



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

MEME KANSERİ GELİŞİMİNDE miRNA' LARIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ELİF ERTÜRK
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Bursa-2012



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ GELİŞİMİNDE miRNA' LARIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ELİF ERTÜRK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Bursa-2012

(Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından UAP(T)-2011/1 numaralı proje ile desteklenmiştir.).

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu tez, jürimiz tarafından
tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	
Üye	
Üye	
Üye	
Üye	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunun tarih,
sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

.....

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	IVV
SUMMARY	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	4
2.3. Meme Kanseri Moleküler Patolojisi	5
2.3.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli.....	5
2.4. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	6
2.4.1. Bazal Benzeri:	6
2.4.2. Luminal A:	7
2.4.3. Luminal B:	7
2.4.4. HER-2 Pozitif:.....	8
2.4.5. Normal Benzeri:	8
2.5. Meme Kanserinin Genetiği.....	9
2.5.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler.....	11
2.5.1.1. C-MYC:.....	11
2.5.1.2. RAS:	12
2.5.1.3. Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve İnhibitörleri:	12
2.5.1.4. VEGF:.....	13
2.5.2. Büyüme Faktörü Reseptörleri	13
2.5.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR):	14
2.5.2.2. Meme Kanserinde Önemli Sinyal İleti Yolları.....	16
2.5.2.2.1. Ras-Raf-MAP Kinaz Yolağı:.....	16
2.5.2.2.2. PI3K-Akt Yolağı:.....	17
2.5.2.2.3. JAK-STAT Yolağı:.....	19
2.5.2.3. CERBB-2 (HER-2/Neu):.....	20

2.5.3. Steroid Reseptörleri.....	22
2.5.3.1. Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR):	22
2.5.4. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler.....	23
2.5.4.1. TP53:	23
2.5.4.2. PTEN:	24
2.5.4.3. FHIT:	25
2.5.4.4. RB1:.....	26
2.6. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri.....	26
2.6.1. BRCA1 Geni ile İlişkili Meme Kanserleri.....	28
2.6.2. BRCA2 Geni ile İlişkili Meme Kanserleri.....	28
2.6.3. BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonuna Sahip Hastalarda Meme Kanserinin Özellikleri.....	29
2.7. miRNA' lar	30
2.7.1. miRNA' ların Yapısı ve Keşfi.....	30
2.7.2. miRNA' ların Oluşumu.....	31
2.7.3. RISC Yapısının Oluşumu.....	33
2.7.4. Pre-miRNA' nın Yapısı.....	33
2.7.5. miRNA' ların Fonksiyonu.....	34
2.7.6. miRNA' ların Çalışma Prensipleri	34
2.8. miRNA ve Kanser.....	35
2.8.1. Tümör Baskılayıcı miRNA' lar.....	37
2.8.2. Onkogenik miRNA' lar.....	37
2.8.3. Kanser Tanısında miRNA' lar.....	38
2.8.4. Kanser Prognozunda miRNA' lar	38
2.8.5. Tedavi ile İlişkilendirilen miRNA' lar	38
2.9. miRNA' ların Aktivitelerinin Kanserde Bozulma Mekanizmaları.....	41
2.9.1. miRNA Ekspresyon Düzeyinin Değişmesi:	41
2.9.2. miRNA İşlenmesinin Değişmesi:.....	41
2.10. miRNA' ların Çeşitli Kanselerdeki Rollerini	41
2.11. miRNA' lar ve Meme Kanseri.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Hasta Grubu	53

3.2. Gereçler.....	54
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	54
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	54
3.3. Yöntemler	55
3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi	55
3.3.2. Elde Edilen RNA' ların Miktar ve Kalite Tayini	55
3.3.3. RNA' lardan cDNA Sentezi.....	59
3.3.4. Real-Time PCR ile miRNA Ekspresyon Analizleri	59
3.3.5. RT-PCR Tabanlı miRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.....	62
3.3.6. miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi	62
3.3.7. İstatistiksel Analiz.....	63
4. BULGULAR	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	89
6. KAYNAKLAR.....	95
7. TEŞEKKÜR.....	111
8. ÖZGEÇMİŞ	112

ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda mikroRNA' ların işlevlerinin ve kanserdeki rollerinin anlaşılmasına başlanması, hem kanserin moleküler patolojisinin anlaşılmasında hem de yeni moleküler hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde umut olmuştur.

Çalışmada erken yaş ya da aile öyküsü olan ve *BRCA1/2* genlerinin mutasyon analizleri gerçekleştirilen toplam 60 meme kanserli hastanın tümör doku örnekleri ve ilgili hastaların 20' sinin normal doku örneklerinde; meme kanser gelişiminde diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilgili önemi olan 14 miRNA' nın (miR-21, miR-155, miR-145, let-7a, miR-10b, miR-125b, miR-221, miR-222, miR-205, miR-126, miR-206, miR-200c, miR-31, miR-335) ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler; Independent Samples T Testi, Kaplan Meier, Doğrusal Regresyon, Pearson Chi-Square ve Fisher's Exact Test' leri kullanılarak değerlendirildi. *BRCA* mutasyonu belirlenen erken yaş ve/veya ailesel meme kanserli hastalarda let-7a ve miR-335 ekspresyon seviyelerinde azalış belirlendi. Aynı zamanda azalışın, tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkisi değerlendirilerek istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.044$, $p=0.022$).

Elde edilen bulgular ışığında; *BRCA* mutasyonu taşıyan, kötü prognoz potansiyeli olan erken yaş ve ailesel meme kanserli hastalarda let-7a ve miR-335 ekspresyon düzeyleri değerlendirilerek tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi edinilebilir. Mevcut bulgular, diğer meme kanserli hastalar ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, farklı etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine katkı oluşturarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca elde edilen bulgular; *BRCA* mutasyonu taşıyan meme kanserli hastalarda, kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, mikroRNA ekspresyonu, *BRCA1/2* gen mutasyonları, RT-PCR.

SUMMARY

Investigation of the Role of MicroRNAs in Breast Cancer Development

Breast cancer is the type of cancer most frequently seen among women in the world. Recently understanding the functions of microRNAs and their roles in cancer progression has been providing expectations for understanding the molecular pathology of breast cancer and developing new molecular targeted therapies.

Samples were analyzed for the presence and differential expression of 14 miRNAs (miR-21, miR-155, miR-145, let-7a, miR-10b, miR-125b, miR-221, miR-222, miR-205, miR-126, miR-206, miR-200c, miR-31 and miR-335) known to be related to diagnosis, prognosis and drug resistance of breast cancer. Expression profiles of these miRNAs were evaluated for 60 familial and/or early-onset breast tumor and 20 non-tumor tissues of patients. In order to analysis of the data in the study Independent Samples t Test, Kaplan Meier Analysis, Linear Regression Analysis, Pearson Chi-square and Fisher's Exact Test were performed. According to these analysis, let-7a and miR-335 were significantly down-regulated in patients with *BRCA* mutations in early-onset and/or or familial breast cancer cases. In the same time, these decrease evaluated association with tumor growth and metastasis. It was found significant as statistically ($p=0.044$, $p=0.022$).

These data will be beneficial for evaluation of let-7a and miR-335 expression levels to obtain information about aggressiveness of tumor and metastasis risk in early onset and/or familial breast cancer patients with *BRCA* mutation. In addition, these results will contribute similar therapy approaches in other breast cancer patients, thus, patients survival rates and quality of their life may be improved. Moreover, our findings will be useful for the determination of biomarkers on the follow-up of poor prognosis in breast cancer patients with *BRCA* mutation that could contribute to the international and national literature.

Key words: Breast cancer, microRNA expression, *BRCA1/2* gene mutations, RT-PCR.

1. GİRİŞ

Son yıllarda mikroRNA' ların (miRNA) normal gelişimde ve hastalıklardaki rolü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar miRNA' ların birçok kanser türünde etkili oldukları yönünde ipuçları sağlamaktadır. miRNA' lar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili sorulara cevap olmaya aday gözükmektedir.

miRNA' lar, yaklaşık 22 nükleotit büyüklüğünde, RNA kodlamayan, çoğunlukla gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan moleküllerdir (1). miRNA' lar, mRNA' nın 3' Untranslated Region (3' UTR) bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bu transkriptlerin translasyonunu değişik mekanizmalar ile baskılar (2). miRNA' lar bu şekilde görev yaparak gen düzenlenmesinin bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara sebep olmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanserde miRNA ekspresyon profilleri değerlendirilmiş olup, bazı miRNA' ların ekspresyonlarının azaldığı bazılarının ise arttığı belirlenmiştir (3-6). Birçok kanser türünde bu çalışmaların tekrarlanması ve fonksiyonel analizler sonucu, ekspresyonu azalan miRNA' ların "tümör baskılayıcı" özellik gösterdiği ve genelde onkogenlerin transkriptlerini hedeflediği ve ekspresyonu artan miRNA' ların "onkogenik" özellik gösterdiği ve tümör baskılayıcı genlerin transkriptlerini hedeflediği sonucuna varılmıştır (7-10).

Meme kanseri ülkemizde kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir (11, 12). Son yıllarda kanser tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler elde edilmesine rağmen, meme kanserli hastaların dörtte biri bu hastalıktan dolayı yitirilmiştir. Meme kanseri moleküler patolojisi diğer kanser türlerine göre daha iyi açıklanmış olsa da halen cevaplanmayı bekleyen sorular bulunmaktadır. miRNA' lar bu boşlukları doldurmaya aday moleküller olarak gözükmektedir.

miRNA' ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bugün bilinmektedir. Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA' ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir (13). miRNA ekspresyon profilleri, tümörün terapiye vereceği cevabın önceden tahmin edilmesinde kullanılabilir. Ayrıca miRNA ekspresyon profilleri hastaların alt tiplendirilmesinde ve hastanın alternatif tedavi yöntemleri için uygun olup olmadığının saptanmasında fayda sağlayabilmektedir (14). Meme kanserinin de içinde bulunduğu

birçok kanser türünde en etkin tedavi yöntemini bulmak için farklı alt tiplerdeki tümörleri tanımlayan moleküler markörlerin bulunmasına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Son dönemde yapılan çalışmalar meme kanserlerinin sınıflandırılmasında ve hastalara uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesinde tümörün genetik profillerinin histolojik sınıflandırmaya göre daha etkin sonuç verdiğini göstermiştir. Ayrıca, aynı evredeki meme tümörlerinin uygulanan tedaviye farklı cevaplar verdiğini göstermiştir. Metastazın en güçlü belirleyicileri olan lenf nodu tutulumu, histolojik evre vb. tümörün klinik davranışlarına göre sınıflandırılmasında yeterli kadar güvenilir veriler sağlayamamaktadır. Bundan dolayı tümörlerin moleküler düzeydeki özelliklerinin bilinmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, meme ve over kanser gelişiminde etkili olan *BRCA1* ve/veya *BRCA2* genlerinde mutasyon taşıyıcısı olan hastaların tümörlerinin moleküler düzeydeki özellikleri bilinmemektedir. Bu amaçla planlanan çalışmada, Türk popülasyonuna ait *BRCA* mutasyonu belirlenen erken yaş ve/veya ailesel meme kanserli hastalarda meme kanser gelişiminde diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilişkili temel hücresel süreçlerde görev alabilecek miRNA'ların ekspresyon analizleri değerlendirildi. miRNA'ların seçim aşamasında, literatürde son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar değerlendirilerek meme kanser gelişiminde önemli diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilişkisi muhtemel 14 miRNA (miR-21, miR-155, miR-145, let-7a, miR-10b, miR-125b, miR-221, miR-222, miR-205, miR-126, miR-206, miR-200c, miR-31, miR-335) belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30' unu oluşturmaktadır. Ayrıca kansere bağlı ölümler içinde akciğer kanserinin ardından ikinci sırada gelmektedir (15, 16). Meme kanseri 30 yaşından önce nadir görülmekte olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir. Bu artış menapoz sonrasında da yavaş eğimle yükselmeye devam eder (17). Bu nedenle 85 yaşındaki her 9 kadından birinde meme kanseri gelişebileceği beklenmektedir (16, 18). Meme kanserindeki artış, tarama yöntemlerinin daha sık ve düzenli kullanılmasına bağlı tanı oranındaki artışa ve toplumların ortalama yaşam sürelerinin uzamasıyla hastalığın ileri yaş grubunda daha sık görülmesi ile açıklanmaktadır (19).

Küresel olarak yılda yaklaşık 1.3 milyon yeni vaka teşhis edilmektedir (20). Bununla beraber meme kanseri sıklık oranları dünyada coğrafik değişiklikler göstermektedir. İnsidans oranı, Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi gelişmiş bölgelerde; Afrika, Güney ve Doğu Asya' yı içine alan orta ve düşük gelirli diğer bölgelere oranla daha yüksektir (20). Bu durum, beslenme alışkanlıkları ile birlikte endüstrileşmiş modern yaşamda, kadınların mensturasyonunun daha erken yaşta başlaması, daha ileri doğum yaşı, oral kontrastif ve hormon replasman tedavisi, menapoz yaşının gecikmesi, uzamış yaşam beklentisi gibi değişikliklerin etkisinde kalmasına bağlanmaktadır (20). 1980' lerden itibaren hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri insidansı artmış olmasına rağmen, erken tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler ile bazı ülkelerde son yıllarda mortalitede azalma saptanmıştır (21).

Kadınlar için yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski yaklaşık 1/8' dir. Bu risk güçlü aile hikayesi olan ve Breast Cancer 1/2 (*BRCA1/2*) genlerinde mutasyon taşıyan bireylerde daha yüksektir. Bu genlerde gözlenen mutasyonlar kalıtsal yatkınlıkta büyük öneme sahip olup, kalıtsal meme kanserli hastalarda en sık rastlanan germline gen mutasyonlarıdır (20).

Meme kanseri erkeklerde de nadir görülmekle birlikte, her yıl yaklaşık 300 erkeğe meme kanseri tanısı konmaktadır. Erkeklerde görülen meme kanseri, tüm meme kanserleri içerisinde % 0.6 oranında görülürken, tüm maligniteler içerisinde ise %1' in altında görülmektedir (22).

Meme kansinimleri; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi, tedaviye yanıtlarına göre farklı özellikleri olan, heterojen ve karmaşık gruplara ait tümörlerdir. Bu farklılığın sebebi, hedef hücre (kanser hücresi) popülasyonundaki farklılık, farklı onkogen aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı gen fonksiyon kayıplarındaki değişik kombinasyonlardır (23).

Günümüzde meme kanseri tanısında hastanın yaşı, aksiller lenf nodu tutulumu, tümör büyüklüğü, histolojik evre ve invazyon gibi histolojik özellikleri, lenfovasküler, hormon reseptör durumu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (*HER-2*) ifadesi gibi farklı risk kategorisindeki hastalarda farklı kombinasyonlar halinde görülebilen faktörler kullanılmasına rağmen (24, 25), tümörün belirtilen klinik davranışlarına göre sınıflandırılmasında yeteri kadar güvenilir verilerin sağlanamaması, prognozun hastalığın daha erken evrede yapılabilmesinin gerekliliği ve aynı evredeki meme tümörlerinin uygulanan tedavi protokollerine farklı cevaplar vermesi, tedavi protokolünün belirlenmesinde tümörlerin moleküler düzeydeki sınıflandırmalarının gerekliliğini ortaya koymuştur (24).

2.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Histolojik olarak meme kansinimleri iki ana gruba ayrılır: İn situ kansinom ve İnvaziv kansinom. İn situ kansinomda epitelyal hücreler bazal membranla çevrili iken, invaziv (infiltratif) kansinomda ise neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya geçerler. Bu nedenle invaziv kansinimler, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. İnvaziv meme kansinimleri, morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilen tümörlerdir ve bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan karakteristik özellikleri vardır. Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özelliklerinin yanı sıra oluşturdukları yapısal farklılıklar da göz önüne alınmaktadır (26). Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütü' ne (WHO) göre histolojik olarak sınıflandırılması aşağıda görülmektedir.

1. İn situ kansinom
 - İn situ duktal kansinom
 - İn situ lobüler kansinom
2. İnvaziv kansinom

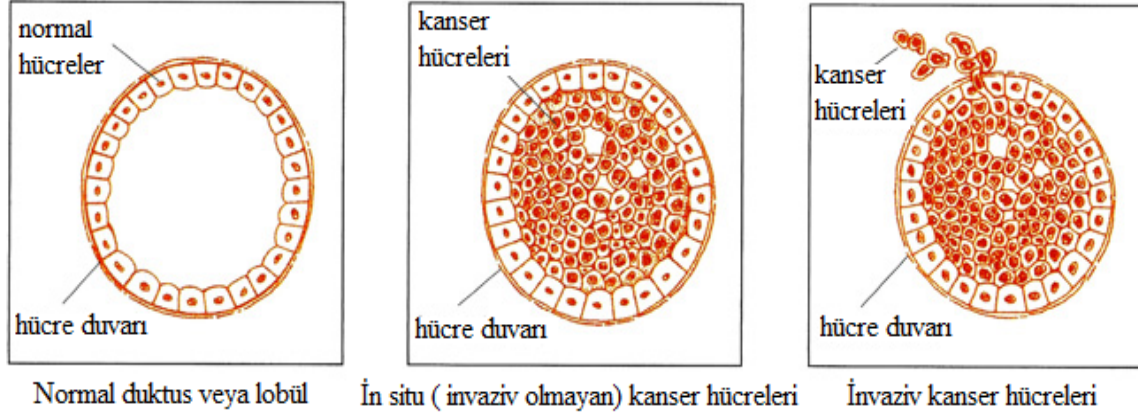
- İnvaziv duktal karsinom
- İnvaziv lobüler karsinom
- Tübüler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medüller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuar karsinom olarak sınıflandırılmıştır (26).

2.3. Meme Kanseri Moleküler Patolojisi

2.3.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli

Meme gelişimi embriyonik dönemde başlar. Duktal morfojeniz, tomurcuk benzeri yapıların dallanması, uzaması ve kanalize olması ile başlar. Yetişkin memesinde 2 temel hücre tipi ayırt edilebilir: Myoepitelyal hücre ve luminal salgı hücresi. Klinik ve histopatolojik olarak tümörün, benign formdan malign forma dönüşümü boyunca çeşitli adımlar tespit edilmektedir. Duktal hiperplazi, değişik şekil ve kromatin yapıdaki çekirdekler içeren, eşit biçimde dağılım göstermeyen epitelyum hücrelerinin proliferasyonu ile karakterizedir. Hücreler, nispeten daha az sitoplazmalı olup hücre kenarları belirsizdir. Sitolojik olarak hücreler benign formdadır. Hiperplaziden atipik hiperplaziye geçiş klinik olarak meme kanseri riskinin artması ile ilişkilidir. Bir sonraki aşama in situ duktal ya da lobüler karsinomun gelişmesidir. Bu aşamada, sitolojik olarak malign özellikteki hücrelerde artış görülmesine rağmen, henüz bazal membrandan stromaya invazyon gerçekleşmemiştir. Son aşamada ise, hücreler bazal membrandan ayrılır, stromayı işgal edip invaziv hale gelir (Şekil-1). İnvaziv hücrelerin, kan ve lenf damarları yoluyla yayılması ile, lokal-bölgesel lenf nodu ya da uzak organ metastazları gelişebilir. İnvaziv karsinomların büyük çoğunluğu duktal (%85-95' i) tiptedir. İnvaziv

lobüler karsinom ise tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10' unu teşkil etmektedir. Bu çok aşamalı modelin her aşamasında hücreye büyüme yönünde belli bir avantaj sağlayan bir genetik değişimin gerçekleştiği düşünülmektedir (27).



Şekil 1 Meme Kanserinin Gelişimi (24)

2.4. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

cDNA mikroarray yöntemi ile oluşan gen ekspresyon profillerine göre meme karsinomları; bazal benzeri, luminal A, luminal B, HER-2 pozitif ve normal meme benzeri olmak üzere 5 tipe ayrılmaktadır (Şekil-2). Bu ayırım temel olarak tümörün köken aldığı hücre tipine özgü genler ile belirlenmektedir (28-33).

2.4.1. Bazal Benzeri:

Tüm meme karsinomlarının %10-20' sini temsil etmektedir. En homojen alt gruptur. Normal meme bezlerinin bazal epitel hücrelerine benzer bir gen ekspresyon profilleri olduğu için bu adı almışlardır. *P53* gen mutasyonları görülmekle birlikte kalıtsal *BRC1* mutasyonu taşıyan bireylerde de bazal benzeri meme kanseri geliştiği bildirilmiştir (29, 34). Klinik olarak; erken yaş, tanı anında büyük tümör boyutuna sahip olunması, yüksek histolojik evre ve yüksek sıklıkla lenf nodu etkisinin görülmesi ile ortaya çıkmaktadır (32, 35). Bu tip, kısa relaps dönemi ve uzak metastaz varlığı ile karakterizedir (28).

İmmünohistokimyasal çalışmalar ile bazal benzeri grubu tanımlamada östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), HER-2, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve sitokeratin 5/6 (CK 5/6) olmak üzere 5 farklı belirtecin önemi ortaya çıkmıştır. Bu belirteçler ile % 76.38 hassasiyet ve % 100 spesiviteye dayalı sınıflandırma

yapılmaktadır (36). Prognoz açısından en kötü grup içerisinde HER-2 pozitif meme karsinomu tipi ile birlikte yer almaktadır. Bu iki grup karsinomda genelde östrojen reseptörü negatif olmakla birlikte, HER-2 pozitif olanlar trastuzumab (herceptin) tedavisinden faydalanırken bazal benzeri grupta hem hormon reseptörleri hem de *HER-2/Neu* onkogen ekspresyonu olmadığından (triple negatif: ER, PR ve HER-2 negatif) tedavi seçeneği kısıtlıdır. Bazal benzeri meme karsinomlarının tüm meme karsinomları içinde ortalama % 10' u oluşturdukları, ER negatif grupta % 30, triple negatif grupta ise % 50' den yüksek oranda yer aldıkları belirtilmektedir (32).

2.4.2. Luminal A:

Tüm meme kanserlerinin %50-60' ını temsil eden ve en yaygın görülen alt grubudur. Luminal B alt tipi ile birlikte luminal epital hücrelere benzer bir gen ekspresyon profilleri olduğu için bu ismi almışlardır (37, 38). Luminal A tümörlerin immünohistokimyasal profilleri, CK8/18, B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2), ER ve PR' nin ekspresyonu ile *HER-2* gen ekspresyonu yokluğu, düşük histolojik evre ve Ki67 proliferasyon indeksinin düşük oranı ile karakterizedir. Ayrıca, bu alt grupta T-hücreli spesifik transkripsiyon faktörü 3 (GATA3) belirtecinin ekspresyonu yüksek seviyelerdedir (39). Bu alt tipte *P53* geni wild type' dır ve çoğunlukla östrojen reseptör pozitifdir (29, 34). Meme kanserinin bu alt tipi iyi prognoz ile karakterize olup, diğer alt tiplere oranla daha düşük (%27.8) nüks oranına sahiptir. Ayrıca, hayatta kalma süresi de daha uzundur (ortalama 2.2 yıl). *BRCA2* mutasyon taşıyıcılarında Luminal A tip kanser gelişebilmektedir (28, 29).

2.4.3. Luminal B:

Luminal B tipteki tümörlerin moleküler profilleri, tüm meme kanserlerinin %10 ile % 20' si arasında değişiklik gösterir. Luminal A tümörler ile karşılaştırıldığında, daha agresif fenotipe sahip, yüksek histolojik evre, yüksek proliferasyon indeksi ve kötü prognoz ile karakterizedir. Uzak nüks bölgeleri farklı olmakla birlikte, hala en yaygın nüks yerleşim yeri kemiklerdir (% 30). Yüksek nüks oranına sahip bir diğer bölge de karaciğerdir (% 13.8). Ayrıca hayatta kalma oranı da düşüktür (1.6 yıl). Luminal A ve B' de ER ekspresyonu mevcuttur ancak luminal B' nin prognozu çok farklıdır. Bu yüzden 2 alt tip arasında belirleyici biyobelirteçleri bulmaya yönelik önemli çabalar harcanmaktadır. İki alt tip arasındaki temel biyolojik farklılık, Kİ67 ve SİKLİN-B1 proliferasyon genlerinin

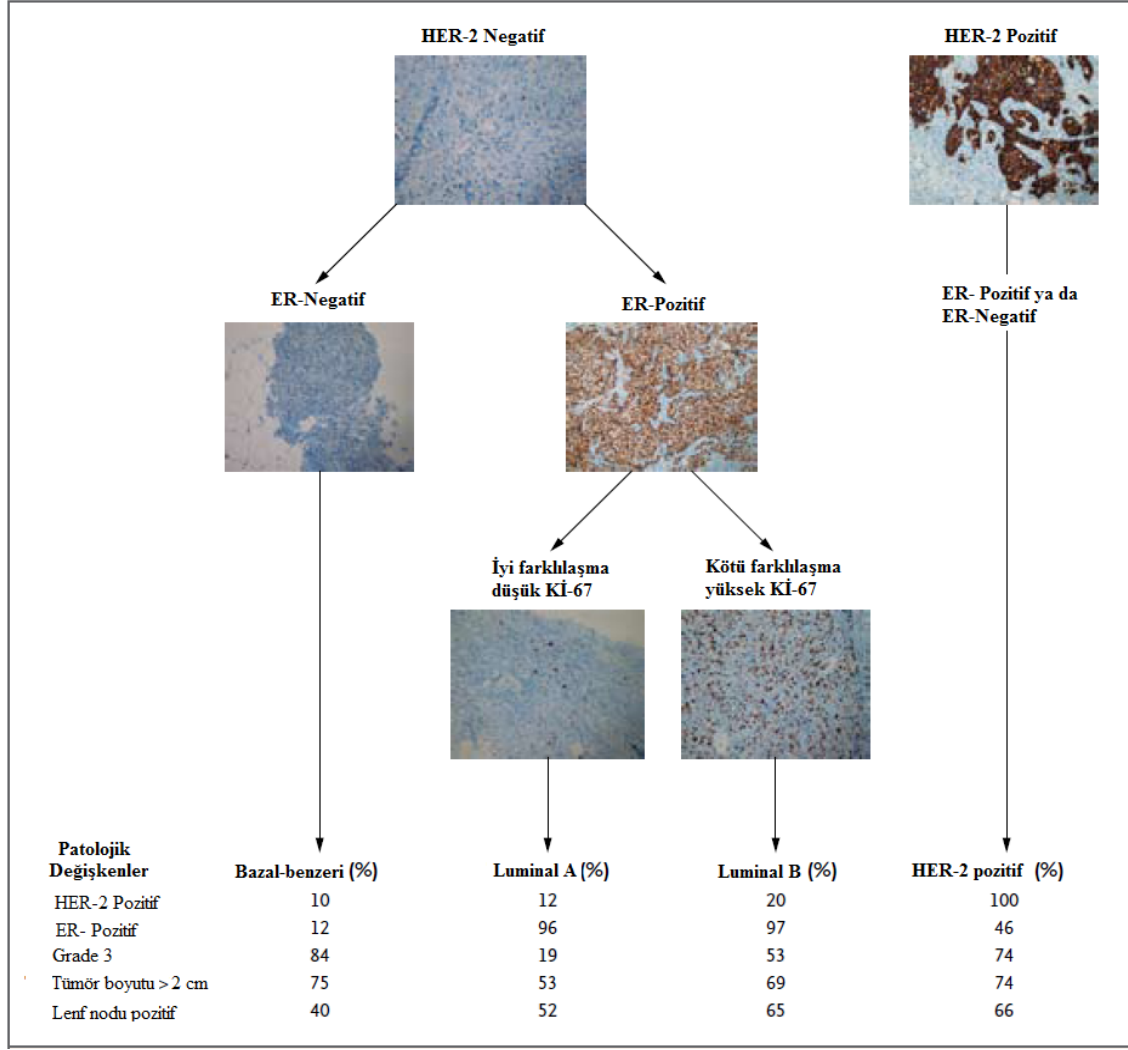
luminal B alt grubunda ekspresyonlarındaki artış ile *EGFR* ve *HER-2* genlerinin sıklıkla eksprese olmasıdır (39-41). Luminal B alt tipi, luminal A tipe benzemekle birlikte çoğunlukla östrojen reseptör pozitif olup prognostik olarak orta grupta sınıflandırılmaktadır. Tamoxifen ve aromataz inhibitörleri ile tedavi edilmesine rağmen, luminal B tümörleri, luminal A tümörlerinden daha kötü prognoza sahiptir. Meme kanserinin bu alt grubunun tedavisi halen zor olmakla birlikte, hayatta kalma mekanizmaları, proliferasyon ve metastaz durumu hakkındaki sorular cevapsız kalmaktadır (33, 40).

2.4.4. HER-2 Pozitif:

Bu alt tip, tüm meme kanserlerinin %15-20' sine karşılık gelmekte ve *ERBB-2* (*HER-2/Neu*) geninin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir (32). Bu grupta bazal benzeri tipte eksprese olan genler yerine, luminal tiplere karakterize genlerin düşük ekspresyonu mevcuttur. Prognozu kötüdür. Yaşam süreleri daha kısadır ve metastazları yaygındır (28). Morfolojik olarak, bu tümörlerde yüksek proliferasyon, %75 yüksek histolojik grade ve %40' dan daha fazla *P53* gen mutasyonu görülür. Meme kanserinin diğer alt sınıfları içerisinde, HER-2 overeksprese olan bu grubun çok güçlü prognostik değeri vardır. Klinik açıdan bakıldığında ise, HER-2 alt grubu kötü prognoz ile karakterize olmasına rağmen son on yıl içinde anti-HER-2 tedavisi ile hayatta kalma, sadece metastatik hastalıkta değil aynı zamanda hastalığın başlangıç aşamalarında da büyük ölçüde ilerlemiştir (42, 43).

