın, bu hastalara 10 yıl boyunca tamoksifen veya aromataz inhibitörü (örneğin letrozol) uygulanmasının 5 yıllık bir uygulamadan daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Goss ve ark., 2016). Bununla birlikte; bu arttırılmış fayda, genişletilmiş tedavinin potansiyel ilave yan etkileriyle birlikte değerlendirilmelidir. Geç nüks geliştirme riski yüksek olan hastaları tanımlamak için kullanılacak biyobelirteçlerin hastaların tedaviden yarar görebilmeleri açısından ulaşılabilir durumda olması önemlidir. Eşit derecede önemli olmak üzere, bu biyobelirteçler, uzun süreli tedavinin yan etkileri ve maliyetlerinden kurtulmaları amacıyla geç nüks riski düşük olan kadınların tanımlanmasına yardımcı olmalıdır. Gelişmekte olan veriler, spesifik gen işaretlerinin endokrin tedaviyi takiben erken veya geç dönem nüks risklerine göre ayırt edilebileceğini göstermektedir (Osborne, 1998).

2.3.2.2. Meme Kanserinde HER2 Durumu ve HER2/Anti-HER2 Terapilerin Tedavi Yanıtını Tahmindeki Rolü

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*HER2*) meme kanseri gelişiminde rol oynayan genlerden biridir ve *HER2* proteininin üretiminde görev almaktadır. *HER2* geni, sağlıklı bir meme hücresinin büyümesi, bölünmesi ve onarımında görev almakla birlikte, meme kanserli hastaların %25'inde kendisinin çok fazla kopyasını oluşturmaktadır. Bu durum *HER2* gen amplifikasyonu olarak bilinir. *HER2* genindeki bu amplifikasyon, meme hücrelerinde *HER2* reseptörlerinin artmasına ve meme hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyüüp bölünmesine neden olur (Hoferlin ve ark., 2013). *HER2* gen amplifikasyonu veya *HER2* proteini aşırı eksprese olan meme kanseri hastalar, patoloji raporunda *HER2*-pozitif olarak tanımlanırlar. *HER2*-pozitif meme kanseri, *HER2* negatif meme kanserlerine kıyasla daha hızlı büyüme ve yayılma eğilimi gösteren yüksek dereceli tümörlerdir. Ancak günümüzde *HER2* pozitif meme kanserli hastalar için *HER2* reseptörlerini hedefleyen ilaçlar mevcuttur. Bu hastalar Trastuzumab (Herceptin) tedavisine genellikle cevap verseler bile, hızlı büyüme ve bölünme eğilimine sahip hücrelerde meydana gelen *PIK3CA* ve *PTEN* gen mutasyonları hastaların tedavi yanıtını düşürmektedir (Hoferlin ve ark., 2013).

HER2 ölçümünün ana klinik kullanımı, neoadjuvan, adjuvan ve anti-*HER2* tedavisine cevabın tahmin edilmesine yöneliktir (Eroglu ve ark., 2014). Şu anda dört

anti-HER2 terapisi; trastuzumab, lapatinib, pertuzumab ve trastuzumab emtansine (T-DM1) HER2-pozitif meme kanseri tedavisi için onaylanmıştır (Giordano ve ark., 2014). Şu anki verilere dayanarak, *HER2* geni aşırı ekspresyonunun anti-HER2 tedavilere yanıt verdiğini fakat gelişen ilaç direnci nedeniyle yeterli olmadığını öngörebiliriz.

2.3.2.3. Meme Kanseri Hastalarında Ki67 Durumu

Ki67'nin (Prolifere hücre nükleer antijen) incelendiği klinik araştırmaların ve meta-analizlerin retrospektif olarak değerlendirilmesini de kapsayan birçok çalışma, yüksek Ki67 düzeylerinin bağımsız olarak meme kanseri hastalarında istenmeyen sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Yerushalmi ve ark., 2010). Konuyla ilgili Petrelli ve ark. (2015), literatür hakkında sistematik bir inceleme yaptıktan sonra, bireysel çalışmalara dair bir meta-analiz gerçekleştirmiştir. Söz konusu meta-analiz sonucunda toplamda 64.196 hastayı kapsayan 41 çalışma tespit edilmiştir. Her ne kadar 10 ile >% 25 hücre boyaması aralığında farklı kesme noktaları incelenmiş olsa da genel sağkalım için en güçlü prognostik önemi gösteren eşik, >%25 hücre boyaması olarak tespit edilmiştir. Meme kanseri hastalarında yüksek Ki67 değerleri ile kötü prognoz arasında tutarlı ilişki, kullanılan testler için laboratuvarlar arası hassaslığın zayıf oluşu, Ki67'yi ölçmek için farklı yöntemlerin kullanılması ve düşük tümörlerin ayırt edici tanımı için farklı kesme noktalarının kullanılmasıyla tespit edilmiştir (Dowsett ve ark., 2011; Polley ve ark., 2015). Denkert ve arkadaşlarına (2015) göre hassasiyet, özellikle sınırda veya ara konsantrasyonda bulunan Ki67 düzeylerinde önemlidir. Bu nedenle, araştırmacılar klinik karar vermenin sınırda bulunan aralıklardaki Ki67 düzeylerine göre yapılmaması gerektiğini belirtmişlerdir.

Prognostik değerlendirmelere ek olarak Ki67'nin özellikle neoadjuvan ve adjuvan terapilerdeki potansiyel prediktif kullanımı araştırılmıştır. Neoadjuvan terapide, patolojik bulgulardan elde edilen yüksek Ki67 düzeyleri ile kemoterapiye cevap arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Denkert ve ark., 2015). Bununla birlikte, adjuvan terapide Ki67 düzeyleri ile kemoterapi arasındaki ilişkinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Denkert ve ark., 2015). Metastatik ortamda Ki67'nin kemo veya endokrin prediktif değeri hakkında çok az veri mevcuttur.

2.3.3. Moleküler Sınıflandırma

2.3.3.1. Luminal A Alt Tipi

Luminal A, meme kanserinde görülen en yaygın alt tip olup tüm meme kanserlerinin %50-60'ını temsil etmektedir. Bu tümörler iyi prognoz göstermekle birlikte; sıklıkla düşük histolojik evre, düşük derecede nükleer pleomorfizm, düşük mitotik aktivite ve özel histolojik tipleri (tübüler, invaziv kribriform, müsinöz ve lobüler) içerir (Carey ve ark., 2010). Luminal A, yüksek düzeyde ER ve ilgili genlerde düşük proliferasyon seviyeleri ile karakterizedir. Bu alt tip ayrıca Luminal epitelyal sitokeratinler (CK) 8 ve 18'in yanı sıra ER1'in de dahil olduğu diğer luminal ilişkili belirteçlerin ve ER fonksiyonuyla ilişkili genler olan LIV1, Hepatosit nükleer faktör 3 alfa (FOXA1), X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1), GATA bağlayıcı protein 3 (GATA 3), B hücreli lenfoma 2 (BCL2), erbB3 ve erbB4'ün ekspresyonuyla karakterizedir (Yersal ve Barutca, 2014). Luminal A alt tipi, immünohistokimya tarafından HER2 negatif ve düşük Ki67'ye sahip, ER-pozitif ve /veya PR- pozitif olan tümörler olarak tanımlanır (Yersal ve Barutca, 2014). Luminal A meme kanseri olan hastalar iyi prognoza sahiptir ve nüks oranı diğer alt tiplerden anlamlı derecede düşüktür. Hastalığın kemikte yinelenme durumu daha yaygın görülmekle birlikte, söz konusu nüks ihtimali karaciğer, akciğer ve merkezi sinir sistemi metastazlarında %10'dan daha düşük seviyelerde görülmekte ve tedavi genel olarak hormonal terapiye dayanmaktadır (Yersal ve Barutca, 2014).

2.3.3.2. Luminal B Alt Tipi

Luminal B tümörleri meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturmakla birlikte Luminal A'ya göre daha agresif bir fenotipe, daha yüksek histolojik dereceye, proliferatif indekse ve daha kötü bir prognoza sahiptir (Creighton, 2012). Ayrıca, luminal A alt tipine kıyasla bu alt tipte nüks oranı daha yüksektir ve nüks sonrası sağkalım oranı daha düşüktür (Yersal ve Barutca, 2014). Bununla birlikte luminal B tümörleri, büyüme reseptörü sinyal genlerindeki artmış ekspresyon oranını ifade etmektedir. Her iki luminal alt grup arasındaki temel fark, luminal B'de proliferasyon ile ilişkili avian miyeloblastosis viral onkogen homologu (*v-MYB*), gamma glutamil hidrolaz (*GGH*), lizozom transmembran Protein 4-beta (*LAPTMB4*), nükleaz duyarlı eleman bağlama proteini 1 (*NSEPI*) ve siklin E1 (*CCNE1*) gibi genlerin ekspresyonlarındaki artıştır (Reis-Filho ve ark., 2010).

İmmünohistokimyasal olarak tanımlanan HER2 pozitif tümörlerin yaklaşık %30'u, luminal B alt tipine dahildir (Loi ve ark., 2009).

İmmünohistokimyasal bakış açısına göre değerlendirildiğinde luminal B alt tipi, ER-pozitif, HER2 negatif ve Ki67 yüksek ya da ER ve HER-2 pozitif tümörler olarak tanımlanıyor olsa da bu tanım, bütün luminal B tümörleri kapsamaz. Çünkü bu tümörlerin %6'sı hem ER hem de HER2 açısından negatif özelliktedir. Bununla birlikte Ki67, luminal A ve B'yi birbirinden ayırt edebilecek kesin veriler sunmamaktadır (Geyer ve ark., 2012). Tedavi edilmemiş luminal B meme kanserlerinin tümünden sağkalımı, yüksek riskli tümörler olarak tanımlanan bazal benzeri ve HER-2 pozitif alt tiplerine benzemektedir. Ayrıca, luminal B meme kanseri, neoadjuvant kemoterapiye luminal A alt tipine göre daha iyi yanıt verir ve bu alt tipte daha yüksek patolojik tam yanıt oranları elde edilir (Yersal ve Barutca, 2014). Luminal B tümörlerde görülen nüks oranları, tanıdan sonraki ilk 5 yıl ile sınırlıdır. Yeni kanıtlar, fibroblast büyüme faktörü reseptör 1 (*FGFR1*), *HER1*, fosfoinozid 3 kinaz (*PI3K*) katalitik alfa polipeptidi ve sarkom proto-onkogen (*Src*) gibi bazı alternatif büyüme faktörü yollarındaki yüksek proliferasyonun nükse katkıda bulunabileceği öngörülmektedir (Tran ve Bedard, 2014).

2.3.3.3. HER2 Alt Tipi

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (*HER2*) proto-onkogeni veya c-erbB2, kromozom 17q21'de yer alan ve yapısal olarak epidermal büyüme faktörü reseptörü ile ilişkili 185 kDa'luk bir proteini kodlar. Meme kanserli hastaların %15-20'sinde *HER2* yüksek miktarda eksprese edilir (Barnes ve Kumar, 2004). Bu tip kanserler *HER2* reseptörlerinin, *HER2* yolağı ve/veya *HER2* amplifikasyonu ile ilişkili diğer genlerin yüksek ekspresyonu nedeniyle yüksek histolojik ve nükleer dereceye sahiptir. Ayrıca %40'ından fazlası p53 mutasyonlarına sahiptir. Söz konusu tümörler, morfolojik olarak oldukça proliferatif özellik gösterir (Tsutsui ve ark., 2003) *HER2*-pozitif meme kanserlerinin neredeyse yarısı ER için pozitifdir, ancak genellikle düşük ER düzeylerini ifade etmektedirler. Bu yüksek dereceli tümörler, trastuzumab (Herceptin) tedavisine genellikle cevap verseler bile, nispeten kötü prognozla ilişkili tümörlerdir (Yersal ve Barutca, 2014).

HER2, dört membran tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. *HER2* bir liganda sahip değildir ve çok yüksek seviyelerde eksprese olduğunda aktif hale gelmek için başka

bir aile üyesiyle heterodimerizasyona veya kendisiyle homodimerizasyona ihtiyacı vardır. Bu fosforile tirozin rezidüleri sayısız hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşime girerek aşağı akış ikinci haberci yolaklarının aktivasyonuna ve diğer membran sinyal yollarıyla sinyallerin karışmasına yol açar. Yolak tarafından aktive olan transkripsiyon faktörleri; hücre proliferasyonu, sağkalım, farklılaşma, anjiyogenezis, invazyon ve metastazda yer alan birçok geni regüle eder (Gutierrez ve Schiff, 2011).

2.3.3.4. Bazal Benzeri Alt Tipi

Bazal benzeri alt tip, tüm meme kanserlerinin %8-37'sini temsil eder ve bu kanserler; yüksek histolojik ve nükleer derece, zayıf tübül oluşumu, merkezi nekrotik veya fibrotik bölgelerin varlığı, belirgin lenfositik infiltrat ve son derece yüksek mitotik ve proliferatif indekslere sahip meduller özellikler ile ilişkilidir. Ayrıca bu tümörlerin birçoğu; solid büyüme paterni, agresif klinik davranış ve yüksek oranda metastaz ile duktal tümörlere infiltrasyon yapmaktadır (Heitz ve ark.,2009; Yersal ve Barutca, 2014). Bazal benzeri alt gruba ait tümörler; CK5/6, CK14, CK17, EGFR ekspresyonundan dolayı pozitif ve ER/PR/HER2 negatif olarak tanımlanmaktadır. Bu üç reseptörün triple negatif olarak anılmasının da sebebi budur. Bu tümörler ayrıca P-kadherin, faskin, kaveolinler 1 ve 2, alpha-beta kristalin ve epidermal büyüme faktörü reseptörünü (*EGFR*) aşırı eksprese eder (Heitz ve ark.,2009).

Triple-negatif ve bazal benzeri terimlerinin tamamen eş anlamlı olmadığını ve çalışmalar boyunca yaklaşık %20-30 uyumsuzluğu bulunduğunu belirtmek önemlidir. Triple negatif terimi; ER, PR ve HER2 protein ekspresyonundan yoksun meme tümörlerinin immünohistokimyasal sınıflandırmasını belirtirken, bazal benzeri alt tip, gen ekspresyonu ile mikroarray analizi sonucu tanımlanır (Kreike ve ark.,2007). TNMK, karakteristik bazal hücre belirteçlerini eksprese etmez. Bazal belirteçler için pozitiflik, genel olarak TNMK'yle karşılaştırıldığında daha kötü prognoz ile ilişkilidir ve TNMK'nin farklı genetik alt tiplerinde görülebilir (Yersal ve Barutca, 2014). Bazal benzeri grupla ilişkili halihazırda, tamamlayıcı biyolojik belirteçler dışında bazal benzeri kanserleri tanımlayabilecek belirli bir uluslararası görüş birliği bulunmamaktadır (Anders ve Carey, 2009). Bazal benzeri alt tip ile ilgili hücresel çoğalmayı, hücre sağkalımını, hücre göçünü ve invazyonunu arttırmada etkin birçok gen ve yolak mevcuttur. Bu yolların geniş çeşitliliğine

rağmen; öne çıkan MAPK, PI3K, Akt ve NF-Kb gibi sinyal yolları diğer meme kanseri alt tiplerinde olduğu gibi düzensizdir. Ayrıca bazal benzeri kanserlerde, bu yollarındaki değişikliklerle birlikte sitoplazmik ve nükleer beta katenin ekspresyonundaki artış gibi değişiklikler de mevcuttur ve bu değişiklikler bazal benzeri alt tip için potansiyel bir terapötik hedef olarak önerilmiştir (Criscitiello ve ark., 2012).

2.4. Triple Negatif Meme Kanseri

ER ve PR ekspresyonunun yokluğunun yanı sıra HER2 eksikliği ile de karakterize olan triple negatif meme kanseri (TNMK), tüm meme kanserlerinin %10-30'unu oluşturur (Hon ve ark.,2016). TNMK ayrıca daha büyük bir tümör boyu ile birlikte, daha yoğun bir tümör yükü gösterir ve çoğunlukla daha agresif seyreden yüksek dereceli tümörlerden oluşur (Massihnia ve ark., 2016). TNMK hastaları, teşhis sonrası 3 yıl içinde distant hastalık nüksünde daha yüksek insidansa sahiptir ve bu hastalar diğer alt gruplara kıyasla, metastaz gelişimine daha yüksek bir duyarlılık göstermektedir. Bu durum TNMK hastalarının kötü prognoz ve olumsuz klinik sonuçlar göstermesine neden olmaktadır (Nowacka-Zawisza ve Krajewska, 2013). Ayrıca, genetik yatkınlık açısından değerlendirildiğinde *BRCA1* gen mutasyonunu taşıyan genç kadınlarda insidansı %9-16 arasında değişmekte ve etnik kökene bağlı güçlü bir korelasyon göstermektedir (Massihnia ve ark., 2016). TNMK hastaları başlangıçta neoadjuvan tedavilere cevap veriyor olsa da, bu hastalığa sahip bireylerin yalnızca %30'u ilk tanıdan sonra 5 yıldan daha uzun bir sağkalıma sahiptir. Bu durum, söz konusu alt tipteki agresifliği göstermektedir (Liedtke ve ark., 2015). *BRCA1* mutasyonu olan hastalara sıklıkla TNMK tanısı konmakta ancak bu durum, tüm TNMK hastalarının *BRCA1* pozitif olduğu anlamına gelmemektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak TNMK'nin *BRCA1* mutasyonunu taşımadığında, *BRCA1* yönünden eksik tümörlere benzer şekilde davrandığı ve benzer gen ekspresyon profilleri gösterdiği tespit edilmiştir (Chacón ve Costanzo, 2010; Craig ve ark., 2013).

Tümör heterojenitesi ve hastalığın iyi tanımlanmış moleküler belirteçlerinin bulunmaması nedeniyle tedavi için bir hedef görevi görebilecek yaygın bir sinyal yolağının tespit edilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Bu durum, TNMK biyolojisinde VEGF, EGFR, Src ve mTOR gibi potansiyel biyobelirteçleri hedef alan

yeni ilaç araştırmalarının önünün açılmasını sağlamıştır (Ellard ve ark., 2009). Dahası, TNMK'nin karakterizasyonunda tümörün moleküler özelliklerinin çalışılması, TNMK'nin alt tiplerinin sınıflandırmasını mümkün kılmıştır (Tablo 1). TNMK, genetik ekspresyon profillerine bağlı olarak; lümen androjen reseptörü (LAR), mezenkimal (MES), bazal benzeri bağışıklığı baskılamış (BLIS) ve bazal benzeri immün-aktif (BLIA) olarak en az dört grupta incelenmektedir (Lehmann ve ark., 2011; Burstein ve ark., 2015).

Tablo-1 Triple negatif meme kanserindeki üç moleküler sınıflandırmanın karşılaştırılması (Ahn ve ark., 2016)

Yazar	Yayın Yılı	Veri Seti	Metod	Alt Tip sayısı	Prognozu Ayırt Etme Durumu
Lehmann et al.	2011	586	K-means Kümeleme	6	Düşük
Burstein et al.	2014	198	Negatif Olmayan Matris Çarpanı	4	İyi
Jézéquel et al.	2015	194	Fuzzy Kümeleme	3	İyi

2.4.1. Triple Negatif Meme Kanseri Alt Tipleri

TNMK, farklı moleküler alt tiplere ayrılmış olsa da bu alt tipler arasında oldukça fazla tümoral, mutasyonel ve transkripsiyonel heterojenite mevcuttur. TNMK'nin moleküler heterojenitesi, TNMK tedavisinde uygulanacak klinik tedavi yaklaşımlarını oldukça zora sokmaktadır (Pohl ve ark., 2017). TNMK'ler, *TP53*, *PIK3CA* ve *PTEN* geni de dahil olmak üzere kanserleşmede anahtar rol oynayan genlerdeki tek gen mutasyonlarının yüksek frekanslarıyla karakterizedir. Bu durum, mutasyona uğramış genlerin klonal evriminin TNMK gelişiminde erken bir evrede ortaya çıktığını göstermektedir (Shah ve ark., 2012). Bununla birlikte, TNMK vakaları arasında bu genler için mutasyon sıklığı tek tip değildir. Lehmann ve ark. (2011) 587 TNMK vakasında belirlenen gen ekspresyonu işaretlerini tespit etti ve altı farklı moleküler TNMK alt tipi belirledi. Bu alt tipler arasında bazal benzeri 1, bazal benzeri 2, immünomodülatör, mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR) bulunur. Burstein ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen son RNA profillemesi çalışması, Lehmann'ın gen

ekspresyonu profillemesine dayanan LAR ve MES alt tiplerinin çakıştığını göstermiştir. Bu çalışmaların her ikisinin de bulguları; lümen androjen reseptörü (LAR), mezenkimal (MES), bazal benzeri bağışıklığı baskılamış (BLIS) ve bazal benzeri immün-aktif (BLIA) olarak tanımlanan moleküler olarak belirgin ve stabil en az dört TNMK alt tipinin varlığını göstermektedir. Dahası, bu çalışmalar TNMK tedavisine özgü terapötiklerin geliştirilmesi için moleküler hedefler önerme potansiyeli taşımaktadır (Pohl ve ark., 2017).

2.4.1.1. Luminal Androjen Reseptörü (LAR) Alt Tipi

LAR alt tipinin tüm TNMK'lerinin ~%10'unu oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca bu alt tip, ER negatiftir ve hormon bağımlı yolakların yüksek düzeyde deregülasyonu ile karakterizedir (Lehmann ve ark., 2011). Özellikle androjen reseptör yolu (AR), LAR alt tipindeki spesifik genlerin ekspresyonunu indüklemeye önemli bir rol oynamaktadır (Abramson ve ark., 2015). LAR alt tipinde, androjen reseptörü mRNA ekspresyonunun diğer alt tiplere göre önemli derecede (9 kat) arttığı gösterilmiştir (Massihnia ve ark., 2016). Bununla birlikte, TNMK'nin LAR alt tipi, Wnt/ β -catenin yolağı tarafından düzenlenen bir gen olan *CCND1*'in genomik amplifikasyonunu ifade etmektedir. AR pozitif TNMK bireylerin bir non-steroidal antiandrojen olan Bicalutamide'e pozitif bir klinik cevap vermiş olmasına karşın, araştırmalar negatif AR ifadesi ile ilişkili sağkalım oranları üzerinde anlamlı bir etkiye işaret etmemektedir (Massihnia ve ark., 2016).

2.4.1.2. Mezenkimal (MES) Alt Tip

Lehmann'ın mezenkimal, mezenkimal kök hücre benzeri ve klaudin-düşük alt tiplerini içeren mezenkimal alt tipi; hücrel motilite (Rho yolağı), proliferasyon ve farklılaşmaya katılan sinyal yolakları (Wnt/ β -catenin, ALK, TGF- β yolakları) ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir (Pohl ve ark., 2017). MES alt tiplerinde platelet kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve c-kit'in yüksek ekspresyonu görülür. Mezenkimal tümörleri meme kök hücre belirteci, *ALDH1A1* de dahil olmak üzere mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eder ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ve diğer kök hücre benzeri özellikleri taşıyan genlerle zenginleştirilmiştir (Lehmann ve ark., 2011). Özellikle mezenkimal kök hücre benzeri alt tipi inositol fosfat bağımlı sinyal yolağı, *EGFR*, *PDGF* ve *ERK1/2* de dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolaklarında yer alan genlerin zenginleşmesini ve

proliferatif genlerin azaltılmış ekspresyonunu gösterir. Lehmann'ın MES ve mezenkimal kök hücre benzeri alt tiplerinde, EMT ile ilişkili; *MMP2*, *TWIST*, *SNAI2* ve *TCF4*'ün de dahil olduğu Wnt sinyalleme tarafından modüle edilen bir dizi zenginleştirilmiş gen vardır. *CTNNB1* (β -katenin), *DKK2*, *DKK3*, *SFRP4*, *TCF4*, *TCF7L2* ve *FZD4*'ün de dahil olduğu MES ve mezenkimal kök benzeri alt tiplerinde Wnt/ β -katenin sinyallemeyle ilgili bir gen setinin zenginleştirilmiş olduğu tespit edilmiştir. MES ve mezenkimal kök benzeri alt tiplerinde benzer gen ekspresyonu ve benzer kimyasal direnç gözlenmektedir (Pohl ve ark., 2017).

2.4.1.3. Bazal Benzeri Bağışıklık Baskılamalı (BLIS) Alt Tip

Bazal benzeri bağışıklık baskılamalı alt tip; B hücresi, T hücresi ve doğal katil hücrelerin (NK) fonksiyonlarını kontrol eden genlerin ve immün düzenleyici yolların yanı sıra sitokin yollarının da aşağı regülasyonu ile karakterizedir. Bu alt tip, en kötü hastaliksız sağkalım ile hastalığa özgü sağkalıma sahip olmakla birlikte; antijen sunumunu, bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve kalıtsal/adaptif immün hücre iletişimini kontrol eden moleküllerin düşük ekspresyonuna sahiptir. Ayrıca bu alt tip, birden fazla SOX ailesi transkripsiyon faktörünü benzersiz bir şekilde ifade etmektedir (Burstein ve ark., 2015).

2.4.1.4. Bazal Benzeri İmmün-aktif (BLIA) Alt Tipi

Bazal benzeri immün aktive alt tipi, bazal benzeri bağışıklık baskılamalı alt tipin aksine immün regülasyon yolları ile B hücresi, T hücresi ve doğal katil hücrelerin fonksiyonlarını kontrol eden genlerin up-regülasyonu ile tanımlanır (Burstein ve ark., 2015). STAT transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu ve sitotoksik T-lenfosit-ilişkili protein 4 ile bağışıklık aktive eden yolların up-regülasyonu bu alt tip için belirleyicidir. Bazal benzeri immün aktive tümörlerinin lenfositik infiltrasyon düzeylerinde artış gerçekleştiğinden diğer TNMK alt tiplerine kıyaslandığında hastalıktan bağımsız sağkalım oranları ve hasta sonuçları iyi prognoz gösterse de bu tümörler nispeten daha yüksek bir nüks riski (~%20) taşımaktadır (Pohl ve ark., 2017).

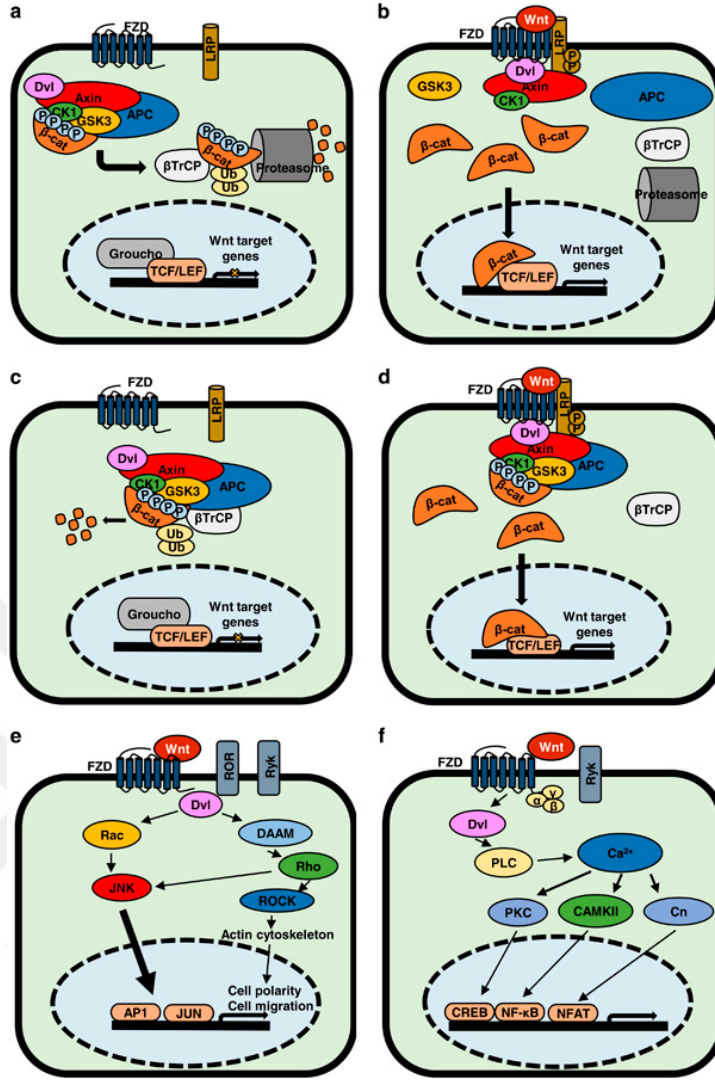
2.5. Triple Negatif Meme Kanserinde Etkili Sinyal Yolları

TNMK, biyolojik açıdan değişken bir hastalık olması sebebiyle tedavi için bir hedef görevi görebilecek yaygın bir sinyal yolağını tespit etmek oldukça zordur (Rahim ve O'Regan, 2017). TNMK gelişiminde etkili olan AR, PI3K/AKT,

RAS/MAPK, Wnt/ β -katenin gibi sinyal yolları, TNMK'de kötü prognozla ve düşük tedavi yanıtıyla örtüşen bir fonksiyonelliğe sahiptir. Bu nedenle, TNMK'de önem arz eden yollar arasındaki düzensiz sinyal iletim mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve tedavide yüksek verimde sinerjik bir terapötik etki sağlanabilmesi açısından, kombin tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılacak çalışmalar önem arz etmektedir.

2.5.1. Triple Negatif Meme Kanserinde Wnt/ β -katenin Sinyal Yoluğu

Wnt/ β -katenin sinyal yoluğu; hücre siklusunun düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve adezyonunda, tümör oluşumu, sinaps oluşumu, adipogenez ve anjiyogenez ile birlikte kök hücre biyolojisinde önemli biyolojik roller oynar. Bu yoluğun anormal aktivasyonunun pek çok tümör tipinin gelişiminde anahtar bir rol oynadığı ve bu durumun kanser kök hücrelerin (KKH) davranışını etkilediği bilinmektedir (Altınok ve Sunguroğlu, 2016). Fare kanser modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, β -katenin yoluğu üzerinde TNMK tümörigenezinin ve in vitro ortamda TNMK hücrelerinin hücre migrasyonunu, kök hücre benzeri hücre özelliklerini ve kemodirenci desteklediğini göstermiştir. Bu nedenle, Wnt sinyal yoluğunu hedef alan yeni terapötik ilaçların KKH'lerin eliminasyonuna yönelik yeni stratejiler içermesi önemlidir (Altınok ve Sunguroğlu, 2016). Uyarım mekanizmasına göre bu yolak; Wnt/ β -katenin (Kanonik/Klasik), Wnt/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP, Kanonik olmayan) olmak üzere 3 farklı şekilde sınıflandırılır (Huelsenken ve Behrens, 2002).