2.4.5. Normal Benzeri:

Bu tümörler, tüm meme karsinomlarının yaklaşık %5-10' unu oluşturur. Zayıf karakterli olup, normal meme dokusu örnekleri ve fibroadenomlar ile aynı alt grupta yer alırlar (32, 37). Bu alt tip ile ilgili az sayıda çalışma olması nedeniyle klinik açıdan önemi geri kalmaktadır (28).

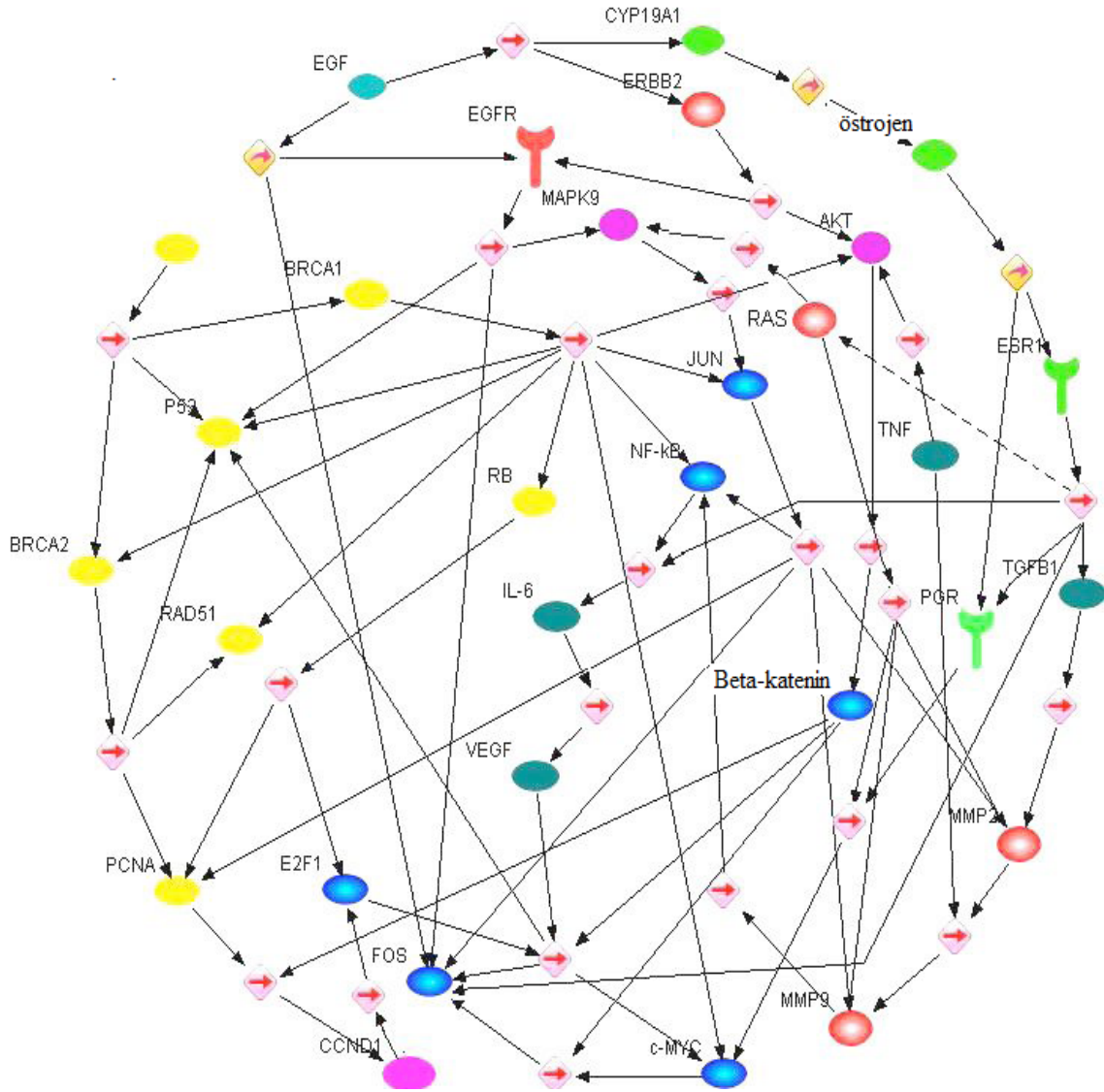


Şekil-2 Meme Kanserinin Klinikopatolojik Özellikleri ve Moleküler Sınıflandırılması (44)

2.5. Meme Kanserinin Genetiği

Meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişiminde rol oynayan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal ve kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri olarak isimlendirilirler. Onkogenler, normal işlevlere sahip protoonkogenlerden türevlenirler. Eğer bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse oluşan hasar genin, dolayısı ile gen ürününün yapısının

değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu karsinogenezde birbiriyle zıt etkilidir (Şekil-3). Onkogenler malign transformasyona neden olurken, tümör baskılayıcı genler hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (45, 46).



Şekil-3 Meme Kanseriinde Önemli Genler ve Etkiledikleri Sinyal Yolakları (47)

2.5.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler

Meme kanserlerinin yaklaşık % 25' i bazı onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen çeşitli değişimler sonucu ortaya çıkar. Meme kanserinde heterozigosite kaybı ve gen kopyalarının sayısındaki artış ile hiperplaziden in situ duktal karsinoma (DCIS) geçişte hatta daha ileri DCIS derecelerine geçişte ani artışlar gözlenir. Bu genetik değişimler tarafından etkilenen hücrel işlem yolları diğer birçok hücrel yol ile oldukça sıkı ilişkili olduğundan bu karmaşa nedeniyle teşhis ve tedavi uygulamaları da oldukça yavaş ilerlemektedir (48). Birçok onkogenin, farklı işlevleri ve hücrel lokalizasyonu ile insan meme karsinogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir. Onkogenlerdeki değişimler daha sıklıkla tümör invazyonu veya metastaz ile ilişkili olabilirler. Sporadik meme kanserlerinde onkogen amplifikasyonuna sıklıkla rastlanmaktadır. Ancak amplifiye genlerin sadece birkaçı meme kanser gelişimde önemlidir. Bunlar; *C-MYC*, *RAS*, *SİKLİN-D1* ve *HER-2*' dir. Meme kanserinin büyümesine ve proliferasyonuna EGF, TGF ve IGF-1 gibi büyüme faktörleri de dahil olabilir (27).

2.5.1.1. C-MYC:

C-MYC geni kromozom 8q24' e yerleşmiştir. *C-myc* proteini hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir. *C-MYC* geninin tümör işleyişinde ve karsinogenezde rolü olduğu düşünülmektedir (49). *C-MYC* gen amplifikasyonu, hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve P53' e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. *C-MYC* geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Karsinomların %32' sinde *C-MYC* protoonkogeninin 2-15 kat amplifiye olduğu, invazif duktal karsinomlarda ise *C-MYC* geninin yapısal değişiklikler taşıdığı gösterilmiştir. Berns ve arkadaşları (50, 51), özellikle nod negatif ve reseptör pozitif meme kanserli hastalarda *C-MYC* gen amplifikasyonunu kısa nüks-sağkalım ile ilişkilendirmişler ve *C-MYC* gen amplifikasyonunun primer meme tümörlerinde genel sağkalım için prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Popülasyon tabanlı bu çalışmanın aksine, *C-MYC* geninin amplifikasyonu agresif seyirli meme kanserlerinin bir göstergesidir ve kötü prognoz ile agresif klinik gidişe neden olan tümörlerde *C-MYC* amplifikasyonu gösterilmiştir. *C-MYC* ekspresyonu tek başına meme karsinogenez için yeterli olabilir.

Hatta C-MYC' in hormona yanıt vermemede veya kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu ileri sürülür. C-MYC gen amplifikasyonu meme kanserinde sıklıkla rastlanan genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3' ü bu genetik değişikliği taşır (46, 52, 53).

2.5.1.2. RAS:

Ras proteinleri (p21) 21 kD' dur ve G proteinleri ailesinden olup guanozin nükleozidlerini bağlama yeteneğindedir. Sinyal iletiminde önemli bir aracı moleküldür. Genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşirler. GTP ile aktifleşir ve protein kinazlar ile ilişkiye girerek mitoze geçişte rol alırlar. RAS' ın onkogenik özellik kazanması nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olur. Mutasyonların ve amplifikasyonun nadiren gözlenmesi, RAS gen aktivasyonunun diğer mutasyon mekanizmaları tarafından etkilendiğini gösterir (46, 54, 55).

2.5.1.3. Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve İnhibitörleri:

Siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitörleri (CDKI) hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinlerdir. Meme kanserlerinde Siklin-D1 ve Siklin-E' nin %30 oranında aşırı ekspresyonu saptanmıştır ve prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (56, 57). Meme kanserlerinde tespit edilen bir diğer gen, kromozom 9p21' e yerleşen CDK-2' dir. Meme kanseri hücrelerinde bu genin yerleştiği kromozom bölgesinin mutasyonu ve homozigot delesyonu bildirilmiştir (58). CDKI-4 (siklin bağımlı kinaz inhibitör-4) geninin ise delesyon ya da mutasyon taşıdığı bilinmektedir. Amplifiye siklinler onkogen gibi davranırken, siklin inhibitörlerinin de tümör baskılayıcı olma olasılığı yüksektir. CDK aktifleşince, Rb (retinoblastoma) ve diğer bazı nükleer proteinleri fosforiller ve G0 fazının geçilip hücrenin mitoze girmesi sağlanır (55, 57).

CDK' ların işlevleri siklinler tarafından düzenlenir. Siklin-D1 ve Siklin-E' nin ekspresyonlarındaki aşırı artışlar hücre döngüsünün kontrolünün bozulmasına yol açar. Hücre içinde yüksek Siklin-D1 düzeyi, hücrelerin G0 fazından G1 fazına geçişini sağlar. Siklin-D1, östrojene duyarlı hücrelerin proliferasyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. ER ve PR ekspresyon seviyeleri ile güçlü pozitif korelasyon gösterir. Siklin-D1 ekspresyonundaki artış, invaziv tip meme kanserlerinde %20-30 oranında gözlenir ve ER'

ü pozitif olan invaziv meme kanserli hastalar arasında prognostik faktör olarak kabul edilir. Siklin-D1 amplifikasyonu, erken nüks ve kötü prognoz ile ilişkili olup, olası prediktif değeri hormon reseptör pozitif hastalarda gösterilmiştir. Siklin-D1' in aşırı ekspresyonunun yanısıra amplifikasyonu, anti-östrojen tedavilerine yanıtı kötü yönde etkilemektedir (57, 59). Siklin-E gen amplifikasyonu ise birkaç meme kanser hücre hattında ortaya çıkmıştır. Bu da Siklin-E' nin tümörigenezde rol oynadığının güçlü bir kanıtıdır. Siklin-E' nin yüksek seviyelerdeki ekspresyonu, artmış proliferasyon indeksi ve ER pozitifliği ile yakın ilişkili bulunmuştur (57).

2.5.1.4. VEGF:

Anjiyogenez, önceden var olan bir damar ağından tümör büyümesi, invazyon ve metastaz için gerekli yeni kan damarlarının oluşumuna yol açan süreçtir. Deneysel ve klinik çalışmalar meme kanserinde tümörlerin anjiyogenez bağımlı olduğunu göstermektedir. Az sayıda yayınlanan çalışmalar, VEGF' nin relapsız sağkalım, genel sağkalım ya da her ikisi ile arasında anlamlı bir ilişkili olduğunu göstermiştir. Adjuvan tedavi almış, nüks ya da ölüm olasılığının yüksek olduğu meme kanserli hastalarda düşük anjiyogenik tümörlü hastalara kıyasla VEGF seviyeleri daha yüksektir (60).

Yapılan bir çalışmada, insan meme kanserlerinde Vegf protein ekspresyonu ile Vegf-B ve Vegf-C' nin düşük seviyelerde ekspresyonu izlenmiştir (61). Duktal karsinomlu 46 meme biyopsi örneğinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise anjiyogenez derecesi ve VEGF mRNA ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (62). Aynı grup araştırmacılar in situ duktal meme karsinomun yarısında VEGF' nin tümör hücrelerinde güçlü ekspresyonunu, invaziv karsinoma da ise VEGF ekspresyonunu güçlü ya da orta seviyede eksprese bulmuşlardır (63). Bu nedenle VEGF prognostik amaç için anjiyogenik aktivitenin önemli bir belirteci olabilir. *VEGF* gen ekspresyonunun regülasyonundaki değişikliklerden VEGF reseptör (*VEGFR*) genindeki mutasyonların sorumlu olduğu düşünülmektedir (63).

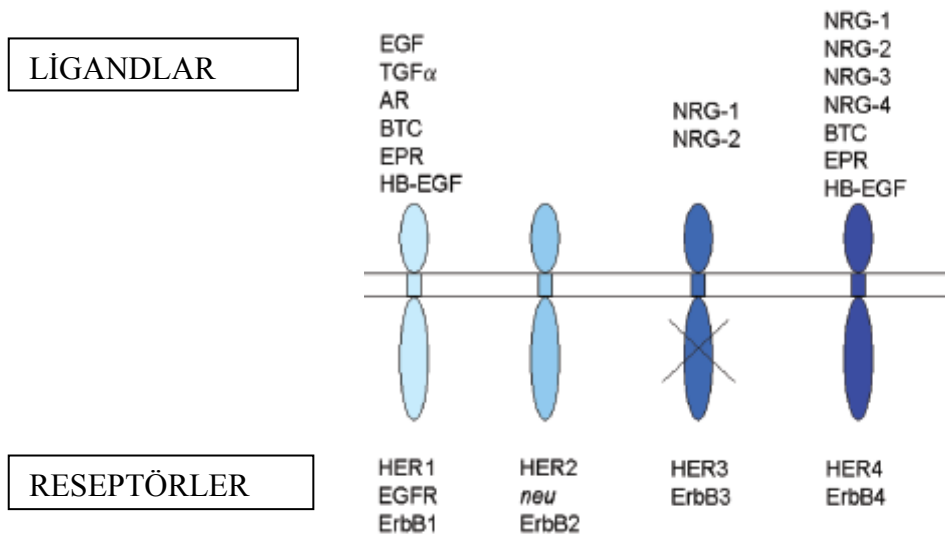
2.5.2. Büyüme Faktörü Reseptörleri

Hücrede kansere yol açan değişimlerin büyüme faktörü sentezinde artış ya da büyümeyi inhibe eden faktörlerin sayısında azalmaya bağlı olduğu iddia edilmiştir.

Başlıca büyüme faktörü aileleri; EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), TGF (Transforming Büyüme Faktörü), IGF-I (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1), IGF-II (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2), PDGF (Trombosit Türetilen Büyüme Faktörü) ve FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) aileleridir. Bu faktörlerin bağlandığı reseptör ailelerinin en önemlileri HER veya EGFR ailesi olarak bilinen reseptörlerdir (64, 65).

2.5.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR):

EGFR ailesi hücre membranında monomer olarak bulunan 4 adet reseptörden oluşur. Bunlar; EGFR (ERBB-1, HER-1), HER-2 (ERBB-2), HER-3 (ERBB-3) ve HER-4 (ERBB-4) olarak isimlendirilir (Şekil-4). Reseptörlerin hepsi hücre dışında yer alan bir ligand bağlayıcı bölüm, lipofilik bir transmembran bölümü ve tirozin kinaz (TK) içeren bir sitoplazmik bölümden (HER-3 hariç) oluşur (64, 65).

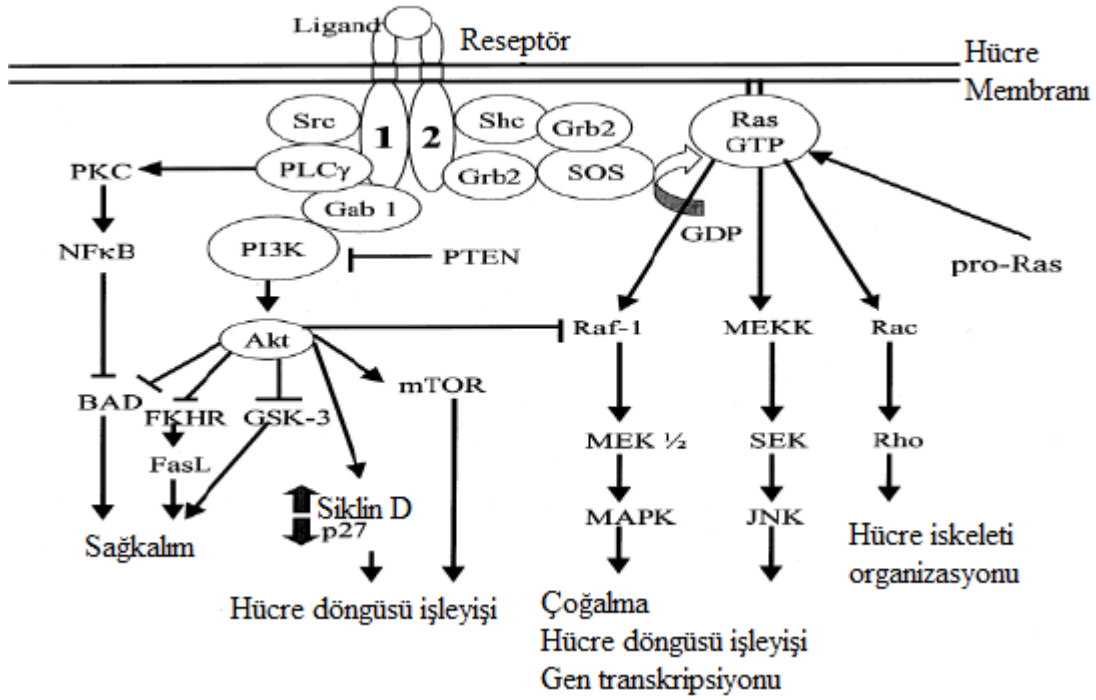


Şekil-4 ErbB Reseptör Tirozin Kinaz Ailesi (66)

Bugüne kadar HER-2' ye spesifik ligand bulunamamıştır (65, 67). Ligandlar bağlandıklarında reseptörler birbirleriyle homodimer veya heterodimer oluştururlar ve aktive olan reseptörün hücre içinde bulunan bölümündeki TK fosforillenir. Sonuçta nükleustaki transkripsiyon faktörlerine ulaşan bir ileti yolu çalışmaya başlar. HER-3 hariç hepsinin TK aktivitesi vardır. Ligandsız olan HER-2, gen amplifikasyonuna bağlı olarak hücre membranında fazlaca eksprese edildiğinde kendiliğinden dimerize olup sinyal ileti yolağını uyarabilir (68). Kanserlerin çoğunda HER-2' ye eşlik eden ikinci reseptör EGFR

(HER-1)' dir. *EGFR* gen amplifikasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu birçok karsinomda gösterilmiştir. İnsan meme kanserlerinin %16-48' inde *EGFR* overekspresedir. *EGFR* ekspresyonu, invaziv duktal karsinomda özellikle nod negatiflerde kötü prognoz ile ilişkilidir (69). ER negatif meme kanser hücrelerinde ise östrojenin yapacağı büyüme etkisi olmayacağı için *EGFR* ayrıca önem kazanmaktadır. *EGFR* ekspresyonu steroid reseptör ekspresyonuyla ters ilişkilidir. *EGFR*' nin ekspresyon seviyesindeki artışı veya amplifikasyonu ER ile ters orantılıdır. HER-2' nin aksine *EGFR*' nin artışı ortamda ligand yoksa hücrede uyarı yapmaz. HER-2' nin yer aldığı dimer kompleksleri, diğer HER komplekslerine göre daha aktiftir. Dimerizasyon sonrası reseptörlerin TK' ları fosforillenir ve böylece pek çok enzimin bağlanabileceği bölgeler açığa çıkar. Bunlara bağlanan enzim ve proteinler bir sinyal ileti zincirini başlatır. İleti en son nükleer transkripsiyon faktörlerine ulaşarak proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz gibi önemli olayları tetikler (70-74).

EGFR tarafından başlatılan en önemli iki yol PI3K ve MAPK' dır. Bu sinyal ileti yolları *EGFR* yolunu çeşitli basamaklarda uyarabilir veya engelleyebilir. Birçok kanser türünde, *EGFR* sinyal ileti yolağıyla ilişkili faktörlerin (ligand, protein, reseptör gibi) normalden fazla bulunduğu, fonksiyonunun arttığı veya yıkımının azaldığı gösterilmiştir. Bu da hücrelerin proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz potansiyelini arttırmaktadır. *EGFR* ileti yolunun fazla çalışmasının kötü prognostik bir faktör olduğu, metastatik ve invaziv potansiyelin yanısıra endokrin tedaviye dirençle ilişkili olduğu ve daha az diferansiye ve daha yüksek evreli tümör gelişimine neden olduğu yönünde bildirimler mevcuttur. Ayrıca, *EGFR* yolağı Siklin-D artışına da neden olur. Apoptozu baskılayarak tümör hücrelerinin yaşamının uzamasına yol açar. Diğer bir ifadeyle *EGFR* aktivitesinde artış; hücre siklusunun işleyişi, anjiyogenezin artışı, apoptozun ve tedaviye yanıtın azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. *EGFR*' nin görev aldığı sinyal ileti yolağı şekil-5' de gösterilmiştir (73).



Şekil-5 EGFR Sinyal Yolağı (73)

Reseptörlerin hücre içi bölümleri hangi alt ileti yollarının uyarılacağını belirler. Örneğin HER-1' in hücre içi kısmında PI3K için bağlanma bölgesi olmadığından diğer HER' lere göre daha zayıf PI3K aktivasyonuna yol açar. Belli başlı saptanan diğer yollar ve özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

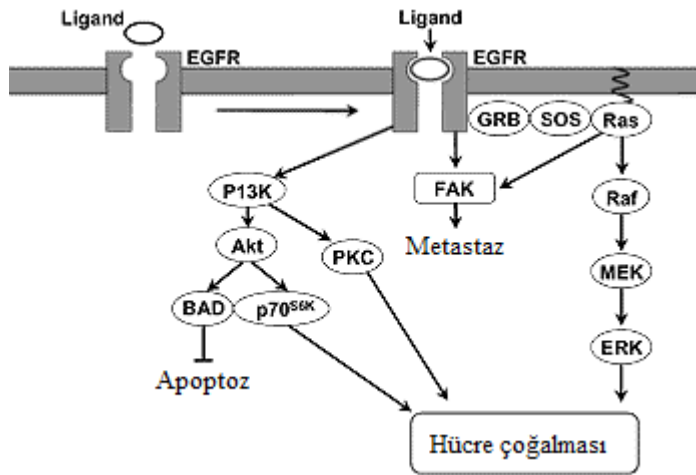
2.5.2.2. Meme Kanserinde Önemli Sinyal İleti Yolları

2.5.2.2.1. Ras-Raf-MAP Kinaz Yolağı:

Bu yolağın merkezi elemanları, çok sayıda büyüme faktörü ve diğer sinyal iletimi molekülü uyarımına yanıt olarak aktive olan, MAP kinazlar denilen bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir. MAP kinazlar hücrede büyüme, farklılaşma, apoptoz ve yapısal organizasyonda rol alırlar. Hücre içi ve dışı sinyallerle uyarılabilirler. MAP kinazlar ilk olarak ERK ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır. ERK yolağı aktivasyonu Ras olarak adlandırılan GTP bağlı protein tarafından başlatılır. Ras aktivasyonu, bir protein-serin/treonin kinaz olan Raf aktivasyonuna yol açar. Aynı zamanda Ras, MEK' i (MAP kinaz ya da ERK kinaz) fosforiller ve aktifleştirir. Bu da tirozin ve treonin kalıntılarının

fosforilasyonu ERK' i (hücre dışı sinyalin düzenlediği kinaz) aktive eder. Aktif ERK, transkripsiyon faktörü Elk-1' i fosforilleyeceği çekirdeğe gider. Aktif Elk-1 ise SRE' ye bağlanarak SRF ile bir kompleks oluşturur ve gen uyarımı olur (75, 76).

Mutasyona uğramış aktif Ras proteinleri insan kanserlerinin %30' unda saptanmıştır. Hedefe yönelik tedavilerde bu basamak araştırma konusu olmaktadır. MAPK yolağı; mitojenler, büyüme faktörleri ve tümör oluşumunu kolaylaştırıcı etkenlerle aktive edilir. Diğer Ras sistem yolakları ise sitokinler, hormonlar ve çeşitli uyarımlarla uyarılırlar. Meme kanserinde EGFR yolağıyla ER arasında kesişme noktası olarak bu sinyal ileti yolağı endokrin direncinin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. MAPK yolağı ER tarafından aktive edilen bir kinaz yolağıdır ve fosforile MAPK endokrin tedaviye kısa süreli cevap ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir (77). Şekil-6' da Ras-Raf-MAP Kinaz sinyal ileti yolağı görülmektedir.



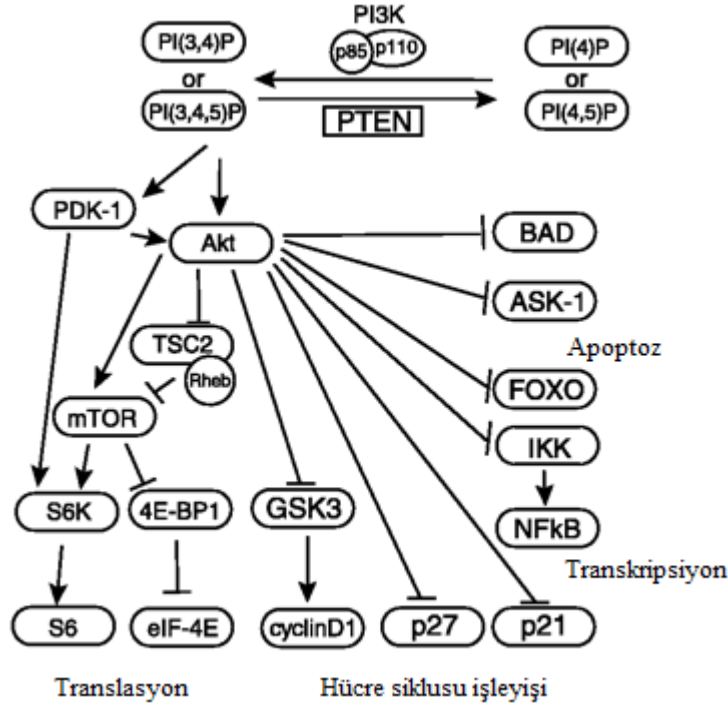
Şekil-6 MAPK Sinyal Yolağı (78)

2.5.2.2.2. PI3K-Akt Yolağı:

Ana hücre içi sinyal iletimi yolaklarından birisidir. PI3-kinaz enzimi ile başlatılan hücre sağ kalımının uyarılmasından sorumludur ve protein tirozin kinazlar ya da G proteini eşlikli reseptörler tarafından aktive edilir. PI3K, dimerik özellikte olan düzenleyici bir p85 ile, ERBB reseptörü için spesifik bağlanma bölgesi içeren katalitik bir kinazdır. Malign transformasyonun birçok basamağında etkilidir. Proliferasyon artışı, büyüme, invazyon, metastaz, anjiyogenez ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde görev alır (79).

PI3K; hücre yüzeyindeki reseptörler (TK aktivitesi olanlar), tirozinle fosforillenmiş proteinler ve Ras proteini tarafından aktive edilir (80, 81). PI3-kinaz, PIP₃ oluşumu için bir zar fosfolipidi olan PIP₂' yi fosforiller. Bu da bir protein-serin/treonin kinaz olan Akt' yi aktive eder. Böylece Akt apoptozu düzenleyen çok sayıda protein fosforiller. Akt' nin hedefleri apoptoz baskılayıcılarıdır. Akt; Pdk1, Pdk2, Ras gibi proteinlerin aktive edilmesinde rol oynar ve apoptoz (p21, p27, Nf-kB, Kaspazlar ve Bad) ve hücre siklusunun progresyonunda görevli proteinlerin (Siklin-D ve EF2) fonksiyonlarını düzenler. Ek olarak Akt, kendi hedef genlerinin hem transkripsiyonunu hem de translasyonunu düzenleyerek apoptozu etkileyen bir diğer protein kinazı (GSK-3) fosforiller. Bu yüzden PI3-kinaz/Akt yolu, birçok hedef yoluyla hücre sağkalımını düzenler (82-84).

Akt2 ve Akt3 meme kanserinde tespit edilmiştir (85, 86). AKT sinyal yolağının inhibisyonu, meme kanserinde endokrin tedavinin etkinliğini arttırabilir. AKT aktivasyonu ise metastatik meme kanserlerinde endokrin direncini indükler. PI3K, EGFR sinyal ileti yolunun bir alt yolağı olan Ras-Raf-MAPK ile de ilişkilidir (87). PI3K, hücrede Akt aracılığıyla proliferasyon, büyüme, apoptoz gibi birçok fonksiyonu düzenler. PTEN, tirozin fosfataz olarak bilinen tümör baskılayıcı bir proteindir ve PI3K yolağındaki 3-fosfoinozidleri yıkar (88). Birçok kanser türünde *PTEN* geninde oluşan mutasyon veya delesyon PTEN inaktivasyonuna, o da hücrede PI3K birikimine neden olur. Böylece hücrel aktivasyon artar (89). Şekil-7' de PI3K sinyal ileti yolağı görülmektedir.



Şekil-7 PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı (90)

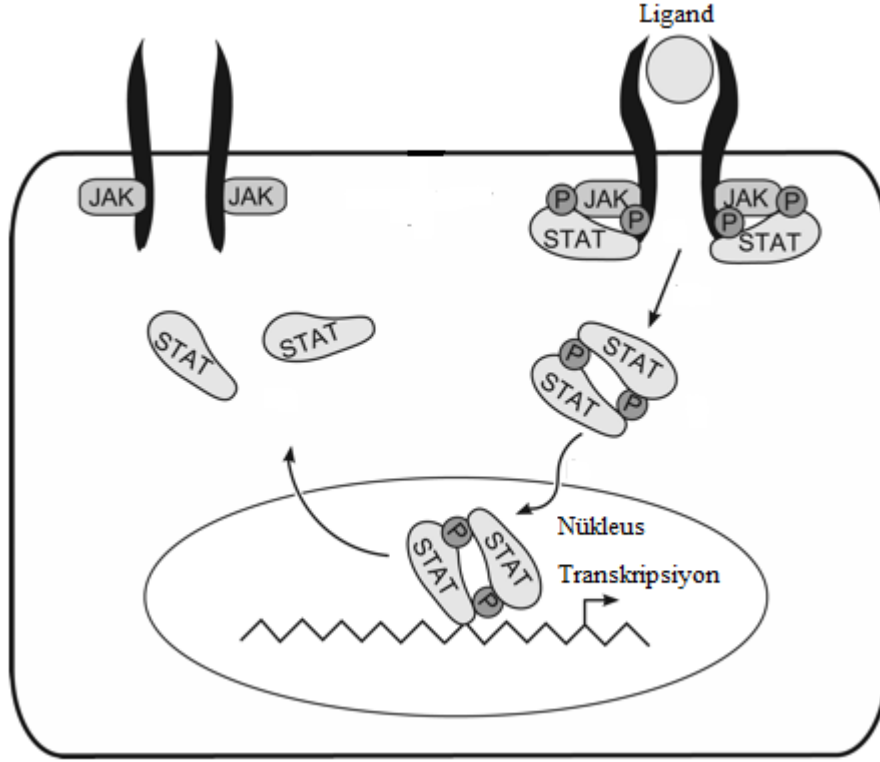
2.5.2.2.3. JAK-STAT Yolağı:

Jak-Stat yolu, doğrudan transkripsiyon faktörlerinin etkilediği protein-tirozin kinazlar ve transkripsiyon faktörleri arasında sıkı bir bağlantı sağlar. Bu yolda, protein-tirozin fosforilasyonu transkripsiyon faktörlerinin yerleşimini ve fonksiyonlarını direkt olarak etkiler.

Stat proteinleri, bir SH2 (fosfotirozin içeren dizilere bağlanmasını sağlayan bölgeler) bölümü olan ve inaktif durumda sitoplazmada bulunan transkripsiyon faktörleridir. Ligand bağlanmasıyla bir reseptörün uyarılması Stat proteinlerini devreye sokar. Stat proteinleri, SH2 bölümleriyle Jak protein-tirozin kinazın sitoplazma bölümüne bağlanır ve fosforile olur. Fosforillenmiş Stat proteinleri dimerize olur ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ettikleri çekirdeğe taşınırlar.

Bu proteinler sinyalin güçlenmesi ve dönüşümünde rol alırlar. Memeli hücrelerinde Stat proteinleri, 1-2-3-4-5a-5b-6 olarak adlandırılan bir aileye sahiptirler. Normal hücresel süreçte embriyonik gelişim, organogenez, immün fonksiyon, hücre farklılaşması, büyüme ve apoptozda görevlidirler. Normal koşullarda aktivasyonları geçici ve kısa sürelidir. Stat1, Stat3 ve Stat5 özellikle kanser hücrelerinde aktivasyonu saptanan

(bazı çalışmalarda Stat1' in tümör baskılayıcı özellik gösterdiği bildirilmiştir) proteinlerdir (91-94). Meme gelişiminde ve karsinogenezinde Stat3 ve Stat5' in önemli rol oynadığı savunulmaktadır (95). Stat ve Jak ailesi üyelerini içeren Jak-Stat sinyal ileti yolağı şekil-8' de görülmektedir.



Şekil-8 JAK-STAT Sinyal Yolağı (96)

2.5.2.3. CERBB-2 (HER-2/Neu):

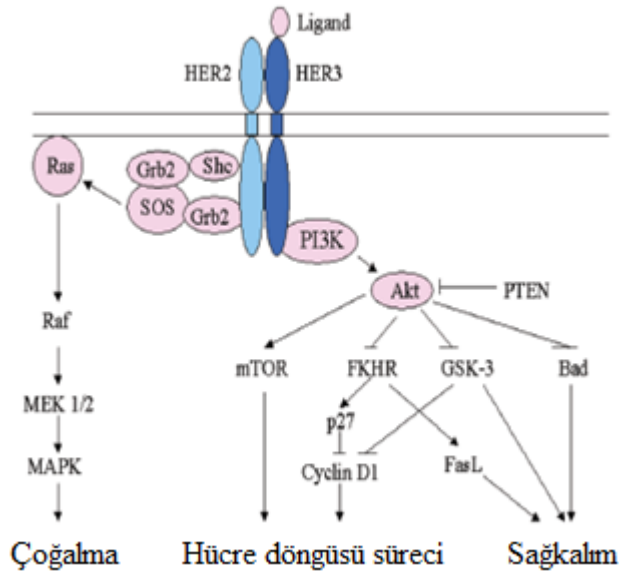
HER-2/Neu, diğer adı ile *CERBB-2* veya *P185* olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q12' ye yerleşmiş olup, protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Meme kanserlerinin %25' inde ERBB-2' nin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir (27). Gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogenezinde katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir (97, 98).

İn vitro çalışmalar, HER-2 overeksprese olan meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda (%92) *HER-2* gen amplifikasyonunun olduğunu göstermiştir. *HER-2* gen amplifikasyonu gösteren tümörler kötü prognoz ile koreledir. Mevcut kanıtlar, HER-2 amplifikasyonu/overekspresyonu ile özellikle nod pozitif hastalarda hastalısız ve genel

sağkalımın azalması arasında ilişki olduğunu destekler. ERBB-2 aktivasyonu, D-tipi siklinlerin ekspresyonu ile p21 ve p27 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin düzenlenmesini sağlar (99, 100).

HER-2 over ekspresyonu genellikle daha agresif özellik gösteren, kötü prognoza sahip, metastaz kapasitesi yüksek, standart kemoterapiye dirençli, daha kısa sürede relaps ile ilişkili olabilen tümörlerde görülmektedir. HER-2 reseptörü overeksprese olan meme tümörlerinde, Her-2 proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahip bir monoklonal antikor olan herceptin kullanılır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda HER-2 pozitif olan metastatik meme kanserli hastalarda herceptin ile klinik olarak anlamlı yararlar sağlanmaktadır. Ayrıca meme kanserli hastalarda klinik denemeler sonucunda HER-2 pozitifliği ile tamoxifen ve diğer endokrin tedavilerine yanıt arasında da önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir (101).

ERBB-2' nin aşırı ekspresyonu hücre döngüsü kontrol noktalarının da bozulmasına sebep olur. Özellikle G1/S noktası ERBB-2' ye bağlı yollarla kontrol edilir. Bu yollar Ras/ERK, p38MAPK ve PI3K' dır (Şekil-9). Son yapılan çalışmalarda, ERBB-2' nin hücre yolaklara ihtiyaç duymadan nükleusa geçerek transkripsiyon kompleksinin bir parçası olarak görev yapıp hücre fonksiyonları yerine getirdiği öne sürülmüştür (102, 103).



Şekil-9 ERBB Sinyal Yolağı (66)

2.5.3. Steroid Reseptörleri

2.5.3.1. Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR):

Meme dokusu ve kanserli hücrelerin büyüme ve gelişmesini östrojen hormonu sağlar. Çoğu meme kanseri dokusu bu hormonu hücreye bağlayacak reseptöre sahiptir ve bu tip hastalar endokrin tedaviye olumlu cevap verirler. Tümörün prognozu açısından ER tayininin daha güvenilir olması için östrojen ile düzenlenen PR protein düzeyine de bakılır. Meme kanserinde bilinen prognostik faktörlerin en önemlisi, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörüdür. ER ve PR gen regülasyonunda iş gören reseptörlerdir. ER ekspresyonu, endokrin tedaviye duyarlılıkta güçlü bir belirleyici olduğundan meme kanserinde şüphesiz çok önemli bir biyomarkırdır (104).

Primer meme kanserlerinin ortalama %55-65' i, meme kanseri metastazlarının ise yaklaşık %45-50' si östrojen reseptörü ihtiva ederken, primer ve metastatik meme kanserlerinin yaklaşık %45-60' ı progesteron reseptörüne sahiptir. Östrojen pozitif hastalarda tedaviye yanıt %70 iken reseptör negatif hastalarda ise %5' dir (105, 106).

Meme kanserli ER pozitif dokularda, PR de pozitif bulunur. Düşük gradeli tümörlerde ER ve PR pozitiftir. Yüksek gradeli tümörler ise her iki reseptör için negatiftir. ER ve PR pozitifliği postmenopozal dönemde, premenopozal dönemden daha fazladır. PR pozitif hastalar tedaviye iyi cevap verir ve nüks ortaya çıkanlarda klinik prognoz daha iyi olacağı söylenir. Hormona bağımlı meme kanserlerinde ER ve PR' nün aktivasyonu normale göre daha fazladır. Hormona cevapsız olanlarda, reseptörde bir mutasyon veya reseptör kontrolündeki bir proteinin etkisi veya reseptör izoformlarının farklı seçiminden kaynaklanan bir durum söz konusudur (107-111).

ER pozitif tümörler ER' e ligandı olan östrojenin bağlanmasını engelleyen ajanlarla tedavi edilebilir. Ancak tümör bu ajanlara karşı direnç geliştirebilir. Genelde bu direnç gelişimini takiben EGFR ve ERBB-2 (HER-2/Neu) tarafından kinaz yollarının uyarılması görülür. Hormon reseptörlerinin pozitifliği, hormon tedavisi ve kemoterapiye cevap ile ilişkili olduğundan meme kanserlerinde tedavinin düzenlenmesi için östrojen ve progesteron reseptörlerinin belirlenmesi günümüzde standart bir çalışmadır. Normalde, ER ve PR pozitif olan meme kanserinin tamoksifene yanıt verme olasılığı % 80' ler civarındayken, ER pozitif ancak PR negatif olan tümörlerde bu oran %40' lara kadar düşebilir. ER ve PR, onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıflarına dahil edilemezler

ancak meme kanserinin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde aracı rol oynadıklarından kanser genleri gibi düşünülebilirler (55).

2.5.4. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör gelişiminde rol oynayan ikinci temel mekanizma tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılayıcı yönde etki eder. Birçok tümör bu genlerde oluşan hasar veya delesyonlar nedeniyle genin işlevini yitirmesi sonucunda ortaya çıkar. Tümör baskılayıcı genler tarafından sentezlenen proteinler hücredeki önemli efektör proteinlere bağlanarak bunların işlevini engeller. Baskılayıcı proteinin sentezlenememesi veya inaktivasyonu, bağlandığı proteinin serbest kalarak aktivitesini sürdürmesi ile sonuçlanır.

2.5.4.1. TP53:

P53, *TP53* geni tarafından kodlanır. 17. kromozomun p13-1 bölgesine lokalizedir. 11 ekzondan oluşmakta olup 20kb' ı kapsamaktadır. Sırasıyla p63 ve p73' ü kodlayan, *TP63* ve *TP73* genlerinin de dahil olduğu büyük ölçüde korunmuş gen ailesi sınıfına aittir (112). *P53* geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir. Dokuda mutant P53 pozitifliğinin tespiti %80-90 oranında meme kanserlerini doğrular. Meme kanserlerinin %20-30' unda da P53 inaktivasyonu gözlenir.

Meme kanserlerinde P53' ün yaklaşık %60' ının nokta mutasyonu şeklinde bulunduğu ve *P53* geni mutasyonlarına birçok kanser tipinde kimyasal kanserojenlerin neden olduğu ileri sürülmüştür (113-116).

Meme kanserlerinde 17p' nin kaybı ile malign histopatolojik özellikler arasında yakın ilişki vardır (113-116). Meme kanserlerinde aşırı p53 protein üretimi kötü prognoz için bir indikatördür. Meme kanserlerinde yapılan çalışmalar, P53 ekspresyon düzeyi ile yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, aneploidi ayrıca ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu fikrinde birleşilmiştir. Bu parametreler kısa ömür ile ilişkili olduğundan P53 pozitifliği kötü prognoz ile de yakın ilişkilidir. Teşhis sırasında lenf nodu metastazına sahip olanlar kadar genelde tüm hastalarda kısa yaşam süresi ve hastalığın gözlenmediği aralıklar ile P53 ekspresyon düzeyi arasında prognostik bir anlamlılık bulunmuştur (116).

P53 mutasyonlarının tespiti *in situ*' dan invaziv karsinomaya geçiş için bir belirteç olarak kullanılabilir. *In situ* duktal karsinomlarda P53 mutasyonu belirlenmediği, buna karşılık meme karsinogenezinin erken evrelerinde P53' ün mutasyona uğradığı bildirilmiştir. P53 mutasyonlarının invaziv meme kanserlerinin gelişiminden önce ortaya çıktığı, özellikle yüksek histolojik dereceli DCIS' de hastalığın önlenmesi ve tedavisi için önemli bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir. Primer meme kanserli vakalarda P53 ekspresyon düzeyi %15 oranında pozitif saptanmış, ER negatif meme kanserli vakalarda ise P53 ekspresyon seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve P53' ün meme kanserinin prognozundaki önemi belirtilmiştir (115). Primer meme kanserli örneklerde %52' ye varan P53 mutasyonu ya da p53 protein over ekspresyonu gözlenmesi ve P53' ün özellikleri ile ilgili bilgilerin artması ile son yıllarda P53 kullanımına yönelik çalışmalar ortaya çıkmıştır. Yapılan bu çalışmalarda hastalığın ilerlemesi, hastalık sonucu, tedaviye yanıt, tümör gelişimi ile mutant P53 ekspresyonu arasındaki ilişkilere bakılarak P53' ün potansiyel bir biyomarkır olarak kullanılabildiği belirtilmektedir (112).

2.5.4.2. PTEN:

PTEN geni, birçok insan tümör tipinde heterozigosite kaybı sıklığı ile karakterize bir genomik bölge olan 10q23.3 kromozomal bandı üzerinde lokalize, 403 aminoasit içeren bir tümör baskılayıcı gendir. *PTEN* geninin somatik delesyon ve/veya mutasyonları bazı tümör tiplerinde oldukça sık olarak görülürken bazı tümör tiplerinde ise daha az sıklıkla görülmektedir. Somatik mutasyonun sık olarak görüldüğü tümörler; endometrium kanseri (özellikle endometrioid tip), malign melanom, meme kanseri, ileri evre glioblastoma, metastatik prostat kanseri, tiroid ve böbrek kanserleridir. Somatik mutasyonlar sporadik gelişen meme kanserlerinde nadir görülmekle birlikte *PTEN* genindeki germline mutasyonlar meme kanserine neden olmaktadır (27).

Literatürde bildirilmiş çeşitli neoplazilerdeki *PTEN* mutasyonlarının derlendiği bir çalışmaya göre, genetik anomalilerin başında frameshift ve missense mutasyonlar ile homozigot gen kayıpları gelmektedir (117). Depowski ve arkadaşlarının (118) çalışmasında, primer meme karsinomlu 151 hastada (ortalama yaş 62) immünohistokimyasal yöntemle Pten protein ekspresyonu değerlendirilmiş ve sonuçlar klinikopatolojik parametrelerle korele edilmiştir. Ortalama takip süresi 56 ay (1-169 ay) olan tüm grupta vakaların 73' ünde (%48) Pten protein ekspresyonunda kayıplar

saptanmıştır. İstatistiksel analizlerde, hastalığa bağlı ölüm ile evre, lenf nodu metastazı ve PTEN ekspresyon seviyesindeki düşüş arasında korelasyon belirlenmiştir. Pten protein ekspresyonunda kayıp ise lenf nodu tutulumu ve östrojen reseptör kaybı ile korelasyon göstermiştir. Bose ve arkadaşlarının (119) yürüttüğü bir başka çalışmada ise, immünohistokimyasal olarak PTEN genotip moleküler durumu bilinen 34 invaziv ve 18 in situ meme karsinomlu vakada Pten protein ekspresyonuna bakılmış, invaziv meme karsinomlu hastaların %38' inde, in situ kanserli hastaların ise %11' inde Pten protein ekspresyon düzeyinde azalma ya da kayıp saptanmıştır. Ekspresyondaki azalmanın evre 2 ve evre 3 tümörlerde en sık olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile ileri evre meme kanserlerinde, PTEN ekspresyonunda azalma olduğu görüşü ileri sürülmüştür (119).

PTEN, hücre büyümesi ve apoptoz için gerekli sinyal yollarını düzenlemede önemli rol oynar. Bu düzenlemeyi embriyonik gelişimde ve kanser biyolojisinde rol oynayan integrin fonksiyonlarını negatif olarak düzenleyerek yapar. PTEN, meme kanseri hücre hattında ise büyümeyi P13K sinyal yolunun downregülasyonu ile baskılamakta, öncelikle hücre siklusu progresyonunda duraklamaya, ardından hücre ölümünün induksiyonuna yol açmaktadır. Weng ve arkadaşlarının (120), MCF-7 meme kanseri hücre hattında mutant PTEN ekspresyon sonuçlarını inceledikleri bir araştırmada, PTEN genindeki aşırı ekspresyon varlığında hücre büyümesinde baskılanma görülmüştür. Büyümenin baskılanması erken dönemlerde G1 fazında duraklamaya bağlı iken, ileri dönemlerde hem G1 fazındaki duraklamaya hem de hücre ölümüne bağlı olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda büyümenin baskılanması öncesi Akt fosforilasyonunda azalma izlenmiştir (120).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda meme kanserlerinde Pten protein ekspresyonunda %38 azalma veya kayıp gözlenmiştir (27). Bu ekspresyon azalmasının miRNA' lar ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (121).

2.5.4.3. FHIT:

Fragile histidine triad (*FHIT*) geni 3p14.2 kromozom bölgesinde lokalize olan bir tümör baskılayıcı gendir. Meme kanserini de içine alan ve sık görülen pek çok kanser tipinde genellikle delesyonlar ile inaktive olmaktadır. Bu genin ürünü olan Fhit proteininin, hücre döngüsü ve apoptoz gibi önemli hücresel olaylar ile ilişkili olduğu ve ilgili genin bazı kanserlerde erken dönemde bazılarında ise kötü prognoz ile

ilişkilendirilerek ileri evrede inaktive olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinin invaziv ve metastatik karakter kazanmasında *FHIT* geninin oldukça önemli olduğu ve kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir (122).

FHIT geni, özellikle çevresel karsinojenlere maruziyetten oluşan tümörlerde inaktive olmaktadır. Bu tip tümörlerin başında akciğer kanserleri gelmektedir. Özellikle akciğer kanserleri başta olmak üzere meme kanserleri, kolorektal kanserler, gastrik kanserler, ovaryum kanserleri, böbrek tümörleri, lösemiler gibi çok sayıda tümörde bu genin inaktivasyonu bilinmektedir. Meme kanserleri ile ilgili olarak gerçekleştirilen *FHIT* genindeki inaktivasyon çalışmaları meme kanserlerinde bu genin %30-35' ler civarında inaktive olduğunu ortaya koymuş bulunmaktadır. Bu oran, bir hastalığın genetik oluşum mekanizması için azımsanmayacak anlamlı bir orandır. *FHIT* genindeki değişimleri araştıran bazı çalışmalar akciğer, özefagus ve meme kanserlerinde bu değişimlerin kanser gelişiminin oldukça erken safhasında meydana geldiğini belirtirken, diğerleri bu değişimlerin meme, serviks ve endometrium kanserlerinde ileri evrede meydana geldiğini ve tümörün agresif davranışı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (123-128).

2.5.4.4. RB1:

Retinoblastoma geninin (*RBI*) ürünü Rb proteini, kromozom 13q14.1' de lokalize olup, transkripsiyonel aktivasyon yoluyla *BRCA1* geninin ekspresyonunu düzenler. Rb fosforilasyon durumuna bağlı olarak hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasını denetler. *RBI* geninde mutasyonlardan dolayı bu tümör baskılayıcı genin her iki allelinin inaktivasyonu kalıtsal ve sporadik retinoblastomada tespit edilmektedir. RB1 mutasyonları, sporadik gelişen meme kanserlerini de içeren pek çok kanserde ortaya çıkmaktadır. Özellikle bazal benzeri meme kanserinde tümör baskılayıcı RB1' in kaybı sözkonusudur (129, 130).

2.6. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Meme kanserleri kalıtsal ya da sporadik olabilir. Hastaların büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanserleri ortaya çıkmaktadır. Ailesel meme kanseri oluşumundaki etkisi en iyi araştırılmış olan genler *BRCA1* ve *BRCA2*' dir. *BRCA1* geni DNA hasarlarının tanınmasında ve sinyal cevabın oluşturulmasında rol alırken, *BRCA2* geni homolog

rekombinasyonda ve hücre döngüsü kontrol noktalarında DNA hasarlarına karşı transkripsiyonel cevap oluşumunda görev almaktadır. Germline mutasyonlar nedeni ile bu genlerde fonksiyon kayıpları ortaya çıkmakta, buna bağlı olarak kalıtsal meme ve ovaryum kanseri sendromları gelişebilmektedir. Germline mutasyon taşıyıcısı olan kadınlarda yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %50-85 iken, ovaryum kanseri gelişme olasılığı ise %12-60 olarak bildirilmektedir (131).

BRCA1 (kromozom 17q) ve *BRCA2* (kromozom 13q) genlerindeki mutasyonlar otozomal dominant kalıtsımlı meme-over kanserine neden olmaktadır. Ayrıca pankreas (*BRCA2*), erkekte meme kanseri (*BRCA2*) ve prostat kanseri riski de artmaktadır (*BRCA1/2*). *BRCA1/2* gen mutasyonlarının kalıtsal meme kanseri vakalarının yaklaşık %30' undan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Li- Fraumeni sendromu, Cowden sendromu, Peutz-Jeghers sendromu da kalıtsal meme kanserine yol açmaktadır. Diğer yandan ovaryum kanseri Lynch sendromu ile ilişkili olarak da ortaya çıkabilir. Ancak bunlar çoğu kez başka kanserler ve kanser dışı bulgularla birliktelik göstermektedir. Bu iki gen, genomik instabiliteden sorumlu tümör baskılayıcı genlerdir.

BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında gözlenen meme tümörlerinde genellikle sporadik vakalardan farklı histopatolojik özellikler görülmektedir. *BRCA1* mutasyonuna sahip kadınlarda gelişen meme kanserleri karakteristik olarak erken yaşta görülme özelliğine sahiptir. Bu tip kanserler, genellikle triple negatif veya invaziv duktal karsinoma tipinde olup, yüksek dereceli histopatolojik özellik gösterirler. Prognozları da kötüdür. Patolojik incelemede ise bu tümörler ER, PR ve HER-2 ile negatif, bazal sitokeratinler olan CK5/6 ile pozitif boyanmakta, Siklin-E, p53 ve az miktarda da p27 ekspresyonu göstermektedirler. *BRCA2* mutasyonu taşıyıcılarında saptanan tümörlerin ise patolojik özellikleri çoğunlukla sporadik gelişen meme kanserli vakalara benzemektedir (125).

Aşkenazi Yahudileri ve Ruslar gibi etnik kökeni farklı bazı kapalı toplumlarda ise *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde popülasyona özgü germline mutasyonlar belirlenmiştir. Dini ve kültürel bariyerlerle birbirlerinden ayrılabilen bu gibi toplumlarda yüksek sıklıkla gözlenen bu mutasyonlar diğer toplumlarda çok daha düşük oranda görülmektedir. Yapılan araştırmalara göre, batı toplumlarında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyon oranları %11.7-33 arasında değişmektedir. Türk toplumunda ise bu oran yaklaşık %10 olarak belirlenmiştir (132-139).

2.6.1. *BRCA1* Geni ile İlişkili Meme Kanseri

BRCA1, tümör baskılayıcı bir gendir ve kromozom 17q21' de lokalizedir. *BRCA1* geni 24 ekzondan oluşmakta olup, 1853 aminoasitten oluşan bir protein kodlamakta ve otozomal dominant geçiş göstermektedir. Bu protein DNA replikasyonu, DNA çift zincir kırılmalarının onarımı, transkripsiyon regülasyonu, hücre döngüsü kontrolü, kromatin yeniden biçimlenmesi gibi birçok hücresel işleve sahiptir. Bu gendeki mutasyonlar yalnızca meme ve ovaryum kanserine neden olmamakta ayrıca serviks, endometrium, tuba, periton, mide, karaciğer ve prostat kanseri gelişimine de yatkınlık oluşturmaktadır. Histopatolojik olarak bu tümörler sıklıkla yüksek dereceli invaziv duktal karsinom morfolojisindedir.

İmmünohistokimyasal incelemelerde bu tümörlerde genellikle östrojen ve progesteron reseptörleri negatiftir. Yüksek histolojik derecelerine rağmen ERBB-2 ile boyanma göstermezler. DNA mikroarray çalışmaları bu tümörlerin östrojen reseptörü negatifliği ve bazal sitokeratin (CK5/6, CK 14) pozitifliği ile karakterli "bazal tip" moleküler fenotipte olduğunu göstermiştir. *BRCA1* ile ilişkili meme kanserlerinde *P53* gen mutasyonları da daha yüksek oranda görülmektedir (132-139).

2.6.2. *BRCA2* Geni ile İlişkili Meme Kanseri

BRCA2 geni, 13. kromozomun uzun koluna yerleşmiş olup, 27 ekzondan oluşmakta ve 3418 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır. DNA çift zincir kırılmalarının onarımı, transkripsiyon regülasyonu, hücre döngüsü kontrolü gibi *BRCA1* geni ile benzer işlevlere sahiptir. *BRCA2* gen mutasyonları *BRCA1* genine benzer şekilde meme ve ovaryum kanseri riskini artırır. Ancak *BRCA2* geni *BRCA1* genine göre ovaryum kanseri gelişiminde daha düşük riske sahiptir. Ayrıca *BRCA2* ile ilişkili meme kanserleri erkeklerde de görülebilir.

BRCA2 geni ile ilişkili meme karsinomlarının patolojik özellikleri ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar bu tümörlerin, düşük histolojik dereceli ve invaziv lobüler ya da tübüle lobüler morfolojide olma olasılığının yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu tümörlerin çoğunlukla klasik tip invaziv duktal karsinom morfolojisinde ve sporadik gelişme gösteren tümörlere göre ileri evreli olduğu belirlenmiştir (132-139).

2.6.3. *BRCA1* ve *BRCA2* Mutasyonuna Sahip Hastalarda Meme Kanserinin

Özellikleri

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinden herhangi birinde mutasyona sahip hastalarda ortaya çıkan meme kanserleri, sporadik gelişen meme kanserlerinden ve *BRCA* ile ilişkisi olmayan ailesel meme kanserlerinden morfolojik, immünofenotipik ve moleküler farklılıklar gösterirler.

BRCA1 karsinomlarının çoğu yüksek dereceli, yüksek proliferasyon indeksine sahip, ER ve HER-2 negatif bir alt tip olan bazal hücre fenotipindedir. *BRCA2* karsinomlarında ise bu fenotip nadirdir. Sporadik kontrollere göre daha ileri evrelidirler fakat daha fazla oranda ER ve PR pozitifdir. Aynı zamanda tüm *BRCA1/2* karsinomlarında *BRCA1/2* heterozigosite kaybı görülür (140). *BRCA1* ile ilişkili meme kanserlerinin, bu genetik değişime sahip olmayan hastalardaki kanserlerle karşılaştırıldığında daha sıklıkla medüller karsinomalar, atipik medüller karsinomalar ve yüksek gradeli invaziv duktal karsinomalar olduğuna dair genel bir fikirbirliği vardır. *BRCA1* mutasyonu ile ilişkili kanserler, sporadik meme kanserlerinden daha fazla belirgin yüksek mitotik aktiviteye, daha fazla lenfositik infiltrasyona sahiptirler (141). Bunlara ek olarak, *BRCA1* ile ilişkili tümörlerde, sporadik gelişen meme kanserlerine göre daha sıklıkla anöploid durum söz konusudur. Daha az sıklıkla östrojen ve progesteron reseptörü pozitifdir ve daha fazla p53 proteini aktivasyonu gösterirler (141).