Şekil-6 Klasik (Kanonik) ve yeni (Kanonik olmayan) Wnt/β-katenin yolları; a. FZD reseptörüne bağlı durumda olmayan inaktif klasik/kanonik Wnt/β-katenin yolağı, b. FZD reseptörüne bağlı aktif Wnt/β-katenin yolağı, c. Kanonik olmayan/yeni Wnt/β-katenin yolağı ligand reseptöre bağlanmamış durumda, d. Kanonik olmayan Wnt/β-katenin modeli FZD reseptörüne bağlı durumda, e. Wnt planar hücre polaritesi (PCP) Wnt/β-katenin yolağı aktif ve Wnt çoklu reseptörlere (FZD, ROR ve Rky), f. Wnt/Ca²⁺ yolağı aktif durumda. FZD, Ryk reseptörleri ile Dvl ve G proteinlerini uyarıyor.

Wnt/β-katenin sinyal yolağında, Wnt ligandının Frizzled (FZD) reseptörüne ve FZD'nin ko-reseptörü olarak tanımlanan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein olan LRP5/6 proteinine bağlanması ile birlikte hücre içi sinyalizasyon başlar. Böylelikle Wnt sinyal mekanizmasının başlatılabilmesi için gerekli olan üçlü yapı (FZD-Wnt-LRP5/6) birbirleriyle bağlantı kurmuş olur (Altınok ve Sunguroğlu, 2016) (Şekil 6). Bu bağlanmanın sonrasında sinyal önce sitoplazmaya geçer ve DVL (dishevelled) fosforilasyonu uyarılır. Sonrasında bu fosforilasyon Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CK1 (casein kinase 1) ve GSK-3 (glycogen synthase

kinase 3)'ten oluşan yıkım kompleksini dağıtarak, β -katenin stabilizasyonunu sağlar ve β -kateninin nükleer translokasyonuna izin verir. Nükleusa giren β -katenin, bir transkripsiyon faktör ailesi olan TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) üyelerine bağlanarak koaktivatörlerin (p300 ve CREB-bağlanma proteini) de yardımıyla hücrenin proliferasyonunu sağlayacak çok sayıda Wnt hedef geninin transkribe olmasını sağlar (Teo, 2010). Wnt ligandının yokluğunda sitoplazmik β -katenin, yıkım kompleksi tarafından parçalanmak üzere hedef alınır. CK1 ve GSK3 komponentleri β -katenini, N terminal bölgesindeki serin ve treonin rezidüleri ile fosforlar. Fosforlanan β -katenin, transdusin tarafından tanınır ve transdusin β -kateninin proteozomal yıkımına öncülük eder (Kimelman ve Xu, 2006).

TNMK'de Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun zenginleşmesi oldukça belirgindir ve zayıf klinik sonuçlar bu yolakla ilişkilidir. Düzensiz Wnt/ β -katenin sinyali sergileyen TNMK hastalarının akciğer metastazı ve beyin metastazı gibi ikincil metastazları geliştirme olasılıkları daha yüksektir (Dey ve ark., 2013) Çalışmalar, β -katenin nükleer birikiminin fare kanser modellerinde TNMK tümörigenezinin ve in vitro olarak TNMK hücrelerinin hücre migrasyonunun; koloni formasyonunu, kök hücre-benzeri özellikleri ve kemodirenci teşvik ettiğini göstermiştir. Bu durum Kanonik Wnt sinyallemesinin, TNMK tümörigenezinin önemli bir itici gücü olduğu fikrini temellendirmektedir (Xu ve ark., 2015).

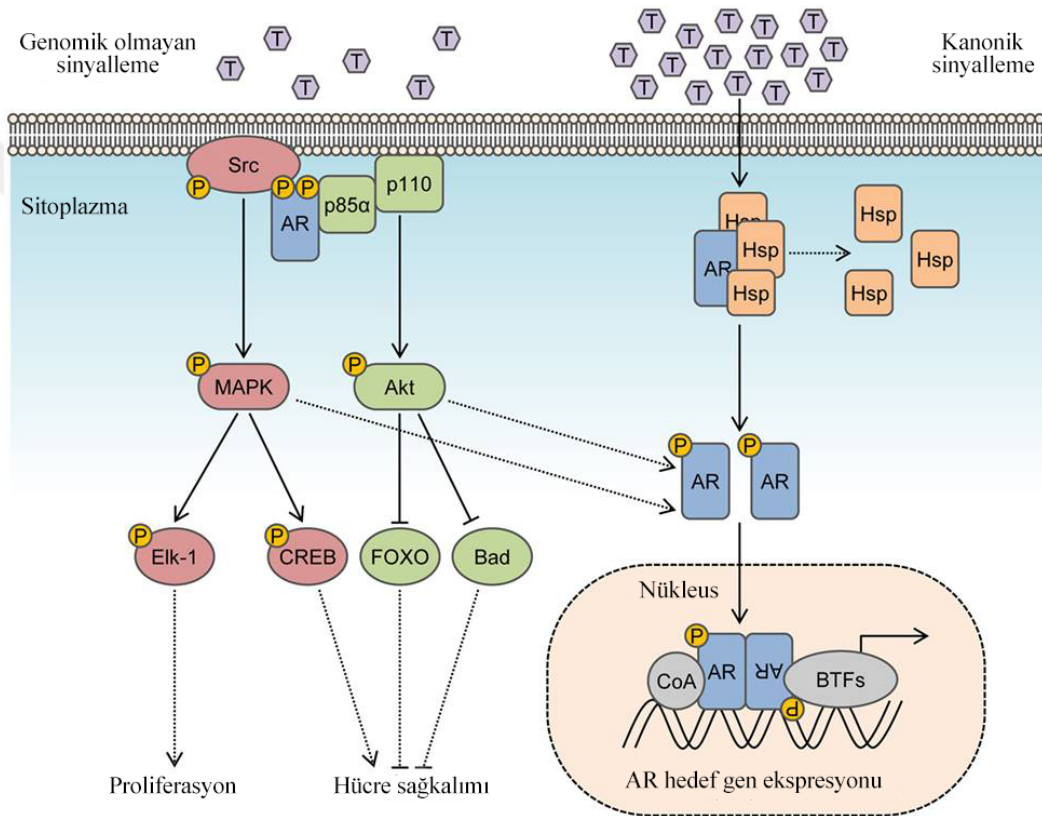
Çalışmalar, özellikle berrant c-Jun N-terminal kinaz aktivasyonu yoluyla, TNMK hücrelerinin ve MKK'lerin yüksek derecede metastatik davranışında kanonik olmayan Wnt sinyal yolaklarının disregülasyonunu kapsamaktadır. Wnt sinyallemesi; normal meme kök hücre fonksiyonu ve embriyogenez sırasında meme bezi gelişiminde, postnatal gelişimde ve gebelikte, Wnt-duyarlı kök hücre popülasyonları içeren erişkin meme bezleri için gereklidir. Çalışmalar meme kanseri kök hücrelerinde (MKK'lerde) anormal Wnt sinyallemesinin meme tümörigenezi açısından önemli bir durum olduğunu ortaya koymuştur (Pohl ve ark., 2017). Ayrıca yapılan araştırmalar, Wnt/ β -katenin sinyalleme aktivitesinin, Aldefluor-pozitif hücrelere karşı Aldefluor-negatif hücrelerde TCF4 ve LEF1 ekspresyonuna dayalı MKK'lerinde β -kateninin, kitle tümör popülasyonundan daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Pohl ve ark., 2017). Çalışmalar ayrıca Wnt sinyallemesinin, aşırı Wnt ekspresyonu ile gelişen meme tümörlerinde Wnt inhibisyonunu yeniden aktive

edebilen klonlar tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. Bu da, anormal Wnt aktivasyonunun meme kanseri nüksünde ve ilerlemesinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Pohl ve ark., 2017).

2.5.2. Meme Kanserinde AR Sinyal Yolağı

Androjen reseptörü (AR) ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür (Pietri ve ark., 2016). İnsan Androjen reseptör geni, X kromozomunun q11-12 uzun kolunda bulunur ve sekiz ekzon içerir. (Higa ve Fell, 2013). AR, nükleer reseptörlerin süper ailesine ait steroid hormon reseptör ailesinin bir üyesidir. Diğer steroid hormon reseptörleri; östrojen reseptörü (ER), glukokortikoid reseptör (GR), progesteron reseptörü (PR) ve mineralokortikoid reseptörüdür. AR, birçok fizyolojik ve patolojik sürece dahil olan spesifik genlerin ekspresyonunu kontrol eden ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür (Higa & Fell 2013). Reseptör, birincil ve ikincil cinsel özelliklerin, erkeklerde ve kadınlarda meme bezi dahil olmak üzere, pubert gelişiminde; zihinsel enerji, libido ve kas kuvveti seviyelerinde; yetişkin erkeklerin ve kadınların genel sağlığı üzerinde bir etki yaratmakla birlikte, prostat ve meme kanserinde önemli rol oynamaktadır (Pietri ve ark., 2016). Transkripsiyonel AR sinyalleme, MAPK yolağına bağımlı veya MAPK'dan bağımsız bir şekilde ortaya çıkabilmektedir (Liao ve ark., 2013). MAPK aracılı, transkripsiyonel olmayan AR sinyalleme, sitoplazmik AR aracılıdır ve fosfoinozimid 3-kinaz (PI3K), Src-ailesi kinazları ve Ras GTPaz ile etkileşime geçerek gerçekleşir. Bu sinyaller, MAPK/ERK yolağı üzerinde, MAPK translokasyonu ve transkripsiyonel faktörlerle etkileşerek hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Ayrıca AR sinyalleme nükleotiddeki MAPK translokasyonu ile MAPK/ERK yolağında birleşir ve hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer. Androjenlere yanıt olarak, membrana bağlı AR, plazma membranı G proteine bağlı reseptörler (GPCR) veya cinsiyet hormonu bağlayan globulin reseptörü (SHBGR) siklik adozin monofosfat (cAMP) seviyesini upregüle eder (Pietri ve ark., 2016; Liao ve ark., 2013) (Şekil 7). AR sinyal yolları üzerinde odaklanan tedaviler, TNMK alt gruplarını moleküler düzeyde tanımlamak adına gen ifadesi profillerinin çıkarılmasında kullanılmaktadır. AR sinyal yolağını baz alan LAR alt tipinin, AR sinyallemesinin mRNA ekspresyonunda zengin olduğunu ve in vitro çalışmalarla AR antagonist Biklitamid'e

duyarlılığının arttığını gösteren çoklu AR hedefleri olduğu belirlenmiştir (Pietri ve ark., 2016). Ayrıca Lehmann ve ark. (2011) TNMK hastalarda AR pozitif tümörlerin aynı zamanda PIK3CA mutasyonlarına da sahip olduğunu ortaya koyduğu çalışma sonucunda, 26 AR pozitif ve 26 AR negatif TNMK klinik vakası üzerinde Sanger dizilimi yapılmış ve klonal PIK3CA mutasyonlarının AR pozitif (%40) tümörlerde, AR negatif tümörlere (%4) oranla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil-7 Androjen reseptörünün (AR) genomik olmayan sinyalleme ve kanonik sinyallesinin entegrasyonu. Düşük androjen düzeyleri varlığında, SR kinazı ve fosfoinozid 3-kinazın p85 α düzenleyici alt birimi ile AR etkileşimleri, hücre proliferasyonunu ve canlılığını, genomik olmayan bir biçimde modifiye etmek için mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) ve Akt yollarını aktive eder. Yüksek androjen düzeyleri varlığında AR, hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için kanonik bir yolda aktive edilir. Genetik olmayan sinyalle MAPK ve Akt'in aktive edilmesi, AR veya transkripsiyonel koaktivatörleri nfosforilasyonu yoluyla genomik AR sinyallerini artırır (Leung ve Sadar, 2017).

2.5.3. NF- κ B Sinyal Yolağı

NF- κ B transkripsiyon faktörleri; embriyogenez, inflamasyon, immünolojik cevaplar, hücre proliferasyonu ve sağkalım süresince farklılaşma da dahil olduğu biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (Pires ve ark., 2016). NF- κ B

doğuştan gelen bağışıklığın bir düzenleyicisidir ve siklooksijenaz 2 (COX2) ve nitrik oksit sentaz (NOS), IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin ve CC motif kemokin ligandı 2 (CCL2) ve CXC motif kemokin ligandı 2 (CXCL8) gibi kemokinlerin ekspresyonunu indüklemekten sorumludur (Colotta ve ark., 2009). NF- κ B ayrıca, B hücre lenfoma 2 (BCL2) ailesi (BCL2, BCL-x1 ve BIRC5) de dahil olmak üzere birçok anti-apoptotik genin ekspresyonunu indükleyerek intirinsik apoptotik yolağın inhibe edilme sürecinde rol oynar. G1/S evresinin anahtar siklini olan siklin D1'in up-regülasyonunun yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve IL6'nın up-regülasyonu yoluyla anjiyogenezin artırılmasıyla proliferasyonu indükler (Gupta ve ark., 2011). Buna ek olarak, NF- κ B hem radyoterapi hem de kemoterapi direncinde önemli bir faktördür (Gupta ve ark., 2011) NF- κ B'nin yapısal aktivasyonu meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde gösterilmiştir (Pires ve ark., 2016). Meme tümörlerinde, NF- κ B'nin yapısal aktivasyonu; hücresel çoğalmaya, anjiyogeneze ve apoptozun önlenmesine katkıda bulunur ve çoğunlukla insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2'de (HER2/neu) ve triple negatif tümörlerde tanımlanır. Liu ve ark. (2010) HER2-pozitif fare meme tümörü büyümesinin başlatılması için NF- κ B'nin gerekli olduğunu göstermişlerdir. Bu transkripsiyon faktörü, HER2 tümörlerinin başlatılmasını yönetir ve bu faktörün inhibisyonu, CD44+ (insan kanser kök hücreler belirteci) hücre popülasyonunu azaltmak için yeterlidir. NF- κ B'nin oluşturulan modellerde tümör kılcal damar yoğunluğunu düşürdüğü tespit edilmiştir (Liu ve ark. 2010).

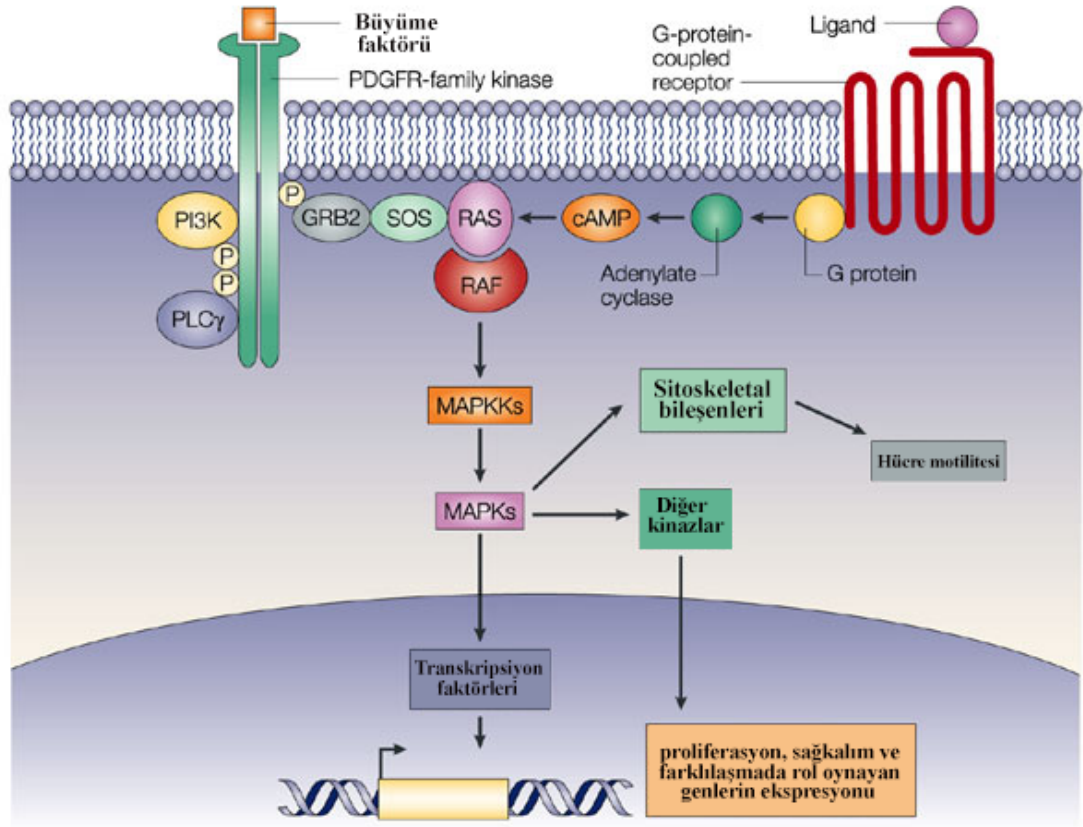
Pratt ve ark. (2009) NF- κ B'nin luminal progenitör hücrelerin farklılaşması sırasında aktiflediğini ve meme kanserinde tümörigenezin erken aşamaları için gerekli olduğunu bildirmiştir. Triple negatif tümörlerde bulunan yüksek NF- κ B seviyesi, bu grubun bir kısmında pozitif olan ve eninde sonunda NF- κ B'yi aktive eden epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nün aşırı ekspresyonundan kaynaklanmaktadır (Pires ve ark., 2016). Yakın tarihli bir çalışmada, Kendellen ve ark. (2014) rejenerasyon ve TNMK hücrelerine yönelik ksenograft tümörleri oluşturmak maksadıyla kanonik ve kanonik olmayan NF- κ B sinyallemesinin gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, NF- κ B sinyalinin, CD44+ fare hücrelerinde ikincil mammosfer oluşturulmasında kanser kök hücresi bağlamında kilit bir role sahip

olduğu ve tedavilere dirençte önemli olduğu bilinmektedir. (Shostak ve ark. 2011). Dolayısıyla, NF-κB yolu kanser tedavisi için umut vadeden bir hedeftir.

2.5.4. MAPK Sinyal Yolağı

MAPK yolağı hücre biyolojisinde en iyi tanımlanmış sinyal iletim yollarından biridir. Bu yolak, hücrenin yüzeyindeki bir reseptörden hücrenin nükleusundaki DNA'ya kadar sinyal gönderen bir protein zincirinden oluşur (Orton ve ark., 2005). MAPK başlangıçta "ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz" (ERK) ve "mikrotübül ilişkili protein kinaz" (MAPK) olarak adlandırılmıştır. ERK tarafından fosforile edildiği bilinen ilk proteinlerden biri, bir mikrotübüle bağlı protein (MAP) idi. Daha sonrasında MAPK tarafından fosforilasyonu gerçekleştiren birçok ilave hedef daha bulundu ve protein "Mitojenle aktive olan protein kinaz" (MAPK) olarak yeniden adlandırıldı. (Orton ve ark., 2005). MAPK yolağı; JNK, SAPK 14-3-3 ve NF-KB19 gibi bir dizi aracı vasıtasıyla hücre sağkalımını ve apoptozu teşvik etmek için büyüme faktörleri ve sitokinler de dahil olmak üzere çoklu sinyallere yanıt olarak aktive olan ve MAP kinazlar olarak bilinen bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir (Kinaz, bir donör molekülünden alıcıya bir fosfat grubunun transferini katalize eden bir enzimdir). Ras/Raf/MAPK yolağında sinyal iletimi, yolağın genel yapısında bulunan EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü), Grb2/Sos kompleksinin katkısıyla GDP'nin GTP'ye dönüştüğü bir sinyal aktivasyon noktası olan GTP bağlı protein RAS ve üç protein kinaz; RAF (MAPKKK), MEK (MAPKK), ERK (MAPK) sinyalleme kaskadı tarafından gerçekleştirilir. MAPK yolağındaki uyarım, sırasıyla RAS, RAF, MAP kinaz/ERK kinaz ve ERK1/2 fosforilasyonuna neden olmakta ve ERK1/2'nin nükleusa translokasyonu ile sonuçlanmaktadır (Orton ve ark., 2005) (Şekil 8). MAPK, transkripsiyon faktörlerinin seviyelerini ve aktivitelerini değiştirerek hücre döngüsü için önemli olan genlerin transkripsiyonunu etkiler. Örneğin, C-MYC, ETS-1, ETS-2, ELK-1, C-Fos ve CREB gibi transkripsiyon faktörlerini düzenler (Stegmaier ve ark., 2004) Bununla birlikte MAPK yolağı; motilite, hücre büyümesi, farklılaşması, proliferasyonunu ve sağkalımla ilgili bir dizi substratı düzenlemekle görevlidir (Pires ve ark., 2016). Ayrıca RAS; hücre döngüsü regülasyonu, yara iyileşmesi, doku onarımı, integrin sinyalleme ve hücre göçünde rol oynamakla birlikte doğrudan yeni kan damarlarının oluşumunda rol oynayan genlerin ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla anjiyogenezi uyarabilir.

Ras/Raf/MAPK aracılığıyla sinyalleme, tümörigenez için önemli olan çeşitli hücrese fonksiyonları düzenleyebilmektedir. Aktif durumda olan MAPK sinyalizasyonu, ERK1/2 ekspresyonu ile karakterizedir (Giltne ve Balko, 2014). RAS/MAPK yolağının, kanserin başlamasında ve ilerleğinde önemli olduğı bilinmektedir. RAS ve RAF'daki onkojenik mutasyonlar; akciğer, kolorektal, pankreas ve melanoma da dahil olmak üzere çeşitli karsinomalarda sık rastlanan durumlardır (Giltne ve Balko, 2014). Ras/MAPK aktivitesi, EGFR ve HER2 gibi reseptör trozin kinazların aşırı ekspresyonun yanısıra, diğere mekanizmalar yoluyla da anormal olarak uyarılabilir. Artmış ERK1/2 aktivitesi primer meme tümörlerinin aksine metastatik bölgelerde gözlemlenir ve TNMK'de daha çok rastlanır (Giltne ve Balko, 2014). Ras/MAPK'nın pozitif regülasyon yoluyla aktivitesini teşvik eden değışikliklerden farklı olarak, TNMK'de önemli olan negatif regülasyonun kaybedilmesi için birçok mekanizma önerilmiştir. Ras/MAPK yolağının, mitojenik sinyalizasyonun şiddetini ve süresini modüle eden negatif geri bildirim mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiğı bilinmektedir (Orton ve ark., 2005; Giltne ve Balko, 2014).



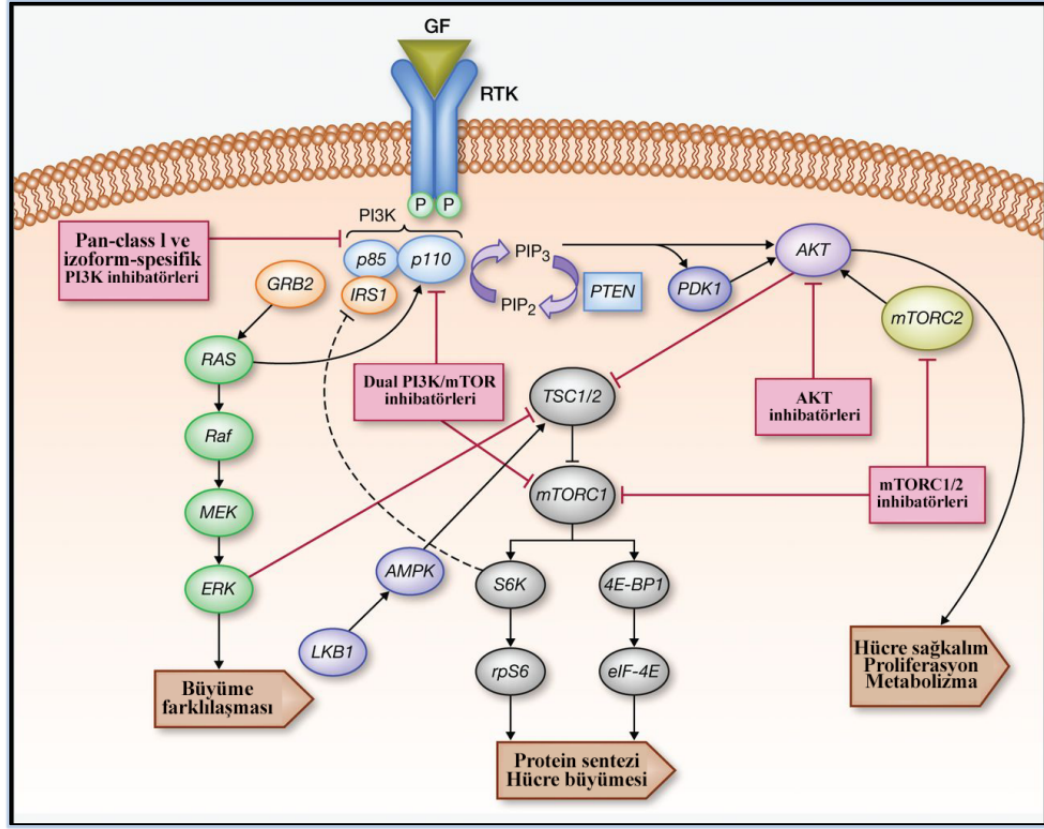
Şekil-8 Ras/MAPK yolağının şematik gösterimi

2.5.5. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K/AKT/mTOR (PAM); hücre proliferasyonu, sağkalım, metabolizma ve motilitenin düzenlenmesinden sorumlu olan ana sinyal yolağını temsil eder ve genellikle meme kanserinde aktiftir (Massihnia ve ark., 2016). Lipid kinazlara ait heterodimerik bir molekül olan fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), bu yolağın ana bileşenidir. Yolak; yapısına, regülasyon mekanizmasına ve lipid substrat spesifitesine dayanarak üç sınıfta kategorize edilebilir olsa da, sınıf I PI3K kanserde daha disregüle durumdadır (Mayer ve Arteaga, 2016). PI3K sinyal yolağı, bir büyüme faktörü veya ligandının HER proteinleri ve IGF-1 reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanmasını takiben başlar (Massihnia ve ark., 2016). Aktive edilmiş formunda PI3K; fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat'ı (PIP2), AKT kinazı için kenetlenme bölgesini temsil eden fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat'a (PIP3) fosforile eder. AKT aktivasyonu, TSC1/2 aracılığıyla mTOR'u aktive ederek protein

sentezinin ve hücre çoğalmasının önünü açar (Zhao ve Vogt, 2008). Dahası; PIP3 seviyelerinin, PIP3'ü PIP2'ye defosforile eden başka bir tümör baskılayıcı olan inositol polyphosphate 4-phosphatase tip II (INPP4B) ile sıkı bir şekilde modüle edildiği düşünülmektedir (Agoulnik ve ark., 2011). Yapılan birçok araştırma, TNMK hastalarında PTEN ve PI3K mutasyon insidansının diğer histolojik alt tiplere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Massihnia ve ark., 2016). PI3K/AKT yolağının downstream bileşeni, mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere işlevsel açıdan farklı iki komplekste bulunan mTOR'dur. mTORC1, mRNA translokasyonunu destekleyerek protein translasyon sürecinin aktivasyonundan sorumludur ve ayrıca metabolizma ve lipid sentezinde rol alır (Dowling ve ark., 2010). mTOR downstream substratı S6K1'dir ve ligandan bağımsız bir mekanizma ile aktivasyonunu belirleyerek östrojen fosforile edebilir (Dowling ve ark., 2010). Öte yandan, mTOR kompleks 2, aktin sitoskeletonunun düzenlenmesinde rol alır ve aynı zamanda AKT fosforilasyonunu düzenler. Birçok ilacın mTORC1'i seçici olarak hedefleyebilmesi nedeniyle, mTOR kompleksleri ve yolları klinik açıdan önem taşımaktadır (Bhola ve ark., 2016). mTOR yolağının aktivasyon sıklığı, TNMK'de diğer alt tiplere kıyasla daha yüksektir ve genellikle kötü prognoz ile korelasyon gösterir (Massihnia ve ark., 2016). Bunun yanında, PI3K sinyallemesinin upregülasyonu; hormon tedavisine ve HER2 hedefli tedavilere (Trastuzumab) karşı direnç oluşturmaktadır (Paplomata E ve O'Regan, 2014).

PI3K-AKT-mTOR yolağı, yeni antikanser tedavileri geliştirmede önemli bir hedefdir (Carey ve ark., 2010). TNMK'de çeşitli yolların işlevi olabileceğini göz önünde bulundurduğumuzda, yeni tedaviler geliştirmede en iyi sonuçların toksisiteyi de önemseyen çeşitli hedefler üzerinde farklı moleküllerin kombinasyonu ile alınabileceği düşünülmektedir. Yakın gelecekte, ilaç direnci mekanizmalarını ve tümör patogenezi ile ilgili yeni kavramları daha iyi anlamak ve farklı alt tipleri olan TNMK hastalarına en uygun tedaviyi sağlamak için yeni spesifik çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Kriegsmann ve ark., 2014).



Şekil-9 PI3K/AKT/mTOR yolağının şematik gösterimi (Dienstmann ve ark., 2014)

2.6. Triple Negatif Meme Kanseri ve Kanser Kök Hücreler

Kanser kök hücreler (KKH) veya kanser kök hücre benzeri hücreler (KKHBH) heterojen tümör kitlesi içinde tümör başlatılmasından sorumlu olduğu düşünülen hücrelerin küçük bir alt kümesidir. Bu hücrelerin aynı zamanda meme kanserinde dirençli hücrelerin oluşumu için de intrinsek mekanizmalara sahip olduğu bilinmektedir. KKH'ler başta TNMK olmak üzere birçok kanser tipinde görülen nüksten sorumludur. Çalışmalar bu hücrelerin metastaza önemli bir katkısının bulunduğunu ve düşük hücre yoğunluğunda bile ksenotransplante sonrası katı tümör oluşumunu başlatabildiğini göstermiştir (Yang ve ark., 2016).