Bazı araştırmacılar *BRCA2* geni ile ilişkili kanserlerin daha yüksek histolojik evreli olma eğiliminde olduğunu rapor ederken diğer araştırmacılar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında histolojik derecede belirgin bir fark bulamamışlardır (142, 143). Yapılan bir çalışmada, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlu meme karsinomları karşılaştırılmış, uygulanan 37 immünohistokimyasal belirleyiciden 15' inde ekspresyon seviyelerinde belirgin değişiklikler tespit edilmiştir. P53, aktif kaspaz 3, vimentin ve sitokeratin 5/6 ekspresyonu, *BRCA2* karsinomlarından çok *BRCA1* karsinomlarında saptanmıştır. *BRCA1* karsinomlarının aksine *BRCA2* karsinomlarının daha yüksek oranda ER, PR, MDM2, Siklin-D1 ve Siklin-D3, CDK4 ve CDK1, apoptotik belirleyici BCL-2 ve luminal belirleyici CK8' i eksprese ettikleri belirlenmiştir (144).

2.7. miRNA' lar

İnsan genomunda yer alan DNA' nın büyük bir bölümü, RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak %1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem içerdiği düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, kodlanmayan küçük RNA moleküllerinin keşfi ile ortadan kalkmıştır. Bu grup içine giren miRNA' lar, RNA' ların protein kodlamayan (non-coding) dizileri olarak adlandırılmaktadır. Araştırmacılar miRNA' ların hücrel bir çok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, bununla birlikte, hücrede miRNA ekspresyonunun normal seviyelerinin dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (145).

2000' li yıllardan sonra yapılan kanser araştırmalarında miRNA (miRNA) moleküllerinin öneminden bahsedilmeye başlanmıştır. miRNA' ların; hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, strese karşı cevap, apoptoz, immünite ve transkripsiyonel düzenleme gibi hemen hemen tüm hücrel fonksiyonlarda rol aldıkları ve bu yolların durdurulması ya da bozulmasının da kanser oluşumu ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Böylece, miRNA' ların tümör gelişiminde hem onkogen hem de tümör baskılayıcı fonksiyon gösterdikleri ortaya çıkmıştır (13).

2.7.1. miRNA' ların Yapısı ve Keşfi

miRNA' lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, küçük RNA molekülleridir (146). miRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA' ya dönüşürler. İnsan genomunda miRNA' ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Bugüne kadar insan genomunda 1048 adet miRNA tanımlanmıştır (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>).

İlk miRNA, Lee ve arkadaşları (147) tarafından 1993 yılında Victor Ambros Laboratuvarı' nda keşfedilmiş olup, mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (148). Lee ve arkadaşları 1993 yılında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*' ı gen içeriği bakımından taramışlar, lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein

kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir (147). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları (149) *C.elegans*' da 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfetmişlerdir. Let-7' nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup (150), bu durum let-7' nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Daha sonraki yıllarda lin-4 ve let-7' ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiş ve mikroRNA' lar olarak isimlendirilmiştir (151).

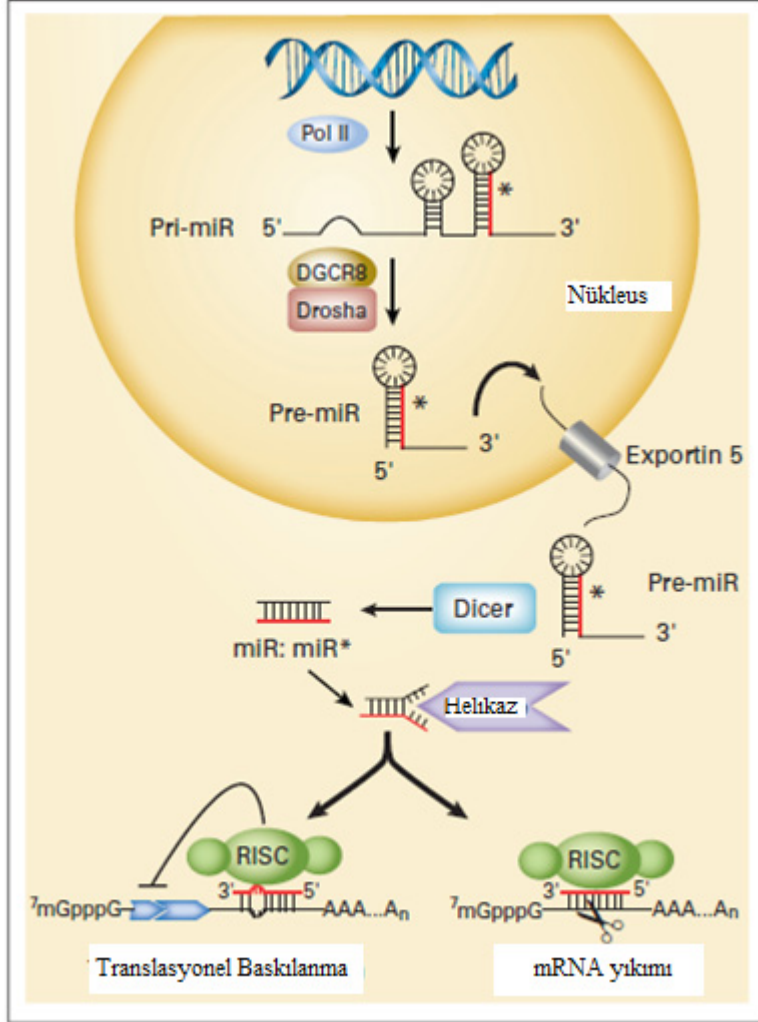
2.7.2. miRNA' ların Oluşumu

miRNA' lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)' ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA' lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)' lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA' ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (152).

miRNA' lar, primer transkript olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA' dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8), tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA' ya dönüştürülür (153). Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha' nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks adı verilir (154).

Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP' ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (155). Sonrasında, pre-miRNA' lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir (156). Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatır (157). Dicer, pre-miRNA' nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAaz olan Argonaute' ın etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir (Şekil-10).

miRNA' lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA' nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (158).



Şekil-10 miRNA' ların Biyogenesi, İşlenmesi ve Olgunlaşması: İlk olarak, nükleus içerisindeki miRNA geninin transkripsiyonu gerçekleştiikten sonra sap-ilmik yapısında primer transkript (pri-miRNA) oluşur. Drosha ve kofaktörü Pasha, pri-miRNA' yı belirli bölgelerden keserek daha kısa yapıdaki pre-miRNA' ya dönüştürürler. Pre-miRNA molekülü, Exportin 5 ve RAN-GTP' ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA' lar sitoplazmada Dicer tarafından kesilerek çift zincirli miRNA' ya çevrilir. Daha sonra RISC kompleksinde yer alan Argonaute proteinini, daha kararlı olan ipliği seçerek RISC kompleksine dahil eder. Tek zincirli miRNA' yı içeren aktif haldeki RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA' ya bağlanarak translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA' nın yıkımına neden olur (159).

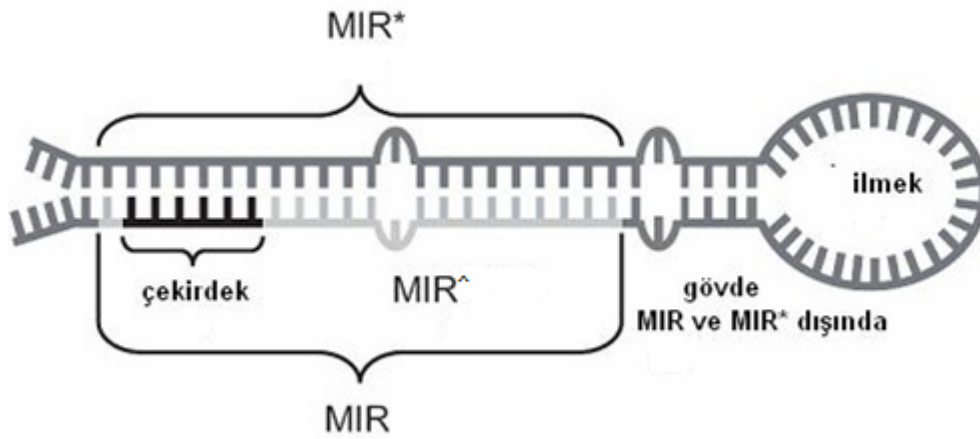
2.7.3. RISC Yapısının Oluşumu

Olgun miRNA' lar işlevlerini gerçekleştirmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyarlar. Bu proteinlerle birlikte RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks olan RISC' i oluştururlar. Bu yapıdaki tanımlanmış proteinler Argonaute ailesi proteinleridir. Olgun miRNA bu yapıya katılırken tek zincir haline geçer. Argonaute protein ailesinin üyeleri iki domain içerir. Bunlardan Dicer' a benzeyen PAZ domaini, tek zincir RNA' nın 3' ucuna bağlanır. Yapılan çalışmalar Argonaute proteinlerinin hedefi kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir (160, 161).

2.7.4. Pre-miRNA' nın Yapısı

Pre-miRNA farklı görevleri olan birimlerden oluşur (162). Bu birimler:

1. Çekirdek bölgesi
2. Çekirdeğin dışında kalan olgun miRNA bölgesi (MIR[^])
3. Olgun miRNA ile baz eşleşmesi oluşturan gövde bölgesi (MIR*)
4. Olgun miRNA (MIR) ve MIR* kapsamayan gövde bölgesi
5. İlmek bölgesi (Şekil-11)



Şekil-11 Pre-miRNA Yapısı (162)

Çekirdek bölgesi miRNA' nın 5' ucundaki 2-8 nükleotitleri arasındaki bölgedir. Bu bölge mRNA' yı tanıyarak baz eşleşmesi oluşturan bölge olduğu için ayrı bir öneme sahiptir (160, 162, 163).

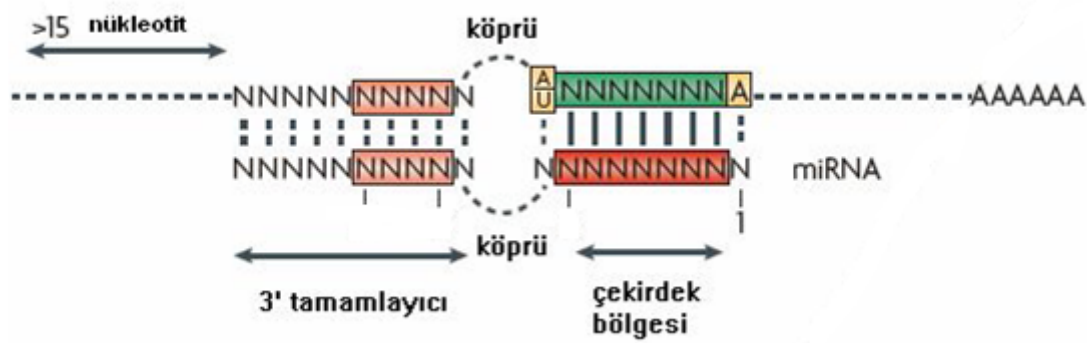
2.7.5. miRNA' ların Fonksiyonu

Olgun miRNA' lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA' lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA; RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA' ya bağlanır ve sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA' nın yıkımına neden olur (146).

miRNA, hedef mRNA' nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye UTR veya hedef mRNA' nın Open Reading Frame (ORF) bölgesine bağlanır. miRNA kompleksinin mRNA bağlanma bölgesine bağlanması kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır (164). ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 tarafından mRNA' nın yıkımı ile sonuçlanır. Ayrıca, miRNA' ların her birinin birden fazla mRNA' nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA' ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (165).

2.7.6. miRNA' ların Çalışma Prensipleri

miRNA' lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNA' ların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak bu mRNA' ların degradasyonunu sağlar veya traslasyona uğramalarını engellerler (Şekil-12). Aslında miRNA' lar sadece hedefi bulan ve miRISC yapısını hedefe yönlendiren moleküllerdir. Asıl mRNA degradasyonunu veya translasyonun durmasını sağlayan RISC yapısını oluşturan diğer proteinlerdir (161).



Şekil-12 miRNA ve mRNA' nın 3' UTR Bölgesinin Baz Eşleşmesi (161)

Hücrede bilinen mRNA' ların yaklaşık %30' unun bu miRNA' ların hedefi olduğu bilinmektedir (9). Bu bilgiye dayanarak miRNA' ların birçok hücreyel olayda görevli olduğunu söyleyebiliriz. miRNA' lar ilk olarak gelişim ve farklılaşmadaki rolleriyle ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde kanser dahil birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde miRNA' ların rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (160).

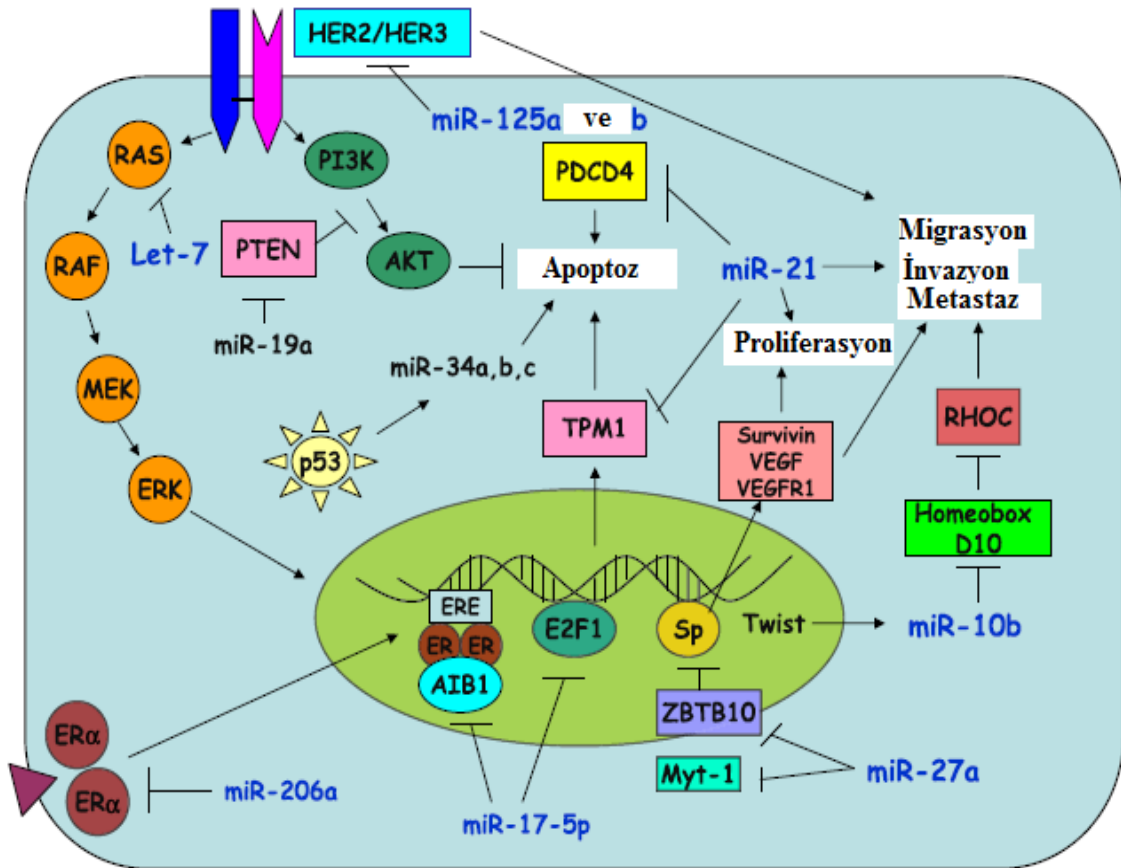
2.8. miRNA ve Kanser

Günümüze kadar farklı kanser tiplerinde miRNA ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri tanımlayan birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Hangi miRNA' nın hangi mRNA' yı hedef bölgesinden tanıdığı tam olarak bilinmemekle beraber bazı genel özellikler tanımlanmıştır (166). miRNA tarafından bağlanan sekans motif, transkriptin 3' UTR bölgesinde, mRNA' nın protein kodlayan bölgesi ile poli (A) kuyruğu arasında bulunur (167). miRNA' ların ve onların hedefleri olan mRNA' ların sekansları karşılaştırıldığında, miRNA' nın 2-8. nükleotidlerinin, mRNA komplementer sekansını tanımlama görevli çekirdek bölge olduğu görülmüştür (168, 169). miRNA' nın merkez bölgesi (özellikle 10 ve 11. nükleotidler) çoğunlukla mRNA ile daha az komplementerdir. Bununla birlikte, miRNA' nın 3' bölgesi daha az ya da daha fazla spesifite ile mRNA' ya bağlanır ve miRNA, mRNA kompleksine spesifite ve afinite açısından katkıda bulunur. miRNA' lar genel olarak çekirdek bölge sekansları ile mRNA' ya bağlanırlar. Ancak daha farklı afinite ile başka miRNA' ların çekirdek sekansları da aynı mRNA' ya bağlanabilir ve etkiye yol açabilir (168). miRNA' ların mRNA' lara bu bağlanma özelliklerine dayanarak yapılan hesaplamalar her bir miRNA' nın yaklaşık 100 farklı mRNA' yı hedefleyebildiğine işaret etmektedir (169-171).

İnsanlarda mRNA' nın fonksiyonu, miRNA tarafından translasyonun başlangıcının baskılanması, translasyonun uzama fazının baskılanması ve poli(A) kuyruğunun kısalması gibi basamaklarda düzenlenir (166). Protein kodlayan genleri etkileyen amplifikasyon, translokasyon, delesyon, nokta mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar kanserli hücrelerde miRNA' nın da fonksiyonunu etkilemektedir (166). İnsan miRNA' larının yaklaşık %50' si DNA üzerinde kanserle ilişkili genomik bölgelerden ve frajil bölgelerden kodlanmaktadır. Bu durum, miRNA' ların bugüne kadar açıklanamayan biyolojik olaylarda yer alan hedef moleküller olabileceğini düşündürmektedir (172).

Son dönemde miRNA ekspresyonunun kanserde değiştiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bazı miRNA' ların hücre proliferasyonunu arttırırken, diğerlerinin

azalttığı gösterilmiştir. miRNA'ların bu iki sınıfı kanser gelişiminde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil-13). miRNA'ların büyük çoğunluğunun kanserli hücrelerde düşük seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir (4). Normal dokularda, bu miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle bu miRNA'lara "tümör baskılayıcı miRNA"lar (TS-miR) denmektedir. Çünkü bunların normal fonksiyonları onkogenlerin ekspresyonlarını kontrol altında tutmaktır. Bazı miRNA'ların ise kanserli hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese oldukları belirlenmiştir. Bunlar ise "onkomiRNA"lar (onko-miR) olarak tanımlanmaktadır (Tablo-1). miRNA'ların birden fazla potansiyel hedefleri olduğu için, hüresel durumuna göre bir miRNA, TS-miR ya da onko-miR özelliği gösterebilir (166).



Şekil-13 Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler ile miRNA'lar Arasındaki İlişki (173)

Tablo-1 Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Özellikteki miRNA' lar (174)

miRNA	Hedefi	Fonksiyonel yolağı
Tümör Baskılayıcı miRNA' lar		
miR-206	ESR1	ER sinyalizasyonu
miR-17-5p	AIB1,CCND1,E2F1	Çoğalma
miR-125a,b	HER-2,HER-3	Anchorage-dependent growth
miR-200	BMI1,ZEB1,ZEB2	TGF-β sinyalizasyonu
let-7	H-RAS,HMGA2,LIN28,PEBP1	Çoğalma,Farklılaşma
miR-34a	CCND1,CDK6,E2F3,MYC	DNA hasarı,Çoğalma
miR-31	FZD3,ITGA5,M-RIP,RDX,RHOA, MMP16	Metastaz
Onkogenik miRNA' lar		
miR-21	BCL-2,TPM1,PDCD4,PTEN,MASPIN	Apoptoz
miR-155	RHOA	TGF-β sinyalizasyonu
miR-10b	HOXD10	Metastaz
miR-373/520c	CD44	Metastaz

2.8.1. Tümör Baskılayıcı miRNA' lar

Çeşitli kanser türlerinde miRNA ekspresyon profillerinde değişimler olduğu belirlenmiştir. Örneğin; Kronik lenfositik lösemi (CLL) hastalarının yarısından fazlasında, 13q14' te miR-15 ve miR-16' yı kodlayan bölgede 30 kilobazlık bir bölgenin delesyonu görülmüştür (13). CLL hastalarının %68' inde miR-15 ve miR-16' nın ekspresyonu down-regüledir. Ayrıca, akciğer kanserinde let-7, kolorektal kanserde let-7, miR-143, miR-145, meme kanserinde miR-145, CLL ve akut myeloblastik lösemi (AML) de miR-29b ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu belirlenmiştir (175, 176).

2.8.2. Onkogenik miRNA' lar

TS-miR' ların aksine, onko-miR' lar çoğunlukla kanser türlerinde up-regüle' dir ve proliferatif veya anti-apoptotik aktivite gösterirler. İlk tanımlanan oncomiR' lardan biri miR-155' tir. Bu miRNA, *BIC* geni ile ko-eksprese olarak görülmektedir. Bu miRNA' nın yüksek ekspresyonunun lösemiye sebep olduğu belirlenmiştir (177-179). miR-155' in yüksek ekspresyonunun, bazı lösemi tiplerinde ve akciğer adenokarsinomlarında tümörün agresifliği ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-17-92 sınıfı üyeleri, lenfomalarda çoğunlukla up-regüle olan onko-miR gruplarından biridir. Bu moleküller C-MYC' in overeksprese olduğu tümörlerde apoptozu inhibe eder (180, 181).

2.8.3. Kanser Diagnozunda miRNA' lar

Son dönemde, miRNA ekspresyon profillerinin diaagnozda kullanılabileceğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle miRNA ekspresyon profili, normal ve malign dokuyu ayırt etmede kullanılabilir. Günümüzde hepatosellüler karsinoma (182), pankreatik karsinoma (183, 184), CLL (185), kolorektal kanserler (186) ve akciğer kanseri (181) gibi birçok kanser türü için farklı miRNA profilleri identifiye edilmiştir. Bu profiller histolojik ve mRNA düzeyinde ayırt edilemeyen tümörleri ve aynı organda gelişen farklı histolojideki tümörleri de ayırdetmede kullanılabilir (181, 183). Ayrıca, miRNA ekspresyon profilleri histolojik olarak benzer, farklı moleküler alt yapıdaki tümörlerin ayırımını da sağlayabilmektedir (187).

2.8.4. Kanser Prognozunda miRNA' lar

miRNA ekspresyon profilleri, tümörün terapiye vereceği cevabın önceden tahmin edilmesinde kullanılabilir. Hemen hemen her kanser türünde en etkin tedavi yöntemini bulmak için farklı alt tiplerdeki tümörleri identifiye edecek moleküler markırların bulunmasına ilişkin çalışmalar mevcuttur. miRNA' lar dokuya-özü ifade edilir ve doku tipindeki ifadenme değişiklikleri hastalığın prognozu ile ilişkilidir. Bir diğer deyişle, miRNA' ların prognostik biyomarker olabilmesi için, miRNA ile tümör evresi ve derecesi arasındaki ilişkiyi ilgili dokuda analiz etmek gereklidir. Kanser türleriyle ilişkilendirilen miRNA' ların kanserli dokudaki ekspresyon düzeylerinin ölçülmesiyle kanser prognozu ile ilgili bilgi sağlanabilmekte ve miRNA' lar bu şekilde tümör belirteci olarak kullanılabilir. miRNA ekspresyon profilleri hastaların alt tiplendirilmesinde ve hastanın alternatif tedavi yöntemleri için uygun olup olmadığının saptanmasında fayda sağlayabilmektedir (14).

2.8.5. Tedavi ile İlişkilendirilen miRNA' lar

İlaç direnci kanserli hastalarda başarılı bir tedavi için önemli klinik bir engeldir ve kanserde ilaç direnci ile ilişkili miRNA' ların varlığı yakın zamanlarda ortaya çıkmıştır. Örneğin meme kanserinin oransal kemoterapisinde, miR-200c' nin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada, neoadjuvan kemoterapi alan 39 meme kanserli hastanın kantitatif RT-PCR analizi ile tümör örneklerinde miR-200c ekspresyon

seviyesindeki farklılıklar araştırılmıştır (188). Ebeveyn MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında, doxorubicine dirençli meme kanser hücrelerinde (MCF-7/ADR) miR-200c ekspresyonununun 800 kat üzeri down-regülasyonu belirlenmiştir. Meme kanserinde kemoterapiye yanıtın geliştirilebilmesi için, miR-200c' nin gelecek vaat eden bir tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceği düşünülebilir (188).

Paklitaksel (taxol), son yıllarda meme ve diğer bazı kanserlerin (over, prostat, akciğer gibi) tedavisinde önemli kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Kanser metastazında ve nükste, bu kemoterapötik ajanlara sıklıkla direnç sözkonusudur. İlk alınan klinik tepkiler etkileyici olmasına rağmen, zamanla hastaların çoğunda taxol tabanlı tedaviye direnç gelişmiştir. Kanser hücrelerinin taxola direnç mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. miRNA' ların ilaç direncinde ve tümörigenezde önemli rollerinin olduğu ortaya çıkmış olmasına rağmen, taxol direncinin gelişimi ve miRNA' lar arasındaki etkileşim ile ilgili daha önce araştırma yapılmamıştır (189). Ming Zhou ve arkadaşlarının (189) yaptığı çalışmada, taxol direnci ve taxol hassasiyeti olan ebeveyn hücrelerde farklı ekspresyon olan miRNA' ların karşılaştırılması, miRNA arrayleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taxole direnç gösteren kanser hücrelerinde miR-125b, miR-221, miR-222 ve miR-923' ün up-regüle olduğu RT-PCR ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada, taxol direncinde miR-125b' nin mekanizması ve rolü araştırılmış, taxole dirençli hücrelerde miR-125b' nin up-regüle olduğu bulunmuştur. Bu durumun taxole dirençli kanser hücrelerinde taxole bağlı belirgin bir inhibisyonun olduğunu göstermiştir. Ayrıca, miR-125b' nin direkt hedefi BCL-2' nin antagonisti olan BAK1' dir. BAK1' in down-regülasyonu taxole bağlı apoptozun baskılanmasına ve taxol direncinin artmasına yol açmıştır. Bu bulgular, bir takım farklı tümör histolojilerinde taxole direnci ortadan kaldırmak için terapötik hedeflerin geliştirilmesinde önemli olmaktadır. miR-125b ile miR-222 ve miR-222' nin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları doğrulamak ve bu miRNA' ların taxole bağlı sitotoksiste üzerindeki etkilerini incelemek için bu çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, miR-125b ve miR-221' in meme kanser hücre hatlarında taxole bağlı sitotoksiste belirgin bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (189). Rodriguez-Gonzalez ve arkadaşları (190) ise, meme kanserlerinde tamoksifen tedavisinin uygulanabilirliği ile ilişkili olarak miR-30c' nin belirleyici bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir. Meme tümörlerinde tamoksifen tedavisine karşı gelişen yanıtta HER-2/Neu overekspresyonu ile miR- 221/222 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi açıklayan bir çalışma da Miller ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (191).

Bugüne kadar kanser tedavisinde gen ekspresyon profillerinin değerlendirildiği çalışmalarda mRNA' nın kullanılması taze materyalin gerekliliğinden ve kaliteli ürün elde edilmesinde problemlerin yaşanmasından dolayı klinik uygulamada dezavantajlar oluşturmaktadır. mRNA' nın fonksiyonu; translasyonun başlangıcının baskılanması, translasyonun uzama fazının baskılanması ve poli(A) kuyruğunun kısalması gibi basamaklarda miRNA tarafından düzenlenmekte olduğundan miRNA' lar, mRNA' dan sentezlenecek proteinlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde direkt görevlidirler (166). Ayrıca, miRNA' ların sayılarının daha az olması ve parafin dokudan da stabil ürün elde edilebilmesi, klinik uygulamalarda bir kanser belirteci olarak miRNA' ların, mRNA ekspresyon profillerine kıyasla daha kullanışlı olabileceğini düşündürmektedir (14).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA' ların meme tümörlerinde regülatör moleküller ile ilgili olduğu gösterilmiş ve miRNA profillemeye çalışmalarında meme kanserinde deregüle olan miRNA' lar tanımlanmıştır. Fonksiyonel çalışmalar, bu miRNA' ların meme kanserlerinde hem tümör baskılayıcı (miR-335) hem de onkogen (miR-21) olarak rol aldığını göstermiştir. Meme kanserlerinde deregüle olan miRNA' ların östrojen reseptör alfa gibi regülatör moleküllerin translasyonel düzenlenmesini etkilediği bilinmektedir ve bu moleküllerin fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılmış değildir (192).

Meme kanserlerinde yüksek oranda genomik instabilite görüldüğünden, meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, miRNA gen ekspresyonlarında farklılıklar belirlenmiştir. Selçuklu ve arkadaşları, çeşitli meme hücre hatlarında 35 tane miRNA' nın ekspresyonunu değerlendirmişler ve bu miRNA' ların %23' ünün normal hücre hatlarına göre up-regüle olduğunu tespit etmişlerdir (193). Shen ve arkadaşları ise meme kanseri oluşumundaki anahtar genlerden *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *P53* ve *PTEN* genlerinin hedef miRNA' ları olan miR-21, miR-146a, miR-92, miR-24-1, miR-125a, miR-191, miR-125b1, miR-223, miR20a, miR-29b-2, miR-29b-1, miR-128, miR-30c-1, miR-30c-2, miR-128b, miR-125b-2, miR-24-2, miR-17 genlerinin normal hücrelerdeki göre farklı eksprese olduğunu belirlemişlerdir (194). miR-206, miR-17-5p, miR-125a, miR-125b, miR-200, let-7, miR-34 ve miR-31 tümör baskılayıcı özellikteki miRNA' larının meme kanserlerinde down-regüle, miR-21, miR-155, miR-10b, miR-373 ve miR-520c onkogenik miRNA' ların ise overeksprese olduğunu O' Day ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarında ifade etmişlerdir (174).