TNMK kök hücreleri, *CD44+* (homing hücre yapışma molekülü), *CD24-* (ısıya dayanıklı antijen) hücreleri olarak tümörlerden izole edilmektedir. KKH'ler metabolik olarak diğer kanser hücrelerinden farklıdır. Yüksek mitokondriyal reaktif oksijen türleri oluşturma, gelişmiş oksijen tüketimi ve daha yüksek mitokondriyal aktivite ile desteklenen ve mitokondriyal solunuma daha fazla bağımlı hücrelerdir. (Kai ve ark., 2015; Pohl ve ark., 2017)

TNMK'nin tedavisi, bu hastalığın altında yatan heterojenitenin yanı sıra öngörücü biyobelirteçlerin ve etkin hedefli terapilerin bulunmaması nedeniyle oldukça zordur. Bu nedenle meme kanseri kök hücre benzeri alt popülasyonlardaki intratümoral heterojenite, özellikle sistemik terapi direnci ve TNMK'nin kötü prognozunun klinik anlamda agresif seyri için öncü bir hipotez olarak ortaya çıkmıştır (Yang ve ark., 2016). Katı meme tümörleri ile yapılan bir çalışmada, *CD44+/CD24-/düşük* hücre popülasyonlarının tümörojenik potansiyelini test etmek amacıyla, hastalardan alınan ve primer kültür ile elde edilen meme kanseri hücreleri, yüzey moleküllerinin ekspresyonlarına dayalı olarak floresan aktive hücre sıralama özelliği olan akış sitometri kullanılarak *CD44+/CD24-/düşük* hücre popülasyonları elde edilmiştir. Bu hücreler obez olmayan diyabetik/ileri derece kombine bağışıklık yetersizliği olan (NOD/SCID) farelerin meme yağ pedlerine enjekte edilerek söz konusu hücrelerin tümör oluşturma yetenekleri incelenmiştir. İlgili deneyde, diferansiyasyon kümesi *CD44*'ü ifade eden kanser hücrelerinin küçük bir popülasyonu tespit edilmiş ve diferansiyasyon kümesi *CD24*'ün (yani *CD44+/CD24-/düşük*) düşük bir ekspresyona sahip olmakla birlikte *CD44-/CD24+* hücrelerinden daha fazla tümörejenik olduğu ortaya konulmuştur (Habib ve O'Shaughnessy, 2016). Bu yüzey belirteçlerinin yanı sıra, aldehit dehidrogenaz 1'in (*ALDH1*) ekspresyonu, meme kanseri kök hücrelerinin bir özelliği olarak gösterilmiştir. Bu hücreler, kapsamlı olarak tümörün başlatılması, progresyonu, metastazı ve radyo/kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmekte ve aynı zamanda kanser nüksü ve terapötik başarısızlıkla da ilişkili olduğu görülmektedir (Atkinson ve ark., 2013; Habib ve O'Shaughnessy, 2016).

2.7. MikroRNA'ların Kanserde Biyogenezi, İşlevi ve Rolü

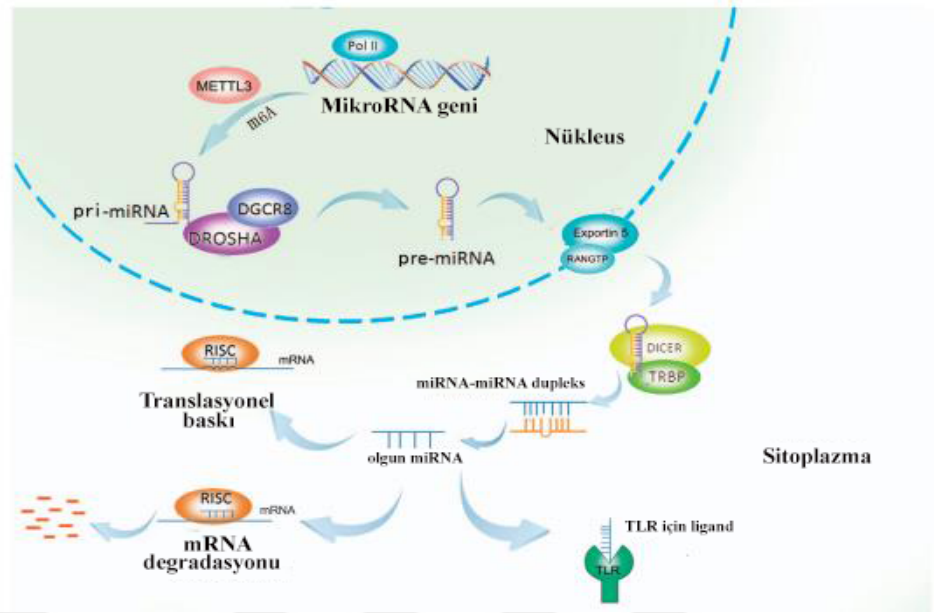
Başlangıçta *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilen mikroRNA (miRNA), insanlar da dahil olmak üzere birçok ökaryotta bulunmaktadır (Mathe ve ark., 2015). Bu miRNA'lar, post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu değiştirebilen küçük (18-21 nükleotidli), kodlama yapamayan RNA'lardır. miRNA'nın insan genomunun %1-5'ini oluşturduğu ve protein kodlayan genlerin en az %30'unu regüle ettiği tahmin edilmektedir (Mathe ve ark., 2015). Bugüne kadar, insan genomu dahilinde ~ 2578 olgun miRNA dizisi halinde işlenen toplam 1872 açıklanmış insan miRNA prekürsör geni bulunmaktadır (Mathe ve ark., 2015). miRNA moleküllerinin spesifik

hedefleri ve biyolojik fonksiyonları hakkında halihazırda çok az şey biliniyor olsa da, miRNA'nın çeşitli hücre ve metabolik yolları kontrol eden gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynadığı açıktır (MacFarlane ve Murphy, 2010). Keşfedildikleri dönemden bu yana, mikroRNA'ların türler arasında oldukça korunmuş olduğu bulunmuş ve gen ifadesinin düzenlenmesinde evrensel bir role sahip oldukları ortaya koyulmuştur. miRNA'ların tümör gelişimi için gerekli olan proliferasyon, hücre ölümü, gelişimi ve genomik stabilitenin de dahil olduğu çoklu biyolojik süreçleri düzenledikleri bilinmektedir (MacFarlane ve Murphy, 2010). Tüm protein kodlayıcı genlerin %60'ından fazlası, kendi 3'UTR bölgelerinde korunmuş miRNA bağlanma bölgelerine sahiptir ve bu da kendilerine ilgili miRNA'lar tarafından kontrol edilme olasılığı sağlamaktadır (Friedman ve ark., 2009). Tanımlanmış miRNA'ların biyolojik işlevi bilinmiyor olsa da, bu moleküllerin ekspresyon profillerinin incelenmesi, regülasyonları ve işlevleri hakkında bilgi vermektedir. Bu gözlemler, miRNA ekspresyon profillerinin spesifik tümörlerde değiştiğini göstermiştir. Bu da, miRNA'nın kanser ve diğer hastalıkların gelişiminde rolü olabileceği yönünde ipuçları vermektedir (Zhu ve ark.,2014). Bu moleküllerin temel ekspresyon profillemesi ile sahip olunan sınırlı bilgilere rağmen, söz konusu moleküllerin klinik açıdan kanser tanısı, progresyonu ve sonuçlarıyla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (MacFarlane ve Murphy, 2010). miRNA'lar tümör gelişimi için gerekli olan proliferasyon, hücre ölümü, gelişme ve genomik stabilite (Beezhold ve ark., 2010) de dahil olmak üzere çoklu biyolojik süreci düzenlemektedir. Bu miRNA'lar fizyolojik koşulları düzenlemekle kalmayarak aynı zamanda malignitede rol oynayan patolojik değişkenleri de benzer şekilde düzenlemektedir (O'Connell ve ark., 2010).

miRNA'lar mRNA'ya kıyasla ekspresyon analizi için birkaç avantaj sunar. Küçük oldukları için daha kararlıdır, dondurulmuş dokudan, formalinde sabitlenmiş parafine gömülmüş dokulardan ve ayrıca az bozulma olan ya da hiç bozulma olmayan kandan da elde edilebilirler. Bu özellikler miRNA'ları TNMK'nin tanı ve tedavisi de dahil olmak üzere klinik amaçlar için ideal hale getirmektedir (Mathe ve ark., 2015).

miRNA biyogenezini özetleyecek olursak; miRNA'lar bir takım adımlar vasıtasıyla endojen olarak oluşturulur, RNA polimeraz II (bazen III) primer transkript olarak nukleusta miRNA'ları transkribe eder. *Drosha* (RNase) ve *DGCR8*,

pri-miRNA'yı ~ 70 nükleotide kısaltır ve prekürsör miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılan bir stem-loop oluşturur. Eksportin 5, pre-miRNA'yı sitoplazmaya aktarır ve burada *Dicer* (RNase) onu 22-nükleotid RNA dupleksine keser. Çoğu durumda, 5' ucunda daha az eşleştirilmiş DNA ipliği, olgun miRNA iken diğer DNA ipliği ise degradedir. Olgun miRNA, RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksini (RISC) ortaya çıkarmak amacıyla Argonaute 2 proteini ve Dicer-2 proteinlerinin heterodimeri ile kompleks oluşturur (MacFarlane ve Murphy, 2010). RISC kompleksi, hedef genin (mRNA) 3'UTR bölgesine bağlanarak bu hedef genin ekspresyonunu susturabilmektedir. Bağlanma; genin translasyonunu engeller ve bu da hedef genin ekspresyonunu azaltır (MacFarlane ve Murphy, 2010). miRNA'ların hedef mRNA'larının translasyonunu olumsuz olarak etkileyebileceği üç olası yol vardır. mRNA ve miRNA arasındaki baz eşleştirmesi tamamlanırsa, muhtemelen bu süreci azalmış sterik engel sebebiyle mRNA'nın degradasyonu takip eder. İkinci olarak, tamamlanmamış bağlanma ile RNA-Polimeraz için başlatma bölgesi bloke edilir ve mRNA transkripsiyonunda azalma sağlanır. Üçüncü seçenek, miRNA-RISC kompleksinin, ribozomal bileşenleri bulunmayan ve bir mRNA deposu olarak işlev gören ve mRNA degradasyonuna aracılık edebilen sözde *processing bodies*'e (P-bodies) translokasyon yapılmasıdır. Buna karşın, bazı miRNA'lar, hedef mRNA'nın translasyonunu aktive edebilirler ancak buna çok sık rastlanmaz. Bu yolla miRNA'lar, hücrel homeostazın kontrolü için önemli olan genleri baskılayabilir (veya bazen aşırı eksprese edebilir) (MacFarlane ve Murphy, 2010; Mathe ve ark., 2015).



Şekil-10 mikroRNA'ların biyogenezini. miRNA genleri, pri-miRNA'lar olarak adlandırılan büyük birincil transkriptleri üretmek üzere genellikle RNA polimeraz II tarafından kopyalanır ve RNA-bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNaz Drosha'dan oluşan bir mikro işlemci kompleksi tarafından ~ 85 nükleotid sap-ilmik şeklinde bölünür. Nukleusdan sitoplazmaya Ran/GTP/Exportin 5 kompleksinin taşınmasının ardından pre-miRNA'lar başka bir RNase III enzim Dicer tarafından ~ 20-22 nükleotid miRNA/miRNA* duplesine işlenir. Dupleks açıldıktan sonra olgun miRNA, RISC olarak adlandırılan bir protein kompleksine dahil edilir. Bir miRNA yüklü RISC, miRNA ve hedeflenen mRNA transkripti arasındaki komplementerliğe bağlı olarak mRNA bölünmesi ve parçalanması veya translasyonel baskılama yoluyla gen susturulmasına aracılık eder. Buna ek olarak, miRNA'lar Toll benzeri reseptör (TLR) ile doğrudan bağlanmaya yönelik ligandlar olarak işlev görebilir ve aşağı sinyalleri tetikler. Metiltransferaz benzeri 3 (METTL3) son dönemde, olgun miRNA üretme maksadıyla DGCR8 tarafından tanınma ve işleme için işaretlenen pri-miRNA'ları metile etmek için keşfedildi (Peng ve Croce, 2016).

2.7.1. Kanserde miRNA'ların Rolü

miRNA'ların kanserde rol aldığı ilk kez 2002 yılında gösterildi. Calin ve ark. (2002) lösemi hastalarında sıklıkla kaybolan bir bölgede miR-15a ve miR-16-1 bulunduğunu ve her iki miRNA'nın da tüm kronik lenfositik lösemi hastalarının neredeyse %70'inde silindiğini veya önemli derecede down-regüle olduğunu keşfetti. İlk keşfinden bu yana kansere bağlı miRNA'lar; onkogenik mikroRNA'lar (oncomiR) veya tümör baskılayıcı mikroRNA'lar olarak sınıflandırıldı. Bu miRNA'lara genellikle kanserle ilişkili gen bölgelerinde rastlanmaktadır. oncomiR'ler kanserde sıklıkla up-regüle edilirken tümör baskılayıcı genleri hedefler ve kanserli hücre gelişimini teşvik ederler. Tümör baskılayıcı mikroRNA'lar ise genellikle kanserde down-regüle edilmelerinin yanı sıra degradasyon için onkogenleri hedef alırlar ve bir anti-tümör fonksiyonuna sahip olurlar (Mathe ve ark., 2015). Bu nedenle, oncomiR'lerin inhibisyonu ve tümör baskılayıcı mikroRNA'ların aşırı ekspresyonu,

miRNA'ların kanserde hedefe yönelik terapilerin önünü açması açısından umut vaat etmektedir. Kanser sürecinin hemen hemen tüm evrelerinde (hücre döngüsü, apoptozis, invazyon, anjiyogenez), normal dokuyla karşılaştırıldığında disregüle edilmiş miRNA ekspresyonu tespit edilmiştir (Izumiya ve ark., 2015). Değiştirilmiş miRNA ekspresyon profillerine kolon kanseri, beyin tümörleri, akciğer kanseri ve meme kanseri de dahil olmak üzere insan kanserinin şimdiye kadar incelenmiş her türünde rastlanmıştır (Baffa ve ark., 2009). Bu bulgular, miRNA'ların erken kanser tespiti için biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır (Heneghan ve ark., 2009; Jeffrey, 2008; Mathe ve ark., 2015).

Son 10 yılda, TNMK ile ilişkili çok sayıda miRNA tanımlayan çalışma yapılmıştır. Çoğu çalışmada, TNMK'yi, bu alt tipi tanımlayabilen miRNA işaretlerini belirlemek amacıyla diğer meme kanseri alt tipleriyle mukayese etmeye yönelik karşılaştırmalar yapılmıştır (Avery-Kiejda ve ark., 2014). TNMK'nin metastaz yapması ihtimalindeki artış sebebiyle miRNA çalışmaları önemli bir inceleme alanını temsil etmektedir. Kritik hücresel işlevlerde rol alan hedef genleri hedefleyen çok sayıda miRNA tanımlanmış ve onaylanmıştır (Avery-Kiejda ve ark., 2009; Mathe ve ark., 2015). Bunlara örnek olarak hücre proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu için önemli olan *ZEB1/ZEB2*, *Suz 12*, *EphA2*, *MSN*, *FNI*, *TrkB*, *XIAP*'ın dahil olduğu miR-200 ailesini verebiliriz (Aydoğdu ve ark., 2012). Birçok çalışma, TNMK gelişiminde ER, PR ve HER2 reseptörlerinin yanı sıra, meme kanseri yatkınlık geni *BRCAl*'i spesifik olarak hedef alan çeşitli miRNA'ların varlığını ortaya çıkarmıştır (Chang ve Sharan, 2012).

TNMK ile ilişkili miRNA'lar arasında yer alan miR-335 ve let-7a, bu meme kanseri alt tipinde down-regüledir (Mathe ve ark., 2015). Let-7 ailesine dahil miRNA'lar yüksek oranda korunmuş iyi düzenlenmiş terminal diferensiyasyonun promotörleridir (Büssing ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar let-7 tarafından kontrol edilen genlerin (örneğin; kanserde rol oynayan RAS gen ailesi) evrimsel süreçte korunduğunu göstermektedir. Let-7 ailesi, hücre rejenerasyonu ve diferansiyonu için belirlenen ilk miRNA'lardır. Let-7 miRNAlar, RAS, HMGA2, c-Myc ve caspase-3 gibi çoklu onkogenleri hedefleyerek bu onkogenlerin regüle edilebilmesini sağlar (Büssing ve ark., 2008). Let-7 ailesinin tümörlerde normal dokuya kıyasla downregüle edildikleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca, let-7'nin ER α 'yı bir

hedef olarak düzenlediği, hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptozisi teşvik ettiği belirlenmiştir. Yapısal olarak aktif Ras mutantları (*H-Ras*, *K-Ras* ve *N-Ras*); pankreas, kolon, tiroid ve akciğer kanserlerinde mevcuttur. Let-7 ailesi, 3'UTR bölgesine bağlanarak *Ras*, *K-Ras* ve *N-Ras* ekspresyonunu regüle eder. Tümör baskılayıcı olarak işlev gören let-7, Ras'ın baskılanmasına ve modüle ettiği hücresel süreçlere aracılık eder (Büssing ve ark., 2008). Let-7, ER α ve ER α downstream genlerindeki korelasyon, ER-pozitif meme kanseri kök hücrelerindeki ER α -mediated hücresel malignansi ilerleyişini inhibe ederek let-7'nin tümör baskılayıcı bir gen gibi davrandığını göstermiştir. Ayrıca meme kanseri kök hücresindeki let-7'nin düşük ifadesinin, östrojene bağlı hücrelerde önemli bir etkiye sahip olan östrogen sinyal yolağını aktive ettiği tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2015). Let-7 ailesinin bir üyesi olan let-7a ile yapılan çalışmalar, let-7a'nın triple negatif meme kanseri ve metastatik melanoma hücre hatlarındaki anahtar anabolik enzimleri down-regüle ettiğini ve hem oksidatif fosforilasyonu hem de glikozu düzenlediğini göstermiştir (Serguenco ve ark., 2015). Ayrıca, let-7a mitokondriyal ROS üretiminin, oksidatif strese duyarlı genlerin upregülasyonuna eşlik ettiği belirlenmiştir. İlgili çalışmada, artan ROS seviyelerini terapötik amaçla kullanmak için let-7a transfeksiyonu, kemoteröpatik ilaç dexorubicin ile kombine edilmiştir. M-acetyl cysteine ile ön tedavi, bu etkiyi tamamen ortadan kaldırmıştır. Böylece let-7a'nın kanser hücrelerinde enerji metabolizmasını düzenlemede önemli bir rolü olduğu ve terapötik potansiyelinin genişlediği gösterilmiştir (Serguenco ve ark., 2015).

Let-7 ailesiyle ilgili başka bir çalışmada ise, bu ailenin Wnt-beta-katenin yolağını çok sık hedeflediği gösterilmiştir. Modifiye edilmiş let-7a antagomirinin, MMTV-Wnt-1 farenin henüz hasar görmemiş (pre-malignant) memeli dokusuna taşınmasıyla Wnt-beta-katenin yolağının kök hücre fenotipini tamamen ortadan kaldırdığı ortaya koyulmuştur (Cai ve ark., 2013). Bir anti-diyabetik ilaç olan Metformin tarafından tedavi edilen meme kanseri epitel hücrelerinin miRNA ekspresyon profilinin incelendiği bir çalışmada Metformin'in, let-7a'nın ifadesini önemli ölçüde upregüle ettiği tespit edilmiştir. Öte yandan, Let-7a'nın aşırı ifadesinin, hem kültüre edilmiş tümör hücrelerini hem de hayvan modellerindeki tümörleri, hücresel translasyonel mekanizmada anahtar rol oynayan genleri hedefleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir (Oliveras-Ferraro ve ark., 2011). Ayrıca,

let-7a inhibisyonunun, NFκB, Lin28, let-7 and IL6'nın dahil olduğu bir epigenetik mekanizmayı aktive ederek, hücrel transformasyonu indüklediği gösterilmiştir (Oliveras-Ferraro ve ark., 2011). Let-7a'nın *PIK3CA1*'in potansiyel hedefi olduğu web bazlı programlar ile gösterilebilmesine rağmen, bu iki genin literatürde etkileşimlerini inceleyen herhangi bir makale bulunmamaktadır (Ertürk ve ark., 2014).

Metastaz, meme kanseri hastalarında birincil ölüm sebeplerindedir ve normal olmayan şekilde eksprese edilen miRNA'lar büyük ölçüde bu süreçle ilişkilendirilmiştir (Gao ve ark., 2014). miR-335, meme kanseri metastazını promote eden en belirgin örneklerden biri olarak belirlenmiştir (Tavazoic ve ark., 2008). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda miR-335'in, meme kanserinde down-regüle olduğu, normalde tümör invazyonu ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca c-Met protein ekspresyonunun, downregüle olan miR-335 ekspresyonuna bağlı olarak upregüle olduğu ve miR-335'in, 3'UTR bölgesini hedefleyerek c-Met protein seviyesini negatif olarak regüle ettiği belirlenmiştir. Böylece miR-335'in hücre migrasyonu ile ilişkili HGF/c-Met yolağını negatif bir şekilde düzenleyerek meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Gao ve ark., 2014).

Meng ve ark. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada; miR-355'in PAX6 genini hedef alarak MCF-7 hücrelerindeki PAX6 ifadesini G1 fazında negatif olarak regüle ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, gerçekleştirilen western blot analizlerinde miR-335'in aşırı ifadesinin, p37 proteinini düzenlediği, fakat MCF-7 hücrelerindeki siklin D1 ifadesini inhibe ettiği ifade edilmiştir. Sonuç olarak, miR-335'in meme kanseri tedavisinde umut vaat eden bir aday olduğu ifade edilmiştir (Meng ve ark., 2015). miR-335'in meme kanseri kök hücrelerindeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, bu miRNA'nın hedef geni *MAP2K1* ile etkileşimi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Ertürk ve ark., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Çalkalayıcı İnkubatör (JSR, Kore)
- FACSAria™ III Cell Sorter (BD, ABD)
- Thermo-Shaker (Biosan, Letonya)
- Orbital Shaker (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- Hassas Terazi (A&D Company, Japonya)
- Hassas Terazi (Radwag, ABD)
- -152°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -80°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -80°C derin dondurucu (Nüve, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Buz Makinası (Scotsman, ABD)
- Buzdolabı (Samsung, Türkiye)
- UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)

- Thermal Cycler (Biorad, Kaliforniya, ABD)
- Profilex PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Yatay Elektroforez (Biorad, Kaliforniya, ABD)
- UV Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Almanya)
- Class II Laminar Flow Steril Kabin (Labogene, Danimarka)
- CO₂ İnkübatör (Panasonic, Japonya)
- Işık Mikroskop (Olympus, Japonya)
- İverted Mikroskop (Euromex, Hollanda)
- ELISA Okuyucu (Berthold, Almanya)
- Thermo Scientific Fluroscan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- GenomeLab TM Gexo Genetic Analysis Sistem (Beckman Coulter, ABD)
- Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre)
- StepOnePlus™ System Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- d6-DMSO (EMD Milipore, Almanya)
- Agaroz (Lonza, İsviçre)
- Ethidium bromid (Amresco, ABD)
- Ethanol (Sigma Aldrich, ABD)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- Tripkan blue (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- QIAamp® RNA mini kit (Qiagen, Almanya)
- DNA Ladder (100bp and 1kb) (New England Biolabs, ABD)

- Ethanol (Sigma Aldrich, ABD)
- İsoopropanol (Sigma Aldrich, ABD)
- LB Broth (Miller) (Sigma Aldrich, ABD)
- Toz agar (Sigma Aldrich, ABD)
- Ampicillin (100 mg/mL) (Sigma Aldrich, ABD)
- High-Fidelity DNA Polymerases & Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- PCR primerleri (IDT, ABD)
- E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek, ABD)
- GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, ABD)
- GenomeLab™ Separation Buffer (Beckman Coulter, ABD)
- Mineral Oil (Beckman Coulter, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- RPMI 1640 medium (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Tripsin/EDTA (%0.25), fenol red (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)
- Penicillin-Streptomycin Solution (Biological Industries, ABD)
- WST-1 kiti (Biovision, ABD)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

- TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- miRCURY LNA™ Universal RT microRNA Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Danimarka)
- miRCURY LNA™ Universal RT PCR primer mix (Exiqon, Danimarka)
- ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, Danimarka)
- Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen, ABD)
- Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, ABD)
- QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen, Almanya)
- QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Almanya)
- QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Almanya)
- Muse Cell Cycle Kit (Millipore, ABD)
- XbaI enzimi (New England Biolabs, ABD)
- PGL3 Vektör (Promega, ABD)
- Rapid DNA Ligation Kit (Roche, İsviçre)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini

İnsan triple negatif meme kanseri hücre hattı (HCC1937) ve insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MDA-MB-231) *American Type Culture Collection* (ATCC, ABD)'den uygun koşullarda temin edilerek -152°C'de saklandı.

3.2.1.2. Hücre Hatları ve Özellikleri

3.2.1.2.1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı

İleri evre meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), patolojik teşhisi adenokarsinom olarak belirtilmiştir. Zayıf derecede farklılaşma özelliği gösteren hücreler 51 yaşında, beyaz ırk (Caucasian) olarak tanımlanan kadın bir hastadan elde edilmiştir. Moleküler sınıflandırmada basal B alt tipi olarak tanımlanmaktadır. *BRAF*, *CDKN2A*, *KRAS*, *NF2*, *TP53*, *PDGFRA* genlerinde mutasyon taşıyan MDA-MB-231, *BRCA1* ve *PIK3CA* yolağı açısından herhangi bir mutasyon taşımamakta olup (Kathryn ve ark., 2010), triple negatif meme kanseri alt tipleri içerisinde mezenşimal kök hücre benzeri alt tipini ifade etmektedir (Lehmann ve ark., 2011).

3.2.1.2.2. HCC1937 Meme Kanseri Hücre Hattı

İleri evre meme kanseri hücre hatlarından bir diğeri HCC1937 (ATCC® CRL-2336™)'dir. Bu hücre hattı orijini primer tümör olan, patolojisi infiltratif duktal karsinoma olarak tanımlanmış ve tümör derecesi 3 olarak belirlenmiştir. 23 yaşında beyaz ırka mensup bir kadına ait kanser hücrelerinden elde edilmiştir. Sınıflandırmada basal A alt tipi özelliği göstermektedir. *BRCA1*, *TP53*, *MAPK13*, *MDC1* mutasyonu taşımakla birlikte *PIK3CA* yolağı açısından incelendiğinde *PTEN* delesyonu taşıdığı belirlenmiştir. Triple negatif meme kanseri alt tipleri arasından bazal benzeri 1 alt tipi özelliği göstermektedir (Kathryn ve ark., 2010; Lehmann ve ark., 2011).

3.2.1.3. Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi

Kök hücre potansiyeli yüksek MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) ve triple negatif meme kanseri hücre hattı HCC1937 (ATCC® CRL-2336™), 25 cm²'lik flasklarda hücre tipine uygun olarak sırasıyla; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle

Medium) ve RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri içerisinde 37 °C'lik, %5 CO² içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı için içeriğinde; 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1 mM sodyum prüvat içeren DMEM besiyerinde %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) ve %1 oranında Penisilin/Streptomisin (10.000U/ml) ve 10mM HEPES bulunmaktadır. HCC1937 hücre hattı için ise; RPMI besiyeri içeriğinde mevcut olan 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM sodyum prüvat, 4500 mg/L glukoz, ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat'a ek olarak %10 FBS, %1 oranında Penisilin/Streptomisin (10.000U/ml) ve 10mM HEPES eklenerek hücreler kültüre edilmiştir. %80-90 üremenin gözlemlendiği flasklardaki hücreler, PBS (Phosphate buffered saline) ile yıkandıktan sonra trypsin-EDTA (%0.025 trypsin/1mM EDTA) solüsyonu ile muamele edilerek 75cm²'lik orta boy flasklara alınmıştır. Orta boy flasklarda yeterli üremesi sağlanan hücreler tekrar pasajlanarak 175cm²'lik flasklara aktarılmıştır.

3.2.1.3.1. Hücrelerin Stoklanması

Trypsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılan hücreler santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek, thoma lamı yardımı ile hücre sayımı yapıldı. Her bir kriyo tüpü (vial) için 900 µL FBS konulup, 30 dk buz üzerinde bekletildi. Sonrasında her bir kriyo tüpe 100 µL DMSO eklenerek kriyo tüpler -20 °C'ye kaldırıldı. 3-4 saat sonra -152 °C'lik derin dondurucuya saklanmak üzere kaldırıldı ve stoklama işlemi tamamlandı.

3.2.1.3.2. Hücre Sayımı

Santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelleti üzerine 1 ml besiyeri konularak hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonu içerisinde 50 µl ependorf tüpe alındı ve üzerine 50 µl tripan mavisi eklendi. Bu karışım pipetaj işlemi ile homojen hale getirildi ve thoma lamı üzerine konularak 16 büyük karenin her birinde olan 25 küçük karenin iç kısımları ve kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıldı. Sayım en az 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sayıların ortalaması alınarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı hesaplandı (Toplam hücre sayısı= 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10.000 x dilüsyon faktörü).

3.2.1.4. Kök Hücrelerin Manyetik Ayrımı

Hücre hatlarından *CD44*⁺/*CD24*⁻ yüzey belirteciye sahip kanser kök hücrelerinin manyetik ayrımının yapılması amacıyla; MidiMACS™ ayırım aparatı ve

LS kolon olarak adlandırılan süperparamanyetik partiküller içeren 2×10^9 hücre kapasiteli kolonlar kullanıldı. Kültüre edilmiş kök hücre potansiyeli yüksek HCC1937 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarından %80-90 doluluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra trypsin-EDTA (%0.025 trypsin/ 1mM EDTA) solüsyonu kullanılarak kaldırıldı. Hücre sayısı 2×10^4 olacak şekilde thoma lamı kullanılarak hesaplandı. Bu hesaplamaadan yola çıkarak gerekli hücre sayısını içeren hücre süspansiyonu işlem için falkona alındı. MidiMACS™ ayırım kolonları ile uyumlu CD24 mikro boncukları içeren ve *CD24+* hücreleri manyetik olarak CD24 Biyotin antikorları ve Anti-Biyotin mikro boncukları ile hücreler etiketlendi. Aynı etiketleme işlemi, CD44 mikro boncukları ile *CD44+* hücrelerin ayırımı için de gerçekleştirildi.