2.9. miRNA' ların Aktivitelerinin Kanserde Bozulma Mekanizmaları

2.9.1. miRNA Ekspresyon Düzeyinin Değişmesi:

Birçok kanser türünde miRNA' ların ekspresyon düzeylerinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bazı miRNA' ların ekspresyon düzeyleri artarken bazılarının ki azalmıştır. Bu ekspresyon değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; miRNA genlerinin promotor bölge metilasyonları, miRNA genlerindeki mutasyonlar ve miRNA işlenmesinin değişmesinin olabileceği yönündedir (7).

2.9.2. miRNA İşlenmesinin Değişmesi:

miRNA işlenmesinde görev alan Drosha ve RISC yapısının oluşmasında görev alan Argonate ailesi üyesi proteinlerini etkileyen mutasyon veya ekspresyon değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC yapısının görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (6, 14).

2.9.3. miRNA-mRNA Eşleşmesini Sağlayan Dizilerde Mutasyonlar:

Bu mutasyonlar, miRNA genlerindeki mutasyonlar ve mRNA' nın 3' UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA' nın 3' UTR kısmındaki mutasyonlar, **a)** miRNA' nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir. **b)** miRNA' lar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir (195).

2.10. miRNA' ların Çeşitli Kanserlerdeki Rollerini

Croce ve arkadaşları kanserin dünya çapında yaygın bir hastalık olduğundan bahsetmiş ve birçok ölümcül kanser için etkili hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmesi ve moleküler mekanizmaların anlaşılması gerekliliğinden bahsetmişlerdir (196). 2000' li yıllardan sonra miRNA' ların keşfi ile kanserde yeni terapötik hedefler ve prognostik biyomarkırlar olarak bu aday moleküllerin ilgi çekici hale gelmesi ile bu araştırmacılar da miRNA işleyişi ve kanserin ayırt edici özellikleri ile kanser tedavisinde miRNA' ların mevcut rollerinden ve çeşitli malignansilerde onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikteki miRNA' ların öneminden yayımladıkları çalışmalarında bahsetmişlerdir (196). 2003

yılında Michael ve arkadaşları da (197) ilk olarak insanlardaki katı tümörlerde (kolon ve rektum adenokarsinomları) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA' ları rapor etmişlerdir. Daha sonraki yıllarda değişikliğe uğramış miRNA ekspresyon seviyeleri meme kanserinde, Burkitt's lenfomada, malign beyin tümörlerinde, tiroid kanserinde, akciğer kanserinde, prostat kanserinde ve hepatosellüler karsinomda keşfedilmiştir (196). Spesifik miRNA' ların dokudaki konsantrasyonlarının tümör invazyonu, metastatik potansiyeli ve diğer klinik karakteristik özellikleri ile ilişkili olduğu kronik lenfolitik lösemi, meme, kolon, karaciğer, akciğer, pankreas ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde ifade edilmiştir (Tablo-2).

Tablo-2 Bazı İnsan Kanserlerinde Etkili Olan miRNA' lar (196)

Kanser tipi	Ekspresyon seviyesi yüksek miRNA' lar	Ekspresyon seviyesi düşük miRNA' lar
Akciğer Kanseri	miR-155, miR-21, miR-17-92, miR-221/222	Let-7, miR-1, miR29, miR-126
Meme Kanseri	miR-155, miR-21, miR-182, miR-17-92, miR-200, miR-9	Let-7, miR-143/miR-145, miR-10b, miR-125b, miR-126
Hepatosellüler Kanseri	miR-21, miR-221/222	miR-1, miR-26a
Kolorektal Kanseri	miR-155, miR-21, miR-17-92	Let-7, miR-34
Pankreas Kanseri	miR-21, miR-155	Let-7, miR-15a/16-1, miR-34
Prostat Kanseri	miR-21	Let-7, miR-15a/16-1, miR-221
CLL	miR-155	miR-15a/16-1, miR-29b, miR-181b, miR-34
AML	miR-10a/b, miR-29, miR-155	miR-181, miR-204

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia, AML: Acute Myleoid Leukemia

2.11. miRNA' lar ve Meme Kanseri

miRNA' ların ekspresyon profilleri birçok meme kanseri hücre hattında, normal ve kanserli meme dokusunda incelenmiştir. Farklı ekspresyon gösteren miRNA' lar ile tümörün evresi, moleküler alt tipi ve klinik özellikleri arasında ilişki kurulmuştur. Ekspresyon değişiklikleri yanında miRNA genlerinin kopya sayısı değişiklikleri de normal ve tümörlü dokular karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu kopya sayısı değişikliklerinin yüksek bulunması (%72,8) ekspresyon değişikliklerini bir anlamda açıklamaktadır (6). Ekspresyon değişikliklerine sebep olabilecek diğer bir mekanizma ise epigenetik değişikliklerdir. Lehman ve arkadaşlarının (198) çalışmasına göre meme kanserinde etkili olduğu bilinen bazı miRNA genlerinde, %34-86 arası vakada hipermetilasyon saptanmıştır.

Bu çalışmada metilasyona uğradığı tanımlanan miRNA genleri; miR-9-1, miR-124a-3, miR-148, miR-152 ve miR-663' tür (198).

İnsan meme kanserlerini karakterize edici miRNA' ların varlığı ile ilgili ilk çalışma 2005 yılında yayımlanmıştır. Lu ve arkadaşları flow sitometri tekniği ile meme kanserini de içine alan farklı tümör tiplerinde miRNA ekspresyon profillerini değerlendirerek miRNA ekspresyon düzeylerinin, normal dokulara kıyasla tümörlerde genel olarak düşük seviyelerde olduklarını belirlemişlerdir (4). Iorio ve arkadaşlarının (199) yaptıkları çalışmada ise meme kanserine spesifik normal ve tümörlü dokularda farklı seviyelerde eksprese olan miRNA' lar tanımlanmıştır. Bu miRNA' lardan miR-10b, miR-125b ve miR-145 down-regüle; miR-21 ve miR-155 ise up-regüle olarak belirlenmiştir (199). Tablo-3 ve tablo-4' de meme kanserinde etkili miRNA' lar ve hedeflediği genleri görmekteyiz.

Tablo-3 Meme Kanserinde Etkili Olan miRNA' lar ve Hedeflediği Genler (200)

İsim	Lokalizasyonu	Ekspresyon durumu ve rolü	Hedefi
MiR-21	17q23.2	Aşırı eksprese,onkogenik role sahip	BCL2, TPM1, PDCD4
MiR-155	21p21.3	Aşırı eksprese	-
MiR-206	6p12.2	Aşırı eksprese	ERa
MiR-125a	19q13.41	Düşük eksprese, Hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik	ERBB2, ERBB3
MiR-125b	11q24.1	Hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik role sahip	ERBB2, ERBB3
MiR-145	5q32	Düşük eksprese	-
miR-10b	2q31.1	Düşük eksprese ama metastatik potansiyel ile ilişkili	Homeobox D10
MiR-9-1	1q22	Düşük eksprese, hipermetile	-
MiR-27a	19p13.12	MDA-MB-231 hücrelerinde onkogenik role sahip	ZBTB10
MiR-17-5p	13q31.3	Meme kanser hücre hatlarında hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik	AIB1
Let-7	*	Düşük eksprese	RAS, HMGA2

let-7 ailesi üyeleri farklı kromozomal lokasyona sahiptir.

Tablo-4 Meme Kanserinde Önemli miRNA' lar ve Hedefleri (200)

MikroRNA	Ekspresyon durumu ve Rolü	Hedefi
miR-21	Overeksprese, onkogenik	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN
miR-10b	Down-regüle, metastatik potansiyel	HOXD10
miR-27a	Onkogenik (meme kanser hücreleri)	ZBTB10
miR-206	Overeksprese	ER alpha
miR-17-5p	Tümör baskılayıcı (meme kanser hücreleri)	AIB1
miR-125a & b	Down-regüle, tümör baskılayıcı	ERBB2, ERBB3
miR-200 family	Down-regüle, metastaz baskılayıcı	ZEB1, ZEB2
miR-205	Down-regüle, tümör baskılayıcı	ERBB3, VEGF-A, ZEB1, ZEB2
miR-146a & b	Metastaz baskılayıcı	EGFR
miR-204	Overeksprese	PDEF
miR-510	Overeksprese	PDEF
miR-193b	Tümör baskılayıcı (meme hücre hatları)	uPA, ER alpha
miR-145	Down-regüle	RTKN, ER alpha
miR-155	Onkogenik	RhoA

Meme kanserinin biyolojisinde önemli role sahip farklı seviyelerde eksprese olan miRNA' lardan, meme kanseri dokuları ve normal dokular karşılaştırıldığında ekspresyonunda en fazla artış görülen onkogenik özellikteki miR-21' in, meme karsinomunda overeksprese olup hücre sağkalımına ve proliferasyonuna aracılık ettiğini Iorio ve Croce yaptıkları çalışmalarında kanıtlamışlardır (3). miR-21; *PTEN*, *PDCD4* ve *TPM1* gibi tümör baskılayıcı genlerini hedeflemektedir. miR-21, bu tümör baskılayıcı genlerin eksprese olmasını baskılayarak tümör oluşumuna sebep olmakta ve transkripsiyonel olarak Stat3 geni tarafından IL-6 sinyal yolağında aktif duruma geçmektedir (201). miR-21, hücre hareketini ve invazyonu, tümör baskılayıcı bir protein olan PTEN' in mRNA' sını hedefleyerek teşvik etmektedir. PTEN, birkaç MMP (Matriks Metalloproteaz)' in ekspresyonunu engelleyerek, dolayısıyla hücre invazyonunu azaltarak tümör baskılayıcı bir etki göstermektedir (202). Bu miRNA' nın ekspresyonundaki farklılık ER ve PR ekspresyon durumu, tümör evresi gibi meme kanserinin bazı histopatolojik özellikleri ile de ilişkilidir (203). Son zamanlarda, kolorektal kanserlerde miR-21' in, *PDCD4* genini baskıladığı, bunun da invazyon ve metastaza yol açtığı belirlenmiştir. Kolorektal kanserlerde, pankreas endokrin ve ekzokrin tümörlerde de miR-21 overekspresyonunun düşük sağkalım ve kötü tedavi sonuçları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. miR-21; ileri klinik evre, lenf nodu metastazı, kötü prognoz ile ilişkili olup

invazyon ve metastaz olaylarında çok iyi karakterize edilmiştir (204). Bu miRNA, açıklanan ilk kanser miRNA' sını olup bu molekülün diğer malignansilerde de overeksprese olduğu belirlenmiştir. miR-21' in AML, KLL ve glioblastoma (5, 205-208) gibi hematolojik malignansilerde ve pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme, ovaryum ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yüksek seviyelerde ekspresyonu tespit edilmiştir (5, 203).

İlk tanımlanan onkogenik miRNA' lardan bir diğeri olan miR-155 ise meme kanserinde sıklıkla up-regüle olup *TCL1*, *BCL2*, *TP53*, *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genleri hedef almaktadır (209). Meme kanserli hastalarda, miR-155 ekspresyon seviyesinin normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda önemli derecede yüksek bulunması, ilerlemiş tümör evresi ve lenf nodu metastazı ile korelasyon göstermektedir. miR-155 ekspresyonunun, insan meme kanserleri için terapötik hedef ve bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilebileceği ifade edilmektedir (210). Bununla birlikte bu miRNA' nın yüksek ekspresyonunun bazı lösemi tiplerinde ve akciğer adenokarsinomlarında tümörün agresifliği ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (177-181). miR-155' in katı tümörlerde ve hematolojik malignansiler ile birçok malign olmayan hastalıkta da regülasyonunda bozukluk görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda miR-155' in ekspresyonundaki artışın malignansilerin birkaç tipinde kötü genel sağkalım ve geç evre ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-155' in pediatrik Burkitt lenfoma, Hodgkin hastalığı, DLBCL (diffüz büyük B hücreli lenfoma), kolon ve pankreas kanserlerinde overeksprese olduğu belirlenmiştir (211-213).

İnsan kanser hücrelerinde metastatik etkisi belirlenen ilk miRNA, miR-10b' dir. Meme tümörlerinin farklı tiplerinde ekspresyon seviyelerinde artış gözlenen miR-155' ten farklı olarak miR-10b' nin sadece metastatik meme kanser hücrelerinde ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca in vitro çalışmalarda hücre migrasyonu ve invazyonunda, in vivo da ise metastazda rol oynadığı tespit edilmiştir (3). Iorio ve arkadaşları (173) 2008 yılında yayımladıkları makalelerinde, miR10b' nin ekspresyon seviyesindeki durumu, meme tümörlerinde normal dokular ile karşılaştırdıklarında down-regüle olarak belirlemişlerdir. Ayrıca bu miRNA' nın ekspresyon seviyesindeki farklılığın da klinik işleyiş ve metastaz varlığı ile korele olduğu da aynı çalışma da analiz edilmiştir. miR-10b metastaz içermeyen meme kanserli hastalarda down-regüledir. Fakat %50 metastaz pozitif hastalarda miR-10b seviyesinde artış belirlenmiştir (173).

miR-145, meme tümör dokularında genellikle down-regüle olup, etkisini TP53 yolağının aktivasyonu aracılığı ile ERa' yı hedefleyerek ortaya koymaktadır (196). Kim ve arkadaşları (196) miR-145' in terapötik potansiyelinin belirlendiği çalışmalarında meme kanser hücre hatlarında ve meme kanserli hasta dokularında, miR-145 ve hedef genlerinin (*FASCIN-1*, *C-MYC*, *SMAD2/3* ve *IGF-1R*) ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlar ve aralarında ters korelasyon olduğunu bulmuşlardır. miR-145 ekspresyon düzeyleri, normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda azalma göstermiştir. Meme kanserinde miR-145' in yüksek ekspresyon seviyesi; metastazı, kanser hücresi büyümesini ve kanser hücrelerinde sağkalım faktörlerinin seviyesini azaltır. Dolayısıyla mevcut çalışmada, meme kanseri tedavisinde miR-145' in potansiyel bir hedef olarak düşünülebileceği ifade edilmektedir (196).

Radojijic ve arkadaşları (214) onkomiRNA' ların ve tümör baskılayıcı miRNA' ların ekspresyon profillerini araştırmak ve triple negatif olan primer meme kanserli hastalarda bu miRNA' ların olası ilişkilerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmalarında, triple negatif primer meme kanserli hasta örneklerinde miR-21, miR-210 ve miR-221' in ekspresyon seviyelerinde artış; miR-10b, miR-145, miR-205 ve miR-122a' nın ise ekspresyon seviyelerinde düşüş saptamışlardır. miR-222 ve miR-296 ekspresyon düzeyi ise triple negatif olan, normal ve meme kanserli doku örnekleri arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Genel sağkalım ve hastalısız sağkalım ile miR-21, miR-210, miR-221 ve miR-222' nin yüksek ekspresyon seviyeleri arasında da anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (214).

miRNA ailesinin kurucu üyelerinden biri olan let-7 ise hayvan filumları boyunca korunan ve *C.elegans*' ın gelişiminde önemli rolü keşfedilmiş bir moleküldür. Let-7 miRNA' sı tümör baskılayıcı özellikte bir miRNA olup, meme kanserini de içine alan çeşitli insan kanserlerinde ekspresyon seviyesi düşüktür. Normal ekspresyon düzeyi ile birkaç mitojenik yolağın anahtar düzenleyicilerini baskıladığı ve çeşitli onkogenleri hedef alarak kanser büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Let-7 ekspresyonu, meme kanser işleyişinde erken evrede kaybedilir veya devam eden ekspresyon düşük evreli, ER pozitif ve luminal A tümörler ile ilişkilidir. ER pozitif metastatik meme kanserlerinde let-7 miRNA' sının etkinliğini destekleyen çalışmalarda mevcuttur. Let-7' nin birkaç fonksiyonel hedefi tespit edilmiştir. Bunlar arasında klasik bir proto-onkogen olan *RAS*, *HMG2* ve *IMP-1* bulunmaktadır. Let-7' nin, *RAS* proto-onkogeninin ekspresyonunu regüle ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ras proteinleri hücre büyümesi ve

farklılaşmasını düzenleyen membran ile ilişkili sinyal proteinleridir. Let-7, onkogenik proteinlerin ekspresyonunu kontrol ettiği için, bu molekülün tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu tahmin edilmektedir (215).

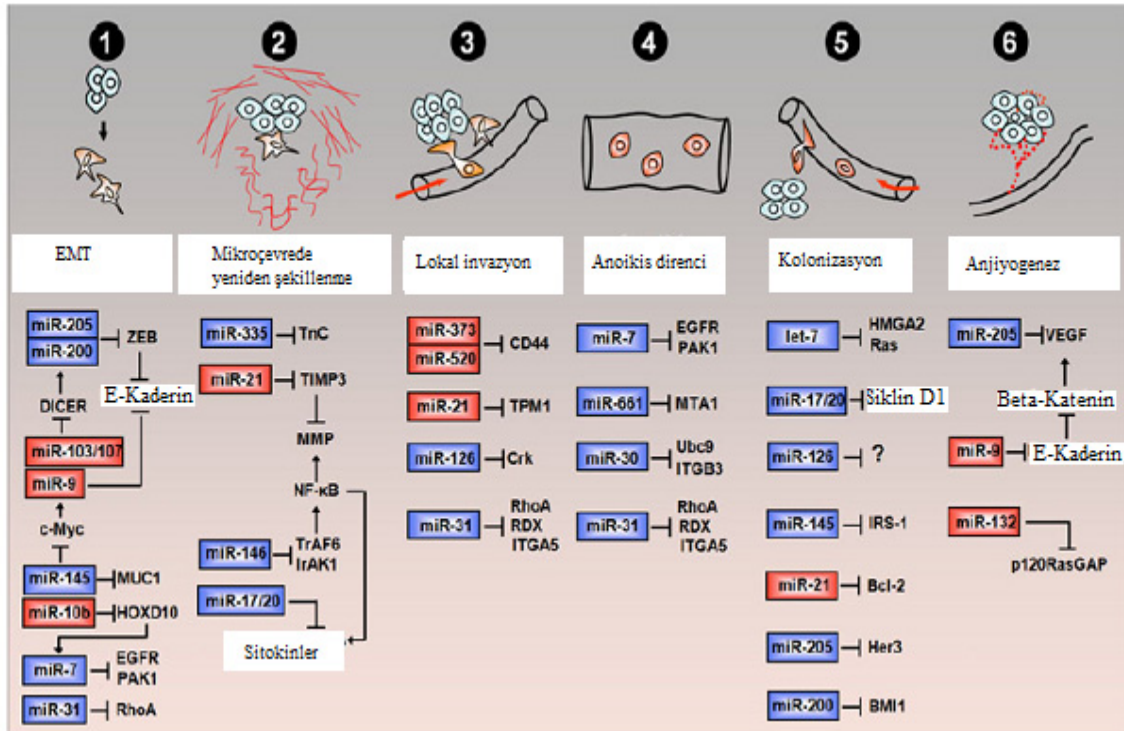
İn vivo çalışmalarda da, let-7' nin akciğer ve meme kanserli fare modellerinde etkili olduğu belirlenmiş ve bu miRNA' nın ekspresyon düzeylerinin fare meme hücrelerinde down-regüle olduğu bildirilmiştir. Meme kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda let-7 ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin proliferasyon ve metastazi etkilediği belirlenmiştir. Elde edilen veriler aynı zamanda let-7 miRNA' sının kanser kök hücre farklılaşmasını ve apoptozu düzenlediğini, bu nedenle de kanser tedavisinde potansiyel tedavi edici molekül olarak denenebileceğini göstermektedir (215).

Birbirinin homoloğu olan miR-221 ve miR-222' nin, son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda insan tümörlerinin birkaç tipinde up-regüle olduğu açıklanmış olup, tümör sistemine bağlı olarak onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği kabul edilmiştir (216). Ayrıca bu miRNA' ların agresif seyirli bazal benzeri meme kanserinde rol oynadığı bildirilmiş olup, özellikle bazal benzeri meme kanserinde miR-221/miR-222' nin ekspresyon düzeyindeki farklılık ile onkogenik RAS-RAF-MEK yolağının fonksiyonunda azalma raporlanmıştır. Bu miRNA' ların *TRPS1* geninin baskılanması yoluyla invazyon ve migrasyonun artması ile metastaza aracılık ettikleri belirlenmiştir. Stinson ve arkadaşları (217), meme kanserinin bazal ve luminal tipini dahil ettikleri çalışmalarında, birden çok hücre hattı kullanarak mikroarray taraması gerçekleştirmişlerdir. Bunun sonucunda miR-221 ve miR-222' nin ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olduğunu ortaya koymuşlardır (217).

miR-221 ve miR-222' nin artmış ekspresyon seviyeleri, ER negatif meme kanserlerinde daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olup (216), son yıllarda da bu miRNA' lar ile ER durumu arasındaki ilişkiyi destekleyen çalışmalar ortaya çıkmıştır. miR-221 ve miR-222' nin ER negatif meme kanseri hücre hatları ve primer meme tümörlerinde sıklıkla up-regüle olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, miR-221 ve miR-222' nin artmış ekspresyon düzeyleri, ER' nün negatif regülasyonu yoluyla tamoksifen direncine katkıda bulunurken, miR-221 veya miR-222' nin ekspresyon seviyesindeki düşüş tamoksifene duyarlılığı yeniden düzenler. Bu nedenle, miR-221 ve miR-222' nin ER negatif meme kanserleri için potansiyel terapötik hedefler olarak hizmet edebileceği ifade edilmiştir (218).

Bazı miRNA' lar ise özellikle meme kanser hücre hatlarının metastatik ve invaziv fenotipi ile ilişkilidir ve metastatik tümör dokularında ve lenf nodlarında tespit edilmiştir.

Bu miRNA' lar metastazı baskılayıcı yönde hizmet ederler. Ekspresyonları sıklıkla down-regüledir ya da metastatik odakları ve meme kanser hücre hatlarında ekspresyonlarında kayıp söz konusudur (Şekil-14). miR-335 ve miR-126 metastazı baskılayan ilk miRNA' lar olarak tanımlanmıştır. miR-335 ve miR-126 tümör büyümesinin inhibisyonunda, proliferasyon ve hücre invazyonu ile meme kanserinde metastazın baskılanmasında rol oynamaktadır (219). Massague ve arkadaşları (220) primer meme tümörlerinde miR-335 ve miR-126' nın ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları analiz etmişler ve bu miRNA' ların zayıf metastazlı sağkalım ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle, bu iki miRNA, hastalıkta metastaz gelişme olasılığının birer belirteci olarak tespit edilmiştir. Bu bulguların moleküler temelini açıklamaya yönelik yapılan çalışmalar miR-335 ve miR-126' nın metastaz ile ilişkisini ortaya koymuş ve bu miRNA' ların meme kanserli hastalarda prognostik sınıflamada kullanılabileceğini göstermiştir (219). Klinik çalışmalarda belirtildiği üzere, miR-335 ya da miR-126' dan herhangi birinde görülen ekspresyon seviyesindeki kayıp, tümörlerin metastatik nüksü ve uzak metastazlı sağkalım ile ilişkilidir.



Şekil-14 Meme Kanseri Metastazında miRNA' ların Kontrolü (221)

Meme dokularında homeostazinin korunması ve *BRCAl* düzenleyici kaskadının kontrolü, miRNA'ların fonksiyonunun belirlenmesinde öneme sahiptir. miR-335' in *BRCAl* kaskadının düzenlenmesindeki rolünü ve bu miRNA'nın yüksek ekspresyon düzeyinin meme kanser hücrelerinde kritik tümör baskılayıcı biyolojik özellikler ile ilişkili olduğunu Heyn ve arkadaşları (222) 2011 yılında yayımladıkları makalelerinde ortaya çıkarmıştır. miR-335, üç (*ESR1*, *IGF1R* ve *SPI1*) genin ekspresyonunda post-transkripsiyonel düzenleyici olarak tahmin edilmiş, daha öncesinde ise *BRCA1* ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. İnsan meme kanserlerine yönelik miR-335 regülasyonunun önemi, normal kontrol örneklerine göre primer sporadik meme tümörlerinde miR-335 seviyelerinin ($p < 0.05$) azalması ile teyit edilmiştir. Fonksiyonel olarak miR-335 overekspresyonu hücre canlılığının azalmasına ve apoptozun artmasına yol açmıştır. Bu da miR-335' in tümör baskılayıcı rolünü destekler niteliktedir. Meme kanseri gelişimi ve ilerleyişi boyunca bu miRNA'nın deregülasyonu, kritik tümör baskılayıcı sinyallerin inaktivasyonu ile tümörjenik potansiyelin artmasına neden olabilmektedir (221).

Meme kanserli hastalarda metastaz gelişimi ile ekspresyon düzeyi arasında ters korelasyon olduğu belirlenen miR-31' in artmış ekspresyon düzeyi, agresif seyirli meme tümör hücrelerinde metastazı baskılamaktadır. miR-31, son zamanlarda PCR tabanlı görüntüleme yoluyla insan meme kanserinde metastatik işleyişin potansiyel düzenleyicisi olarak tespit edilmiştir. 15 farklı meme epitel hücre hattında ve meme tümörlerinde metastatik kapasite ve miR-31 ekspresyon seviyeleri arasında ters bir ilişki olduğu Valastyan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmektedir (223). Aynı çalışmada primer meme tümörlerinde miR-31 ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, klinik olarak saptanabilen uzak metastazlı hastalara ait tümörler ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (224). miR-31 aktivasyonunun, meme kanseri metastazı oluşmuş olan vakalarda, sağkalımı uzattığı ve metastatik ilerleyişi baskıladığı açıklanmıştır.

Diğer bazı tümörlerde ekspresyon seviyesi yüksek olmasına rağmen miR-205' in meme tümörlerindeki ekspresyonu normal meme dokularına oranla düşük seyretmektedir. miR-205' in anormal derecede artmış ekspresyon düzeyi, hücre proliferasyonunu inhibe eder ve hücre büyümesini engeller. miR-205, bu tümör baskılayıcı rolünü *HER-3* ve *ZEB1* onkogenlerini direkt hedeflemesi yoluyla ortaya koyar. Bu nedenle miR-205, meme kanseri için terapötik bir hedef olarak gösterilebilir (225). Meme kanserlerinin yaklaşık %20-30' unda *HER-2*' nin protein overekspresyonu ve gen amplifikasyonu gözlenir. Bu

miRNA, HER-2 overekspresyonu ile negatif regülasyon göstermektedir. HER-2 pozitif meme epitel hücrelerinde, miR-205 ekspresyonu düşüktür. Adachi ve arkadaşlarının (226) yaptıkları çalışmada, miR-205, meme kanseri ile ilişkili bir molekül olarak belirlenmiş ve bu molekülün *HER-2* geninin yüksek ekspresyon seviyesi ile negatif regülasyonu saptanmıştır (226).

O' Day ve arkadaşlarının (174) normal ve meme kanserli dokular arasında microarray kullanarak miRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, miR-206 meme kanserinde tümör baskılayıcı miRNA olarak tanımlanmıştır (174). Kondo ve arkadaşlarının (227) yaptıkları diğer bir çalışmada ise, kantitatif RT-PCR analizi ile miR-206 ekspresyon seviyesinin ER α pozitif meme kanserli dokularda azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca meme kanserli dokularda miR-206 ekspresyonunun ER α ile ters korelasyon gösterdiği buna karşın ER β ile korele olduğu belirtilmiştir. miR-206' nın, ER α ekspresyonunu baskıladığı ve MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği yine bu çalışmada ifade edilmiştir.

Meme kanserlerinin yaklaşık % 5' ini temsil eden, moleküler özellikleri arasında *P53* mutasyonları, onkogen amplifikasyonları, genomik anomalilerin gözlenmesi ve spesifik belirteçlerin ekspresyonlarının görünmesi ile tanımlanan bilateral meme karsinomlarında miRNA ekspresyonlarını tanımlayan ilk çalışma 2012 yılında Iyevleva ve arkadaşları tarafından yayımlanmıştır (228). Meme kanser patogenezinde rol oynadığı bilinen birkaç miRNA' nın (miR-21, miR-10b, miR-17-5p, miR-31, miR-155, miR-200c, miR-18a, miR-205 ve miR-27a) ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, 80 bilateral meme kanserli hasta ile 40 ünilateral meme kanserli hasta karşılaştırılarak analiz edilmiş, iki onkogenik miRNA (miR-21 ve miR-10b) ve bir antionkogenik miRNA (miR-31)' nın ünilateral neoplazmları ile karşılaştırıldığında, bilateral meme kanserli hastalardan alınan tümörlerde ekspresyon seviyeleri yüksek bulunmuştur (228). Ünilateral ve bilateral meme kanserlerinde etkisi olduğu belirlenen miRNA' lar tablo-5' de verilmiştir.

Tablo-5 Ünilateral ve Bilateral Meme Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Tümör Baskılayıcı ve Onkogenik Özellikteki miRNA' lar (228)

miRNA	Hedeflediği genler	Meme kanserindeki etkisi
Onkogen		
miR-21	PDCD4, PTEN, TPM1, ANP32A, SMARCA4, MARCKS	Apoptoz, hücre çoğalması, invazyon ve metastazi etkiler. Meme kanserinde ekspresyonu yüksektir. Hastalığın agresif seyri ile ilişkilidir.
miR-10b	HOXD10, Tiam1	Metastazi teşvik eder. Metastatik meme kanserinde regülasyonu yüksektir.
miR-155	RHOA, FOXO3a, SOCS1, SMAD5, SHIP1	Meme kanserinde, özellikle epitelyal mezanjimal geçişlerde yer alan hormon reseptörü negatif tümörlerde ekspresyonu yüksektir.
miR-27a	FOXO3, ZBTB10, myt1, Spry2,	Hücre siklusu ve östrojen sinyalizasyonunu düzenler.
Tümör baskılayıcı gen		
miR-31	FZD3, ITGA5, M-RIP, MMP16,	Metastaz ile ilişkili genlerin regülasyonunu düşürür.
miR-200c	BM11, ZEB1, ZEB2, TUBB3, FAP1	Meme kanseri kök hücrelerinde regülasyonu düşüktür. Epitelyal mezanjimal geçişi engeller. Çeşitli deneysel koşullarda tümör baskılayıcı özellik gösterir. Apoptozu düzenler.
miR-18a	ER alpha	Östrojen sinyalizasyonunu düzenler. ER-negatif tümörlerde ekspresyonu yüksektir.
miR-205	HER-3, ZEB1, ZEB2, VEGF-A	Meme kanserinde regülasyonu düşüktür.
miR-17-5p	A1B1, CCND1, E2F, HBP1	Hücre çoğalması, invazyon ve migrasyonu düzenler.

Meme kanserinde regülasyonunda düzensizlik olan miRNA' lardan bir diğeri de miR-125b' dir. miR-125b ekspresyonu, meme kanserinde down-regüledir ve meme kanserli primer tümörlerde ve meme kanser hücre hatlarında ekspresyon seviyesi azalmıştır. Iorio ve arkadaşları (3) 10 normal ve 76 primer meme tümör örneğinin mikroarray analizi sonucu, miR-125b ekspresyon düzeyinde azalma olduğunu yaptıkları çalışmada ifade etmişlerdir (3). miR-125b' nin ekspresyon seviyesindeki azalma, 13 HER-2 pozitif, 7 HER-2 negatif meme tümör örneğinde gösterilmiştir. Bir tümör baskılayıcı gen fonksiyonu ile uyumlu olan miR-125b' nin hedefleri arasında ovaryum kanserinde proto-onkogen olan *BCL3* ve *E2F3*, meme kanserinde ise *ETSI* ve bir onkogen olan *MUC1* bulunmaktadır.

Jurmeister ve arkadaşlarının (229) gerçekleştirdikleri çalışmalarında ise miR-200c' nin, aktin düzenleyici genler olan *FHOD* ve *PPMIF*' yi regüle ederek, meme kanser hücrelerinde invazyonu ve migrasyonu baskıladığı ifade edilmiştir. Meme kanser hücre hatlarında, meme kanserli hasta örneklerinde ve farklı kökene ait 58 kanser hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada, *FHOD1* ve *PPMIF* genlerinin ekspresyon seviyeleri ile miR-200c' nin ekspresyon seviyesi arasında ters korelasyon olduğu ortaya konmuştur. miR-200 ailesi üyelerinin ekspresyon düzeylerinin, primer tümörler ile karşılaştırıldığında

metastazlı örneklerde sıklıkla down-regüle olduğu birkaç epitel malignanside ise miR-200c ekspresyon seviyesinin azalmasının kötü sonuç ile ilişkili olduğu açıklanmıştır. miR-200c' nin regülasyonunun düzenlenmesinin agresif kanser hücrelerinde migrasyonu ve invazyonu azalttığı, dahası miR-200c' nin yüksek ekspresyonunun meme kanserli ve akciğer adenokarsinomlu fare modelinde metastazı baskıladığı ifade edilmiştir. Çalışmalar doğrultusunda meme, ovaryum ve endometrial kanserlerde kemoterapi ve agresivite için miR-200c ekspresyon kaybı bir belirteç olarak kullanılabilir (229).

Sonuç olarak bugüne kadar yapılan araştırmalar ve elde edilen bulgulardan yola çıkarak, miRNA ekspresyon profillerindeki değişimlerden meme kanserinin de içinde bulunduğu birçok kanser türünün tedavisinin takibinde biyomarkır olarak yararlanılabileceği gösterilmiştir.

miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin tek bir gen ürününü etkilemekten ziyade bütün gen düzenleyici sistemi etkileyebilmeleri, bu moleküllerin her birinin çok sayıda hedef genin ekspresyonunu düzenlemesi, bir miRNA' nın ekspresyonunun değiştirilmesinin umulmadık birçok geni etkileyebilmesi ve bu durumun tersi olarak, tek bir genin birçok miRNA tarafından düzenlenebilmesi spesifik bir gen hedefini verimli şekilde etkileyebilmektedir. Kanserde gelişim sürecinin bir biyomarkırı veya terapötik ajan olarak miRNA' lardan yararlanılması için elde edilen bilgilerin belirli standartlara getirilmesi gerekmekte ve yeni araştırma bulgularına ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdiye kadar elde edilmiş veriler ışığında çalışmamızda, *BRCAl/2* genlerinden herhangi birinde mutasyon belirlenmiş ve belirlenmemiş, erken yaş ya da aile öyküsü olan meme kanserli vakaların normal ve tümörlü doku örnekleri kullanılmıştır. Meme kanser gelişiminde önemli diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilişkili 14 miRNA' nın (miR-21, miR-155, miR-145, let-7a, miR-10b, miR-125b, miR-221, miR-222, miR-205, miR-126, miR-206, miR-200c, miR-31, miR-335) ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda vakalarda belirlenmiş olan farklı tipteki mutasyonların miRNA ekspresyon seviyelerine ne şekilde etki ettiği, miRNA' ların fonksiyonlarını değiştirip değiştirmediği ayrıca belirlenmiş mutasyonların, miRNA' ların görev aldığı sinyal ileti yolaklarındaki işlevleri ve hedeflediği genler üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu sayede ilgili miRNA' ların meme kanserindeki rolleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından Haziran 2010 -Ekim 2011 tarihleri arasında Tıbbi Biyoloji AD' na yönlendirilen, erken yaş ya da aile öyküsü olan meme kanserli 60 hastanın kan örneklerinde, U.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Kanser Genetiği Laboratuvarı' nda rutin hasta hizmeti dahilinde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin mutasyon analizleri gerçekleştirildi. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ait tüm ekzonlar (*BRCA1*' in 23, *BRCA2*' nin 27 ekzonu) amplifiye edildikten sonra Heterodubleks Analizi ve DNA Dizi Analizi ile değerlendirildi. *BRCA1* geninin 10.ekzonu 6, *BRCA2* geninin ise 10.Exonu 3, 11.exonu ise 11 parçaya ayrılarak amplifiye edildi. DNA Dizi Analizleri gerçekleştirilen ve çalışmaya dahil edilmesi planlanan ilgili hastaların normal ve tümör doku materyallerinin temini; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu' nun 2010-1/21 no' lu kararı ile uygun bulunduktan sonra, bu hastalara ait tümörü ve normal dokuyu en iyi temsil eden parafin bloklar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edildi. Hastalara ait klinik özellikler ise Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edildi. Planlanan tez ile ilgili olarak oluşturulan tez projesi, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı' nca değerlendirilerek UAP(T)-2011/1 sayılı proje olarak kabul edildi. Meme kanserli hastalara ait normal ve tümörlü doku örneklerinde meme kanser gelişiminde önemli bazı miRNA' ların ekspresyon analizleri değerlendirildi. Mevcut proje kapsamında planlanan bütçede oluşturulan kısıtlama nedeniyle proje ile ilgili miRNA ekspresyon analizleri, Ohio State Üniversitesi (Comprehensive Cancer Center, PCR shared Resources)' nden hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi.

Tez projesi yapılandırılırken konunun içeriği olarak "Meme Kanseri Gelişiminde miRNA' ların Rolü' nün Araştırılması" planlanmıştır. Fakat ülkemizde tez projesinin değerlendirilmesi, kabulü, sarfların satın alınması ve temini süreçleri çok uzun süre aldığından bu süreçte tez projesinin konu içeriği ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma yayımlanmıştır. Bu nedenle tez projesine dahil edilen hastaların literatürde hiç çalışılmamış *BRCA1/2* gen mutasyonu taranan meme kanserli hasta grubu seçimi oluşturularak literatürde özgün değerler elde edilmesi sağlanmıştır. Bu hasta grubunun oluşturulması oldukça zor olmasına rağmen, ilgili hastalar Anabilim Dalımızın 2000' li

yılların başından itibaren *BRCA1/BRCA2* mutasyon analizleri ile ilgili edinmiş tecrübeleri ile oluşturulan rutin hasta hizmeti dahilinde Anabilim Dalı' mıza başvuran hasta grubu içinden seçilerek sağlanmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

- ABI Prism 7900HT RT-PCR, Applied Biosystems, USA.
- Gene Amp PCR 9700 Thermocycler, Applied Biosystems, USA.
- Isıtıcı blok (DB-2A), Techne, England.
- Su banyosu (BM 302), Nüve, İstanbul, Turkey.
- Santrifüj (Z-23), Hermle, Germany.
- Santrifüj (22R), Beckman Coulter, Germany.
- Plate santrifüjü, Thermo, USA.
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks), Velp Scientifica, Italy.
- + 4°C Buzdolabı, Alaska, İstanbul, Turkey.
- - 20°C Buzdolabı, Bosch, İstanbul, Turkey.
- - 80°C Buzdolabı, Nüve, İstanbul, Turkey.
- DNA/RNA UV kabini, Biosan, Latvia.
- Nanodrop (Nanodrop 2000), Thermo, USA.
- Pipet, (0.5-10 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (10-100 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (20-200 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet F2, (100-1000 µl), Thermo, USA.
- HP lazer yazıcı, İstanbul, Turkey.
- Steril eldiven (P1102), Braun, Germany.

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Biostic Paraffin Removal Reagent, MO BIO, USA.
- RNeasy FFPE kiti (50 örneklik), Qiagen, USA.
- Taqman MicroRNA Reverse Transkripsiyon Kiti, Applied Biosystems, USA.

- Taqman MaturemiRs Assays, Applied Biosystems, USA.
- Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA.
- 96 ‘lık plate, Applied Biosystems, USA.
- Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, USA.
- Etanol, Merck, Germany.
- Parafilm.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Çalışmaya dahil edilen meme kanserli mutasyon belirlenen 23 hasta ile mutasyon belirlenmeyen 37 hastaya ait parafinize edilmiş tümör dokularından ve ilgili hastaların (*BRCAl/2* genlerinden birinde mutasyon belirlenen 10 hastanın ve mutasyon belirlenmeyen 10 hastanın olmak üzere) toplam 20’ sinin parafinize edilmiş normal dokularından Qiagen RNeasy FFPE kit kullanılarak RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

3.3.2. Elde Edilen RNA’ ların Miktar ve Kalite Tayini

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 260 nm’ de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/μL veya μg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA’ nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA’ nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA’ nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

Total RNA (ng/μl) = 260 nm’ deki absorbans x 40 x Dilüsyon Faktörü

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL’ ye karşılık geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerde bulunduğu gibi 280 nm’ de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm’ de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır.

Çalışmamızda izole edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesi nanodrop cihazında ölçülerek ekspresyon analizleri için uygunluğu değerlendirildi (Tablo-6).

Tablo-6 Hastalara Ait Örneklerin RNA Konsantrasyonları ile İlgili Nanodrop Ölçümleri

MUTASYON POZİTİF HASTALARA AİT TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİ									
Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	Faktör	
M(+)	1	883,1	ng/µl	22.077	11.542	1,91	1,98	RNA	40
M(+)	2	13,1	ng/µl	0,327	0,184	1,78	1,19	RNA	40
M(+)	3	52,3	ng/µl	1,307	0,682	1,91	1,7	RNA	40
M(+)	4	151,2	ng/µl	3.779	2.069	1,83	1,24	RNA	40
M(+)	5	56,9	ng/µl	1,423	0,733	1,94	1,73	RNA	40
M(+)	6	485,6	ng/µl	12.141	6.370	1,91	1,53	RNA	40
M(+)	7	526,5	ng/µl	13.161	6.818	1,93	1,91	RNA	40
M(+)	8	218,2	ng/µl	5.455	2.826	1,93	1,86	RNA	40
M(+)	9	16,9	ng/µl	0,422	0,255	1,65	0,95	RNA	40
M(+)	10	2135	ng/µl	53.375	28.862	1,85	1,94	RNA	40
M(+)	11	304,8	ng/µl	7.621	4.278	1,78	1,62	RNA	40
M(+)	12	28,2	ng/µl	0.563	0.315	1,78	1,86	RNA	40
M(+)	13	32,2	ng/µl	0,643	0,327	1,97	1,82	RNA	40
M(+)	14	48,8	ng/µl	0,977	0,493	1,98	1,91	RNA	40
M(+)	15	24,7	ng/µl	0,494	0,303	1,63	1,05	RNA	40
M(+)	16	23,5	ng/µl	0,588	0,314	1,88	1,04	RNA	40
M(+)	17	49	ng/µl	1,225	0,651	1,88	1,08	RNA	40
M(+)	18	177,5	ng/µl	4,436	2,272	1,95	1,88	RNA	40
M(+)	19	119,8	ng/µl	2,396	1,243	1,93	1,85	RNA	40
M(+)	20	16,4	ng/µl	0,327	0,173	1,89	1,61	RNA	40
M(+)	21	82,9	ng/µl	2,073	1,109	1,87	1,32	RNA	40
M(+)	22	171,4	ng/µl	4,285	2,17	1,97	1,92	RNA	40
M(+)	23	10,4	ng/µl	0,208	0,129	1,61	1,03	RNA	40

Tablo 6' nın devamı

MUTASYON NEGATİF HASTALARA AİT TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİ								
Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	Faktör
M(-) 24	153,1	ng/µl	3,827	2,2	1,74	1,4	RNA	40
M(-) 25	26,6	ng/µl	0,665	0,379	1,75	0,97	RNA	40
M(-) 26	13,9	ng/µl	0,349	0,188	1,85	1,03	RNA	40
M(-) 27	119,2	ng/µl	2,979	1,581	1,88	1,43	RNA	40
M(-) 28	90,7	ng/µl	2,268	1,205	1,88	1,41	RNA	40
M(-) 29	17,2	ng/µl	0,429	0,221	1,94	1,57	RNA	40
M(-) 30	224,9	ng/µl	5,622	2,991	1,88	1,54	RNA	40
M(-) 31	29,2	ng/µl	0,729	0,414	1,76	1,11	RNA	40
M(-) 32	86,3	ng/µl	2,158	1,124	1,92	1,91	RNA	40
M(-) 33	12,9	ng/µl	0,323	0,189	1,71	0,65	RNA	40
M(-) 34	110,2	ng/µl	2,756	1,412	1,95	1,94	RNA	40
M(-) 35	45,3	ng/µl	1,131	0,581	1,95	1,9	RNA	40
M(-) 36	22,4	ng/µl	0,56	0,297	1,89	1,74	RNA	40
M(-) 37	177,2	ng/µl	4,431	2,365	1,87	1,52	RNA	40
M(-) 38	81,8	ng/µl	2,045	1,193	1,71	1,25	RNA	40
M(-) 39	136,5	ng/µl	3,414	1,777	1,92	1,54	RNA	40
M(-) 40	100	ng/µl	2,5	1,422	1,76	1,56	RNA	40
M(-) 41	25,5	ng/µl	0,639	0,366	1,74	1,13	RNA	40
M(-) 42	15	ng/µl	0,376	0,215	1,75	1,02	RNA	40
M(-) 43	30,6	ng/µl	0,764	0,465	1,64	1,11	RNA	40
M(-) 44	23,9	ng/µl	0,597	0,343	1,74	1,3	RNA	40
M(-) 45	11,7	ng/µl	0,293	0,165	1,78	1,3	RNA	40
M(-) 46	34,2	ng/µl	0,856	0,483	1,77	1,2	RNA	40
M(-)47	12	ng/µl	0,3	0,182	1,65	0,8	RNA	40
M(-)48	45,6	ng/µl	1,141	0,595	1,92	1,88	RNA	40
M(-)49	46,7	ng/µl	1,167	0,603	1,93	1,26	RNA	40
M(-)50	33,3	ng/µl	0,833	0,439	1,9	0,86	RNA	40
M(-)51	39,8	ng/µl	0,995	0,52	1,91	1,42	RNA	40
M(-)52	125	ng/µl	3,125	1,763	1,77	1,73	RNA	40
M(-)53	10,0	ng/µl	0,209	0,117	1,79	1,34	RNA	40
M(-)54	98,6	ng/µl	2,466	1,331	1,85	1,68	RNA	40
M(-)55	68	ng/µl	1,701	0,871	1,95	1,79	RNA	40
M(-)56	81,9	ng/µl	2,048	1,097	1,87	1,52	RNA	40
M(-)57	26,7	ng/µl	0,667	0,321	2,08	1,75	RNA	40
M(-)58	123,1	ng/µl	3,077	1,607	1,92	1,73	RNA	40
M(-)59	70,5	ng/µl	1,763	0,883	2	1,81	RNA	40
M(-)60	21,4	ng/µl	0,535	0,303	1,77	1,53	RNA	40

Tablo 6' nın devamı

MUTASYON POZİTİF HASTALARA AİT NORMAL DOKU ÖRNEKLERİ									
Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	Faktör	
M(+)	61	124,4	ng/µl	3,11	1,68	1,85	1,56	RNA	40
M(+)	62	13,1	ng/µl	0,326	0,19	1,72	1,45	RNA	40
M(+)	63	51	ng/µl	1,276	0,72	1,77	0,99	RNA	40
M(+)	64	39,6	ng/µl	0,99	0,524	1,89	1,75	RNA	40
M(+)	65	88,8	ng/µl	2,22	1,18	1,88	1,56	RNA	40
M(+)	66	143	ng/µl	3,575	1,868	1,91	1,75	RNA	40
M(+)	67	492,4	ng/µl	12,31	6,411	1,92	1,84	RNA	40
M(+)	68	361	ng/µl	9,024	4,817	1,87	1,78	RNA	40
M(+)	69	109,6	ng/µl	2,74	1,472	1,86	1,52	RNA	40
M(+)	70	52,5	ng/µl	1,313	0,696	1,89	1,39	RNA	40

Tablo 6' nın devamı

MUTASYON NEGATİF HASTALARA AİT NORMAL DOKU ÖRNEKLERİ									
Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	Faktör	
M(-)	71	723	ng/µl	18,08	9,915	1,82	1,95	RNA	40
M(-)	72	39,5	ng/µl	0,987	0,545	1,81	1,15	RNA	40
M(-)	73	406,3	ng/µl	10,16	5,401	1,88	1,73	RNA	40
M(-)	74	64,6	ng/µl	1,615	0,905	1,78	1,02	RNA	40
M(-)	75	53,7	ng/µl	1,342	0,712	1,89	1,7	RNA	40
M(-)	76	66	ng/µl	1,649	0,877	1,88	1,62	RNA	40
M(-)	77	294,4	ng/µl	7,359	3,798	1,94	1,98	RNA	40
M(-)	78	16,6	ng/µl	0,415	0,245	1,69	1,12	RNA	40
M(-)	79	115,8	ng/µl	2,896	1,493	1,94	1,8	RNA	40
M(-)	80	25,7	ng/µl	0,644	0,358	1,8	1,12	RNA	40

3.3.3. RNA' lardan cDNA Sentezi

Konsantrasyon ve kaliteleri değerlendirilerek optimize edilen RNA' lardan Taqman microRNA Reverse Transkripsiyon kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı ve programı tablo-7' de verildi. Çalışmada, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürünü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla florasan ışığa yapabilen işaretli (Taqman problu) primerler kullanıldı.

Tablo-7 cDNA Sentezi için Reaksiyon Karışımı ve PCR Koşulları

cDNA Master Mix		PCR Şartları
Bileşenler	Master Mix 15 µL' lik Reaksiyon	
dNTP (100mM total)	0.15 µl	16 °C'de → 30 dakika
RT enzim (50U/µl)	1.00 µl	42 °C' de → 30 dakika
10X RT miksi	1.5µl	85 °C' de → 5 dakika
RNase inhibitör	0.19 µl	4 °C'de → ∞
RNase-free su	4.16 µl	
Total	7.00 µl	

Her 15 µL' lik reaksiyon 7µl master mix, 3 µl primer ve 5 µl RNA örneği içerir. 15 µL' lik reaksiyon, 1-10 ng RNA örneği içermektedir.

3.3.4. Real-Time PCR ile miRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışmamızda ekspresyon analizleri gerçekleştirilen 14 miRNA' ya ait özellikler tablo 8' de verildi. İlgili miRNA' lara ait özellikler miRbase (<http://www.mirbase.org/>) veri tabanından elde edildi. Tablo-9' da ise çalışmada değerlendirilen miRNA' ların ekspresyon ve seçim kriterlerini ifade eden özellikleri, meme kanser tipleri ile ilişkisi ve hedef genleri verildi. Değerlendirilen miRNA' ların seçimi; meme kanser gelişiminde diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilişkisi literatürde son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar değerlendirilerek belirlendi.

Tablo-8 Ekspresyon Analizleri Gerçekleştirilen 14 miRNA' ya Ait Özellikler

No	Stem loop sekansı				Mature sekansı			Minor MiR* sekansı		
	Accession	ID	Sembol	Stem loop	Accession	ID	Sekans	Accession	ID	Sekans
1	MI 000077	hsa-mir-21	HGNC: MIR21	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUG ACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCG AUGGGCUGUCUGACA	MIMAT 000076	hsa-miR-21	8-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-29	MIMAT 000494	hsa-miR-21*	46-CAACACCAGUCGAUGGGCUGU-66
2	MI 0000681	hsa-mir-155	HGNC: MIR155	CUGUAAUUGCUGUUAUCGUAUAGGGGUUU UUGCCUCCAACUGACUCCU ACAUAUUGAGCAUUAACAG	MIMAT 0000646	hsa-miR-155	4-UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU-26	MIMAT 0004658	hsa-miR-155*	43-CUCCUACAUAUAGCAUUAACA-64
3	MI 0000461	hsa-mir-145	HGNC: MIR145	CACCUUGCCUCACGGUCCAGUUUUCGAG GAAUCCUUAAGAUUGCAAGUUGGGGAUCCU GGAUUACUGUUCUUGAGGUCUAGGUU	MIMAT 0000437	hsa-miR-145	16-GUCCAGUUUUCGAGAAUCCU-38	MIMAT 0004601	hsa-miR-145*	54-GGAUUCUGGAAUACUGUUCU-75
4	MI 0000062	hsa-let-7a-3	HGNC: MIRLET7A3	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGG GGCUCUGCCC UGCUAUGGG AUAACUAUACAUCUACUGUCUUUCCU	MIMAT 0000062	hsa-let-7a	4-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-25	MIMAT 0004481	hsa-let-7a*	52-CUAUACAAUCUACUGUCUUUC-72
5	MI 0000267	hsa-mir-10b	HGNC: MIR10B	CCAGAGGUUGAACGUUGUCUUAUUAUACCCUGUAGA ACCGAAUUUGUGGUUACCGUAUAGUCACAGAUUCG AUUC UAGGGGAAUAUUG GUCGAUGCAAAAACUUA	MIMAT 0000254	hsa-miR-10b	27-UACCCUGUAGAACCAGAAUUGUG-49	MIMAT 0004556	hsa-miR-10b*	66-ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAU-87
6	MI 0000446	hsa-mir-125b-1	HGNC: MIR125B1	UGCGCUCUCUCAGUCCUGAGACCCUAAUUGUG AUGUUUACCGUUUAAUCCAGGGUUAGGCUCUU GGGAGCUGCGAGUCGUGCU	MIMAT 0000423	hsa-miR-125b	15-UCCUGAGACCCUAAUUGUGA-36	MIMAT 0004592	hsa-miR-125b-1*	55-ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU-76
7	MI 0000298	hsa-mir-221	HGNC: MIR221	UGAACAUCAGGUCUGGGGCAUGAACCCUGCAUACA UGUAGAUUUUCUGUUGUUCGUUAGGCAACAGCUACA UG UCUGUGGGUUUCAGGCUACCCUGAAACUGUUCUC	MIMAT 0000278	hsa-miR-221	65-AGCUACAUCUGUCUGGGUUUC-87	MIMAT 0004568	hsa-miR-221*	25-ACCUGCAUACAUGUAGAUUU-46
8	MI 0000299	hsa-mir-222	HGNC: MIR222	GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUAAUGGCUCAGU AGCCAGUUGAUGUUCUGUUUCGUAUACAGCAGCUA CAU CUGGCUA UGGGUCUCUGAUGGCAUCUUCUAGCU	MIMAT 0000279	hsa-miR-222	69-AGCUACAUCUGGCUACUGGGU-89	MIMAT 0004569	hsa-miR-222*	31-CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCCU-52
9	MI 0000285	hsa-mir-205	HGNC: MIR205	AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUCUUCUCUUGUCCUU CAUUCACCCGGAGUCUCUAUACCAACAGAUUU CAGUGAGUGAAGUUCAGGAGGCAUGGAGCUGACA	MIMAT 0000266	hsa-miR-205	34-UCCUUAUUCACCCGAGUCUG-55	MIMAT 0009197	hsa-miR-205*	71-GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC-91
10	MI 0000471	hsa-mir-126	HGNC: MIR126	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGC GCUGUGACAUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUG CGCCGUCCACGGCA	MIMAT 0000445	hsa-miR-126	52-UCGUACCGAGUAAUAAUGCG-73	MIMAT 0000444	hsa-miR-126*	15-CAUUUUACUUUUGGUACGCG-35
11	MI 0000490	hsa-mir-206	HGNC: MIR206	UGCUCUCCGAGGCCACAUGCUUUUAUUCUCCCA UAUUGAAUUAUUGCUAUGAAUGUAAGGAAGU GUGUGUUUCGGCAAGUG	MIMAT 0000462	hsa-miR-206	53-UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG-74	-	-	-
12	MI 0000650	hsa-mir-200c	HGNC: MIR200C	CCCUCGUCUUAACCCAGCAGUGUUU GGGUGCGGUUGGGAGUCUCUAAUACUGCCGGUUA UGAUGGAGG	MIMAT 0000617	hsa-miR-200c	44-UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA-66	MIMAT 0004657	hsa-miR-200c*	5-CGUCUUACCCAGCAGUGUUUG-26
13	MI 0000089	hsa-mir-31	HGNC: MIR31	GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCA UAGCUGUUGAACUGGGAACCGCUAUGCCAACAUA UUGCCAUCUUC	MIMAT 0000089	hsa-miR-31	8-AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU-28	MIMAT 0004504	hsa-miR-31*	44-UGCUAUGCCAACAUAUUGCCA-65
14	MI 0000816	hsa-mir-335	HGNC: MIR335	UGUUUUGAGCGGGGUCUAAAGAGCAAUACGAAAAA UGUUUUGUCAUAAACCGUUUUUCAUUUUGCUCUCCUG ACCUCCU CUCAUUUGCUUAUUA	MIMAT 0000765	hsa-miR-335	16-UCAAGAGCAAUACGAAAAAUGU-38	MIMAT 0004703	hsa-miR-335*	52-UUUUUCAUUUUGCUCUCCUGACC-73

Tablo-9 Meme Kanser Gelişiminde Diagnostik, Prognostik ve İlaç Direnci ile İlişkili miRNA' lar

miRNA	Onk/ Tb	Up/ Down	Hedef Geni	Dia/Pro	Hangi Tip Meme Kanserinde Etkili
miR21	ONK	UP	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN, MASPIN, RECK, RASA1	PRO/DİA	İNVAZİV DUKTAL MEME CA, ER(+) MEME CA, METASTATİK MEME CA
miR155	ONK	UP	RhoA, CMAF, AGTR1, AID, IKBKE, TP53INP1	PRO/DİA	ER(+)MEME CA, İNVAZİV MEME CA
miR10b	ONK	D	HOXD10	PRO	İNVAZİV LOBULAR MEME CA, METASTATİK MEME CA
miR145	TB	D	ERG, RTNK, MYCERK5, HOXA9, KRAS, PARP8	PRO	BAZAL VE LUMİNAL TİP MEME CA
Let-7a-3	TB	D	HRAS, HMGA2, LIN28, PEBP1, CMYC	PRO	ER(+) MEME CA
miR125b-1	TB	D	HER-2, HER-3	PRO	METASTATİK MEME CA
miR200c	TB	D	TCF8, BMI1	PRO	METASTATİK MEME CA
miR205	TB	D	HER3, VEGF-A, ZEB1, ZEB2, TGFβ	PRO	TRİPLE (-) MEME CA, İNVAZİV MEME CA, METASTATİK MEME CA
miR206	TB	UP/D	ER□	PRO	ER□(-) MEME CA, ER□(+) MEME CA, BAZAL TİP MEME CA, HER-2(+) MEME CA
miR221	ONK	UP	P27, P57, PTEN, TIMP3	İLAÇ DİRENCİ	ER(-) MEME CA, HER-2(+) MEME CA, ER(+) MEME CA
miR222	ONK	UP	P27, P57, PTEN, TIMP4	İLAÇ DİRENCİ	ER(-) MEME CA, HER-2(+) MEME CA, ER(+) MEME CA
miR335	TB	D	PTPRN2, MERTK, Tenacin C, SOX4	PRO	METASTATİK MEME CA
miR126	TB	D	VEGFA, PIK3R2	PRO	METASTATİK MEME CA
miR31	TB	D	FZD3, ITGA5, MRIP, MMP16, RDX, RHOA	PRO	METASTATİK MEME CA

Dia: Diagnostik, Pro: Prognostik Onk: Onkogenik, Tb: Tümör Baskılayıcı

Tablo 10' da belirtilen RT-PCR reaksiyon solüsyonu hazırlanarak 96' lık plate'e yüklendi. 14 miRNA' nın ekspresyon analizleri, ABI Prism 7900HT RT-PCR cihazında gerçekleştirildi.