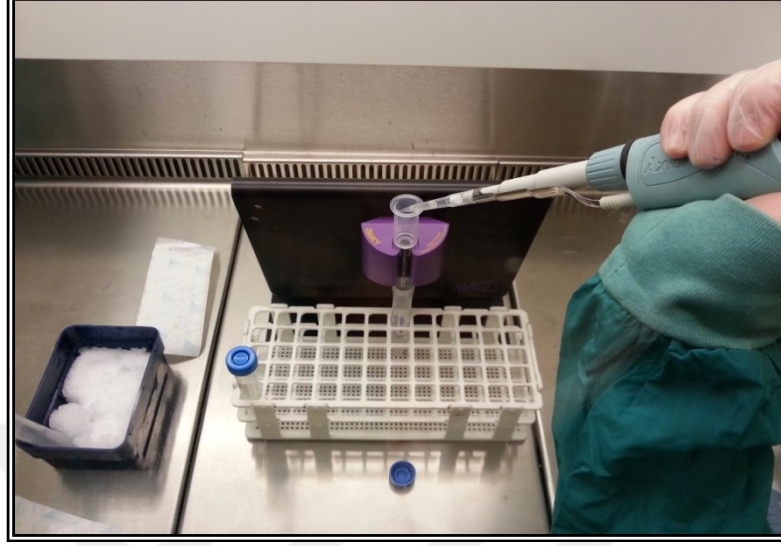
3.2.1.4.1. *CD24-* Hücrelerin Ayırımı

Etiketleme işlemi için her 10^7 hücreye 40µl hücre ayırım solusyonu eklendi. Pipetaj ile homojen hale getirilen hücre süspansiyonu 10µl *CD24* Biyotin ile muamele edilerek +4 °C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1 ml hücre ayırım solusyonu ile yıkanarak 300 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre kümesi üzerine, 80 µL hücre ayırım solüsyonu ve 20 µL anti-biyotin özellikli mikro boncuklar eklenerek +4 °C'de, karanlık ortamda 15 dk daha inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Mikro boncuklar ile muameleden sonra hücreler, 1 ml ayırım solusyonu ile yıkanarak kolonlar için hazır hale getirildi (Şekil 11). LS kolon içerisine aktarılan hücrelerden kolon dışına damlayan *CD24-* özellikteki hücreler toplanarak *CD44+* ayırımı için gerekli hücre sayısına ulaşıncaya dek kültüre edildi.

3.2.1.4.2. *CD44+* Hücrelerin Ayırımı

CD44+ hücrelerin mikro boncuklar ile etikenlenmesi amacıyla her 10^7 hücre için 80 µL hücre ayırım solusyonu eklenerek homojen bir hücre süspansiyonu oluşturuldu. Bu süspansiyon içerisine 20 µL *CD44* mikro boncukları eklenerek 15 dk boyunca +4°C ve karanlık bir ortamda inkübasyon gerçekleştirildi. Hücreler daha sonra 1 mL ayırım solusyonu ile yıkanarak kolonlar için hazır hale getirildi. LS kolondan geçirilen hücrelerden *CD44+* hücreler mikro boncuklar ile işaretli olduğundan kolon içerisinde bulunan manyetik partiküllere tutunarak kolon içerisinde kalmaktadır. Kolon içerisindeki hücreler, hücre ayırım solusyonu ile

yıkayıp kolona uyumlu aparat yardımıyla basınç uygulanarak falkona aktarıldı. Elde edilen hücreler sonraki aşamalar için kültüre edildi.



Şekil-11 Manyetik kolonlar kullanılarak $CD24^-/CD44^+$ hücrelerin ayırım işleminin gerçekleştirilmesi.

3.2.1.4.3. $CD24^-/CD44^+$ Hücrelerin, Floresan Aktive Hücre Sıralama Özelliği Olan Akım Sitometri Cihazı ile Ayrımı

Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. FITC, PE gibi floresan boyalarla işaretleme işlemi gerçekleştirilir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyaller değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Dalva ve Gülbaş, 2008). HCC1937 ve MDA-MB-231 hücre hatları içerisinde $CD24^-/CD44^+$ işaretli hücrelerin sınıflandırılarak akım sitometri cihazı ile ayırımının gerçekleştirilmesi amacıyla Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü'nden hizmet alımı gerçekleştirildi. "BD FACSAria™ III Cell Sorter" cihazına uygun; *FITC Mouse Anti-Human CD44*, *FITC IgG2b Mouse Kontrol*, *PE Mouse Anti-Human CD24* ve *PE mouse IgG2a Kontrol* antikorları kullanıldı. Floresan aktive edilmiş hücre sıralama (FACS), işaretlenmiş ve sınıflandırılmış hücre popülasyonlarını çok yüksek saflıkta (%95-100) elde edebilme özelliğine sahiptir (Basu ve ark., 2010). Bu sayede hücre süspansiyonu içerisinde $CD24^-/CD44^+$ işaretli canlı hücreler "BD FACSAria™ III Cell Sorter" cihazının saflaştırma işleminden geçirilerek diğer popülasyonlardan arındırıldı.

3.2.1.5. Meme Kanseri Kök Hücrelerinde mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Meme kanseri kök hücrelerine özgü genler olarak *CD44*, *CD24* ve *ALDH1A1*, Kontrol Actin β genlerinin RT-qPCR yöntemi ile gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Bu değerlendirme için hücreden total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR cihazında değerlendirme aşamaları gerçekleştirildi.

3.2.1.5.1. Hücreden Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden, total RNA izolasyonu eldesi için RNA izolasyon kit (miRCURY™ RNA Isolation Kit-Cell and Plant, Exiqon) protokolü takip edildi. Kit içeriğinde öngörülen hücre sayısı olan 3×10^5 hücre sayılarak PBS ile yıkama ve santrifüj işlemlerinden geçirildi. Örnekler ependorflara aktarılarak lizis solüsyonu ile muamele edildi. Sonraki aşamada %96'lık ethanol eklenerek elde edilen karışım kolona aktarıldı. RNA'yı kolona bağlama işleminin ardından filtre, yıkama solüsyonu ile yıkandı. İşlem sonunda RNA'lar 50 μ l nükleazsız deiyonize su ile dilüe edildi. RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonları UV-VİS Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında A_{260}/A_{280} optik dansite oranı kullanılarak belirlendi. 260nm RNA'nın, 280nm proteinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın kaliteli eldesini göstermektedir.

3.2.1.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ABD) protokolü takip edilerek hedef genlere özgü cDNA'lar elde edildi. Kit prosedüründe belirtildiği şekilde her bir RNA örneği için 20 μ l reaksiyon hacmi içerisine, 2X reverse transkriptaz master mix miktarı 10 μ l olacak şekilde hazırlandı (Tablo 2). Oluşan karışıma her biri 1 μ g/ μ l içeren örneklerden 10 μ l eklendi. Örnekler cDNA sentezi için Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazına yerleştirildi ve kitte belirtilen reaksiyon koşulları uygulanarak cDNA'lar elde edildi (Tablo 3).

Reaksiyonun prensibi şu şekilde ilerlemektedir; sırasıyla belli bir ısıda ikincil yapıdaki RNA'nın açılması, mRNA'nın gelişigüzel bir bölgesine primerin bağlanması, uygun sıcaklık, iyon yükü, pH ve sentez için gerekli nükleotidlerin varlığında primerlerin üzerinden mRNA'nın dizilimine uygun komplementer

DNA'nın sentezlenmesi (cDNA), yüksek ısıda enzimin inaktive edilerek reaksiyonun durdurulması şeklindedir.

Tablo-2 cDNA sentezi için oluşturulan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	
10X RT Buffer	2,0 µl
25X dNTP Mix (100 nM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNAase-free H ₂ O	4,2 µl
0.75 µg RNA örneği	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo-3 cDNA sentezi için kullanılan thermal cycler programı

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10dk	120dk	5dk	∞

3.2.1.5.3. Real Time PCR Aşaması

Kontrol *ACTB*, *CD44*, *CD24*, *ESA* ve *ALDH1A1* genlerinin mRNA ifade düzeyleri spesifik olarak dizayn edilen “TaqMan” problemler ile hassas çalışmaya imkan veren “StepOnePlus Real-Time PCR” cihazında kantitatif olarak 3 tekrarlı gerçekleştirildi (Tablo 4). Uygun reaksiyon koşulları altında amplifikasyon sağlandı (Tablo 5). Real Time kantitatif PCR yöntemi nükleik asit miktarlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu sisteminin floresan okuma sistemi ile sentezinden oluşmaktadır. mRNA düzeylerini sayısal olarak belirlemek amacıyla gen ekspresyonu çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında floresan işaretli tek zincirli ve kısa oligonükleotidler

(Taqman proplar) kullanılmıştır. Taqman prop yöntemi, istenen DNA bölgesine tamamlayıcı özellikte 5' uçta FAM (Florofor) ve 3' uçta TAMRA (Quencer) ile işaretlenmiş proplar ile çalışmaktadır ve TAMRA boyası 5'uçtaki FAM'ın amplifikasyon başlamadan önce sinyal vermesini engellemektedir. Bu durum yanlış pozitif bağlanmaların önüne geçerek yüksek özgünlük sağlamaktadır. Amplifikasyon sırasında gene özgü primerler probun bağlandığı bölgeye geldiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5' → 3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı proptan ayırarak floresan sinyal oluşturur. Her bir döngüde oluşan floresan sinyal mRNA oranı ile doğru orantılıdır (Gut ve ark., 1999). Bu yöntemde amplifikasyonun ilk anlamlı arttığı nokta eşik değerini vermektedir. Ayrıca, floresan sinyalin eşik değeri geçtiği döngü sayısı C_T değerini (eşik döngü) vermektedir. Kontrol grubu ve deney grubunun eşik döngüleri arasındaki fark ise ΔC_T değerini oluşturmaktadır. Bu değer kontrol gene göre normalizasyonunun yapılmasıyla elde edilen gen ekspresyonu kat değişimine $2^{\Delta\Delta C_T}$ değeri denmektedir.

Tablo-4 RT-qPCR için oluşturulan reaksiyon bileşeni

Taqman Expression Master Mix Reaksiyon Bileşeni	
Gene Expression Master Mix	15 μ l
dH ₂ O	7,5 μ l
Prop-primer	1,5 μ l
cDNA	6,0 μ l
Toplam	30 μl
Kuyu Başına Reaksiyon Hacmi (3 Tekrar)	10 μl

Tablo-5 mRNA ekspresyon analizi için kullanılan RT-qPCR programı

	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Basamağı	50	2 dk
	95	10 dk
Amplifikasyon Basamağı (40 Döngü)	95	15 sn
	60	1 dk

3.2.1.5.4. Gen ve miRNA Primerlerinin Dizaynı

Klonlamada kullanılacak *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR gen bölgeleri ile let-7a ve miR-335'e ait dizilerin PCR reaksiyonunda çoğaltılması amacıyla spesifik primerler dizayn edildi. *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR bölgelerine spesifik primer dizaynı için *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sitesinin sunduğu Primer-BLAST aracı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanıldı (Tablo 6). Program, gen bölgelerine spesifik primer dizilerinin özgünlüğünü kontrol eden blast programını da kapsamaktadır.

Let-7a ve miR-335'in, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR bölgelerinde bulunan bağlanma noktaları TargetScanHuman programı (<http://www.targetscan.org/>) kullanılarak tespit edildi (Tablo 7). *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'ye ait primer dizileri dizayn edilirken kullanılacak PGL3 kontrol vektörü (Promega, ABD) ve ilgili genlerin 3'UTR bölgelerini kesen, ortak enzim kesim bölgeleri değerlendirildi. Hem 3'UTR'yi, miRNA bağlanma bölgesini içine alacak şekilde iki noktadan kesen hem de PGL3 kontrol vektörü kesebilen ortak bir enzim bulunmaması sebebiyle dizayn edilen primerlere, vektör üzerinde mevcut XbaI (TCTAGA) enzim dizisi eklendi. Oligonükleotidler *Integrated DNA Technologies* (IDT, ABD) ve Invitrogen firmalarından HPLC pürfiye edilmiş şekilde temin edilmiştir.

Tablo-6 3'UTR gen bölgeleri ve miRNA'lara ait primer dizileri

Gen		Primer Dizisi (5'→3')
<i>MAP2K1</i> 3'UTR	Forward primer	TATGTCTAGAGGATTGGCTTTGTGCTTGGG
<i>MAP2K1</i> 3'UTR	Reverse primer	ATAGTCTAGACAGGTCACCAAGGAAGGTG
<i>PIK3CA</i> 3'UTR	Forward primer	TATGTCTAGAGGATGGGATTGTGAAGGCTGA
<i>PIK3CA</i> 3'UTR	Reverse primer	AGAGTCTAGATGACTAGGGCTAAGCAAGCAG
Let-7a	Forward primer	TCAACGTAAGTGAATGAAAATGGTCTA
Let-7a	Reverse primer	AGCAATGTTTTCTTCTGGAATGGAA
miR-335	Forward primer	TCTCCTTACCATCCCTGATTCAT
miR-335	Reverse primer	GTTTTGTTCTTGAGAATCTGTGCAA

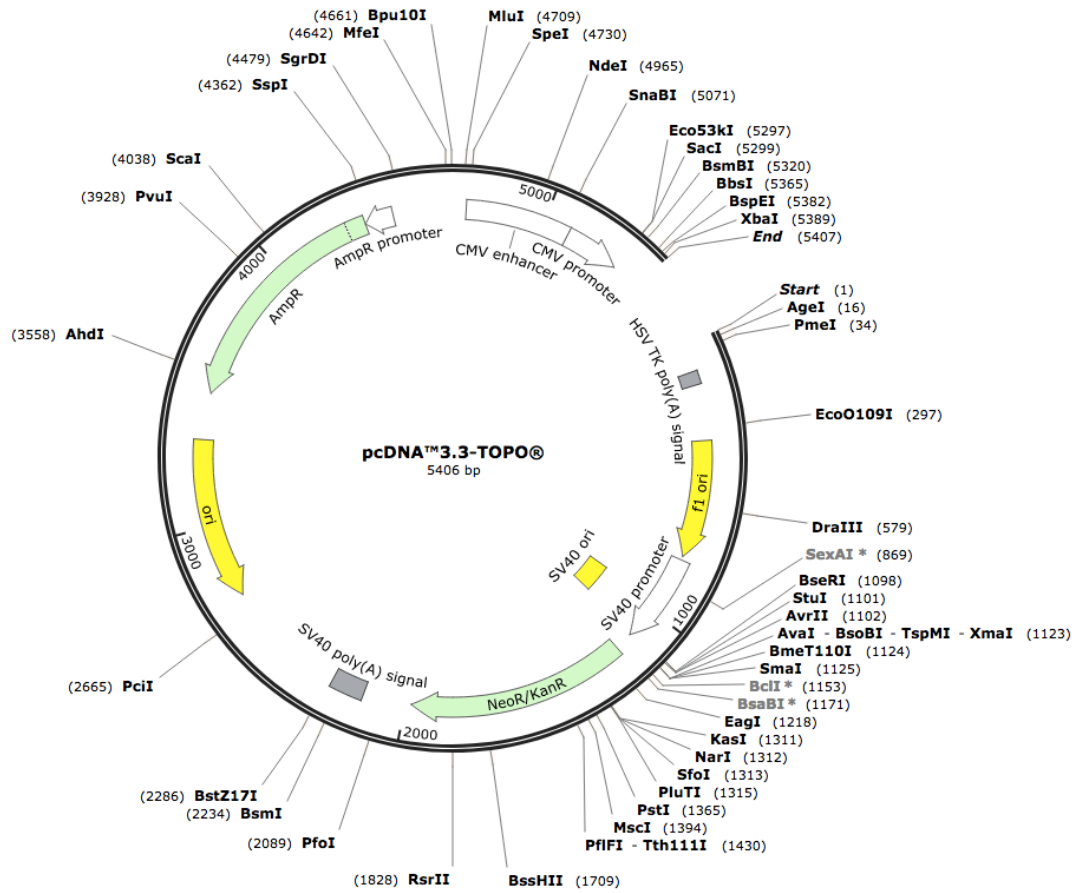
Tablo-7 miRNA'ların 3'UTR gen bölgelerine bağlanma özelliklerinin belirlenmesi

Pozisyon 4112-4119 PIK3CA 3' UTR hsa-let-7a-5p	5' . . . AUUGGAUUGGUAACUCUACCUCA . . . 3' UUGAUAUGUUGGAUGAUGGAGU
Pozisyon 831-837 MAP2K1 3' UTR hsa-miR-335-3p	5' . . . AGUGCCUAAAAUUGUAUGAAAAU . . . 3' CCAGUCCUCGUUAUUACUUUUU

3.2.1.6. Vektör Seçimi

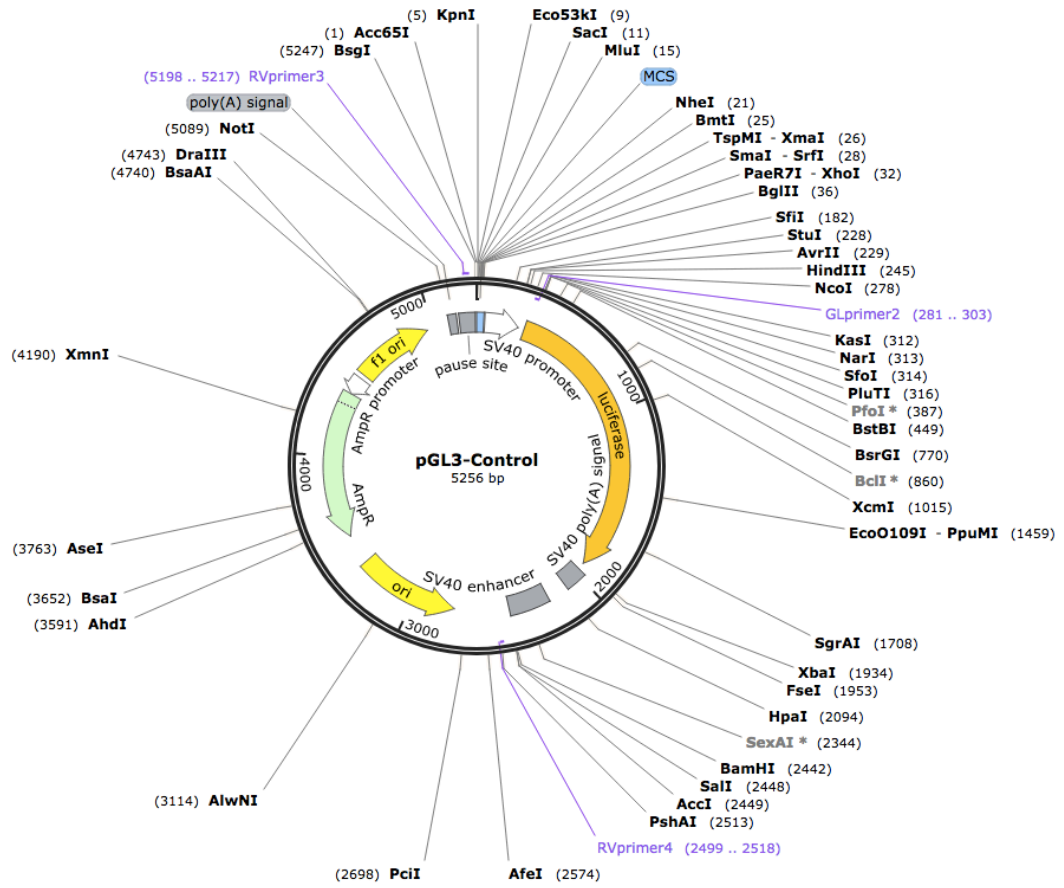
Gen klonlamada kullanılan aracı moleküllere vektör denilmektedir. Vektörler konakçı organizmada, konakçı organizmadan bağımsız olarak replikasyon (çoğalma) gösterir. Plazmid vektörler, bakteri içinde ekstrakromozomal olarak bulunan, çift zincirli, çok kısa sürede ve otonom olarak replike olabilen yapılardır. Bir bakteriden diğerine aktarılabilirler. Plazmid vektörler ~10 kb'a kadar yabancı DNA dizisini kendi dizileri içine alabilirler. Bütün bu özelliklerinden dolayı vektör olarak kullanılmaktadırlar. Genetik mühendisliğinde kullanılacak plazmidler belli sayıda kesim bölgesi ve antibiyotiğe direnç genlerini içermesi için modifiye edilirler. Bakterilerde doğal olarak bulunan plasmidlerden ziyade, in vitro koşullarda ve amaca uygun olarak modifiye edilen suni plasmidler rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaktadır. Doğal plasmidlerin stabilitesine tam güvenilemediği gibi özel belirteçler yönünden de yetersiz oldukları için klonlamada tercih edilmemektedirler. Deney sürecinde E. Coli konak organizmasıyla birlikte kullanılabilen PGL3 lusiferaz haberci kontrol vektör (Promega, ABD) ve pcDNATM3,3-TOPO® TA Cloning® vektörleri (Invitrogen, ABD) tercih edilmiştir. pcDNATM3,3-TOPO® TA Cloning® vektör'ün kullanıldığı TA klonlaması, enzimlerin kullanılmadığı, geleneksel alt klonlama yöntemine göre daha kolay ve hızlı bir alt klonlama tekniğidir. miRNA dizileri lineer olarak verilen pcDNATM 3,3-TOPO® vektöre aktarılmıştır. TA klonlama tekniği için önem arz eden Topoizomeraz I, vektörle kovalent olarak bağlanır (buna "aktive edilmiş" vektör denir). Topoizomerazlar pozitif veya negatif süpersarmal yapıları bozabileceği gibi DNA molekülünü pozitif süper sarmal haline getirebilme özelliğine sahiptir. Topoizomerazların bu özellikleri PCR ürününü ilgili vektöre yerleştirmeyi mümkün kılmaktadır. (C/T)CCTT dizisini tanıyan TOPO klonlama vektöründe, Vaccinia

virüsün topoizomeraz I enzimi kullanılmaktadır. Bu enzimle muamele edilen DNA kesilmekte ve 3' fosfotirozin bağ ile başka bir DNA molekülünün serbest 3' ucu birleştirilmektedir. Ayrıca Taq polimeraz, PCR ürünlerinin 3' uçlarına tek bir deoksiadenozin (A) ekleyen bir terminal transferaz aktivesine sahiptir. Lineer yapıda bulunan klonlama vektöründeki 3' ucuna asılı Timidin (T), 3' uçlarına Adenozin (A) eklenmiş PCR ürünleri ile birleşir (Azkur ve Bolat, 2003). Kesilmiş DNA'dan gelen enerji, bölünmüş ipliğin 3' ucundaki fosfatı ve Topoizomeraz I'in bir tiroz kalıntısı (Tyr-274) arasında bir kovalent bağ oluşturulması suretiyle korunur.



Şekil-12 pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® vektör'e ait özelliklerin gösterildiği harita (snapgene, 2017)

PGL3 lusiferaz haberci kontrol vektör, potansiyel olarak memelilerde gen ekspresyonunu düzenleyen faktörlerin niceliksel analizi için bir temel sağlar. Bu test, artan gen ifadesi ve transfekte ökaryotik hücrelerdeki transkripsiyonel aktiviteyi izlemek için optimize edilmiştir. Vektöre, bu işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için ateşböceği (*Photinus pyralis*) lusiferazı içeren bir kodlama bölgesi eklenmiştir.



Şekil-13 pGL3 lusiferaz haberci kontrol vektör'e ait enzim kesim noktalarının ve vektör özelliklerin gösterildiği harita (Snapgene, 2017)

3.2.1.7. Klonlama

3.2.1.7.1. Kandan DNA İzolasyonu

Transformasyon deneylerinde kullanılacak DNA materyali, sağlıklı bir kadın bireye ait kontrol kanından elde edilmiştir. Kandan DNA izolasyonu için E.Z.N.A. SQ Blood DNA Kit (Omega) protokolü takip edildi. EDTA'lı kan toplama tüpünde saklanan kan örneğinden 400 µl kullanıldı. Elde edilen DNA 100 µl dH₂O ile sulandırıldı.

3.2.1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile hedef gen bölgeleri ve miRNA bölgeleri amplifiye edildi. Temel olarak bu tez çalışması için AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High-Fidelity (Invitrogen, ABD) kiti kullanıldı. Gerçekleştirilen PCR işleminin bileşenleri Tablo 8'de sunulan çizelgede özetlendi.

Tablo-8 Let-7a, miR-335, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR amplifikasyonu için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri

PCR Bileşeni	
10X Buffer	5 µl
dH ₂ O	39 µl
Forward Primer	1,5 µl
Reverse Primer	1,5 µl
MgSO ₄ (50 mM)	2,0 µl
DNA	1,0 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0,5 µl
Toplam	50 µl

Tablo-9 Let-7a, miR-335, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR amplifikasyonu için thermal cycler programı

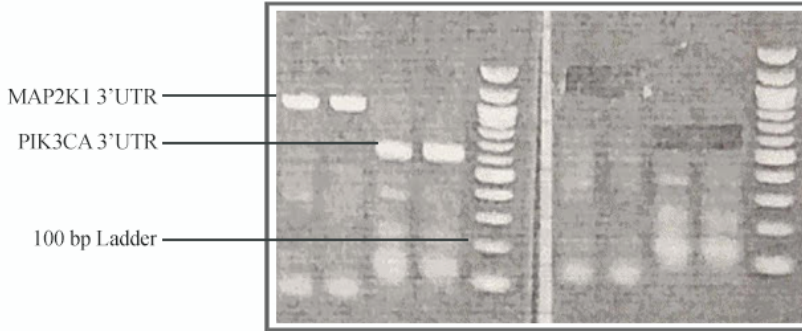
	Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon aşaması	94	5 dk
Amplifikasyon aşaması (40 Döngü)	94	0: 30 sn
	62	0: 30 sn
	72	0: 45 sn
Ekstansiyon aşaması	72	5 dk
	+4	∞

3.2.1.7.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Elde edilen PCR ürünlerinin tamamı ligasyon işleminin hassasiyeti nedeniyle yoğunluğu %1,5 olacak şekilde hazırlanan agaroz jele yüklendi. %1,5'luk jel için; 1,5 gram toz agaroz, 100 ml dH₂O ve %1'lik etidyum bromürden 5 µl eklendi. Örnekler, 6X Loading dye (NEB, ABD) ile birlikte agaroz jele yüklendi. Jel, 1X TBE solusyonu içerisinde yatay jel elektrofrezisi kullanılarak 100V'da 1 saat yürütüldü. İşlem sırasında 100bp'lik ve 1kb'lik DNA ladder (NEB, ABD) molekül ağırlık belirteçleri kullanıldı.

3.2.1.7.4. Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması

Jelden kazanım işlemi için QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilerek DNA örnekleri pürfiye edildi. Bu aşamada UV ışığı altında DNA'nın zarar görmemesi için işlem hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Kesilen örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılarak ağırlıkları ölçüldü. Jelin ağırlığına bağlı olarak örneğe, kit içeriğinde mevcut olan DNA bağlama solüsyonu eklenerek 50°C'de 10 dk inkübe edildi. Sonrasında jel miktarı kadar isopropanol eklenerek pipetaj yapıldı. Elde edilen karışım filtreli tüplere aktarılarak 1 dk 14,000 g'de santrifüj edildi. Alt kısım atılarak 750 µl yıkama solüsyonu eklendi. Bu aşamada sonraki hassas reaksiyonların verimi için yıkama solüsyonu eklendikten sonra 5dk inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda 14,000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre temiz ependorf içerisine alındı ve filtreye 30 µl dH₂O eklendi. 14,000 g'de 2 dk santrifüj edilen örnekler pürfiye edildi.



Şekil-14 *PIK3CA* 3'UTR ve *MAP2K1* 3'UTR'nin PCR görüntüsü ve jelden kazanım işlemi

3.2.1.7.5. Enzimle Kesim İşlemi

MAP2K1 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'nin PCR ürünlerinden elde edilen pürfiye DNA'lar (250 ng - 1 µg aralığında) ve PGL3 lusiferaz haberci kontrol vektör (1 µg), enzim kesim bölgelerinden XbaI enzimi (NEB, ABD) kullanılarak kesildi. Kesim aşaması sırasında PGL3 kontrol vektör tek enzim kesim noktasından kesildiği için Alkaline Phosphatase-Calf Intestinal (NEB, ABD) kullanılarak kesilen uçların

defosforilasyonu gerçekleştirildi. Kesim sonrası ürünler dH₂O ile 100 µl'e tamamlanarak dilüe edildi. Enzim kesimi için kullanılan bileşenler ve inkübasyon süreleri tablo 10'da verilmiştir.