Tablo-10 Real-Time PCR Reaksiyon Karışımı

RT PCR Reaksiyon Mix		
20 µL' lik Reaksiyon		
Bileşenler	1 örneklik reaksiyon	3 tekrarlı reaksiyon
Taqman Small RNA assay (20 x)	1.00 µl	3.60 µl
cDNA	1.33 µl	4.80 µl
Taqman Universal, PCR Master II (2X)	10.00 µl	36.00 µl
Nükleaz free su	7.67 µl	27.61 µl
Total	20.00 µl	72.01 µl

Adım	Opsiyonlu AmpErase UNG Aktivitesi	Enzim Aktivitesi	PCR	
			40 sikluluk	
			Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Süre	2 dakika	10 dakika	15 saniye	60 saniye

3.3.5. RT-PCR Tabanlı miRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

RT-PCR Analizi, negatif kontrolleri de kapsayacak şekilde üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. miRNA' ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar Ct metodu kullanılarak hesaplandı. Referans seviyeleri olarak verilerin normalizasyonu için endojen kontroller olan RNU44 ve RNU48 kullanıldı. miRNA ekspresyonları için RT-PCR cihazının yazılım programında örneklerin başlangıç kopya sayısı ve Ct değerleri belirlendi. Ham verilerin üç kopyasından elde edilen ortalama Ct değerleri housekeeping gen olan RNU44 ve RNU48 ile normalize edildi.

3.3.6. miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi

miRNA' ların hedef genleri miRWalk veritabanı kullanılarak belirlendi (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>). miRNA' ların etkili olduğu sinyal ileti yollarına da KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) ve BioCarta

(<http://www.biocarta.com/>) veritabanları kullanılarak erişildi. Genlerin fonksiyonları ile ilgili bilgiler ise KEGG ve NCBI-Gen' den elde edildi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler farklı istatistiksel testler kullanılarak hesaplandı. Mutasyon pozitif hasta grubu ile mutasyon negatif hasta grubu arasındaki karşılaştırma Independent Sample T Testi ile gerçekleştirildi. İlk tanı ile hastalığın ilk yinelemesi arasında geçen süre hastalıksız sağkalım, ilk tanı ile ölüm tarihi arasında geçen süre genel sağkalım süresi olarak hesaplandı. Takip süresi ilk tanı tarihi ile son kontrol veya ölüm tarihi arasındaki süreler dikkate alınarak belirlendi. miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım süreleri ve hastaların almış olduğu tedaviler üzerine önemliliklerinin incelenmesi için Kaplan Meier Analizi uygulandı. miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için Pearson Chi-Square ve Fisher's Exact Test' leri gerçekleştirildi. Değişkenler arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak açıklamak için ise miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ile klinik özelliklerin tamamı Doğrusal Regresyon Analizi ile değerlendirildi. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Sonuçlar % 95' lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. Sağkalım analizi ise MedCalc programı ile gerçekleştirildi.

Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) web tabanlı programından yararlanılarak, hastaların farklı dokuları arasında miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden fold change grafikleri ve değerlendirilen gruplara göre miRNA' ların hangilerinin up-regüle hangilerinin down-regüle olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü oluşturuldu.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen meme kanserli 60 vakanın yaşları 21 ile 65 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 42.00 ± 1.169 ' dir. Hastalara ait takip süresi 1 yıl ile 19 yıl arasında değişmektedir. Ortalama takip süresi ise ~4 yıldır. Değerlendirilen hastalara ait klinik bulgular tablo-11' de, hastalara ait tümörlerin özellikleri ise tablo-12' de verilmektedir.

Tablo-11 Hastalara Ait Klinik Özellikler

Değerlendirilen parametreler	Hasta sayısı (%)
Yaş ortalaması	42.00± 1.169* (21-65)
İlk mensturasyon yaşı	13.00± 0.170* (11-16)
İlk doğum yaşı	23.00± 0.677* (16-39)
1.dereceden ailesel meme kanser hikayesi	
	+ 24 (40)
	- 36 (60)
Takip süresi	
	≤1 yıl 16 (26.6)
	2-4 yıl 20 (33.3)
	>4 yıl 20 (33.3)
	Bilinmeyen 4 (66.6)
Neoadjuvan tedavi	
	+ 29 (48.3)
	- 31 (51.6)
Adjuvan tedavi	
	+ 33 (55)
	- 27 (45)
Herceptin tedavisi	
	+ 8 (13.3)
	- 52 (86.6)
Hormon tedavisi	
	+ 39 (65)
	- 21 (35)
Radyasyon tedavisi	
	+ 57 (95)
	- 3 (5)

*: Standart sapma

Tablo-12 Hastalara Ait Tümörlerin Özellikleri

Değerlendirilen parametreler	Hasta sayısı (%)
Tipi	
	İnvaziv duktal meme kanseri 38 (63.3)
	Triple negatif meme kanseri 13 (21.6)
	Diğer tip 9 (15)
Lokalizasyon	
	Sol 29 (48.3)
	Sağ 31 (51.6)
Histolojik evre	
	Evre 1 17 (28.3)
	Evre 2 24 (40)
	Evre 3-4 18 (30)
	Bilinmeyen 1 (1.6)
ER	
	+ 41 (68.3)
	- 19 (31.6)
PR	
	+ 33 (55)
	- 27 (45)
CerbB2	
	+ 16 (26.6)
	- 44 (73.3)
İnvazyon	
	+ 14 (23.3)
	- 46 (76.6)
Metastaz	
	+ 29 (48.3)
	- 31 (51.6)

BRCA1/2 genlerinden birinde mutasyon belirlenen 23 hasta ile *BRCA1/2* mutasyonu belirlenmeyen 37 hasta olmak üzere toplam 60 meme kanserli hastanın parafinize edilmiş tümör dokularında ve bu hastalardan 20' sinin parafinize edilmiş normal dokularında RNA izolasyonları tamamlandıktan sonra, meme kanser gelişiminde önemli 14 miRNA' nın ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular, hastalara ait klinik özellikler ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Değerlendirilen doku örneklerinin içeriği ve hasta gruplarının dağılımı tablo-12 ve tablo-13' de verildi.

İstatistiksel analizler gerçekleştirilmeden önce normalizasyon işlemleri 1) 1-23/61-70, 2)

24-60/71-80, 3) 1-60/61-80, 4) 1-23/24-60, 5) 61-70/71-80 grupları arasındaki ekspresyonlar ele alınarak gerçekleştirildi (Tablo-13 ve Tablo-14).

Tablo-13 Gruplarda Karşılaştırılan Doku Örneklerinin İçeriği

1.Grup:	Mutasyon pozitif tümör doku örnekleri ile mutasyon pozitif normal doku örnekleri karşılaştırması
2.Grup:	Mutasyon negatif tümör doku örnekleri ile mutasyon negatif normal doku örnekleri karşılaştırması
3.Grup:	Mutasyon pozitif ve negatif tümör doku örnekleri ile mutasyon pozitif ve negatif normal doku örnekleri karşılaştırması
4.Grup:	Mutasyon pozitif tümör doku örnekleri ile mutasyon negatif tümör doku örnekleri karşılaştırması
5.Grup:	Mutasyon pozitif normal doku örnekleri ile mutasyon negatif normal doku örnekleri karşılaştırması

Tablo-14 Meme Kanserli Hastaların *BRCA1/2* Mutasyon Durumuna Göre Oluşturulan Gruplarının Dağılımı

Hasta No	Örnek Grubu	Hasta No	Örnek Grubu	Hasta No	Örnek Grubu	Hasta No	Örnek Grubu
1	mut. (+) tümör doku	21	mut. (+) tümör doku	41	mut. (-) tümör doku	61	mut. (+) normal doku-2
2	mut. (+) tümör doku	22	mut. (+) tümör doku	42	mut. (-) tümör doku	62	mut. (+) normal doku-3
3	mut. (+) tümör doku	23	mut. (+) tümör doku	43	mut. (-) tümör doku	63	mut. (+) normal doku-5
4	mut. (+) tümör doku	24	mut. (-) tümör doku	44	mut. (-) tümör doku	64	mut. (+) normal doku-11
5	mut. (+) tümör doku	25	mut. (-) tümör doku	45	mut. (-) tümör doku	65	mut. (+) normal doku-12
6	mut. (+) tümör doku	26	mut. (-) tümör doku	46	mut. (-) tümör doku	66	mut. (+) normal doku-13
7	mut. (+) tümör doku	27	mut. (-) tümör doku	47	mut. (-) tümör doku	67	mut. (+) normal doku-14
8	mut. (+) tümör doku	28	mut. (-) tümör doku	48	mut. (-) tümör doku	68	mut. (+) normal doku-19
9	mut. (+) tümör doku	29	mut. (-) tümör doku	49	mut. (-) tümör doku	69	mut. (+) normal doku-20
10	mut. (+) tümör doku	30	mut. (-) tümör doku	50	mut. (-) tümör doku	70	mut. (+) normal doku-22
11	mut. (+) tümör doku	31	mut. (-) tümör doku	51	mut. (-) tümör doku	71	mut. (-) normal doku-1
12	mut. (+) tümör doku	32	mut. (-) tümör doku	52	mut. (-) tümör doku	72	mut. (-) normal doku-4
13	mut. (+) tümör doku	33	mut. (-) tümör doku	53	mut. (-) tümör doku	73	mut. (-) normal doku-9
14	mut. (+) tümör doku	34	mut. (-) tümör doku	54	mut. (-) tümör doku	74	mut. (-) normal doku-11
15	mut. (+) tümör doku	35	mut. (-) tümör doku	55	mut. (-) tümör doku	75	mut. (-) normal doku-12
16	mut. (+) tümör doku	36	mut. (-) tümör doku	56	mut. (-) tümör doku	76	mut. (-) normal doku-15
17	mut. (+) tümör doku	37	mut. (-) tümör doku	57	mut. (-) tümör doku	77	mut. (-) normal doku-17
18	mut. (+) tümör doku	38	mut. (-) tümör doku	58	mut. (-) tümör doku	78	mut. (-) normal doku-31
19	mut. (+) tümör doku	39	mut. (-) tümör doku	59	mut. (-) tümör doku	79	mut. (-) normal doku-33
20	mut. (+) tümör doku	40	mut. (-) tümör doku	60	mut. (-) tümör doku	80	mut. (-) normal doku-35

Gruplar Arasındaki miRNA Ekspresyon Dağılımları:

1. Grup: miR-125b ve miR-126' nın upregülasyonu; let-7a, miR-10b, miR-21, miR-31, miR-145, miR-155, miR-200c, miR-205, miR-206, miR-221, miR-222 ve miR-335' in down-regülasyonu belirlendi.

2. Grup: miR-10b, miR-21, miR-31, miR-125b, miR-155, miR-200c ve miR-206' nın up-regülasyonu; let-7a, miR-126, miR-145, miR-205, miR-221, miR-222, miR-335' in down-regülasyonu belirlendi.

3. Grup: miR-10b, miR-21, miR-31, miR-125b, miR-126, miR-155, miR-200c, miR-205, miR-206 ve miR-222' nin upregülasyonu; let-7a, miR-145, miR-221 ve miR-335' in down-regülasyonu belirlendi.

4. Grup: miR-125b' nin up-regülasyonu; let-7a, miR-10b, miR-21, miR-31, miR-126, miR-145, miR-155, miR-200c, miR-205, miR-206, miR-221, miR-222 ve miR-335' in down-regülasyonu belirlendi.

5. Grup: miR-21, miR-31, miR-155, miR-205, miR-206, miR-221 ve miR-222' nin up-regülasyonu; let-7a, miR-10b, miR-125b, miR-126, miR-145, miR-200c, miR-335' in down-regülasyonu belirlendi (Tablo-15).

Tablo-15 Değerlendirilen miRNA' ların Regülasyon Durumları

miRNA' lar	1-23/61-70	24-60/71-80	1-60/61-80	1-23/24-60	61-70/71-80
let-7a	Down	Down	Down	Down	Down
miR-10b	Down	Up	Up	Down	Down
miR-21	Down	Up	Up	Down	Up
miR-31	Down	Up	Up	Down	Up
miR-125b	Up	Up	Up	Up	Down
miR-126	Up	Down	Up	Down	Down
miR-145	Down	Down	Down	Down	Down
miR-155	Down	Up	Up	Down	Up
miR-200c	Down	Up	Up	Down	Down
miR-205	Down	Down	Up	Down	Up
miR-206	Down	Up	Up	Down	Up
miR-221	Down	Down	Down	Down	Up
miR-222	Down	Down	Up	Down	Up
miR-335	Down	Down	Down	Down	Down

Elde edilen miRNA ekspresyon seviyeleri, oluşturulan tüm gruplar arasında karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Independent Samples T Testi' ne göre; mutasyon belirlenen hastaların tümör dokuları ile mutasyon belirlenmeyen hastaların tümör dokuları arasında let-7a ve miR-335 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0.044$, $p=0.022$) belirlendi. Yine aynı grupta miR-10b, miR-126, miR-200c ve miR-205' in ekspresyon seviyeleri ise anlamlılığa yakın ($p=0.074$, $p=0.077$, $p=0.086$, $p=0.085$) belirlendi (Tablo-16). Çalışmamıza dahil edilen tüm meme kanserli hastalara ait tümörlü ve normal dokular arasında yapılan karşılaştırma da ise let-7a ve miR-125b ekspresyon düzeyleri anlamlılığa yakın ($p=0.072$, $p=0.083$) bulundu (Tablo-17).

Tablo-16 T Testi Sonuçları-1

miRNA	Grup	n	x	ss*	sd*	t	p
let-7a	mutasyon pozitif tümör doku	23	7.10	1.21	35.4	-2.088	0.044
	mutasyon negatif tümör doku	35	4.40	1.03			
miR-10b	mutasyon pozitif tümör doku	22	2.95	5.70	28.42	-1.858	0.074
	mutasyon negatif tümör doku	29	2.90	7.50			
miR-126	mutasyon pozitif tümör doku	23	8.72	2.10	38.77	-1.818	0.077
	mutasyon negatif tümör doku	34	3.62	8.50			
miR-200c	mutasyon pozitif tümör doku	23	5.95	4.85	31.02	-1.772	0.086
	mutasyon negatif tümör doku	32	9.31	2.80			
miR-205	mutasyon pozitif tümör doku	23	3.37	3.20	36.76	-1.772	0.085
	mutasyon negatif tümör doku	37	2.26	5.00			
miR-335	mutasyon pozitif tümör doku	22	0.740	1.44	29.13	2.421	0.022
	mutasyon negatif tümör doku	27	3.84	6.50			

ss: Standart hata sd: Standart sapma

Tablo-17 T Testi Sonuçları-2

miRNA	Grup	n	x	ss*	sd*	t	p
let-7a	tümör	58	2.93	8.23	18.50	1.910	0.072
	normal	18	1.31	2.21			
miR-125b	tümör	47	2.13	8.03	46.10	1.775	0.083
	normal	17	5.28	1.41			

ss:Standart hata ss: Standart sapma

İstatistiksel olarak analiz edilerek anlamlılık ve anlamlılığa yakın belirlenen miRNA ekspresyonlarının fold regülasyon ve P değerleri ile ortalama Ct değerleri tablo-18’ de verildi.

Tablo-18 İstatistiksel Olarak Anlamlılık ve Anlamlılığa Yakın Belirlenen miRNA’ ların Ct Değerleri, P Değerleri ve Fold Regülasyonları

miRNA	1-23 (Ortalama CT değerleri)	24-60 (Ortalama CT değerleri)	P değerleri	Fold regülasyonları
hsa-let-7a	28,961386	31,984458	0,044*	0,4200158
miR-10b	30,760401	33,303555	0,074	0,3011594
miR-126	29,146287	32,213046	0,077	0,4329291
miR-200c	29,076193	32,173866	0,086	0,4423056
miR-205	27,697221	30,45092	0,085	0,3484787
miR-335	33,563537	35,146354	0,022*	0,1547778

miRNA	1-60 (Ortalama Ct değerleri)	61-80 (Ortalama Ct değerleri)	P değerleri	Fold Regülasyonları
miR-125b	30,097834	31,730225	0,083	4,0290453
let-7a	30,825614	29,986513	0,072	0,7264602

İstatistiksel olarak anlamlılığını belirlenen miRNA’ ların hedef genleri ve etkili olduğu sinyal yollarını miRWalk web tabanlı program (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) kullanılarak belirlendi. Tablo-19’ da miRNA’ ların hedef genleri, tablo 20’ de ise miRNA’ ların etkili olduğu sinyal yollarını ve bu yollarda etkili olan genler verildi.

Tablo-19 İstatistiksel Olarak Anlamlılık Belirlenen miRNA' ların Hedef Genleri

miRNA	Hedef Genler
hsa-let-7a	DGCR8 ,FOXA1, ITGB3 ,SF4 ,RAB40C ,TNF ,PIK3CA ,MYC ,TP63 ,TIMP3 ,NRIP1 ,HMGA1 ,RUNX1 ,RNASEN ,CEBPZ ,FLT3 ,EXOSC1 ,BCL6 ,LIN28 ,DICER1 ,SLC27A4 ,SOX2 ,TNRC6A ,TWIST1 ,EIF4E ,ZNF167, HMGA2, FASN, KIT, E2F1, DDX6, TUT1 ,CEBPB ,AKT1 ,COL4A2 ,STAT3 ,COX8A ,PLOC3 ,ZNF362, SOCS4, ARS2 ,ATN1 ,TAF1C, VDR ,UBE2I ,SCPEP1 ,FXR1 ,PRDM1 ,RET ,ACVR2A ,CCND1 ,CDC25C ,BCL2, CCND2 ,NPM1 ,CCR4 ,BRCA1 ,CYB5R3 ,FBXW7 ,ZEB2 ,FAS ,ZNF512B ,EIF2C4 ,CDKN1A ,MMP14, IGF2BP1 ,DDIT3 ,EGFR ,DUSP2 ,FMR1 ,POLR2A ,RBBP6 ,RAB27A ,IRAK2 ,NR1I2 ,IL6 ,RAD51L3 ,KHSRP ,NKX2-1 ,CDC34 ,NKIRAS2 ,SOCS1 ,PRTN3 ,ERBB3 ,E2F2 ,CHAF1A ,LARP4 ,APC ,STMN1, EIF2C2 ,KRAS, TCF19 ,IL13 ,PAK3, MAPK3, LRRK2, HMOX1 ,EPHB2 ,TGFB3 ,SYNE1 ,MOV10 ,MYCN, TP53 ,CISH ,JAK2 ,PDCD6 ,IL8RA ,RBL2 ,NCOA4 ,KITLG ,NFYC ,RASSF1 ,C17orf91 ,BACE1 ,NCOA3 ,ALDH1A1, CNN3 ,DDX20 ,DNMT1 ,BRAF ,BASP1, PPP2R1B ,MEST ,UHRF2 ,CYCS ,OPRM1 ,PGC ,NPC1, ROS1 ,HDAC4 ,GLI1 ,TNRC6B ,TP73 ,NFKBIA ,SRC ,CBS SKP1, TGFBR1 ,CDKN2A ,EIF2C1 ,HOXA10, CDC25A ,HAND2 ,DNMT3B ,PDHA2 ,CD4 ,ESR1 ,IL1B ,NRAS ,NOL3 ,TGFB1 ,RPE ,CTNBP1 ,TRIM32, CYP7A1 ,CKAP4 ,HOXA9 ,MEIS1 ,TREH ,APOBEC3G ,DCN ,MMP8 ,LIN28B, WEE1, E2F3, ZCCHC11 ,ELK3 ,LAMP3 ,GEMIN4 ,TM9SF3, CD69 ,ESR2 ,TRAF6 ,SCAP ,BRCA2 ,CEBPA ,CYLD ,COL5A3 ,IFNG ,HK1 ,PSD4, POLD3, HNRNP1A1, LSM1 ,CDK6 ,ATP6V1B2 ,ILF2 ,RNPC3 ,NFKB1 ,RBPJL ,RTN4 ,IL2RA, RDX ,SMOX ,CSAD ,CCNG1 ,DYRK2 ,ATP8A2 ,EIF3A ,BCL2L1 ,SRM ,PAX7, ILF3, ME1 ,NCAPG ,SELL ,RORA, PTEN, ECD ,NOS2A ,MCL1 ,BIRC3 ,AMACR ,TNRC6C ,CDKN1B ,PI3 ,CD46 ,ASAHL ,RRBP1 ,WFS1 ,SPRY2, NPAT ,TRAT1 ,HRSP12 ,SMO ,GPI, CCNA2, XPO1 ,SNAI2 ,CDKN1C ,EIF4G1 ,IL17A ,PAH ,TLR4 ,NF2, SLC7A1 ,DERL1 ,FOXP3, ZEB1 ,CYP27B1 ,TRIM17 ,CXCL12 ,SHH ,MBL2 ,IGF1 ,ERBB2 ,HNF4A ,CDKN2D ,CYFIP2 ,TARBP2 ,RABEPK, CNTN3 ,COL1A1 ,PEBP1 ,SOAT1 ,CLEC5A ,WIBG ,PGRMC1 ,NCBP1 .
hsa-miR-335	ITPR1, FABP4, RASA1, TNC, NIT1, FASN ,MEDI, SOX4, MAPK9, PPARG, OPR1, MAP2K1, CSF1, CHD4, MERTK, TACSTD1, AP2M1, PTPRN2, TAF10, MEST, DDX5, RB1, ARPC5L, CCPG1, FGF1, PIAS1, GULP1, NCOA6 ,SYNGAP1, RHOC, FOSB, MBD4 ,DMPK, CD44, INPPL1, TP53, RUNX2, HOXD10.

Tablo-20 İstatistiksel Olarak Anlamlılığı Belirlenen miRNA' ların Etkili Olduğu Sinyal Yolakları

miRNA	Etkili Olduğu Sinyal İleti Yolağı	Veritabanı İsmi	Hedef Geni
hsa-let-7a	APOPTOZ	KEGG	BCL2L1, TP53, BCL2, PIK3CA, BIRC3, CYCS, NFKB1, AKT1, IRAK2, NFKBIA, FAS, TNF, IL1B
	AKT YOLAĞI	Biocarta	AKT1, NFKB1, PIK3CA, NFKBIA
	CASPAZ YOLAĞI	Biocarta	BIRC3, CYCS
	HÜCRE SIKLUSU	KEGG	TP53, CDC25A, CDK6, CDKN1B, E2F1, WEE1, SKP1, E2F3, CCNA2, E2F2, TGFB1, CDKN1A, CCND1, CDKN2A, CCND2, CDKN1C, RBL2, CDC25C, TGFB3, CDKN2D
	EGF YOLAĞI	Biocarta	STAT3, EGFR, PIK3CA, MAPK3
	ERBB YOLAĞI	KEGG	EGFR, NRAS, MYC, PIK3CA, SRC, KRAS, CDKN1A, MAPK3, AKT1, ERBB3, PAK3, CDKN1B, BRAF, ERBB2
	ERK YOLAĞI	Biocarta	MYC, SRC, STAT3, EGFR, MAPK3
	HEDGEHOG YOLAĞI	KEGG	GLI1, SMO, SHH
	JAK-STAT YOLAĞI	KEGG	IL6, MYC, SPRY2, STAT3, CCND1, AKT1, PIK3CA, CISH, CCND2, SOCS4, IL13, BCL2L1, SOCS1, IFNG, IL2RA, JAK2
	MAPK YOLAĞI	Biocarta	NFKBIA, MYC, CEBPA, MAPK3, NFKB1, BRAF, TGFBR1, TGFB3, TGFB1
MAPK YOLAĞI	KEGG	MYC, TP53, TGFBR1, TGFB1, BRAF, AKT1, NFKB1, FAS, KRAS, NRAS, EGFR, DDIT3, DUSP2, TNF, IL1B, TRAF6, STMN1, TGFB3, MAPK3	
NOTCH YOLAĞI	KEGG	RBPJL	

	P53 YOLAĞI	Biocarta	CDKN1A, TP53, CCND1, BCL2, E2F1, TIMP3
	P53 YOLAĞI	KEGG	TP53, FAS, PTEN, CDK6, CCND1, CYCS, CDKN1A, TP73, CDKN2A, CCNG1, IGF1, CCND2
	PHOSPHATİDYLİNOSİTOL YOLAĞI	KEGG	PIK3CA, PTEN
	PTEN YOLAĞI	Biocarta	CDKN1B, AKT1, PTEN, PIK3CA, MAPK3
	TGF-BETA YOLAĞI	KEGG	MYC, MAPK3, ACVR2A, TGFBR1, TGFB1, TNF, TGFB3, SKP1, DCN, IFNG, PPP2R1B, RBL2
	TGFB YOLAĞI	Biocarta	TGFB1, TGFBR1, MAPK3, TGFB3, APC
	WNT YOLAĞI	Biocarta	MYC,CCND1,APC
	WNT YOLAĞI	KEGG	MYC, CCND2, APC, PPP2R1B, TP53, CCND1, SKP1, CTNNBIP1
	VEGF YOLAĞI	Biocarta	PIK3CA
	VEGF YOLAĞI	KEGG	SRC,AKT1,KRAS,PIK3CA,NRAS,MAPK3
	STAT3 YOLAĞI	Biocarta	STAT3,MAPK3,JAK2
	RAS YOLAĞI	Biocarta	NFKB1, MAPK3, PIK3CA, AKT1, BCL2L1
	MTOR YOLAĞI	Biocarta	PIK3CA, PTEN, AKT3, EIF4G1, EIF4E
	MTOR YOLAĞI	KEGG	AKT1, PIK3CA, MAPK3, BRAF, IGF1
	APOPTOZ	KEGG	TP53
	HÜCRE SİKLUSU	KEGG	TP53, RB1
	EGF YOLAĞI	Biocarta	MAP2K1, RASA1
	ERBB YOLAĞI	KEGG	MAPK9, MAP2K1
	ERK YOLAĞI	Biocarta	MAP2K1
	JAK-STAT YOLAĞI	KEGG	PIAS1
hsa-miR-335	MAPK YOLAĞI	Biocarta	MAPK9, MAP2K1
	MAPK YOLAĞI	KEGG	TP53, RASA1, FGFR1, MAPK9, MAP2K1
	P53 YOLAĞI	Biocarta	TP53, RB1
	P53 YOLAĞI	KEGG	TP53
	PHOSPHATİDYLİNOSİTOL YOLAĞI	KEGG	INPPL1, ITPR1
	WNT YOLAĞI	KEGG	MAPK9,TP53
	VEGF YOLAĞI	KEGG	MAP2K1
	RAS YOLAĞI	Biocarta	MAP2K1

Değerlendirilen 14 miRNA' nın ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar ile vakalarda hastalıklı yaşam süresi arasındaki ilişkiyi değerlendirebilmek için, mutasyon belirlenen ve mutasyon belirlenmeyen meme kanserli hastalarda sağkalım analizi olarak Kaplan Meier Analizi yapıldı. Kaplan Meier Analiz sonuçlarına göre; miR-10b, miR-335, miR-31 ve miR-205' de istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi (Tablo-21), (Şekil-15).