Tablo-10 *MAP2K1* 3'UTR, *PIK3CA* 3'UTR ve PGL3 kontrol vektörün enzim kesimi için gerekli bileşenleri ve inkübasyon süresi

Reaksiyon Bileşeni	PGL3 Vektör	PIK3CA 3'UTR	MAP2K1 3'UTR
10X CutSmart Buffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dH ₂ O	19,5 µl	-	-
XbaI Enzimi (20 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Pürfiye PCR ürünü	22 µl (420 ng/µl)	22 µl (13,5 ng/µl)	22 µl (9,5 ng/µl)
rSAP (1U/ 1 pmol)	0,5 µl	-	-

Reaksiyon Programı	Sıcaklık (°C)	Süre
	37	30 dk
	65	5 dk

3.2.1.7.6. Ligasyon İşlemi

3.2.1.7.7. PGL3 Kontrol Vektörü ile *MAP2K1* 3'UTR / *PIK3CA* 3'UTR'nin Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu Rapid DNA Ligation Kit (Roche, İsviçre) T4 DNA ligaz ile gerçekleştirilmiştir. Bu enzim DNA molekülünün 3' hidroksil ucu ile bir diğeri'nin 5' fosfat ucu arasında bir fosfodiester bağ oluşturmaktadır. Katalizledikleri reaksiyon için yüksek enerjili bir kofaktör olarak ATP kullanılmaktadır. Bu kofaktörler fosfat bağının kesilmesi ile reaksiyon için gerekli enerjiyi elde eder. Artakalan AMP molekülü, enzimde bulunan bir lizin uzantısı tarafından bağlanır. Birleştirilecek DNA molekülünün 5' ucundaki fosfat, lizine bağlı AMP'deki 5' fosfata saldırarak AMP'yi DNA'ya bağlayan bir pirofosfat bağı oluşturur. Kopuk DNA zincirinin 3'-OH grubu, 5' uçtaki pirofosfat grubuna saldırarak AMP'nin serbest bırakılmasına ve DNA zincir uçlarının birleşmesine neden olur (Aehle, 2007). Ligasyon işlemi için kullanılan yapışkan uçlara sahip 3'UTR bölgeleri ve PGL3 kontrol vektörün ligasyonu için kullanılan bileşenler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo-11 *MAP2K1* 3'UTR, *PIK3CA* 3'UTR ve PGL3 kontrol vektörün ligasyonu için gerekli bileşenler ve inkübasyon süresi

Ligasyon Bileşeni	PGL3 Vektör	PIK3CA 3'UTR	MAP2K1 3'UTR
10X T4 Ligasyon Buffer	2 µl	2 µl	2 µl
dH ₂ O	16,8 µl	15,3 µl	13,2 µl
T4 DNA Ligaz	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Pürfiye DNA ürünü	1 µl (44,6 ng/µl)	1 µl (44,6 ng/µl)	1 µl (44,6 ng/µl)
Pürfiye PGL3 Vektör	-	1,54 µl (10,2 ng/µl)	3,6 µl (7,0 ng/µl)

Reaksiyon Programı	Sıcaklık (°C)	Süre
	Oda Sıcaklığı	10 dk

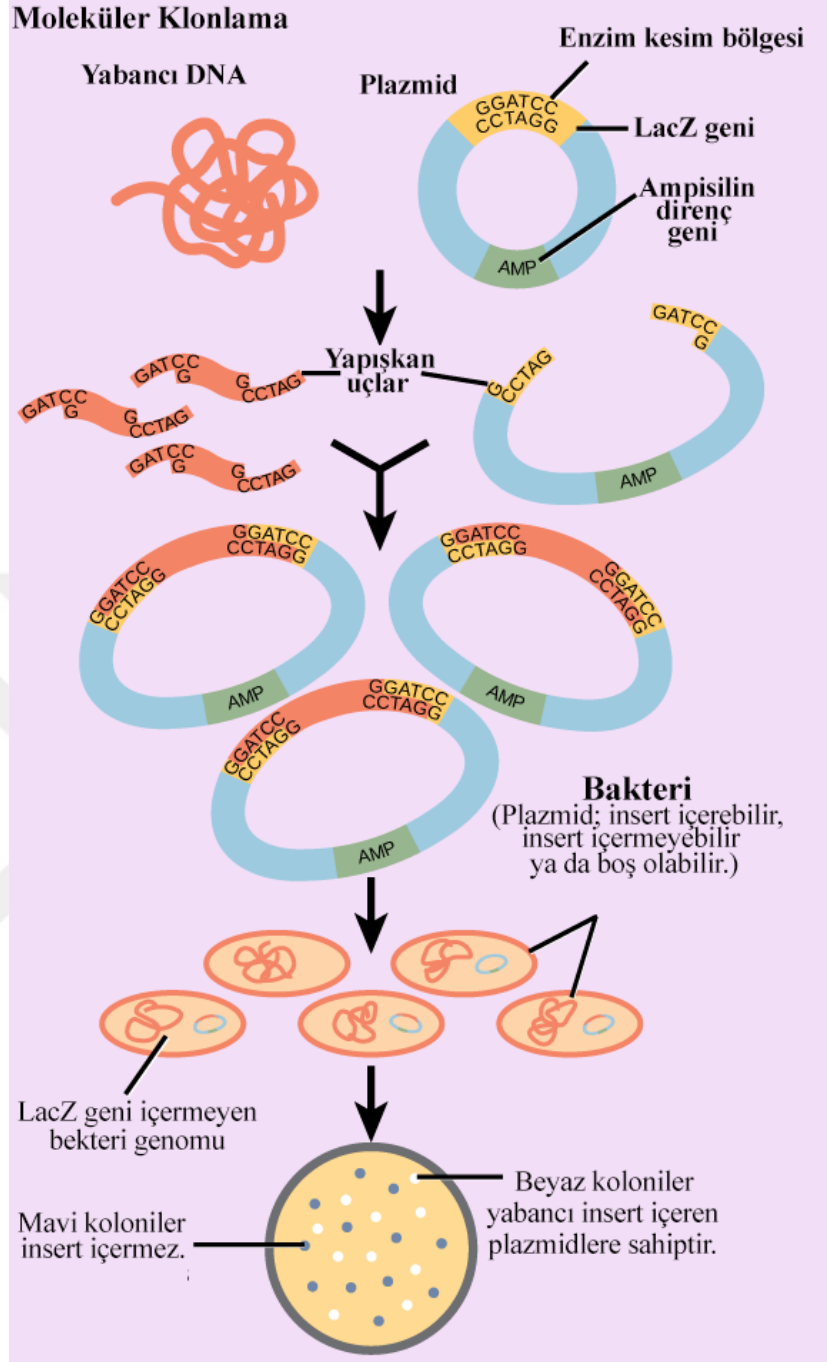
3.2.1.7.8. Let-7a ve miR-335'in pcDNATM3.3-TOPO Vektör İçerisine Yerleştirilmesi

Bu aşamada, PCR ürününün TOPO TA vektör içerisine yerleştirilmesi amacıyla pcDNATM3.3-TOPO TA cloning vektör (Invitrogen, ABD) kit protokolü takip edilmiştir. Reaksiyon için Let-7a ve miR-335'in pürfiye DNA'larından 100'er ng kullanılmıştır. Her bir örnek için 3 µl (100 ng) DNA, 1 µl kit içeriğinde bulunan tuz solüsyonu, 1 µl dH₂O ve 1 µl TOPO vektör olacak şekilde toplam 6 µl'lik reaksiyon oluşturulmuştur. Bu reaksiyon karışımı 24 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.

3.2.1.8. Transformasyon

Mevcut tez çalışmasında konak organizma olarak *Escherichia coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent E. Coli, Invitrogen, ABD) bakterisi kullanılmıştır. miRNA'lara ait TA klonlama ürünleri ve ligasyon sonrası elde edilen *PIK3CA* 3'UTR ve *MAP2K1* 3'UTR ürünleri E. Coli hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon, bir hücrenin içine yabancı bir genin girmesi ve bu DNA'nın genomunun bir parçası haline gelmesi ile DNA'daki genlerin ifade olması sonucu, o hücrenin değişime uğrama işlemidir. Transformasyon deneylerinde kullanılan plazmid vektörlerde genellikle bir antibiyotik direnç geni bulunmaktadır. Bu nedenle plazmid vektörü taşımayan bakteriler seçici besiyerinde üreyemezler.

Transformasyon aşamasında gen aktarımı, ısı şoku (heat shock) olarak bilinen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak -80 °C’de saklanan E. Coli hücreleri buz dolu bir kaba alınarak yavaşça çözünmesi beklendi. Sonrasında ligasyon ve TA klonlama ürünleri; *MAP2K1* 3’UTR, *PIK3CA* 3’UTR, *Let-7a* ve miR-335’in her biri E. Coli içeren tüplere 2 µl olacak şekilde dağıtıldı. Buz içerisinde 30 dk inkübasyondan sonra dört tüp de 42 °C’deki su banyosunda 40 sn bekletildi. Bu aşamadan sonra örnekler hızla buza alınarak 5 dk inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin üzerine 200 µl, kit içeriğinde bulunan ve SOC medium olarak adlandırılan besiyerinden ilave edildi. Örnekler 37 °C’de 99 rpm’de 2 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Sonrasında 3000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Dipte kalan 20-30 µl hücre, daha önceden 200 mL Luria-Bertani (LB) Broth (Sigma, ABD) içerisine 3 gr toz agar (Sigma, ABD) ve 20 µl (100 µg/mL) ampisilin (Sigma, ABD) eklenerek hazırlanan ve petrilere dökülen katı besiyerleri üzerine mikro boncuklar yardımıyla yayılarak ekildi. Plate’ler 37 °C’lik çalkalamalı etüvde (Ecocell, İsviçre) bir gece inkübe edildi. Gerçekleştirilen klonlama basamakları ve transformasyonun genel hatları Şekil 15’te özetlenmiştir.



Şekil- 15 Moleküler klonlama işleminin temel basamakları (Cnx, 2016)

3.2.1.8.1 Pozitif Klonların Seçimi

Elde edilen kolonilerin aktarılan vektörü içerip içermediğini belirlemek amacıyla plate yüzeyinde mevcut üreme sağlamış kolonilerden birkaç adet seçilerek her bir koloni için bir falkon olacak şekilde ampisilin (100 µg/mL) ve 2 mL LB Broth sıvı besiyeri içeren falkonlara aktarıldı. 37 °C’de 99 rpm’de 6 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kolonilerden plazmid izolasyonu için QIAprep Spin Miniprep Kit

(Qiagen) protokolü izlendi. DNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında A_{260}/A_{280} optik dansite oranı kullanılarak belirlendi. İzole edilen DNA örnekleri sekans işlemine alındı.

3.2.1.8.2. Klonların Sekanslanması

Mini-prep sonrasında elde edilen halkasal Plazmid DNA örnekleri, aktarılan dizinin ilgili vektör bölgesi içerisindeki durumun ve pozisyonunun belirlenmesi amacıyla sekanslandı. Bu aşamada halkasal DNA'nın lineer olarak sekanslanabilmesi için öncelikle 95 °C'de 10 dk inkübe edildi. Sekans işlemi için gerekli bileşenler tablo 12'de verilmiştir. Gen bölgelerinin analizi için XbaI enzim kesim bölgesine yakın EBV_R primer kullanılırken, miRNA bölgelerinin analizi için CMV_F primer kullanıldı. Sekans programından sonra örneklere etanol presipitasyonu yapıldı. Bu işlem için 0 °C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüj cihazı (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. Tüm işlemler buz blok üzerinde gerçekleştirildi. Örneklerin herbirinin üzerine 2 µl Na asetat, 2 µl Na EDTA ve 1 µl glikojen eklendi. Daha sonra %96 ve %70'lik alkol serilerinden ve santrifüj işlemlerinden geçirilen örnekler, son aşamada alkolden uzaklaştırılarak 37 °C etüvde 3 saat kurumaya bırakıldı. Elde edilen DNA pelletleri 40 µl SLS içerisinde çözülerek GenomeLab™ GeXP Genetik Analiz Sistemi'ne (Beckman Coulter, ABD) yüklendi.

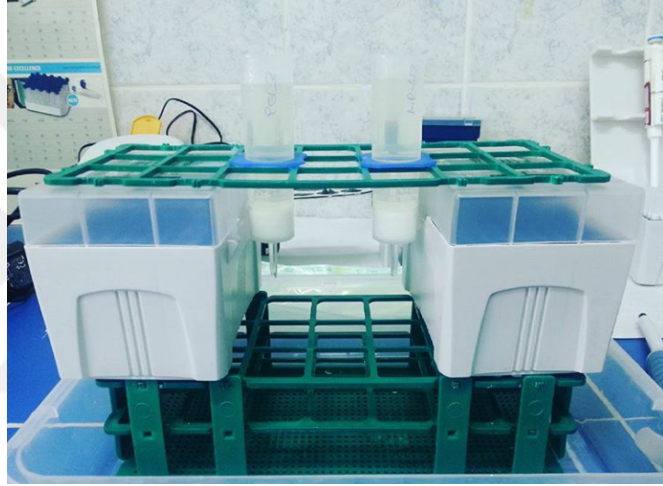
Tablo-12 Sekans reaksiyonu için gerekli bileşenler ve thermal cycler programı

Sekans Reaksiyonu Bileşeni		
dH₂O	9,5 µl	
Pürfiye DNA	1,5 µl	
Primer	0,5 µl	
DTCS	4 µl	
Sulandırma solusyonu	4 µl	

Reaksiyon Programı	Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon aşaması	96	3 dk
Amplifikasyon aşaması (30 Döngü)	96	0: 20 sn
	50	0: 20 sn
	60	4 dk
	+4	∞

3.2.1.8.3. Yüksek Konsantrasyonda Plazmid DNA izolasyonu (Maxi-Prep işlemi)

PGL3 vektör içerisine yerleştirilen pRL-TK (Renilla), PGL3 kontrol vektör (boş), let-7a, hsa-miR-335, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'ye ait sekans işleminde uygunluğu kontrol edilen kolonilerden yüksek konsantrasyonla plazmid DNA'sı elde etmek amacıyla izolasyon gerçekleştirildi. Bu işlem öncesi seçilen koloniler 200 mL LB Broth sıvı besiyeri ve 20 µl ampisilin (100 µg/mL) içeren steril cam şişelerde gece boyunca 37 °C'de 99 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen yüksek konsantrasyondaki bakterilerden Plazmid Maxi Quick-Start Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilerek plazmid DNA'ları elde edildi (Şekil 16).



Şekil-16 Seçilen kolonilerden plazmid DNA'sının elde edilme işlemi

3.2.1.9. Transfeksiyon

Transfeksiyon aşamasında, miR-335 ve let-7a içeren plazmidler; genlerin 3'UTR bölgelerinin PGL3 vektör'e yerleştirilmesiyle hazırlanan plazmidler ve kontrol PGL3-(boş) vektör, Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ABD) kullanılarak

transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. MDA-MB-231 ve HCC1937 hücre hatlarından elde edilen *CD44+/CD24-* meme kanseri kök hücreleri 6 kuyulu plate'lerin her bir kuyusuna 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin zemine tutunması için 24 saat beklendikten sonra (%80 oranında doluluğa ulaşıldığında) her bir kuyuya antibiyotiksiz %5 FBS içeren medyum eklendi. 3 saat sonunda hazırlanan plazmidler OPTMEM içinde hazırlanan lipofectamine ile birlikte karanlık ortamda hücrelere uygulandı. 24, 48 ve 72 saat için bu işlemler tekrar edildi. Transfeksiyon işlemi sırasında her bir hücre kültürü plate'i için hücrelere uygulanan dozlar Tablo 13'te gösterilmiştir. Transfeksiyon işlemi için; 1) PGL3 kontrol vektör, 2) miR-335, 3) *MAP2K1* 3'UTR, 4) miR-335+*MAP2K1* 3'UTR'nin transfekte edildiği bir grup ile 1) PGL3 kontrol vektör, 2-) *let-7a*, 3-) *PIK3CA* 3'UTR ve 4-) *let-7a+PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği bir grup oluşturulmuştur.

Tablo-13 Transfeksiyon işleminde kullanılan bileşenlerin miktarları ve transfeksiyon işlemi için oluşturulan grupların şematik gösterimi

Plate Büyüklüğü	Besiyeri Miktarı	Plazmid DNA'nın Dilüe Edildiği Besiyeri Miktarı	Kuyu Başına Kullanılan Plazmid DNA Miktarı	Lipofectamine 2000 Miktarı
96 Kuyulu	100 µl	2X25 µl	0,2 µg	0,5 µl
24 Kuyulu	500 µl	2X50 µl	0,8 µg	2 µl
6 Kuyulu	2 ml	2X250 µl	4 µg	10 µl

3.2.1.9.1. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Kolorimetrik canlılık testi olarak kullanılan WST-1 yönteminin çalışma prensibi tetrazolium tuzunun (WST), canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile renkli formazan bileşiğine dönüşmesine dayanmaktadır. Kuyucuklara ekimi gerçekleştirilen hücreler içerisine eklenen tetrazolium tuzu, kısa bir inkübasyon süresi sonunda canlı hücrelerdeki enzim aktivitesine bağlı olarak artan veya azalan bir renk değişimi oluşturur. Oluşan bileşiğin 450 ve 620 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçülür.

Transfeksiyon gerçekleştirilen hücreler; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda 6 kuyulu plate'lerden kazınarak transfeksiyon sırasında muamele edildikleri gruba göre 96 kuyulu plate'e, her bir kuyuda 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde 3 tekrarlı

olarak ekildi. Her bir kuyuya 100 µL besiyeri için 10 µL WST boyası eklendikten sonra 1 saat inkübe edildi. 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda ölçüm işlemi, ELISA okuyucu TriStar²S LB 942 (Berthold, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi.

3.2.1.9.2. Lusiferaz Gen Aktivitesi Analiz Protokolü

Transfeksiyon işlemi sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu gerçekleştirilen *CD44+/CD24-* HCC1937 ve *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 meme kanseri kök hücreleri, PBS ile yıkanarak kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra hücre lizatına Dual Luciferase Reporter kit (Promega, ABD) içeriğinde bulunan 100 µl 1X Passive Cell Lysis Buffer eklendi. 10 dk inkübasyonun ardından 20 µl lizat lüminometre plate'ine aktarıldı. 2 dk inkübasyon sonrası 50 µl Luciferase Reagent II eklenerek 10 sn'lik okumalar gerçekleştirildi. Ardından 50 µl Stop&Glo® solüsyonu eklendi ve 2 dk inkübasyon sonrası 10 sn'lik okumalar gerçekleştirilerek işlem tamamlandı.

3.2.1.9.3. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Transfeksiyon sonrası muameleli hücrelerden, total RNA izolasyonu eldesi için RNA izolasyon kit (miRCURYTM RNA Isolation Kit-Cell and Plant, Exiqon) protokolü takip edildi. İşlem sonunda RNA'lar 50 µl nükleazsız deiyonize su ile dilüe edildi. RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonları UV-VİS Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında A260/A280 optik dansite oranı kullanılarak belirlendi.

3.2.1.9.4. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) protokolü takip edilerek hedef genlere özgü total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemiyle cDNA'lar elde edildi. RNA'lardan optik dansitelerine göre 40 µl dH₂O içerisinde her biri 500 ng olacak şekilde ara stok hazırlandı.

3.2.1.9.5. Real Time PCR Aşaması

Transfeksiyon uygulanan hücrelerden elde edilen cDNA'lar kullanılarak kontrol gen *ACTB*, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR genlerinin mRNA ifade düzeyleri spesifik olarak dizayn edilen "TaqMan" problemler ile hassas çalışmaya imkan veren

StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazında kantitatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.9.6. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M evreleri, Muse™ Hücre Döngüsü Kit (Millipore, ABD) protokolü kullanılarak nicel olarak incelendi. 6 kuyulu hücre kültür plate'lerine her grup için 5×10^5 hücre ekildi. 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Sonrasında transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. 48 saat sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı. 1 ml PBS ile yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine %70'lik soğuk etanol eklendi. -20°C 'de 3 saat inkübe edildi. Örnekler, Muse™ Cell Cycle Reaktifi eklendikten sonra 30 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildi. Örnekler 30 dk inkübe edildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazında analizler gerçekleştirildi.

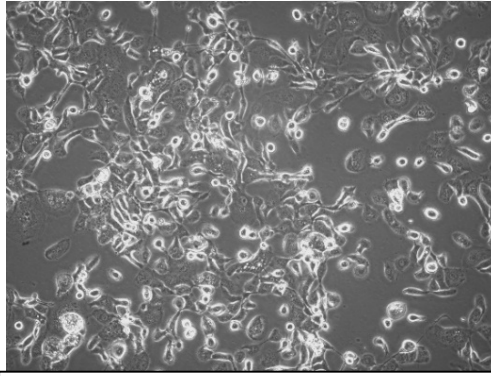
3.3. İstatistiksel Analizler

Gerçekleştirilen WST-1 ve lusiferaz analizleri sonucunda elde edilen veriler, GraphPad Prism 7 (ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Bu program ile iki bağımsız arasındaki farklılıklar iki yönlü varyans (two-way ANOVA) analizi ile karşılaştırıldı. Her bir zaman diliminde deney gruplarının kontrol grubuna göre oransal farklılıkları iki yönlü varyans analizinde Dunnett çoklu karşılaştırma (post-hoc) testinden elde edilen ve anlamlılığı ifade eden p değerlerine göre belirlendi. *PIK3CA* ve *MAP2K1* ve referans gen olarak kullanılan *Aktin- β* için elde edilen veriler “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” web tabanlı programı ile $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ metodu kullanılarak değerlendirildi. Yapılan tüm testlerde $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

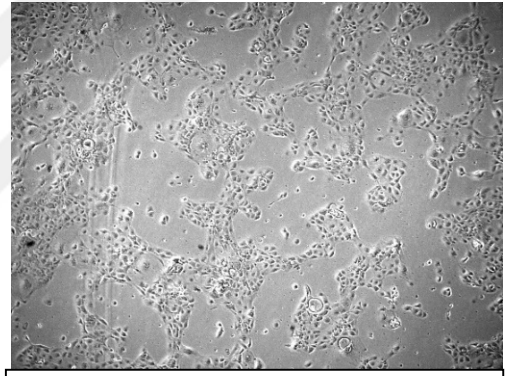
4.BULGULAR

4.1. Kök Hücrelerin Manyetik Ayrımı

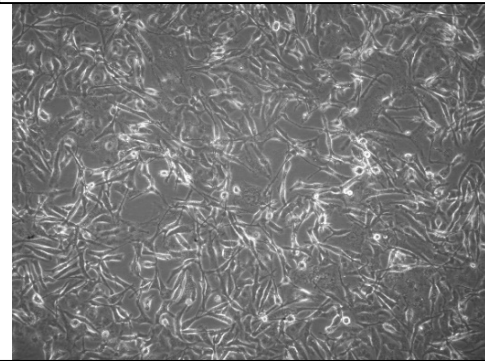
MDA-MB-231 ve HCC1937 hücre hatlarından manyetik ayırım sonucu elde edilen $CD44+/CD24(düşük)-$ hücrelerin ayırım öncesi ve sonrası morfolojik yapıları inverted mikroskop (Euromex) aracılığı ile görüntülenerek elde edilen görseller Şekil 17’de sunuldu. Epitel benzeri hücreler, şekil olarak daha küresel yapıda ve büyük nükleusa sahipken; mezenkimal benzeri hücreler ise küçük bir nükleusa ve daha uzun bir yapıya sahiptir (Van-Pham ve ark., 2007). Tez çalışmamızda da MDA-MB-231 ve HCC1937’nin yapı itibariyle mezenkimal benzeri hücre yoğunluğunun fazla olduğu görülmektedir (Şekil 17, A ve C) HCC1937 hücre hattına ait manyetik ayırım sonrası elde edilen hücre popülasyon miktarı MDA-MB-231 hücre hattına oranla daha düşük düzeyde elde edilmiştir (Şekil 17, B ve D).



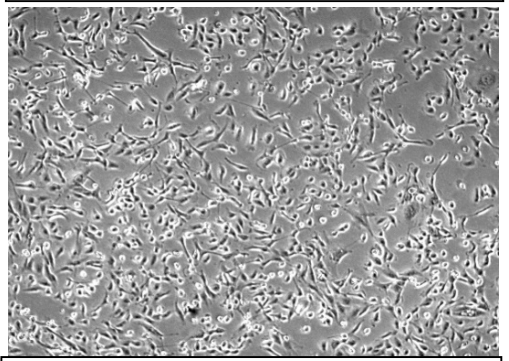
A) HCC1937 hücre hattı hücreleri (10X objektif ile görüntülenmiştir)



B) $CD44+/CD24-$ ayrımı yapılan HCC1937 hücreleri (4X objektif ile görüntülenmiştir)



C) MDA-MB-231 hücre hattı hücreleri (10X objektif ile görüntülenmiştir)

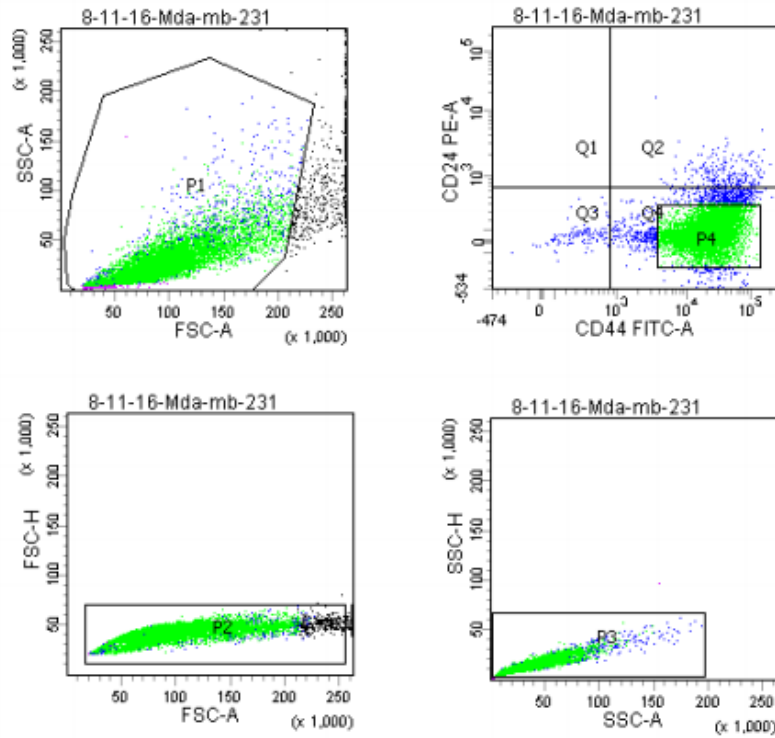


D) $CD44+/CD24-$ ayrımı yapılan MDA-MB-231 hücreleri (10X objektif ile görüntülenmiştir)

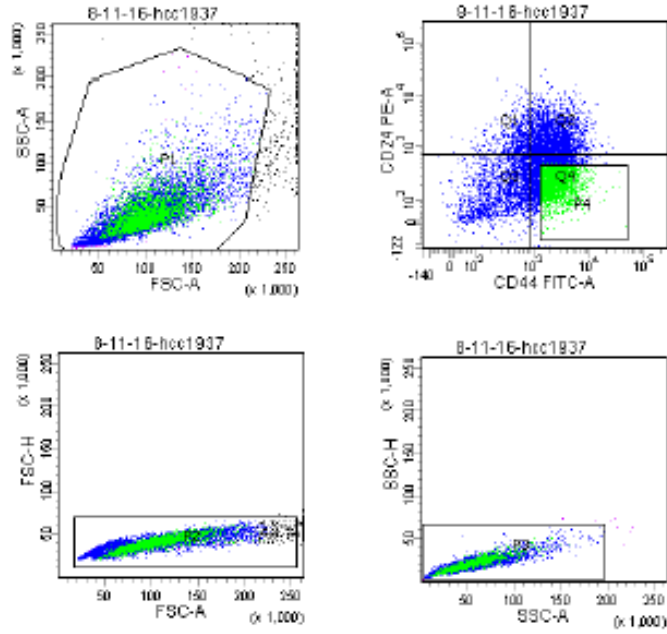
Şekil-17 A ve C, MidiMACs seperator ile ayrımı gerçekleştirilmemiş 175 cm²’lik flask içerisindeki HCC1937 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ait hücreler. B ve D, MidiMACs seperator ile $CD44+/CD24-$ ayrımı sonrası 3. günde çekilmiş, 25 cm²’lik flask içerisinde çoğaltılan hücrelerin morfolojik yapısına ait görüntüler

4.2. *CD44+*/*CD24(düşük)*– Hücrelerin, Floresan Aktive Hücre Sıralama Özelliği Olan Akım Sitometri Cihazı ile Ayrımı Gerçekleştirilen Hücrelerin Tespiti

Manyetik ayırım sonrası elde edilen hücrelerin immün-fenotipi ve kök hücre potansiyeli, meme kanseri kök hücrelerinin hücre yüzey belirteçleri olan *CD44+*/*CD24(düşük)*– fenotipine uygun, *FITC Mouse Anti-Human CD44*, *FITC IgG2b Mouse Kontrol*, *PE Mouse Anti-Human CD24* ve *PE mouse IgG2a Kontrol* antikoları ile işlendikten sonra hücrelerin MDA-MB-231 ve HCC1937’deki dağılımı sırasıyla Şekil 18 ve 19’da gösterilmiştir. Hücrelerin hücre hatları içindeki % oranı Şekil 20 ve 21’de belirtilmiş olup elde edilen MDA-MB-231 *CD44+*/*CD24(düşük)*– kök hücrelerinin yüzde oranı %79,1 olarak belirlenirken HCC1937 hücre hattında bu oran %25,7 olarak tespit edilmiştir. *CD44+*/*CD24(düşük)*– hücre popülasyonları FACS ARIA III cihazının işaretlenmiş hücrelerin saf popülasyon şeklinde eldesini mümkün kılan bölümünden geçerek saflaştırıldı ve sonraki işlemler için yeterli hücre sayısına ulaşıncaya dek hücre toplama işlemine devam edildi.



Şekil-18 MDA-MB-231 hücre hattında *CD44+*/*CD24(düşük)*– kök hücrelerin akış sitometri bulguları



Şekil-19 MDA-MB-231 hücre hattında $CD44+/CD24(düşük)$ – kök hücrelerin akış sitometri bulguları

Tube: Mda-mb-231

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	9,424	94.2	94.2
P2	9,424	100.0	94.2
P3	9,051	96.0	90.5
Q1	0	0.0	0.0
Q2	209	2.3	2.1
Q3	124	1.4	1.2
Q4	8,718	96.3	87.2
P4	7,910	87.4	79.1

Şekil-20 MDA-MB-231 $CD44+/CD24(düşük)$ – kök hücrelerinin yüzde oranı (P4 kısmında belirtilmiştir)

Tube: hcc1937

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	9,691	96.9	96.9
P2	9,691	100.0	96.9
P3	9,552	98.6	95.5
Q1	573	6.0	5.7
Q2	2,617	27.4	26.2
Q3	1,861	19.5	18.6
Q4	4,501	47.1	45.0
P4	2,565	26.9	25.7

Şekil-21 HCC-1937 $CD44+/CD24(düşük)$ – kök hücrelerinin yüzde oranı (P4 kısmında belirtilmiştir)

4.3. Elde Edilen Kök Hücre Pozitif Hücrelerde Gen Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR ile Validasyonu

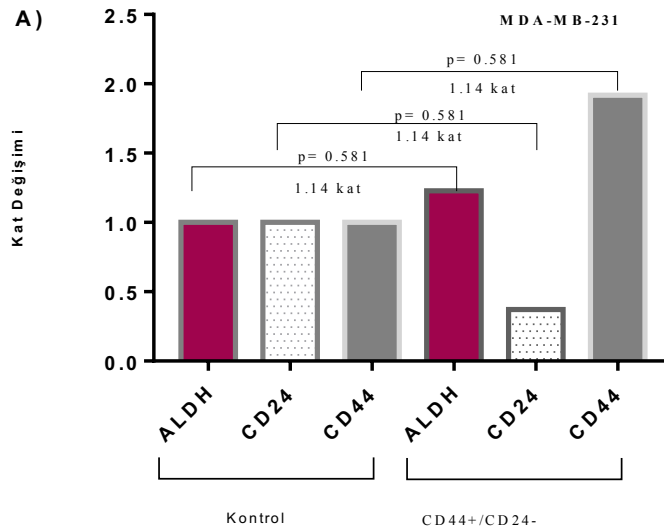
CD44+/CD24- ayrımı sonrası elde edilen RT-qPCR verilerine göre; MDA-MB-231 hücre hattında *CD24* geninde 3,46 kat anlamlı azalma ($p < 0.004$) saptanmıştır. Sırasıyla *CD44* geninde 1,85 kat artış gözlenirken, *ALDH1A1* geninde 1,14 kat artış olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde HCC1937 hücre hattında *CD24* geninde 2,68 kat azalma gözlenmiştir. *CD44* geninde 1,92 ve *ALDH1A1* geninde 1,23 kat artış mevcuttur (Tablo 14).

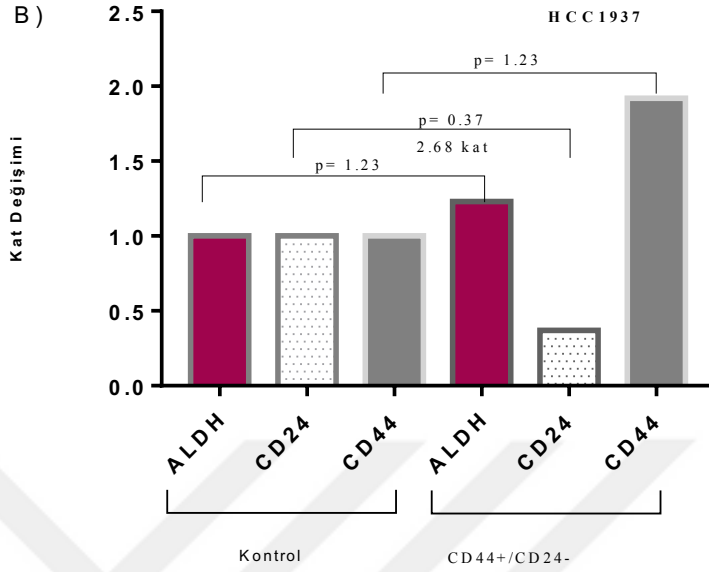
Tablo-14: MDA-MB-231 ve *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 hücre hatlarına ait ekspresyon verileri

Gen Adı	Kontrol Grup	<i>CD44+/CD24-</i> MDA MB 231				
		2 ⁻ ΔCt	2 ⁻ ΔCt	Kat Değişimi	Kat Regülasyonu	95% CL
ALDH	0,000021	0,000024	1,14	1,14	(0.58, 1.70)	0.581103
CD24	0,009016	0,002607	0,29	-3,46	(0.19, 0.39)	0.004235
CD44	0,479632	0,886791	1,85	1,85	(0.99, 2.71)	0.066790

Tablo-15: HCC1937 ve *CD44+/CD24-* HCC1937 hücre hatlarına ait ekspresyon verileri

Gen Adı	Kontrol Grup	<i>CD44+/CD24-</i> HCC1937				
		2 ⁻ ΔCt	2 ⁻ ΔCt	Kat Değişimi	Kat Regülasyonu	95% CL
ALDH	7,08	7,38	0,006017	1,23	(0.00001, 2.76)	1,23
CD24	4,65	3,22	0,107073	-2,68	(0.00001, 0.89)	0,37
CD44	0,99	1,93	0,262429	1,92	(0.00001, 5.22)	1,92



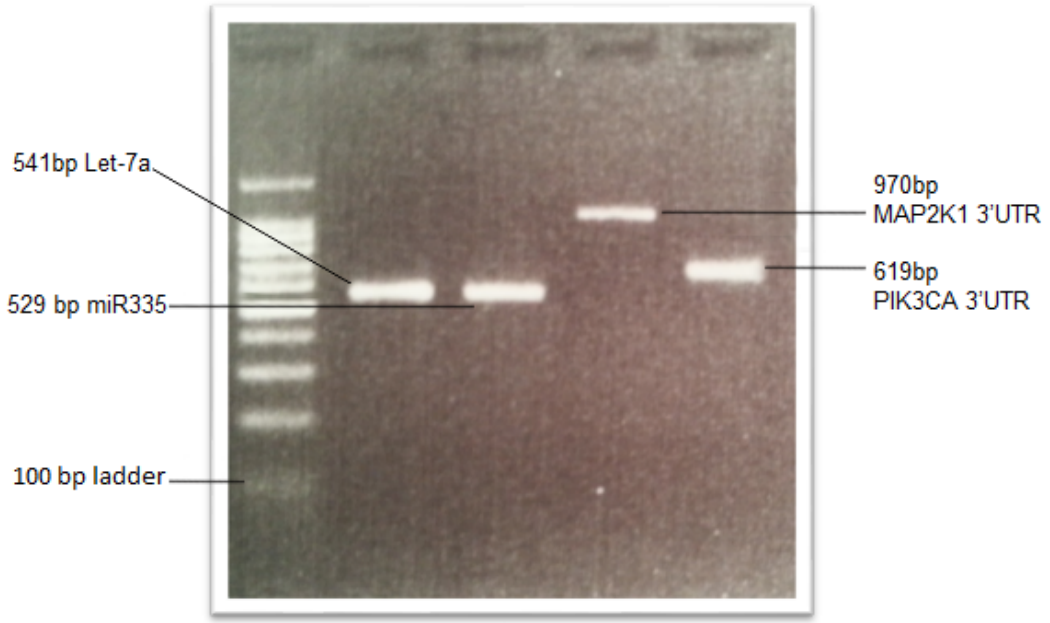


Şekil-22 MDA-MB-231 ve HCC1937 hücre hatları ile kök hücre özelliği gösteren *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 ve *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerinin *ALDH*, *CD24* ve *CD44* genlerine ait mRNA düzeylerini göstermektedir.

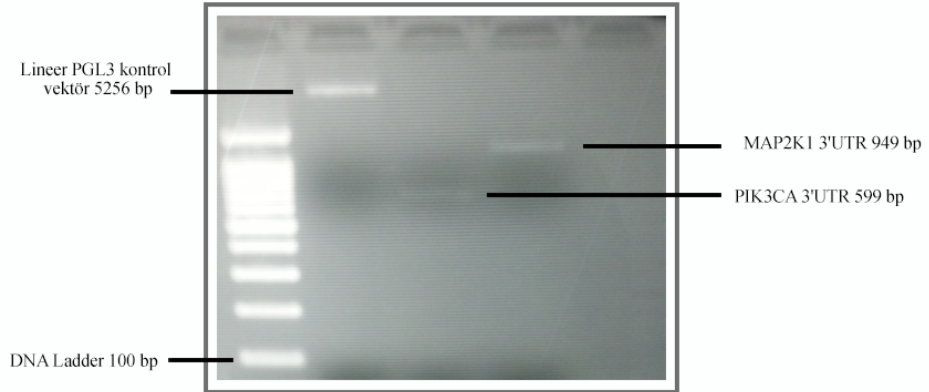
- A) MDA-MB-231 hücrelerine ait değerleri,
 B) HCC1937 hücrelerine ait değerleri göstermektedir.

4.4. Vektörlerin Hazırlanması ve Validasyon İşlemi

Vektör içerisine yerleştirilecek *PIK3CA* 3'UTR, *MAP2K1* 3'UTR, hsa-let-7a ve hsa-miR-335'in ilgili dizilerine ait primerlerin optimizasyon işlemi gerçekleştirildi. İlgili primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 23'te verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri jelden arındırma işlemi sonrasında *XbaI* enzimi ile kesilerek ligasyon işlemi için hazır hale getirildi (Şekil 24). Enzim kesimi sonrası agaroz jel elektroforezine yüklenen ürünlerin kalitesi, ladder ve PGL3 kontrol vektör ile birlikte değerlendirildiğinde ligasyon işlemi için yeterli olduğu gözlemlendi.



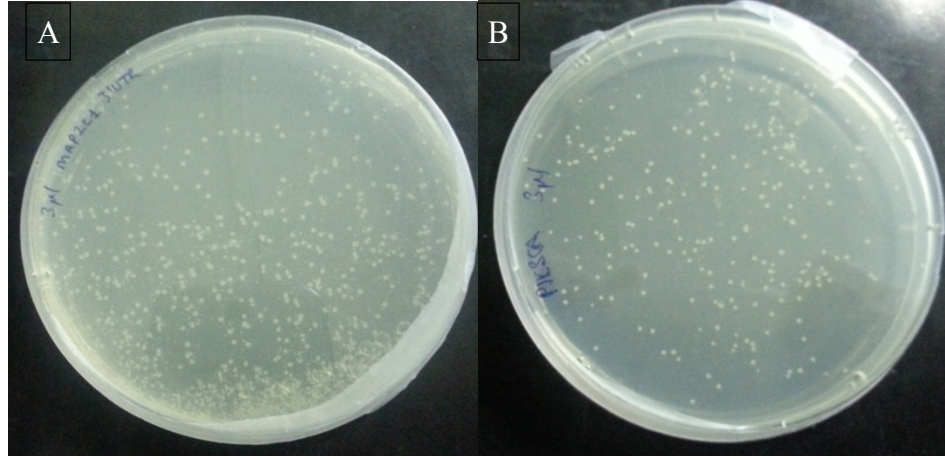
Şekil-23 Sırasıyla; let-7a, miR-335, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'ye ait PCR reaksiyonu görüntüsü



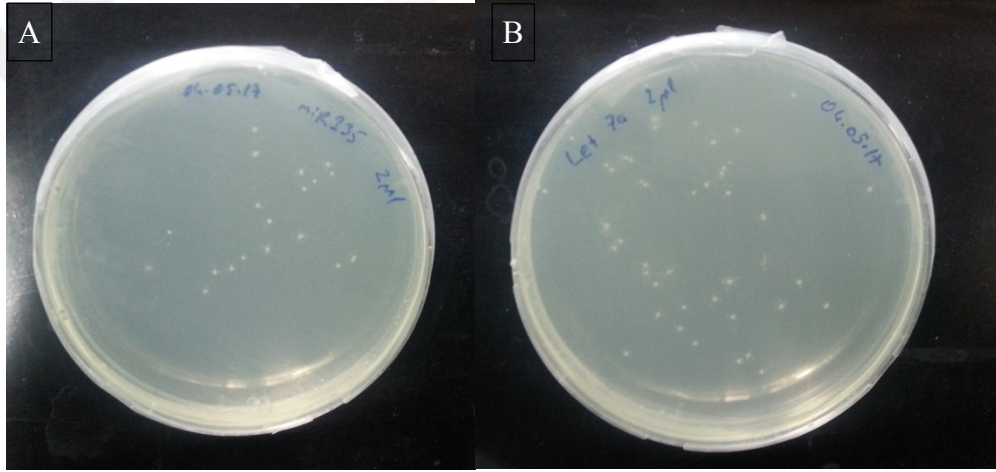
Şekil-24 PGL3 kontrol vektöre aktarılmak üzere XbaI enzim kesim işlemi gerçekleştirilen *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'nin agaroz jel görüntüsü

4.5. Transformasyon İşlemi Sonucu Elde Edilen Kolonilerin Değerlendirilmesi

PGL3 kontrol vektör içerisine aktarılan *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'ye ait transformasyon sonrası elde edilen koloniler Şekil 25'te, Let-7a ve miR-335'in Topo-TA klonlama vektörü içerisine transformasyonu ile elde edilen koloniler ise Şekil 26'da gösterilmiştir. Kolonilerin, pozitif klonların tespitine imkan sağlayacak sayıda ve büyüklükte eldesi sağlanmıştır.



Şekil-25 A) *MAP2K1* 3'UTR ve B) *PIK3CA* 3'UTR'nin E.Coli hücrelerine transformasyonu sonucu elde edilen koloniler

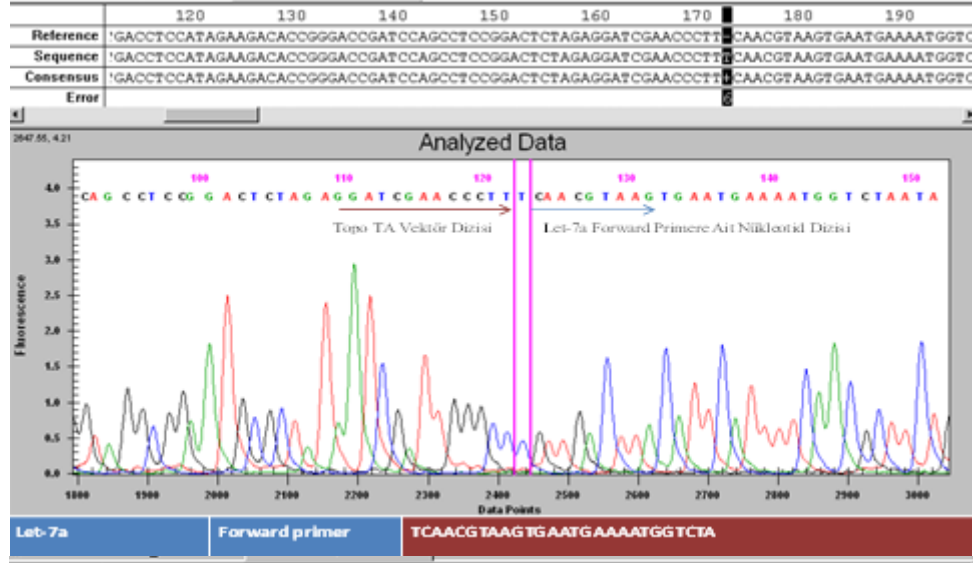


Şekil-26 Topo-TA klonlama vektörü içerisinde E.Coli hücrelerine aktarılan A) miR-335 ve B)Let-7a'ya ait koloniler

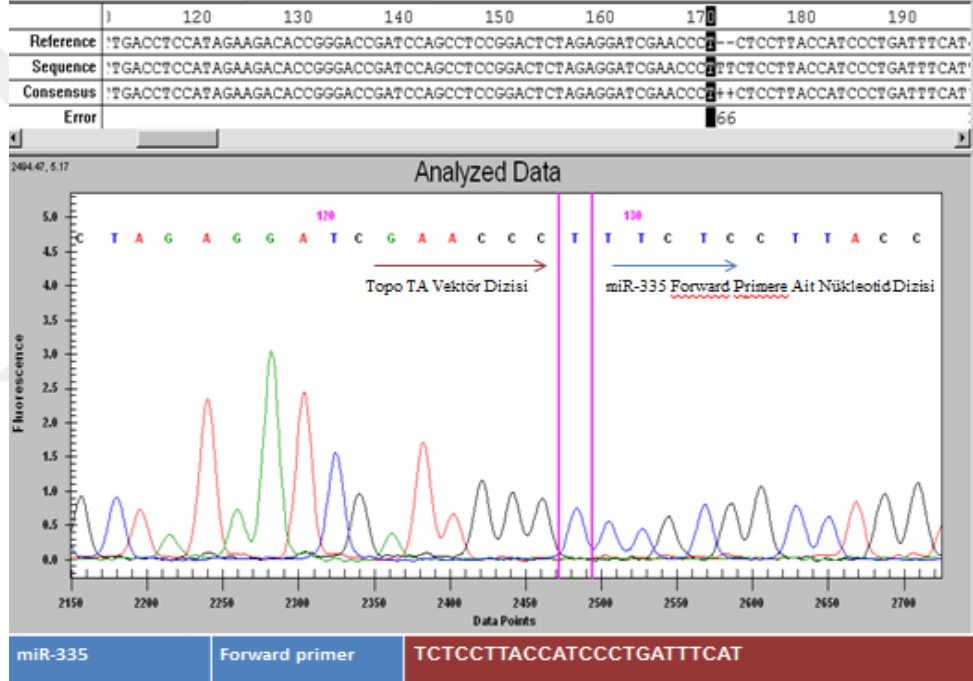
4.6. Pozitif Klonların Seçimi ve Sekans İşlemi ile Doğrulanması

Pozitif klonların tespiti için mevcut kolonilerden 4'er adet seçildi. Seçilen kolonilerden elde edilen plazmid DNA'ların sekans analizleri gerçekleştirildi. Vektör içerisine yerleştirilen gen bölgelerinin doğru yerleşimi sekans analizleri ile belirlendi. Let-7a ve miR-335'in Topo-TA klonlama vektörü içerisindeki yerleşimi Şekil 27'de, *MAP2K1* 3'UTR ve *PIK3CA* 3'UTR'nin PGL3 vektör içerisindeki yerleşimi ise Şekil 28'de gösterilmiştir. Kalıp DNA'ların (*wild type insert*) ilgili vektörler içerisine doğru yönde başarıyla yerleştirildiği analiz edilmiştir. Kalıp DNA içerdiği belirlenen koloniler ile bir sonraki deney aşamasına geçildi.

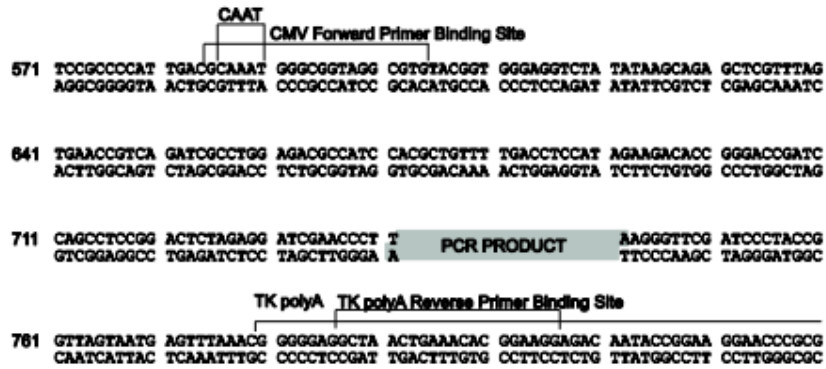
A)



B)

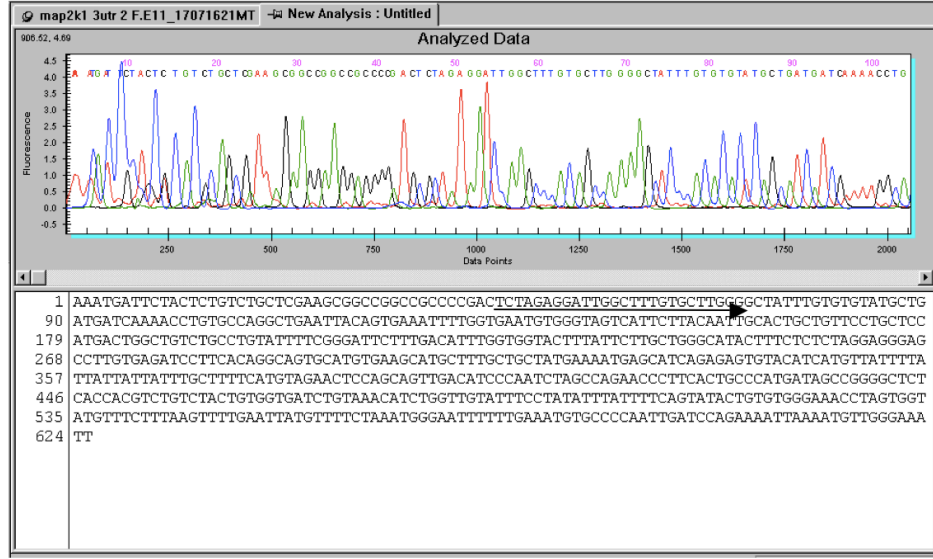


C)

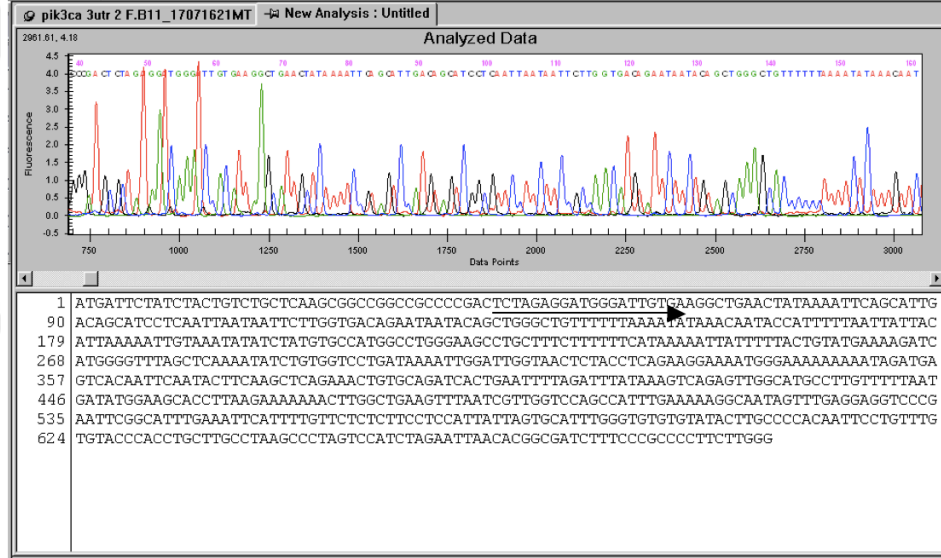


Şekil-27 Let-7a ve miR-335'in vektör içerisindeki yerleşimi A) Let-7a'ya ait sekans görüntüsü, B) miR-335'e ait sekans görüntüsü C) Vektör içerisinde PCR ürününün yerleşeceği bölgeyi gösteren TOPO-TA vektöre ait DNA dizisi

A)



B)



C)

```
1801 ACCGCGAAAA AGTTGCGCGG AGGAGTTGT TTTGTGGACG AAGTACC GAA
1851 AGGTCTTACC GAAAACTCG ACGCAAGAAA AATCAGAGAG ATCCTCATAA
(XbaI Enzim Kesim Bölgesi) ↓
1901 AGGCCAAGAA GGGCGGAAAG ATCGCCGTGT AAT TCTAGAG TCGGGGCGGC
1951 CGGCCGCTTC GAGCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAAC
2001 CACA ACTAGA ATGCAGTGAA AAAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG
```

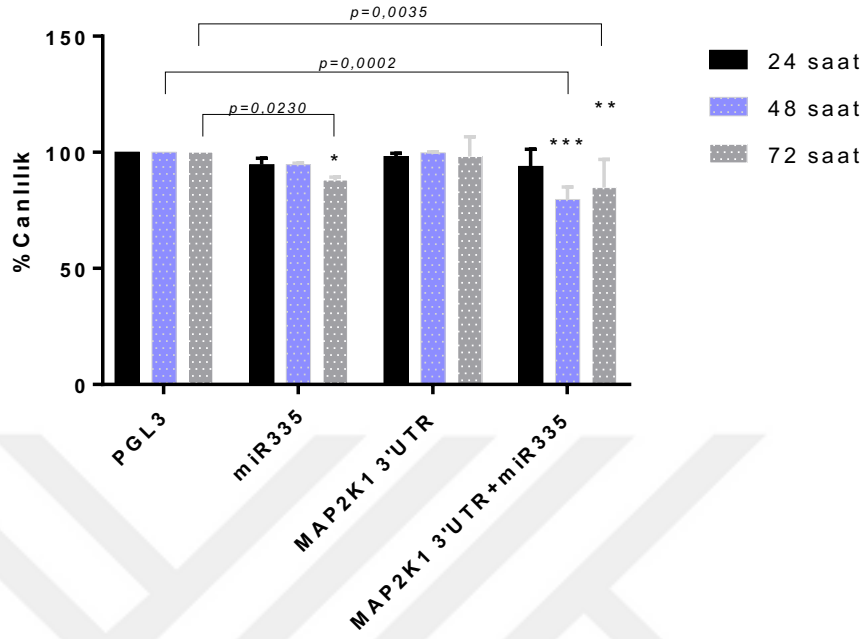
Şekil-28 MAP2K1 3'UTR ve PIK3CA 3' UTR'nin PGL3 vektör içerisindeki yerleşimi A) MAP2K1 3'UTR'ye ait sekans görüntüsü, B) MAP2K1 3'UTR'ye ait sekans görüntüsü C) PGL3 kontrol vektöre ait DNA dizisi

4.7. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerdeki Proliferasyonun Belirlenmesi

Gerçekleştirilen WST-1 analiz sonuçlarına göre; let-7a ve miR-335 ile birlikte bu miRNA'ların hedef genleri olan *PIK3CA* ve *MAP2K1*'in 3'UTR'lerinin farklı gruplar halinde transfekte edildiği *CD44+/CD24-* MDA MB 231 ve *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonunda zamana bağlı etkin transfeksiyon süreleri belirlenmiştir. WST-1 analizinde *CD44+/CD24-* MDA MB 231 ve *CD44+/CD24* HCC1937 hücrelerine transfekte edilen plazmid DNA'ların maksimum sitotoksik etkisini gösterdiği zaman dilimi 48 saat olarak tespit edilmiştir. *CD44+/CD24-* HCC1937 ve *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerinde, 2×10^4 hücrede gerçekleştirilen plazmid DNA transfeksiyonuna ait sonuçlar değerlendirilmiştir.

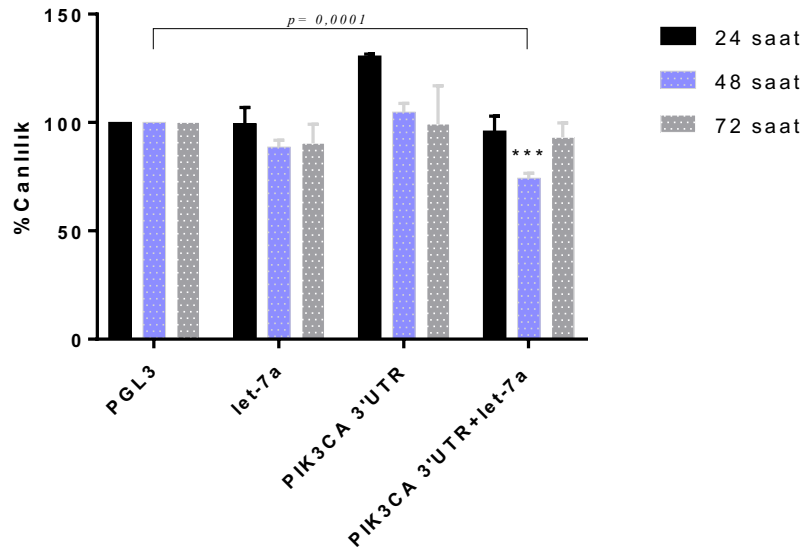
CD44+/CD24- MDA-MB-231 hücrelerine; miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin birlikte uygulandığı grupta 48 saatlik inkübasyon sonunda %25,30 ($p=0,002$), 72 saatlik inkübasyon sonunda ise %11,92 ($p=0,0035$) oranında hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır. Aynı hücre hattına, aynı dozda let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiğinde ise hücre ölüm oranı 48 saatlik süre sonunda %25,63 ($p=0,0001$) olarak belirlenmiştir. *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 hücreleri için 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde hücre canlılığını ifade eden % değişimler Şekil 29 ve Şekil 30'da gösterilmiştir.

MDA-MB-231



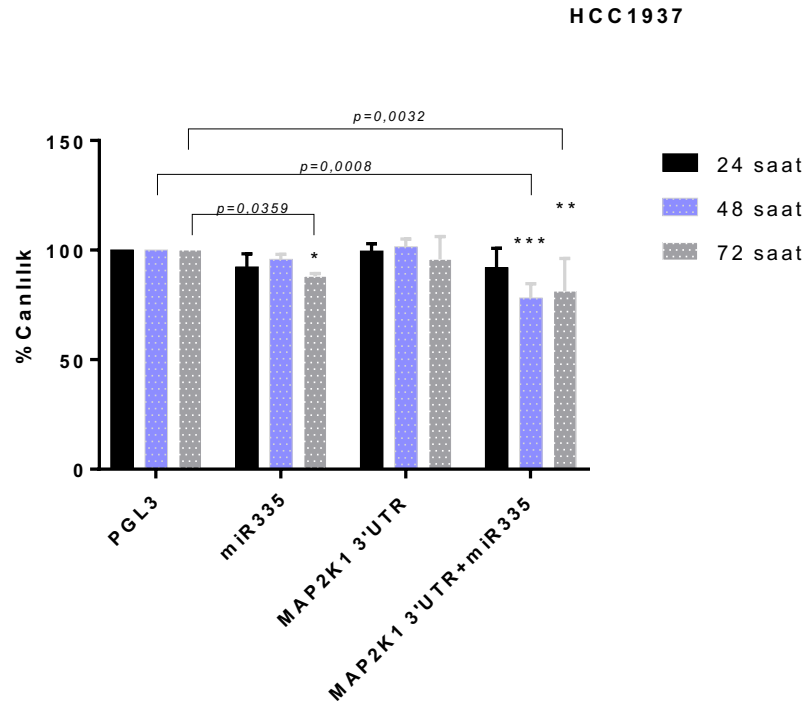
Şekil-29: MDA-MB-231 hücre hattının miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik WST-1 değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

MDA-MB-231

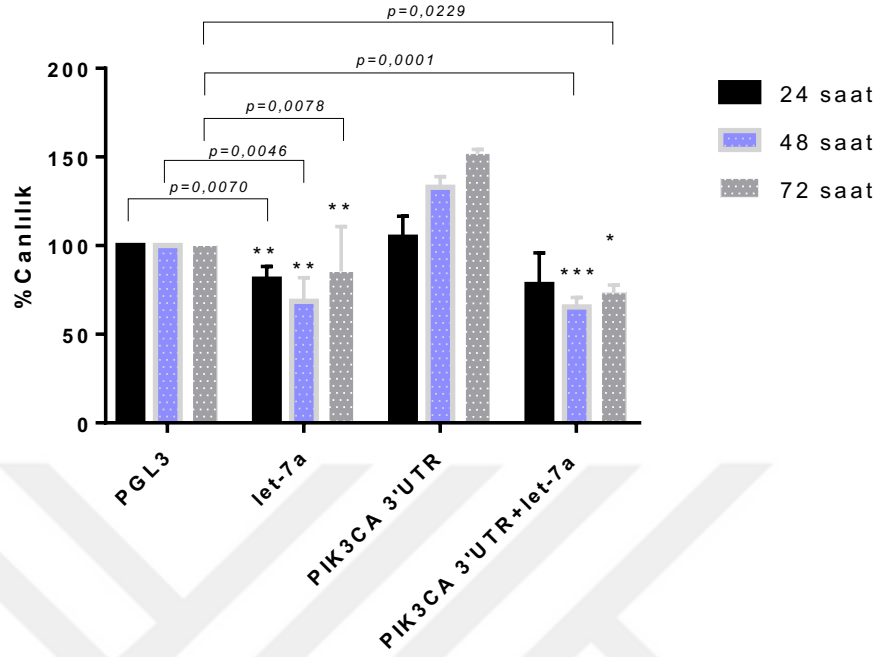


Şekil-30: MDA MB 231 hücre hattının let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik WST-1 değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

CD44+/*CD24-* HCC1937 hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerindeki sitotoksik etkinin doza bağlı hücre canlılığındaki % değişimleri Şekil 31 ve 32’de gösterilmiştir. *CD44+*/*CD24-* HCC1937 hücrelerine birlikte transfekte edilen miR-335 ve *MAP2K1* 3’UTR’nin birlikte uygulandığı grupta 48 saatlik inkübasyon sonunda %21,85 ($p=0,0008$), 72 saatlik sürenin sonunda %18,69 ($p=0,0032$) hücre ölümü tespit edilmiştir. Sadece miR-335 transfekte edilen hücrelerin 72 saatlik inkübasyonu sonunda %11,92 ($p=0,0350$) oranında hücre ölümü belirlenmiştir (Şekil 31). Aynı hücre hattına, aynı dozda *let-7a* ve *PIK3CA* 3’UTR’nin transfeksiyonunun gerçekleştirildiği hücrelerde sadece *let-7a*’nın transfekte edildiği grupta 24 saatlik süre sonunda %18,97 ($p=0,0070$), 48 saatlik süre sonunda %31,36 ($p=0,0046$), 72 saatlik inkübasyon sonunda ise %14,53 ($p=0,0078$) oranında hücre ölümü saptanmıştır. *Let-7a* ve *PIK3CA* 3’UTR’nin birlikte verildiği hücrelerde 48 saatlik inkübasyon sonunda hücre ölümü %34,57 ($p=0,0001$) oranında, 72 saatlik inkübasyon sonunda ise %26,56 ($p=0,0229$) oranında belirlenmiştir. *CD44+*/*CD24-* HCC1937 hücrelerine *PIK3CA* 3’UTR’nin transfekte edildiği hücrelerdeki hücre canlılığı 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda sırasıyla; %104, %132 ve %152 olarak saptanmıştır (Şekil 32).



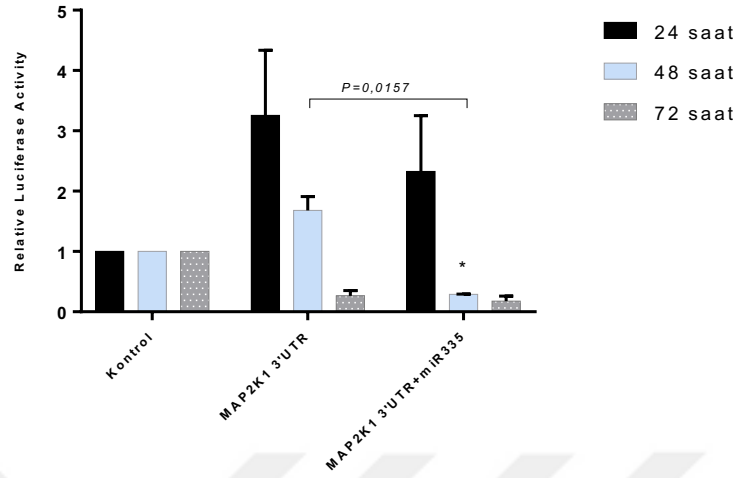
Şekil-31: HCC1937 hücre hattının miR-335 ve *MAP2K1* 3’UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik WST-1 değerleri ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$)



Şekil-32: HCC1937 hücre hattının let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik WST-1 değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

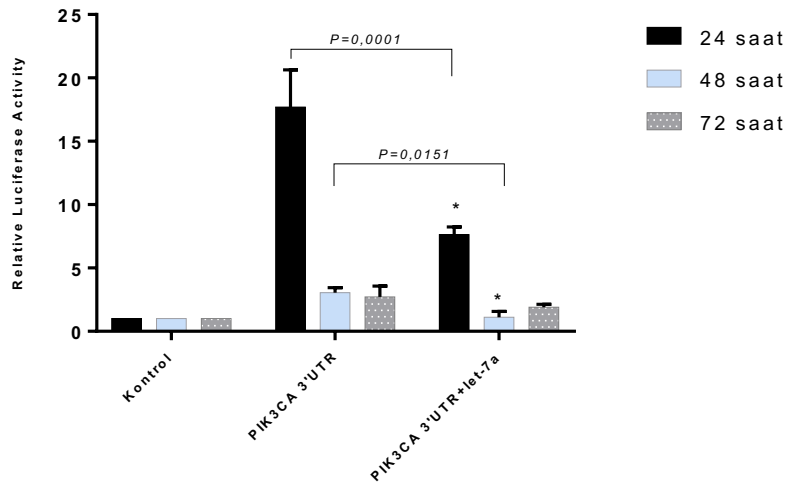
4.8. Gen ve miRNA Etkileşiminin Dual-Lusiferaz Aktivitesi Analizi ile Belirlenmesi

miRNA'lar ve ilgili genlerin 3'UTR bölgelerinin bağlanma özellikleri, lusiferaz gen aktivitesi ölçümü ile elde edilen veriler doğrultusunda değerlendirilmiştir. Yapısında lusiferaz geni ile birlikte aktarılan 3'UTR bölgesini de taşıyan PGL3 vektörün, miRNA dizisi taşıyan vektör ile etkileşimleri sırasında azalan ışımaya düzeyi, ilgili gen ve bu genle ilişkisi araştırılan miRNA arasındaki bağlanma seviyesini belirtmektedir. Bu bağlamda, *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerine miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR dizisi içeren plazmid DNA'lar tek ve kombin olarak 5×10^4 hücreye 0,8 μg plazmid DNA transfekte edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği gruptaki lusiferaz ışımaya oranının, *MAP2K1* 3'UTR transfekte edilen hücrelere göre anlamlı derecede ($p=0,0157$) azaldığı belirlenmiştir (Şekil 33).



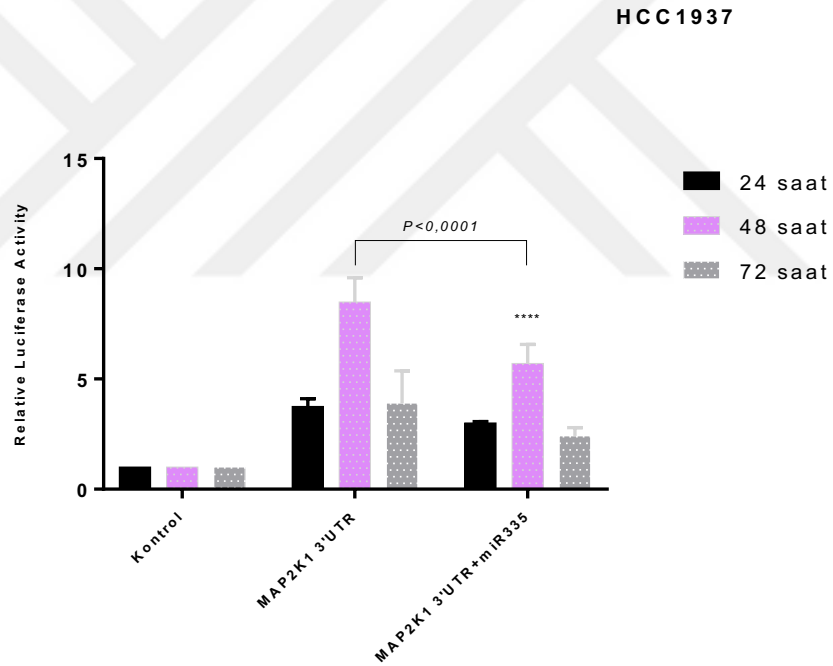
Şekil-33: MDA-MB-231 hücre hattının miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik Firefly/Renilla değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

CD44+/*CD24-* MDA MB 231 hücrelerine transfekte edilen *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin bağlanma özellikleri incelendiğinde 24 ve 48 saatlik süreler sonunda *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte uygulandığı hücreler, sadece *PIK3CA* 3'UTR'nin transfekte edildiği hücelere göre daha az ışımaya yapmıştır (Sırasıyla $p = 0,0001$ ve $p = 0,0151$). *Let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin lusiferaz analizine ait p değerleri Şekil 34'te verilmiştir.

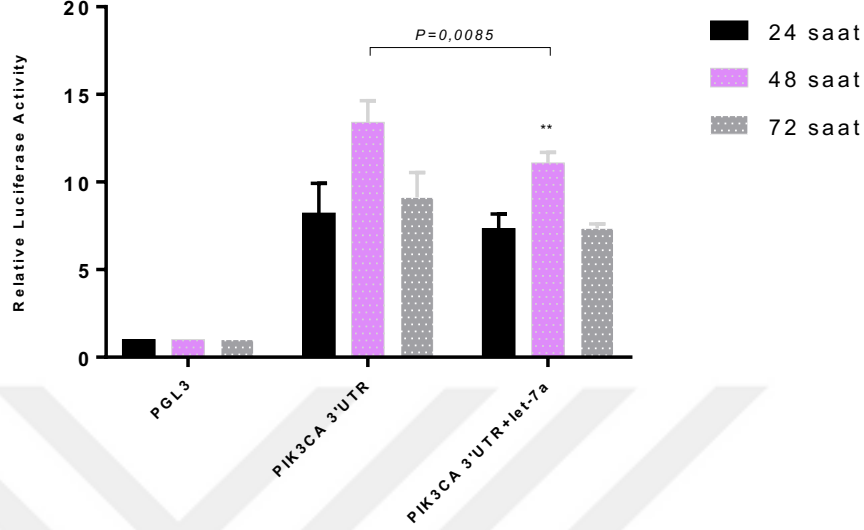


Şekil-34: MDA-MB-231 hücre hattının *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik Firefly/Renilla değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

CD44+/CD24- HCC1937 hücre hattında miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin ayrı ve birlikte transfekte edilmesiyle elde edilen lusiferaz oranları değerlendirildiğinde, 48 saatlik süre sonunda miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği gruptaki lusiferaz ışımaya oranının, sadece *MAP2K1* 3'UTR transfekte edilen hücrelerin ışımaya oranına göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0,0001$) tespit edilmiştir (Şekil 35). Aynı hücrelere aynı oranda transfekte edilen *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin, tek ve kombin olarak transfeksiyonu sonucu elde edilen lusiferaz değerleri Şekil 36'da verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde 48 saatlik inkübasyon sonunda uygulanan lusiferaz protokolü ile elde edilen ışımaya oranının; *PIK3CA* 3'UTR transfekte edilen hücrelerde, *PIK3CA* 3'UTR ve *let-7a* transfekte edilen hücrelere göre anlamlı düzeyde ($p=0,0085$) azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil-35: HCC1937 hücre hattının miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik Firefly/Renilla değerleri ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$)



Şekil-36: HCC1937 hücre hattının let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72 saatlik Firefly/Renilla değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

4.9. *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 ve *CD44+*/*CD24-* HCC1937 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Transfeksiyonun, *MAP2K1* ve *PIK3CA* Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Elde edilen RT-qPCR verilerine göre *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 hücrelerinin WST-1 ve lusiferaz analizlerinde anlamlılık belirlenen miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin transfekte edildiği hücrelerde 48 saatlik inkübasyon sonunda *MAP2K1* gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde [4,22 kat ($p=0,0429$)] azaldığı belirlendi. Sadece *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonunun gerçekleştirildiği hücrelerde ise, *MAP2K1* geninin ekspresyonunda 2,08 kat artış olduğu saptandı. Yine bu grupta sadece miR-335'in transfekte edildiği hücrelerde *MAP2K1* geninin ekspresyonunda 1,51 kat azalma olduğu tespit edildi (Tablo 16 ve Şekil 37). *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 hücrelerinde let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR'nin transfeksiyonu sonrası 48 saatlik inkübasyonda analiz edilen hücrelerdeki *PIK3CA* genine ait ekspresyon verileri incelendiğinde, sadece let-7a transfekte edilen hücrelerde *PIK3CA* ekspresyonunun anlamlı düzeyde 51,50 kat azaldığı ($p=0,043$) belirlendi. Yine bu grupta sadece *PIK3CA* 3'UTR'nin transfekte edildiği hücrelerde artması beklenen *PIK3CA* 3'UTR ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olmayan

düzeyde (5,68 kat) azalma gösterdi. Bununla birlikte; let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği grupta *PIK3CA* ekspresyonunun *PIK3CA* geninin transfeksiyon etkinliğini ifade edecek düzeyde 14,42 kat azaldığı belirlendi ($p=0,05007$). *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerindeki let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonunun *PIK3CA* gen ekspresyonu düzeyine etkisi Tablo 17 ve Şekil 38'de gösterildi.

Tablo-16 *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerinin 48 saatlik miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrasında *MAP2K1* genindeki ekspresyon değişimlerinin kontrol grubu (PGL3) ile karşılaştırılması

CD44+/CD24- MDA MB 231										
Gen	PGL3	miR335			MAP2K1 3'UTR			MAP2K1 3'UTR+miR335		
	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri
MAP2K1	0,230047	0,152125	-1,5122	0,348739	0,478525	2,0801	0,25465	0,054535	-4,2183	0,04292

Tablo-17 *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerinin 48 saatlik let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrasında *PIK3CA* genindeki ekspresyon değişimlerinin kontrol grubu (PGL3) ile karşılaştırılması

CD44+/CD24- MDA MB 231										
Gen	PGL3	Let-7a			PIK3CA 3'UTR			PIK3CA 3'UTR+let-7a		
	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri	2 ⁻ (- Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	P Degeri
PIK3CA	4,046478	0,078563	-51,5059	0,043449	0,712025	-5,6831	0,31801	0,280616	-14,42	0,05007

CD44+/CD24- HCC1937 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyondan sonra elde edilen hücrelerin ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu yapılan grupta, miR-335'in yalnız olarak transfekte edildiği hücrelerdeki *MAP2K1* gen ekspresyonunun beklenen düzeyin altında (1,34 kat) azalma gösterdiği belirlendi. Ayrıca *MAP2K1* 3'UTR'nin transfekte edildiği grupta ise, *MAP2K1* geninde 5,33 kat ekspresyon artışı saptandı. *MAP2K1* 3'UTR ve miR-335'in birlikte verildiği grupta *MAP2K1* ekspresyonunun 1,02 kat azaldığı belirlendi. Elde edilen bulgular, grup içerisinde değerlendirildiğinde; gruplar arası ekspresyon oranları tutarlılık göstermesine rağmen anlamlılık düzeyi beklenen oranın altındadır (Tablo 18 ve Şekil 39). Bu veriler doğrultusunda transfekte edilen miRNA'nın dozunun düşük olmasına bağlı olarak yetersiz bağlanma gösterebileceği

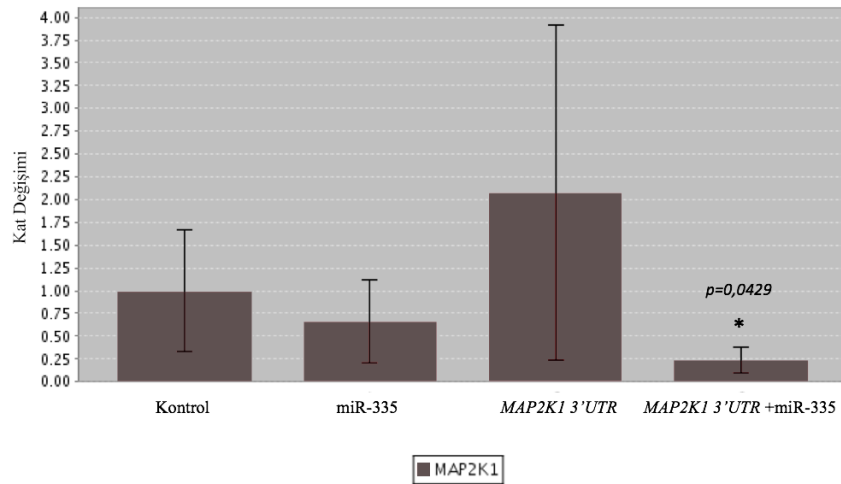
öngörülmüştür. *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerine transfekte edilen let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR'nin *PIK3CA* geni ekspresyon düzeyinde meydana getirdiği farklılık incelendiğinde sadece let-7a'nın transfekte edildiği grubun ekspresyonunda 15,20 kat azalma belirlendi ($p=0,386$). Benzer şekilde *PIK3CA* 3'UTR ve let-7a'nın transfeksiyonu, *PIK3CA* gen ekspresyonunu 8,81 kat azalttığı belirlendi ($p=0,359$) (Tablo 19 ve Şekil 40).

Tablo-18 *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerinin 48 saatlik miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrasında *MAP2K1* genindeki ekspresyon değişimlerinin kontrol grubu (PGL3) ile karşılaştırılması

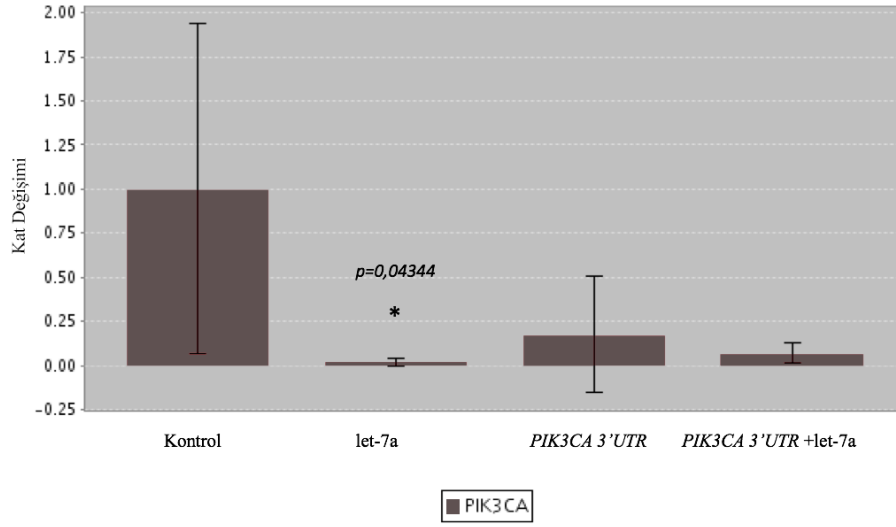
CD44+/CD24- HCC1937										
Gen	miR-335				MAP2K1 3'UTR			MAP2K1 3'UTR+miR-335		
	PGL3	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri
MAP2K1	3,234031	2,40605	-1,3441	0,744386	17,26765	5,3394	0,29240	3,152872	-1,0257	0,86328

Tablo-19 *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerinin 48 saatlik let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrasında *PIK3CA* genindeki ekspresyon değişimlerinin kontrol grubu (PGL3) ile karşılaştırılması

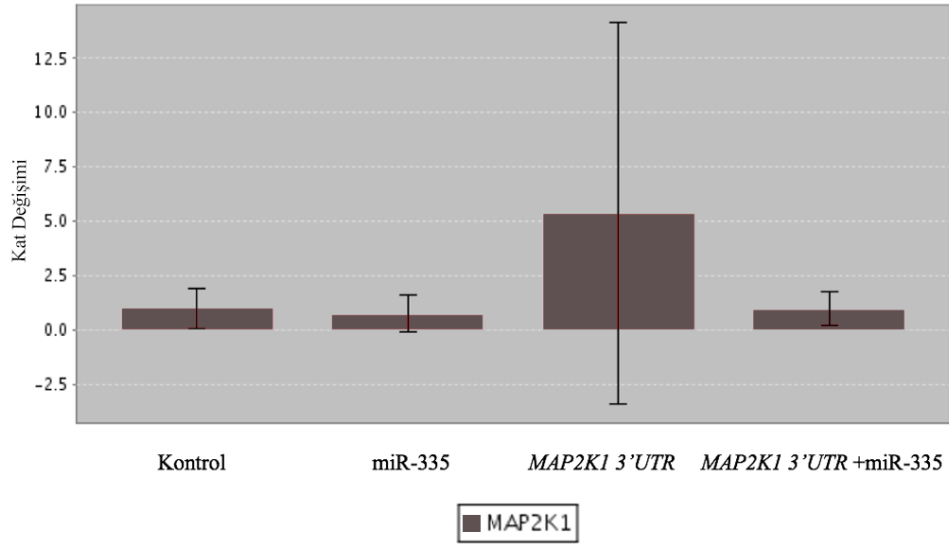
CD44+/CD24- HCC1937										
Gen	let-7a				PIK3CA 3'UTR			PIK3CA 3'UTR+let-7a		
	PGL3	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri	2 ⁻ Δ(Avg.(Delta(Ct)))	Kat	P Degeri
PIK3CA	0,023249	0,001529	-15,207	0,386564	0,032203	1,3851	0,55578	0,002637	-8,8152	0,3599



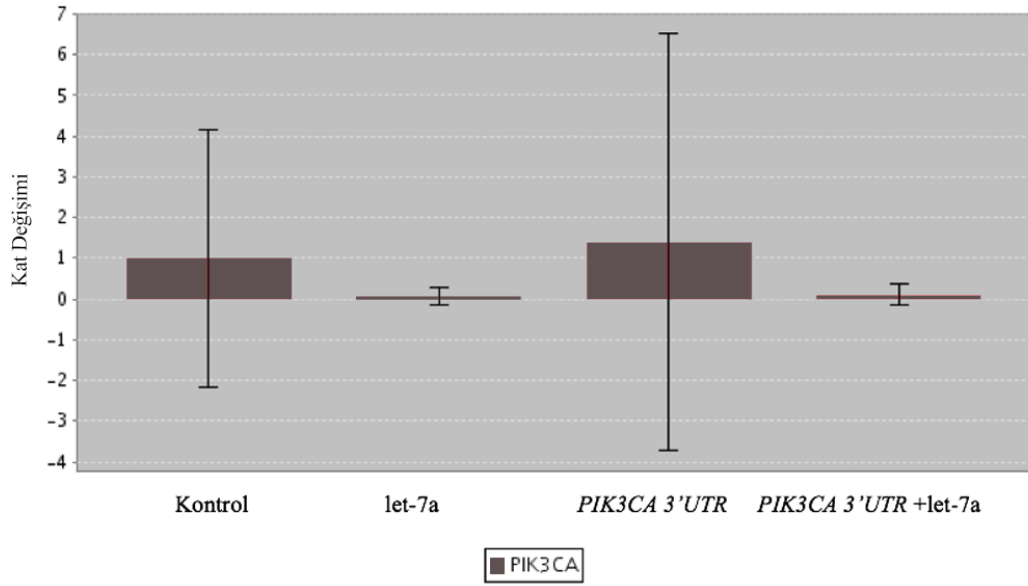
Şekil-37: *CD44+/CD24-* MDA MB 231 hücrelerinin miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 48 saatlik uygulama sonrasında *MAP2K1* gen ekspresyonundaki değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması (* $p<0,05$)



Şekil-38: CD44+/CD24- MDA MB 231 hücrelerinin let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 48 saatlik uygulama sonrasında *PIK3CA* gen ekspresyonundaki değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması (* $p < 0,05$)



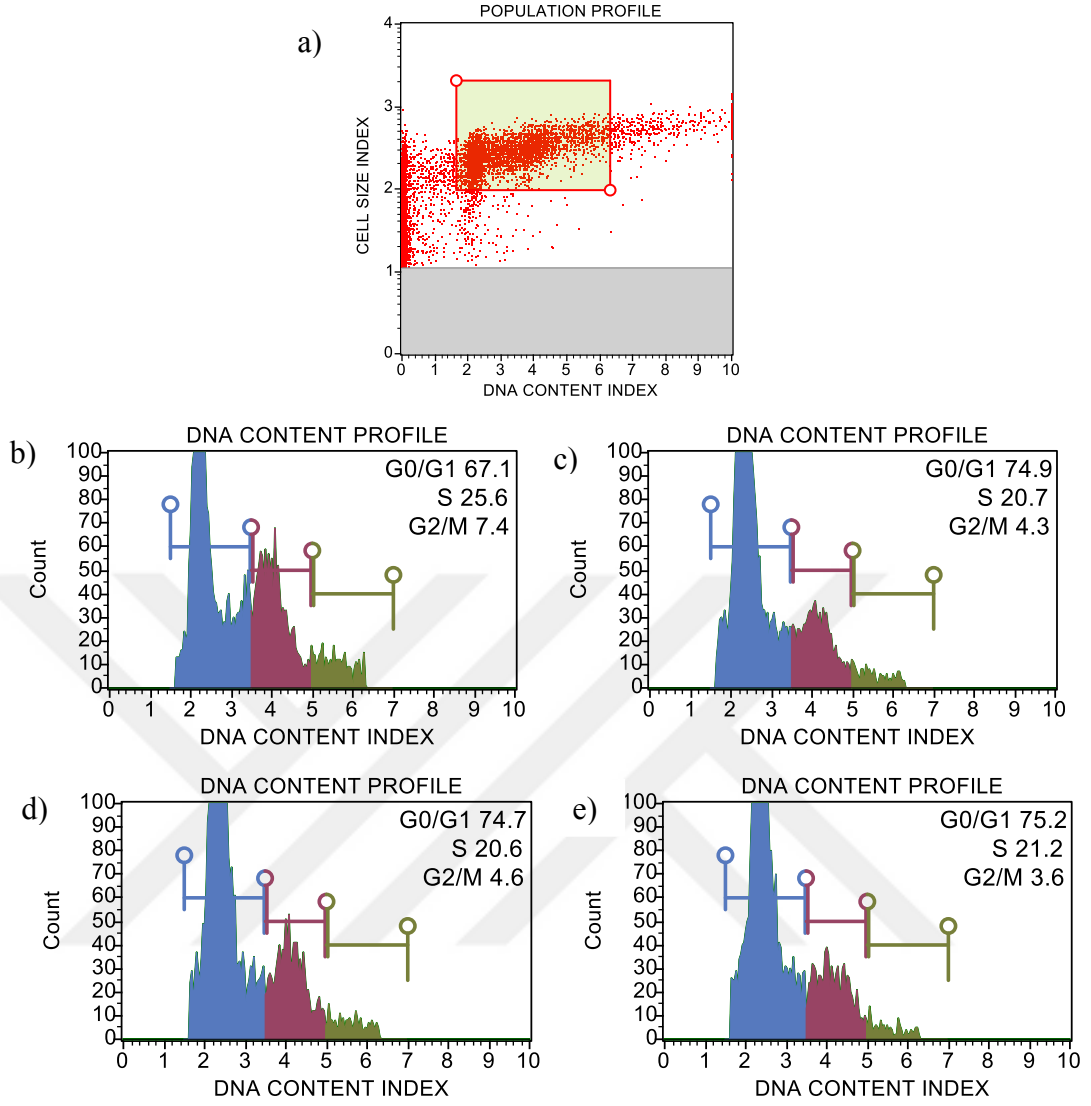
Şekil-39: CD44+/CD24- HCC1937 hücrelerinin miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 48 saatlik uygulama sonrasında *MAP2K1* gen ekspresyonundaki değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması (* $p < 0,05$)



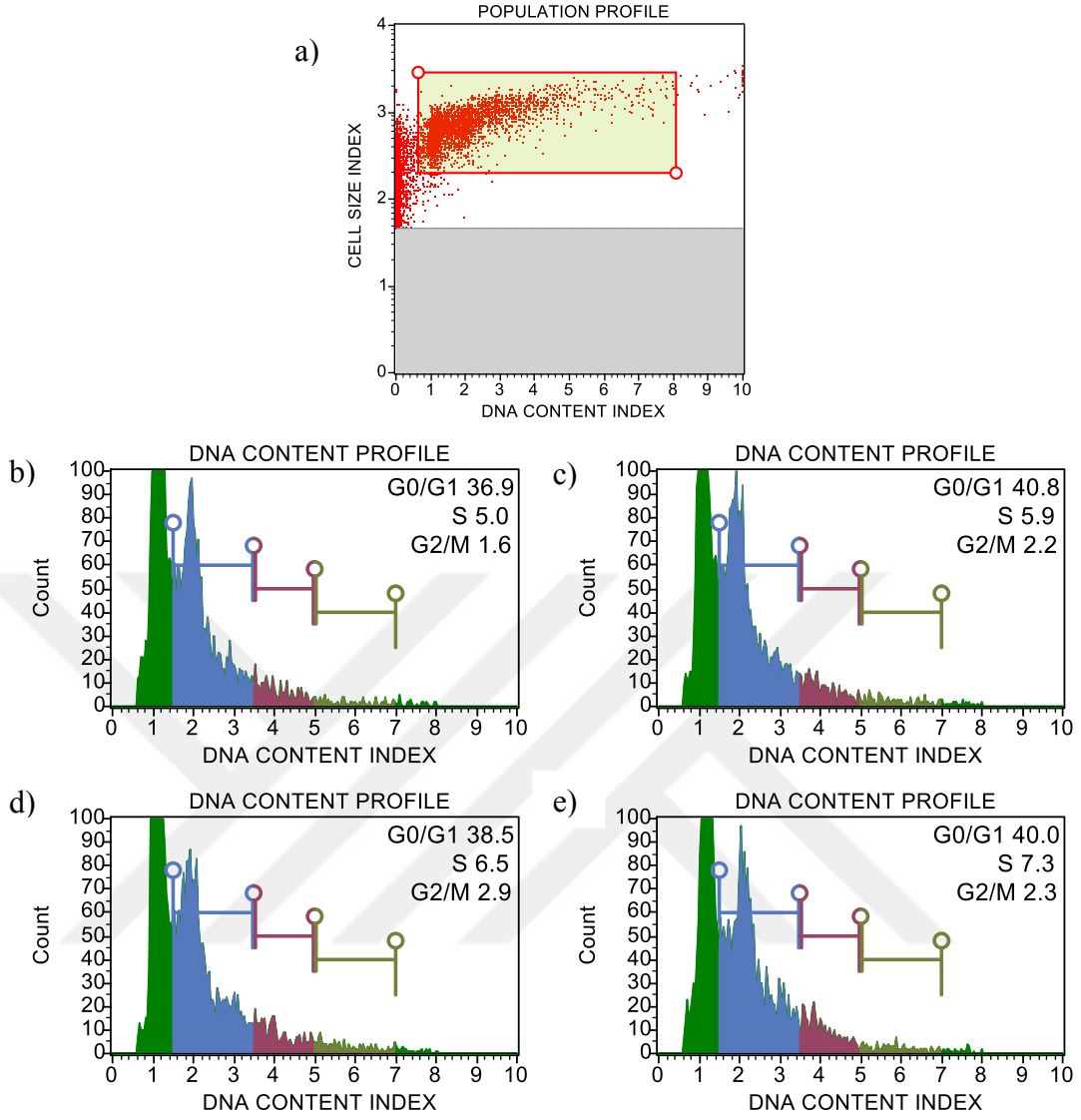
Şekil-40: CD44+/CD24- HCC1937 hücrelerinin let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu sonrası 48 saatlik uygulama sonrasında *PIK3CA* gen ekspresyonundaki değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması (*p<0,05)

5.0 CD44+/CD24- HCC1937 Hücrelerinde Gerçekleştirilen Transfeksiyonun Hücre Döngüsüne Etkisi

CD44+/CD24- HCC1937 hücrelerine *PIK3CA* 3'UTR, *MAP2K1* 3'UTR, let-7a ve miR-335'in, 4 µg/ml konsantrasyondaki plazmid DNA'sında olacak şekilde 5×10^5 hücreye uygulanmasından 48 saat sonra transfeksiyonun hücre siklusu evreleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, farklı gruplar için etkinin değiştiği gözlemlendi. Hücrelerde G0/G1 fazında artış belirlendi. CD44+/CD24- HCC1937 hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %67,1 iken, let-7a transfekte edilen hücrelerde G0/G1 fazında hücreler %74,9, *PIK3CA* 3'UTR transfekte edilen hücrelerde %74,7 ve let-7a ile *PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği hücrelerde %75,2'e arttığı belirlendi (Şekil 41). *MAP2K1* 3'UTR ve miR-335'in transfekte edildiği hücrelerdeki hücre siklusu evreleri incelendiğinde ise kontrol grubunda G0/G1 fazındaki hücre miktarı %36,9 olarak tespit edildi. Buna bağlı olarak miR-335 transfekte edilen hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre miktarının %40'a, *MAP2K1* 3'UTR transfekte edilen hücrelerde %38,5'e ve miR-335 ile *MAP2K1* 3'UTR'nin birlikte transfekte edildiği hücrelerde ise %40'a arttığı belirlendi (Şeki



Şekil-41 Let-7a ve *PIK3CA* 3'UTR transfeksiyonu gerçekleştirilmiş *CD44*⁺/*CD24*⁻ HCC1937 hücreleri ile kontrol grubunun hücre siklus evrelerinin karşılaştırılması a) Kontrol-Kapılama, b) Kontrol, c) Let-7a d) *PIK3CA* 3'UTR e) *PIK3CA* 3'UTR ve let-7a



Şekil-42 miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR transfeksiyonu gerçekleştirilmiş CD44+/CD24- HCC1937 hücreleri ile kontrol grubunun hücre siklusu evrelerinin karşılaştırılması a) Kontrol-Kapılama, b) Kontrol, c) miR-335 d) *MAP2K1* 3'UTR e) *MAP2K1* 3'UTR ve miR-335

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, tüm dünya kadınları arasında en yaygın görülen kanser tipidir (Bucerus J ve ark., 2012). Hem histolojik hem de klinik açıdan değerlendirildiğinde meme tümörleri heterojen bir yapıya sahiptir. Bu nedenle gen ekspresyon profillerinin analiz edilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar; meme tümörlerini luminal A, luminal B, HER2 ve Bazal-benzeri/triple negatif olmak üzere belirli biyolojik özelliklere sahip dört ana alt grup altında toplandığını göstermektedir (Yersal ve Barutca, 2014). Bu alt gruplar arasında yer alan TNMK hastaları, hormonal veya HER2 hedefli tedavilerden yarar sağlayamamaktadır. TNMK'leri diğer alt tiplere göre daha agresif bir klinik davranış sergilemekle birlikte, daha yüksek rekürrens oranı ve daha düşük sağkalım oranına sahiptir (Matamala ve ark., 2016). PI3K ve MAPK yolları, kanserde en çok regülasyonu değişen yollar arasındadır. Bu yollarla etkileşim oluşturabilecek etkin inhibitörlerin kullanılması, ileri evre meme kanseri tedavisinde ciddi öneme sahiptir. Günümüzde, seçici veya seçici olmayan PI3K ve MAPK yolları blokajı sergileyen Rapamycin ve AZD6244 gibi tedavide kullanılabilir inhibitörler bulunmaktadır (Jokinen ve Koivunen, 2015). Bu inhibitörler ile tedavi edilebilen hastalarda ilk tedavi yanıtı değerlendirildiğinde tatmin edici sonuçlar elde edilmesine rağmen, bu inhibitörlerin birçoğunun yüksek toksisite sergilediği ve bloklanmış yolların yeniden aktifleşmesi veya alternatif bir yolların aktivasyonundan dolayı hızlı bir direnç gelişimi olduğu gösterilmiştir (Mutlu ve ark., 2016). İlâveten, PI3K veya MAPK yollarının inhibisyonunun, pozitif veya negatif geri besleme ile her iki yolda da ortak olarak görev yapan proteinlerin aktivitesini de tetiklediği bildirilmiştir (Carracedo ve ark., 2008; Serra ve ark., 2011; Yang ve ark., 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalarda; bazı miRNA'ların, PI3K veya MAPK yollarını hedefleyerek tümör büyümesini baskılamak üzere görev yaptıkları gösterilmiştir (Mutlu ve ark., 2016).

İleri evre meme kanseri gelişiminde önemli olan miRNA'lar arasında miR-335 ve let-7a'nın yer aldığını ve bu miRNA'ların PI3K-Akt, MAPK ve Wnt sinyal yolları gibi hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile ilişkili çeşitli yolları hedeflediğini web tabanlı programlar ile gösteren bulgular mevcuttur (Ertürk ve ark., 2014; Cheaib ve ark., 2015). Meme kanseri moleküler biyolojisi alanındaki bu gelişmelere rağmen, meme kanseri gelişim ve tedavi sürecinde önemli olabilecek

linik olarak doğrulanmış biyobelirteçlerin ve terapötik hedef moleküllerin belirlenmesi konusunda halen fonksiyonel çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Bu bağlamda, terapötik ajan geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, miRNA'ların rolleri araştırılmaktadır.

Mevcut çalışmada, meme kanseri kök hücrelerine let-7a ve miR-335'in transfeksiyonu ile hedef aldığı genler değerlendirildi. İlgili miRNA'ların hedefledikleri genlerin görev aldıkları PI3K ve MAPK hücre sinyal ileti yollarındaki mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik olarak, let-7a ve miR335'in kanser kök hücrelerin progresyonunun düzenlenmesinden sorumlu anahtar genlerin ekspresyonunu negatif şekilde etkileyebilecek potansiyele sahip oldukları gösterildi.

Önceki çalışmalar, malign hücre progresyonunun regülatörü olan miR-335'in birçok kanser tipinde metastatik süreçlerle ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Tomé ve ark., 2011). Ayrıca, birçok kanser tipinde miR-335'in downregüle edildiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2016). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar miR-335'in yeniden düzenlenmiş ifadesinin, ileri evre meme kanserinde hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığını göstermiştir (Carracedo ve ark., 2008; Serra ve ark., 2011; Yang ve ark., 2015) Kanser kök hücre temelli araştırmalar, miR-335 tedavisinin tümör hücresi invazyonunu ve direncini azalttığını, buna karşılık anti-miR-335'in tümör hücresi invazyonunu ve direncini arttırdığını göstermiştir (Carracedo ve ark., 2008; Serra ve ark., 2011; Yang ve ark., 2015). miR-335'in tümör invazyonunu iki bağımsız yolağa etki ederek gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu yolların birinde miR-335 antimitojenik özelliğiyle; *SOX4* ve *Jagged-1* genlerinin kontrolünü sağlarken, pro-apoptotik özelliğiyle; *ERa*, *SP1* ve *IGF1R*'in baskılanmasına aracılık eder. Diğer yolakta ise *ID4* gibi dominant represörleri inhibe ederek meme kanserinde *BRCAl*'in aktive edilmesini sağlar (Chen ve ark., 2016). Mevcut tez çalışmasında PI3K ve MAPK yolağında görev yapan iki genin ifadesini değerlendirebilmek için belirlenen MDA-MB-231 hücre hattı herhangi bir *BRCAl* ve *PIK3CA* mutasyonu taşımasına rağmen, HCC1937 hücre hattı *BRCAl*, *TP53*, *MAPK13*, *MDC1* mutasyonu ve PI3K yolağında *PTEN* delesyonu taşımaktadır (Kathryn ve ark., 2010). Dolayısıyla, transfekte edilen miRNA'ların etkinliğinin MDA-MB-231 hücre hattında HCC1937 hücre hattına göre daha yüksek oranda olması durumunu açıklamaktadır.

Mevcut çalışmada elde edilen bulgular dahilinde, *PIK3CA* ve *MAP2K1* genleri ile bu genleri hedef alan let-7a ve miR-335 arasındaki etkileşime paralel meme kanseri kök hücrelerinde zamana bağlı hücre ölümü saptandı. Her iki hücre hattında gerçekleştirilen transfeksiyon sonrası maksimum sitotoksik etkinin gözlemlendiği zaman dilimi 48 saat olarak belirlenmiş olup fonksiyonel analizler bu zaman dilimindeki hücrelerde gerçekleştirildi. *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 hücrelerine birlikte transfekte edilen miR-335 ve *MAP2K1* 3'UTR'nin 48 saatlik inkübasyonun ardından %25,30 ($p=0,002$) oranında hücre ölümü saptandı. Transfeksiyon sonrası 48 saatlik inkübasyonu tamamlanan hücreler ile gerçekleştirilen ekspresyon analizinde, *MAP2K1* gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde [4,22 kat ($p=0,0429$)] azaldığı belirlendi. Elde edilen WST-1 analiz sonuçları ile bir tümör süpresör miRNA olan ve meme kanserinde down-regüle olan miR-335'in hücre çoğalması, farklılaşması ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok hücresel sürece dahil olan *MAP2K1* geni ile etkileşerek ileri evre meme kanseri kök hücrelerinde miR-335 ile baskılanabildiği belirlenmiştir. Bu bulgu, miR-335'in ilgili görevi *MAP2K1* 3'UTR'sine bağlanarak gerçekleştirdiğini analiz eden lusiferaz deneyleri ile doğrulanmıştır ($p=0,0157$).

Sonuç olarak elde edilen bulgular, miR-335'in MAPK yoluna etki ederek bir tümör süpresör olarak işlev görebileceği görüşünü destekler niteliktedir.

PI3K yolunun, *PTEN*'i downregüle eden ve dolayısıyla PI3K sinyalizasyonunu aktive eden *Bmi1* ve *EZH2* gibi çeşitli efektörler yoluyla EMT ve invazyonu indüklediği bilinmektedir. Aktive edilmiş PI3K sinyalleme, metastazla ilişkili genler olan *Snail* ve *Slug*'ın yanı sıra mTOR aracılığıyla Rho/Rac sinyalleme de dahil olmak üzere EMT'nin uyarıcılarını upregüle edebilir (Mutlu ve ark., 2016). Aynı zamanda hormon terapi ve HER2 terapiler için önem arz eden bu yolak, let-7a'nın da bir hedefidir. Mevcut çalışmada, let-7a'nın transfekte edildiği *CD44+/CD24-* MDA-MB-231 hücrelerinde *PIK3CA* gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p=0,043$) azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, *MAPK13* mutasyonu ve *PTEN* delesyonu taşıdığı bilinen *CD44+/CD24-* HCC1937 hücrelerinde *MAP2K1* 3'UTR ve miR-335'in birlikte verildiği grupta *MAP2K1* ekspresyonunun 1,02 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). miRNA verilen grupta hedef gen ekspresyonunun azaldığı, 3'UTR bölgesinin transfekte

edildiği grupta ekspresyonun arttığı ve gen ile miRNA'nın birlikte transfekte edildiği grupta ise diğer gruplara göre ekspresyondaki azalmaya bağlı anlamlılığın arttığı belirlenmiş olmakla birlikte, istatistiksel anlamlılığın belirlenmemiş olması ilgili bölgelerin transfeksiyonu için uygulanan plazmid DNA oranının *CD44+/CD24-HCC1937* hücreleri için yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. *CD44+/CD24-HCC1937* hücrelerine transfekte edilen *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin *PIK3CA* geni ekspresyonunda meydana getirdiği farklılık incelendiğinde sadece *let-7a*'nın transfekte edildiği grubun ekspresyonunda 15,20 ($p=0,386$) kat azalma belirlendi. Bununla birlikte *PIK3CA* 3'UTR ve *let-7a*'nın birlikte transfekte edildiği gruptaki hücrelerin *PIK3CA* gen ekspresyonu 8,81 kat azaldığı belirlendi. HCC1937 hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksisite deneylerinde ise anlamlılık ifade eden 48 saatlik süre sonunda *let-7a* ve *PIK3CA* 3'UTR'nin birlikte verildiği hücrelerde hücre ölümü %34,57 ($p=0,0001$) olarak belirlendi. Bu oran MDA-MB-231 hücre hattında elde edilen ölüm oranlarına göre daha yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık ifade etmektedir. Elde edilen bulgular ışığında; bazal tip meme kanseri tedavisinde *let-7a*'nın, *let-7a* ve *PIK3CA* temelli tedavi protokolleri oluşturulmasına destek sağlayabilecek nitelikte olduğu görülmektedir.

Mevcut tez çalışmasında, literatürde ilk kez *PIK3CA* ve *MAP2K1* genlerini hedeflediğini belirlediğimiz *let-7a* ve miR-335'in ileri evre meme kanserleri kök hücre tedavisinde potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabilmesi ve ileri evre meme kanserlerinde miRNA temelli gen tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. Böylece ilaç direnci gösteren ileri evre meme kanseri hastalarının tedavisinde alternatif tedavi protokollerinin oluşturulmasına katkı sağlanabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ et al (2015) Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer* 121: 8–16.
- Aehle W (2007) *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3rd Edition, Wiley-VCH. pp: 403.
- Agoulnik IU, Hodgson MC, Bowden WA et al (2011) INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget* 2: 321–28.
- Ahn SG, Kim SJ, Kim C et al (2016) Molecular classification of triple-negative breast cancer. *J Breast Cancer* 19: 223–30.
- Altınok B, Sunguroğlu A (2016) WNT Sinyal Yolağı ve Kanser. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt 15, Sayı 2: 28-38.
- Anders CK, Carey LA (2009) Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2: S73-81.
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S (2003) Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet* 72: 1117–1130.
- Atkinson RL, Yang WT, Rosen DG et al (2013) Cancer stem cell markers are enriched in normal tissue adjacent to triple negative breast cancer and inversely correlated with DNA repair deficiency. *Breast Cancer Res* 15: R77.
- Avery-Kiejda KA, Braye SG, Mathe A et al (2014) Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 14: 51.
- Aydoğdu E, Katchy A, Tsouko E et al (2012) MicroRNA-regulated gene networks during mammary cell differentiation are associated with breast cancer. *Carcinogenesis* 33: 1502- 11.
- Baffa R, Fassan M, Volinia S et al (2009) MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol* 219: 214- 21.
- Barnes CJ, Kumar R. (2004) Biology of the epidermal growth factor receptor family. *Cancer Treat Res* 119: 1–13.
- Basu S1, Campbell HM, Dittel BN et al (2010) Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp*. 41.
- Beezhold K.J, Castranova V, Chen F (2010) Microprocessor of microRNAs: Regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol Cancer* 1: 134.
- Bhola NE, Jansen VM, Koch JP et al (2016) Treatment of triple-negative breast cancer with TORC1/2 inhibitors sustains a drug-resistant and notch-dependent cancer stem cell population. *Cancer Res* 76: 440- 52.
- Bucerius J, Ahmadzadehfar H, Biersack HJ (2012) *Tc-Sestamibi Scintimammography*. Editör: Jan Bucerius *Tc-Sestamibi: Clinical Applications*. Springer, Heilderberg, pp:88 .
- Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM et al (2015) Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 21: 1688– 98.
- Büssing I, Slack FJ, Großhans H (2015) microRNA-335 inhibits proliferation, cell-cycle progression, colony formation, and invasion via targeting PAX6 in breast cancer cells. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2008.07.001>
- Cai WY, Wei TZ, Luo QC et al (2013) The Wnt- β -catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J Cell Sci* 126: 2877- 89.
- Carey L, Winer E, Viale G et al (2010) Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 7: 683- 92.
- Carey LA. (2010) Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010. *Clin Breast Cancer* 10: 188–95.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J et al.(2008) *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. *J Clin Invest* 118: 3065– 74.
- Chacón RD, Costanzo MV (2010) Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: S3.
- Chang S, Sharan SK (2012) BRCA1 and MicroRNAs: Emerging Networks and Potential Therapeutic Targets. *Mol Cells* 34: 425– 32.
- Cheab B, Auguste A, Leary A et al (2015) The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer* 34 : 4– 16.
- Chen L, Song Y, Lu Y et al (2016) miR-335 inhibits cell proliferation, migration and invasion in HeLa cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 9: 10351- 62.
- Collins A, Politopoulos I (2011) The genetics of breast cancer: risk factors for disease. *Appl Clin Genet* 4: 11–19.

- Colotta F, Allavena P, Sica A et al (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30: 1073- 81.
- Craig DW, O'Shaughnessy JA, Kiefer JA et al (2013) Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. *Mol Cancer Ther* 12: 104-16.
- Creighton CJ (2012) The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics* 6: 289-97.
- Criscitiello C, Azim HA Jr, Schouten PC et al (2012) Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Suppl* 23: vi13- vi18.
- Davies C, Godwin J, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), et al. (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials *Lancet* 378: 771–84.
- Denkert C, Budczies J, Minckwitz G et al (2015) Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast* 24: S67–S72.
- Dey N, Barwick BG, Moreno CS et al (2013) Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis. *BMC Cancer* 13: 537.
- Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J (2014) Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther* 13: 1021- 31.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD (2010) Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1804: 433– 39.
- Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, et al (2011) Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *Natl Cancer Inst* 103: 1656–64.
- Drake RL, Vogl AW, Tibbitts AWM, Gray H (2005) *Gray's anatomy for students*. 1st edition, Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 353–356.
- Drake RL, Vogl AW, Tibbitts AWM, Gray H (2005) *Gray's anatomy for students*. 1st edition, Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 353– 56.
- Duffy MJ, Harbeck N, Nap M et al (2017) Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* 75: 284-298.
- Ellard SL, Clemons M, Gelmon KA et al (2009) Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND. *J Clin Oncol* 27: 4536– 41.
- Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G (2014) Human epidermal growth factor receptor (HER) family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Oncologist* 19: 135–50.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al (2014) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* DOI: 10.1002/ijc.29210, <http://globocan.iarc.fr> (21.04.17)
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB et al (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92- 105.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB et al (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92- 105.
- Gao Y, Zeng F, Wu JY et al (2015) MiR-335 inhibits migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein c-Met. *Tumour Biol* 36: 2875- 83.
- Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS (2012) Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol* 19: 39-53.
- Giltane JM, Balko JM (2014) Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med* 17: 275-83.
- Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ et al (2014) American Society of Clinical Oncology. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 32: 2078–99.
- Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI et al (2016) Extending aromatase-inhibitor adjuvant therapy to 10 years. *N Engl J Med* 375: 209–19.
- Gupta S, Sundaram C, Reuter S et al (2011) Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta* 1799: 775-87.
- Gut M, Leutenegger CM, Huder JB et al (1999) One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 77: 37- 46.
- Györfy B, Hatzis C, Sanft T et al (2015) Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* 17: 11.
- Habib JG, O'Shaughnessy JA (2016) The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med* 5: 2989-3006.
- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ et al (2009) MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol* 2009: 950201.

- Higa GM, Fell RG (2013) Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. *International Journal of Breast Cancer* 2013: 284036.
- Hoeflerlin AL, Chalfant CE, Park MA (2013) Challenges in the Treatment of Triple Negative and HER2-Overexpressing Breast Cancer. *J Surg Sci* 1: 3–7.
- Hoeflich KP, O'Brien C, Boyd Z et al (2009). In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res* 15: 4649– 64.
- Hon JDC, Singh B, Sahin A et al (2016) Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res* 6: 1864–72.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al (2013) SEER Cancer Statistics Review 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8578.00.pdf>
- Huelsken J, Behrens J (2002) The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115: 3977-8.
- Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K et al (2011) Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci* 102: 1615- 21.
- Jeffrey SS (2008) Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nat Biotechnol* 26: 400-1.
- Jézéquel P, Sharif Z, Lasla H et al (2015) Gene-expression signature functional annotation of breast cancer tumours in function of age. *BMC Med Genomics* 8: 80.
- Joensuu K, Leidenius M, Kero M et al (2013) ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer—Reduced CK5 Expression in Metastases. *Breast Cancer (Auckl)* 7: 23–34.
- Jokinen E, Koivunen . JP (2015) MEK and PI3K inhibition in solid tumors: rationale and evidence to date. *Ther Adv Med Oncol* 7: 170– 80.
- Kai M, Kanaya N, Wu SV et al (2015) Targeting breast cancer stem cells in triple-negative breast cancer using a combination of LBH589 and salinomycin. *Breast Cancer Res Treat* 151: 281- 94.
- Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K (2015) Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 14: 196–202.
- Kathryn J. Chavez, I Sireesha V et al (2010) Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* 32: 35– 48.
- Kendellen MF, Bradford JW, Lawrence CL et al (2014) Canonical and non-canonical NF-κB signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene* 33: 1297- 1305.
- Kimelman D, Xu W (2006) Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25: 7482– 91.
- Klara Dalva, Zafer Gülbaşı (2008) Akım sitometri uygulamaları. *Hematoloji Derneği - Molkelüler Hematoloji Kursu* s:44-52.
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H et al (2007) Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 9: R65.
- Kriegsmann M, Endris V, Wolf T et al (2014) Mutational profiles in triple-negative breast cancer defined by ultradeep multigene sequencing show high rates of PI3K pathway alterations and clinically relevant entity subgroup specific differences. *Oncotarget* 5: 9952– 65.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121: 2750– 67.
- Leung JK, Sadar MD (2017) Non-genomic actions of the androgen receptor in prostate cancer. *Front. Endocrinol* 8: 2.
- Li CI, Uribe DJ, Daling JR (2005) Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 93: 1046–52.
- Liao RS, Ma S, nMiao L et al (2013) Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. *Translational Andrology and Urology* 2: 187– 96.
- Liedtke C, Rody A, Gluz O et al (2015) The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 152: 667-73.
- Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC et al (2010) The canonical NFκappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res* 70: 10464- 73.
- Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B et al (2009) Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics* 2: 37.
- MacFarlane L, Murphy PR (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11: 537-61.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H et al (2010) Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy* 10: 955-960.
- Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB, (2009). *Human Anatomy*. 6th Edition, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, pp:1.

Massihnia D, Galvano A, Fanale D et al (2016) Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway. *Oncotarget* 7: 60712–22.

Matamala N, Vargas MT, Cámpora RG et al (2016) MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. *Oncotarget*. 7: 20068– 79.

Mathe A, Scott RJ, Avery-Kiejda KA (2015) miRNAs and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer. *Int J Mol Sci* 16: 28347–76.

Mayer IA, Arteaga CL (2016) The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Annu Rev Med* 67: 11-28.

McGuire A, Brown JAL, Malone C et al (2015) Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers* 7: 908-929.

Meng Y, Zou Q, Liu T et al (2015) microRNA-335 inhibits proliferation, cell-cycle progression, colony formation, and invasion via targeting PAX6 in breast cancer cells. *Mol Med Rep* 11: 379- 85.

Mutlu M, Saatci Ö, Ansari SA (2016) miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Scientific reports (Nature)* doi:10.1038/srep32541.

Nowacka-Zawisza M, Krajewska WM (2013) Triple-negative breast cancer: molecular characteristics and potential therapeutic approaches. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67:1090– 97.

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA et al (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 111- 22.

Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Vazquez-Martin A et al (2011) expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGFβ-induced oncomiR miRNA-181a. *Cell Cycle* 10: 1144- 51.

OpenStax CNX (2016) OpenStax Biology, Rice University <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@10.8>.

Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V et al (2005) Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 392: 249– 61.

Osborne CK (1998) Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 51: 227-38.

Paplomata E, O'Regan R (2014) The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *R Ther Adv Med Oncol* 6: 154- 66.

Patrick J. Lynch; illustrator; C. Carl Jaffe; MD; cardiologist (2006) Breast anatomy Yale University Center for Advanced Instructional Media.

Peng Y, Croce CM (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. doi:10.1038/sigtrans.2015.4

Perkins GH, Middleton LP (2003) Breast Cancer in men. *TheBMJ* 327: 239–40.

Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S (2015) Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat* 153: 477–91.

Pietri E, Conteduca V, Andreis D et al (2016) Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 23: R485-98.

Pires BR, DE Amorim ÍS, Souza LD et al (2016) Targeting cellular signaling pathways in breast cancer stem cells and its implication for cancer treatment. *Anticancer Research* 36: 5681- 92.

Pohl SÖG, Broo N , Agostino M et al (2017) Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis* 6: e310.

Polley MY, Leung SC, Gao D et al. (2015) An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol* 28: 778–86.

Pratt MA, Tibbo E, Robertson SJ et al (2009) The canonical NF-kappaB pathway is required for formation of luminal mammary neoplasias and is activated in the mammary progenitor population. *Oncogene* 28: 2710- 22.

Rahim B, O'Regan R et al (2017) AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 9: pii: E21.

Reis-Filho JS, Weigelt B, Fumagalli D (2010) Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Reis-Filho JS, Weigelt B, Fumagalli D, Sotiriou C Sci Transl Med* 2: 47-43.

Rizwan A, Bulte C, Kalaichelvan A et al (2015) Metastatic breast cancer cells in lymph nodes increase nodal collagen density. *Scientific Reports* 5: 10002.

Ross JS, Hatzis C, Symmans WF et al (2008) Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer. *Oncologist* 13:477-93.

Serguienko A, Grad I, Wennerström AB et al (2015) Metabolic reprogramming of metastatic breast cancer and melanoma by let-7a microRNA. *Oncotarget* 6: 2451- 65.

Serral V, Scaltriti M, Prudkin L (2011) PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 30: 2547– 57.

- Severi G, Baglietto L (2009) Breast cancer risk factors: a review of the evidence. National Breast and Ovarian Cancer Centre is funded by the Australian Government Department of Health and Ageing. Surry Hills, ISBN Online: 978-1-74127-141-6
- Shah SP, Roth A, Goya R et al (2012) The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486: 395–399.
- Shostak K, Chariot A (2011) NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res* 13: 214.
- Stegmaier P, Kel AE, Wingender E (2004) Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform* 15: 276-86.
- Sun X, Qin S, Fan C et al (2013) Let-7: A regulator of the ER α signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncology Reports* 29: 2079- 87.
- Tavazoic SF, Alarcón C, Oskarsson T et al (2008) endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451: 147- 52.
- Teo JL, Kahn M (2010) The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 1149– 55.
- Tomé M, López-Romero P, Albo C et al (2011) miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 18: 985– 95.
- Tran B, Bedard PL (2011) Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res* 13: 221.
- Tsutsui S, Ohno S, Murakami S (2003) Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. *Am J Surg* 185: 165-7.
- Vanitha MK, Sakthisekaran D, Anandakumar P (2014) Breast cancer: types, epidemiology & aetiology. *Adv J Pharm Life sci Res* 2;4: 29-38.
- Xu J, Prospero JR, Choudhury N et al (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS ONE* 10: e0117097.
- Yang B, Jia L, Guo Q et al. (2015) MiR-564 functions as a tumor suppressor in human lung cancer by targeting ZIC3. *Biochem Biophys Res Commun* 467: 690–696.
- Yang F, Cao L, Sun Z et al (2016) Evaluation of breast cancer stem cells and intratumor stemness heterogeneity in triple-negative breast cancer as prognostic factors. *Int J Biol Sci* 12: 1568– 77.
- Yersal O, Barutca S (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 5: 412–24.
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM et al (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11: 174–83.
- Zhao L, Vogt PK (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27: 5486- 96.
- Zhu J, Zheng Z, Wang J (2014) Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front Genet* 5: 149.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

KKH	: Kanser Kök Hücre
MKKH	: Meme Kanseri Kök Hücreleri
TNMK	: Triple negatif Meme Kanseri
ATP	: Adenozin Trifosfat
BRCA	: Meme Kanseri Geni
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
miRNA	: mikroRNA
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



8.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgisiyle yolumu aydınlatan, desteğini ve emeğini esirgemeyen, kendime inanmam için beni her zaman yüreklendiren değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e; yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hoşgörüsüyle aktaran, değerli zamanlarını ve emeklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Sn. Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya; eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve desteklerini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Işıl Ezgi ERYILMAZ ve Arş. Gör. Seçil AKSOY'a; yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarımla birlikte tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı personeline; hayatımın her aşamasında bana hep destek olan sevgili aileme ve Oral Ünlü'ye *teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.*

TÜBİTAK 115Z701 no'lu araştırma projesi kapsamında sağlanan burs ve maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

19 Ocak 1990 yılında Bulgaristan'da doğmuştur. İlköğrenimini Bursa Farabi İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. Ortaöğrenimine Bursa Cumhuriyet Anadolu Lisesi'nde başlamış ve 2008 yılında mezun olmuştur. 2009 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümüne başlamıştır. Lisans eğitimini Biyoloji bölümünün, Zooloji opsiyonundan mezun olarak tamamlamıştır. 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-115Z701) tarafından desteklenen “İleri Evre Meme Kanseri Kök Hücre Tedavisinde Let-7a ve miR-335 Temelli Yenilikçi Yaklaşımlar” adlı projede bursiyer olarak görev almaktadır.