Tablo-21 Tüm Meme Kanseri Vakalarının Hastalıklı Yaşam Süreleri ile miRNA Ekspresyon Seviyeleri Arasındaki İlişki

Değişken	BRCA mutasyonu pozitif ve negatif meme kanserli hastalar		
	Hastalıklı sağkalım	HR*	%95 CI**
miR-10b	0.3744	0.1851-0.7574	0.001
miR-335	0.2573	0.0964-0.6865	0.01
miR-31	0.3429	0.1483-0.7929	0.01
miR-205	0.6277	0.3654-1.0783	0.05

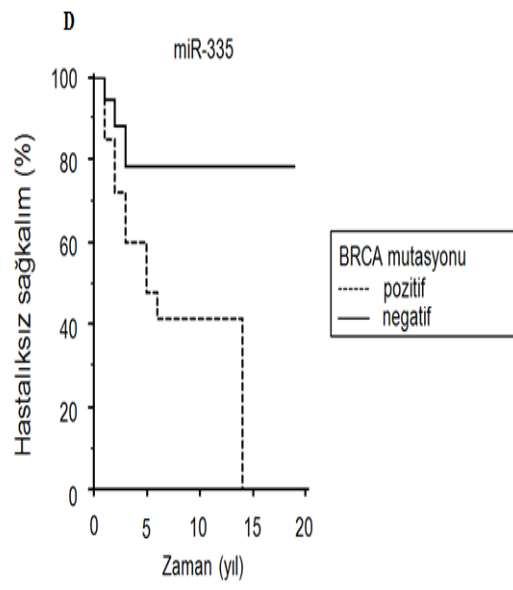
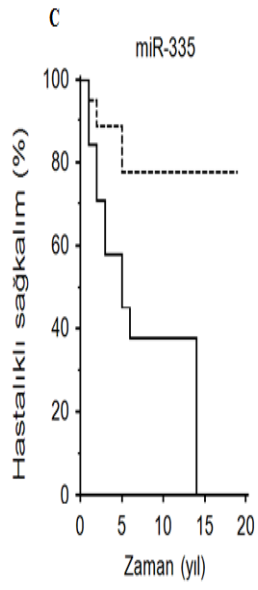
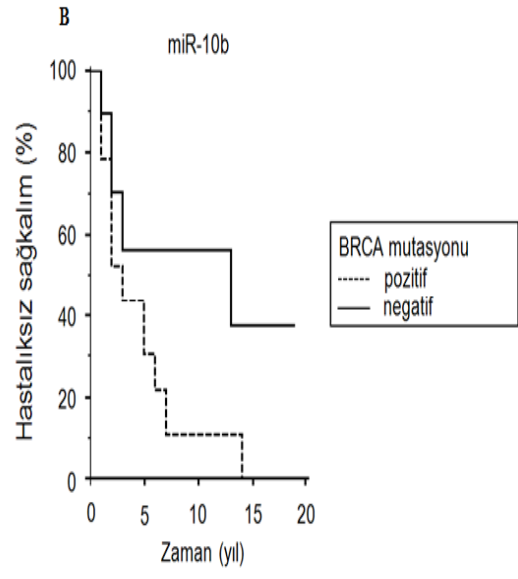
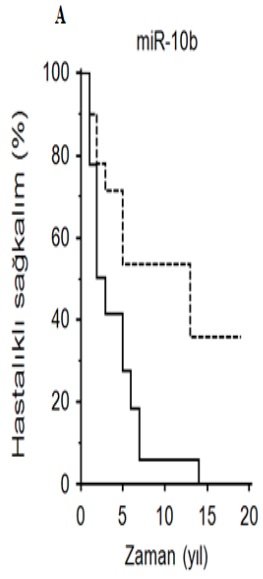
*HR: Risk oranı **CI: Güven aralığı

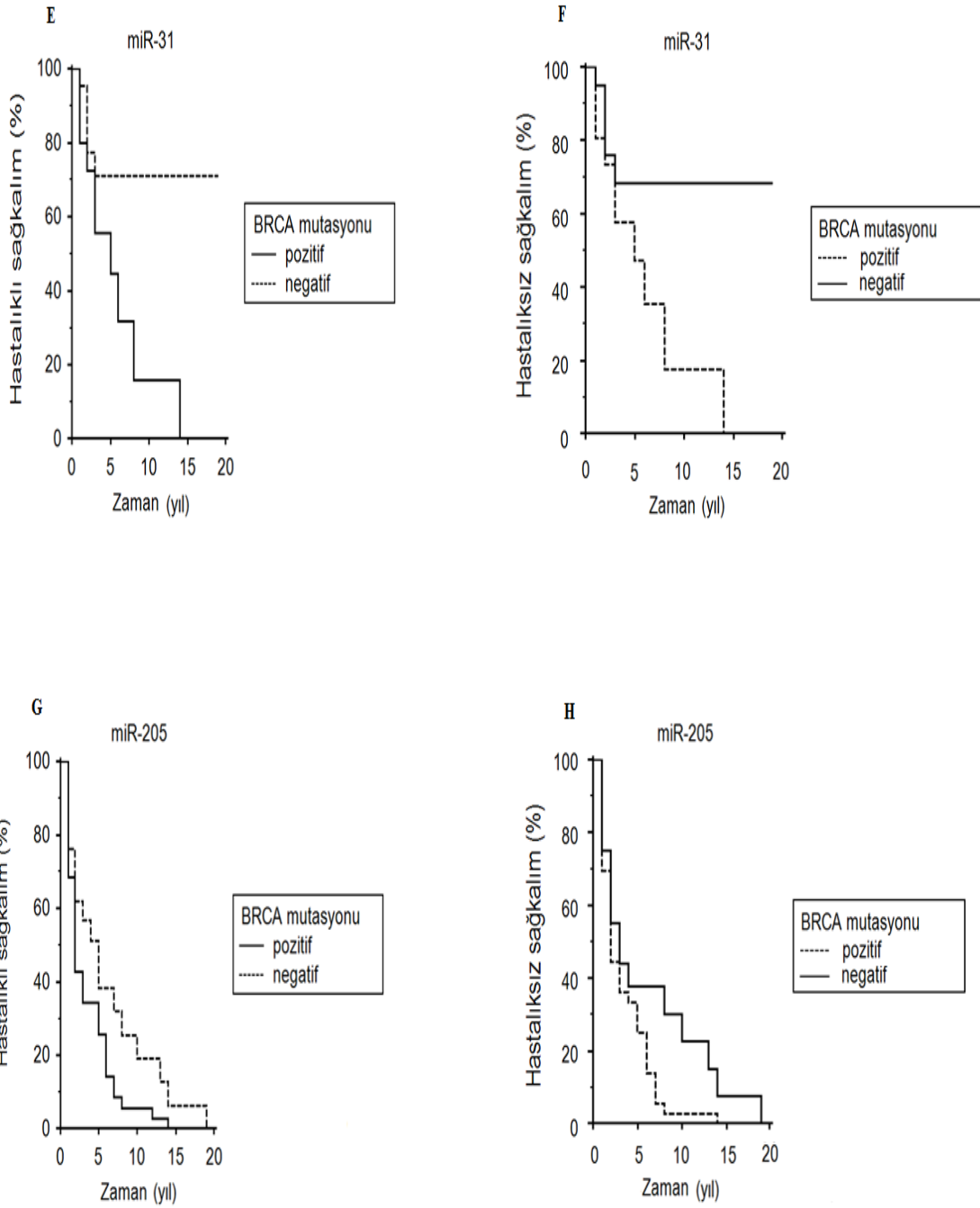
Değerlendirilen 14 miRNA' nın ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar ile vakalarda hastalıktan bağımsız yaşam süresi arasındaki ilişkiyi analiz edebilmek için ise, mutasyon belirlenen ve mutasyon belirlenmeyen meme kanserli hastalar arasında sağkalım analizi olarak yine Kaplan Meier Analizi yapıldı. Kaplan Meier Analiz sonuçlarına göre; miR-10b, miR-335, miR-31' de istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi (Tablo-22), (Şekil-15).

Tablo-22 Tüm Meme Kanseri Vakalarının Hastalıktan Bağımsız Yaşam Süreleri ile miRNA Ekspresyon Seviyeleri Arasındaki İlişki

Değişken	BRCA mutasyonu pozitif ve negatif meme kanserli hastalar		
	Hastaliksız sağkalım	HR*	%95 CI**
miR-10b	2.1928	1.0775-4.4624	0.02
miR-335	3.1979	1.1867-8.6177	0.04
miR-31	2.4501	1.0504-5.7152	0.05
miR-205	1.5424	0.8942-2.6607	0.07

*HR: Risk oranı **CI: Güven aralığı





Şekil-15 Hastalıklı ve Genel Sağkalım ile *BRCA* Mutasyon Durumu:

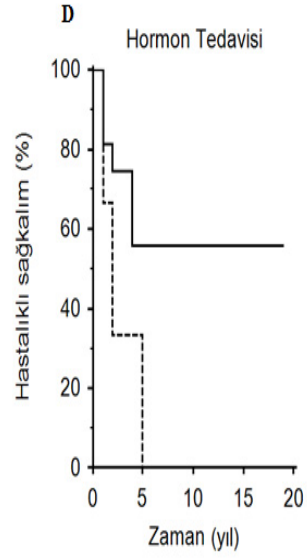
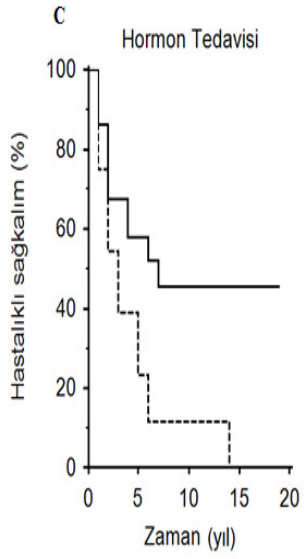
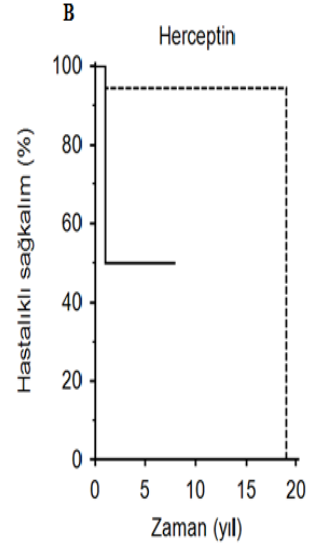
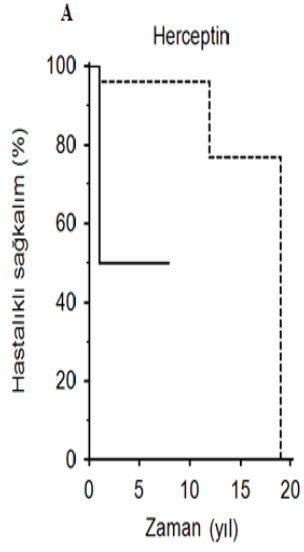
BRCA mutasyonu taşıyan ve taşımayan tümörlerde vakaların hastalıklı ve hastalıktan bağımsız sağkalımını gösteren Kaplan Meier Eğrileri. A-B) miR-10b ($p=0.001$, $p=0.02$), C-D) miR-335 ($p=0.01$, $p=0.04$), E-F) miR-31 ($p=0.01$, $p=0.05$) ve G-H) miR-205 ($p=0.05$, $p=0.07$)

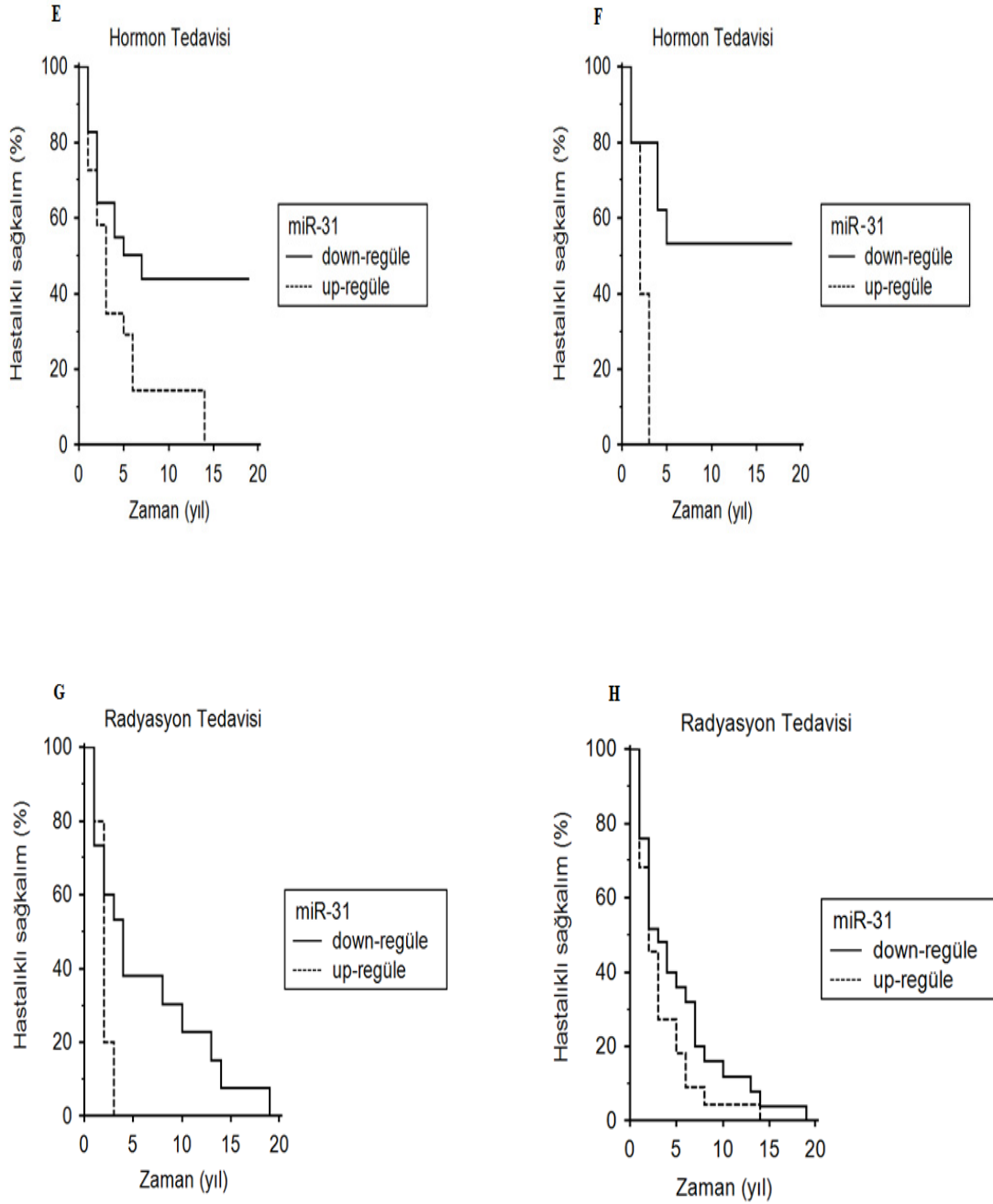
Değerlendirilen 14 miRNA' nın ekspresyon seviyeleri ile vakaların hastalıklı yaşam süreleri boyunca almış oldukları tedaviler, tüm mutasyon belirlenen/belirlenmeyen vakalar ve sadece mutasyon belirlenen vaka grubunda Kaplan Meier Analizi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre; herceptin tedavisi alan hastalar ile let-7a ekspresyon seviyesi her iki grupta, hormon tedavisi alan hastalar ile miR-31 ekspresyon seviyesi her iki grupta, radyasyon tedavisi alan hastalar ile miR-31 ekspresyon seviyesi *BRCA* mutasyonu taşıyan hasta grubunda ve hormon tedavisi alan hastalar ile miR-335 ekspresyon seviyesi ise her iki grupta anlamlı olarak belirlendi (Tablo-23), (Şekil-16). *BRCA* mutasyonu negatif vakaların hastalıklı yaşam süreleri boyunca almış oldukları tedaviler sadece bu grup ele alınarak değerlendirildiğinde ise, herhangi bir anlamlılık belirlenmedi.

Tablo-23 Tüm Meme Kanseri Vakalarının ve *BRCA* Mutasyonu Taşıyan Meme Kanseri Vakalarının Aldıkları Tedaviler ile miRNA Ekspresyon Seviyeleri Arasındaki Hastalıklı Sağlık İlişkisi

Değişken	Alınan tedavi	Meme kanserli hastalar			BRCA mutasyonu pozitif meme kanserli hastalar		
		HR*	%95 CI**	P değeri	HR*	%95 CI**	P değeri
Hastalıklı sağkalım							
Let-7a	Herceptin	0.1039	0.0025-4.1734	0.001	0.1429	0.0015-13.337	0.05
miR-31	Hormon	1.9216	0.9329-3.9585	0.04	3.4378	0.6404-18.453	0.02
miR-31	Radyasyon	1.4567	0.8125-2.6117	0.12	2.4613	0.6370-9.5108	0.03
miR-335	Hormon	2.2658	0.9841-5.2168	0.01	3.0091	0.4642-19.506	0.08

*HR: Risk oranı **CI: Güven aralığı





Şekil-16 Farklı Tedavi Yaklaşımları ile miRNA Ekspresyonlarının Hastalıklı Sağkalım İlişkisi

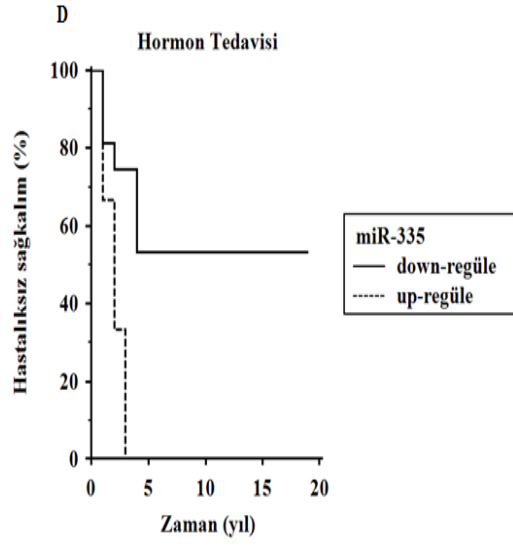
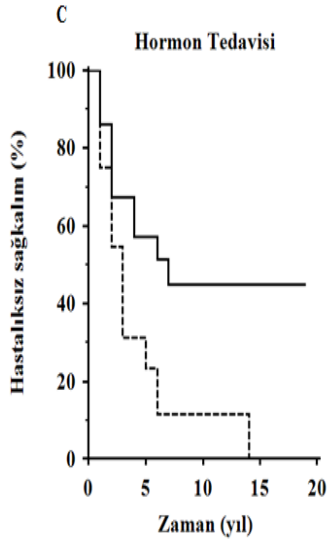
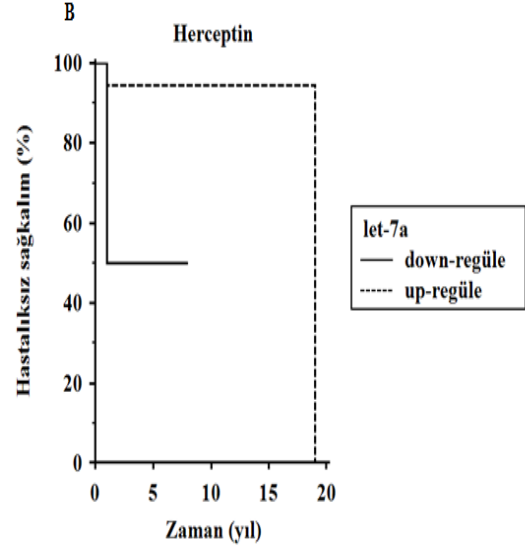
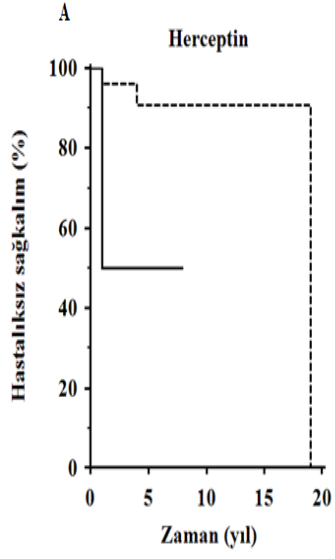
BRCA mutasyonu taşıyan/taşımayan tümörlerde (A, C, E ve G) ve yalnızca *BRCA* mutasyonu taşıyan tümörlerde (B, D, F ve H) hastaların alınan tedavilere göre hastalıklı sağkalımını gösteren Kaplan Meier Eğrileri. A) Let-7a/herceptin tedavisi ($p=0.001$), B) Let-7a/herceptin tedavisi ($p=0.05$), C) miR-335/hormon tedavisi ($p=0.01$), D) miR-335/hormon tedavisi ($p=0.08$), E) miR-31/hormon tedavisi ($p=0.04$), F) miR-31/hormon tedavisi ($p=0.02$), G) miR-31/radyasyon tedavisi ($p=0.12$), H) miR-31/radyasyon tedavisi ($p=0.03$) ile miRNA'ların ekspresyon seviyesindeki değişikliği gösteren grafikler

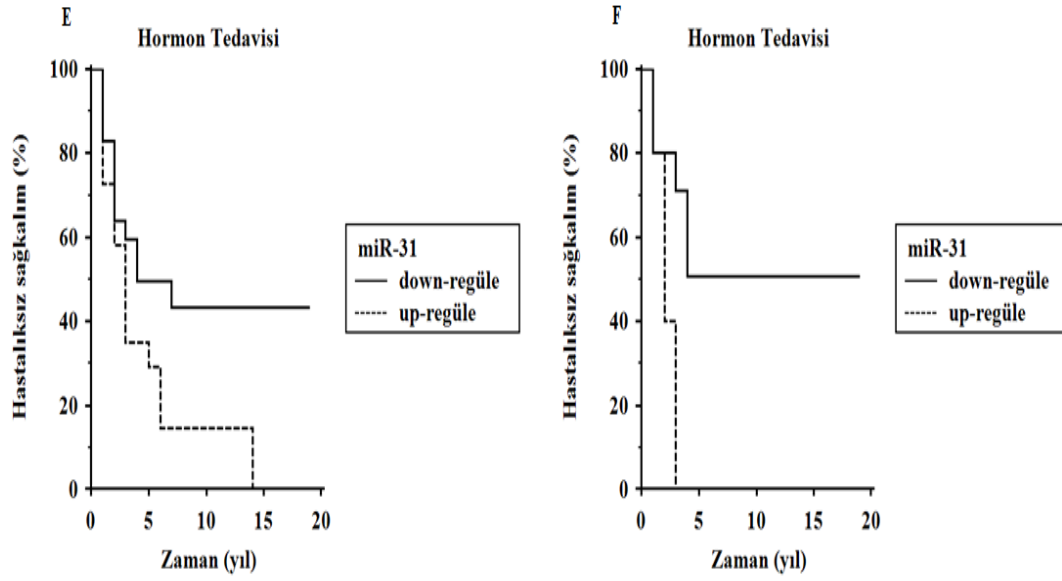
Değerlendirilen miRNA' lar ile, vakaların hastalıktan bağımsız yaşam süreleri boyunca almış olduğu tedaviler, mutasyon belirlenen/belirlenmeyen tüm hastalar ve sadece mutasyon belirlenen hasta grubunda yine Kaplan Meier Analizi ile değerlendirildi. Herceptin tedavisi alan hastalar ile let-7a ekspresyon seviyesi her iki grupta, hormon tedavisi alan hastalar ile miR-31 ekspresyon seviyesi her iki grupta ve hormon tedavisi alan hastalar ile miR-335 ekspresyon seviyesi yine her iki grupta anlamlı olarak belirlendi (Tablo-24), (Şekil-17). *BRCA* mutasyonu negatif vakaların, hastalıksız yaşam süreleri boyunca almış oldukları tedaviler sadece bu grup ele alınarak değerlendirildiğinde ise herhangi bir anlamlılık belirlenmedi.

Tablo-24 Tüm Meme Kanseri Vakalarının ve *BRCA* Mutasyonu Taşıyan Meme Kanseri Vakalarının Aldıkları Tedaviler ile miRNA Ekspresyon Seviyeleri Arasındaki Hastalıktan Bağımsız Sağlık İlişkisi

Değişken	Alınan tedavi	Meme kanserli hastalar			BRCA mutasyonu pozitif meme kanserli hastalar		
		HR*	%95 CI**	P değeri	HR*	%95 CI**	P değeri
Hastalıksız sağkalım							
Let-7a	Herceptin	0.1235	0.0040-3.7713	0.001	0.1429	0.0015-13.337	0.05
miR-31	Hormon	1.8556	0.9033-3.8119	0.05	3.1795	0.6184-16.347	0.03
miR-31	Radyasyon	1.4045	0.7857-2.5107	0.16	2.0808	0.5834-7.4218	0.08
miR-335	Hormon	2.2714	0.9861-5.2318	0.01	3.8757	0.4971-30.215	0.02

*HR: Risk oranı **CI: Güven aralığı





Şekil-17 Farklı Tedavi Yaklaşımları ile miRNA Ekspresyonlarının Genel Sağkalım İlişkisi

BRC A mutasyonu taşıyan/taşımayan tümörlerde (A, C ve E) ve yalnızca *BRC A* mutasyonu taşıyan tümörlerde (B, D ve F) hastaların alınan tedavilere göre genel sağkalımını gösteren Kaplan Meier Eğrileri. A) Let-7a/herceptin tedavisi ($p=0.001$), B) Let-7a/herceptin tedavisi ($p=0.05$), C) miR-335/hormon tedavisi ($p=0.01$), D) miR-335/hormon tedavisi ($p=0.02$), E) miR-31/hormon tedavisi ($p=0.05$), F) miR-31/hormon tedavisi ($p=0.03$) ile miRNA' ların ekspresyon seviyesindeki değişikliği gösteren grafikler

Vakalarımızın, hastalığın ilk tanı tarihi ile son kontrol tarihleri arasındaki süre boyunca almış oldukları tedaviler dikkate alınarak yapılan değerlendirmede ise ekspresyon seviyelerinde anlamlılık belirlediğimiz miRNA' ların etkili olduğu sinyal ileti yolları ve bu miRNA' ların hedeflediği genler belirlendi.

Tablo-25 Meme Kanserli Hastalara Verilen İlaç ve Hormon Tedavilerinde Anlamlılık Belirlediğimiz miRNA' ların Etkili Oldukları Sinyal İleti Yolakları ve Hedeflediği Genler

miRNA	Etkili Olduğu Sinyal İleti Yolağı	Veritabanı İsmi	Hedef Geni
Let-7a	APOPTOZ	KEGG	BCL2L1, TP53, BCL2, PIK3CA, BIRC3, CYCS, NFKB1, AKT1, IRAK2, NFKBIA, FAS, TNF, IL1B
	AKT YOLAĞI	Biocarta	AKT1, NFKB1, PIK3CA, NFKBIA
	ERBB YOLAĞI	KEGG	EGFR, NRAS, MYC, PIK3CA, SRC, KRAS, CDKN1A, MAPK3, AKT1, ERBB3, PAK3, CDKN1B, BRAF, ERBB2
	ERK YOLAĞI	Biocarta	MYC ,SRC, STAT3, EGFR, MAPK3
	MAPK YOLAĞI	Biocarta	NFKBIA, MYC, CEBPA, MAPK3, NFKB1, BRAF, TGFB1, TGFB3, TGFB1
	MAPK YOLAĞI	KEGG	MYC, TP53, TGFB1, TGFB1, BRAF, AKT1, NFKB1, FAS, KRAS, NRAS, EGFR, DDIT3, DUSP2, TNF, IL1B, TRAF6, STMN1, TGFB3, MAPK3
	PHOSPHATİDYLİNOSİTOL YOLAĞI	KEGG	PIK3CA, PTEN
	RAS YOLAĞI	Biocarta	NFKB1, MAPK3, PIK3CA ,AKT1, BCL2L1
	MTOR YOLAĞI	Biocarta	PIK3CA,PTEN,AKT3,EIF4G1,EIF4E
	MTOR YOLAĞI	KEGG	AKT1 ,PIK3CA, MAPK3, BRAF, IGF1
miR-335	APOPTOZ	KEGG	TP53
	ERBB YOLAĞI	KEGG	MAPK9 ,MAP2K1
	ERK YOLAĞI	Biocarta	MAP2K1
	MAPK YOLAĞI	Biocarta	MAPK9, MAP2K1
	MAPK YOLAĞI	KEGG	TP53, RASA1, FGFR1, MAPK9, MAP2K1
	PHOSPHATİDYLİNOSİTOL YOLAĞI	KEGG	INPPL1, ITPR1
	RAS YOLAĞI	Biocarta	MAP2K1
miR-31	APOPTOZ	KEGG	TP53,BAX,TNF
	ERBB YOLAĞI	KEGG	MYC,HBEGF
	ERK YOLAĞI	Biocarta	MYC
	IGF1MTOR YOLAĞI	Biocarta	PTEN
	IGF1 YOLAĞI	Biocarta	FOS
	MAPK YOLAĞI	Biocarta	FOS,MYC
	MAPK YOLAĞI	KEGG	MYC,FGFR3,TNF,STMN1,FOS,TP53
	MTOR YOLAĞI	Biocarta	PTEN
	MTOR YOLAĞI	KEGG	HIF1A
	PHOSPHATİDYLİNOSİTOL YOLAĞI	KEGG	PTEN
RAS YOLAĞI	Biocarta	RHOA	

Ayrıca nümerik (değişken) klinik özelliklerin tamamı belirlediğimiz miRNA ekspresyon seviyeleri ve mutasyon varlığı ile karşılaştırıldı ve aralarında doğrusal bir ilişki olup olmadığı çok değişkenli doğrusal regresyon analizi ile değerlendirildi (Tablo-26). Elde edilen sonuçlara göre, mutasyon varlığında tümör büyüklüğü ve Kİ67 değişkenleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.026$, $p=0.041$). Let-7a ve miR-10b ekspresyon seviyelerindeki değişim ile Kİ67 değeri arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi ($p=0.046$, $p=0.032$). Let-7a ve miR-10b ekspresyonunda azalış belirlenen vakalarda Kİ67 değeri büyüktür.

Tablo-26 Hastalara Ait Klinik Özelliklerin Mutasyon Varlığı, let-7a ve miR-10b ile İlişkisi

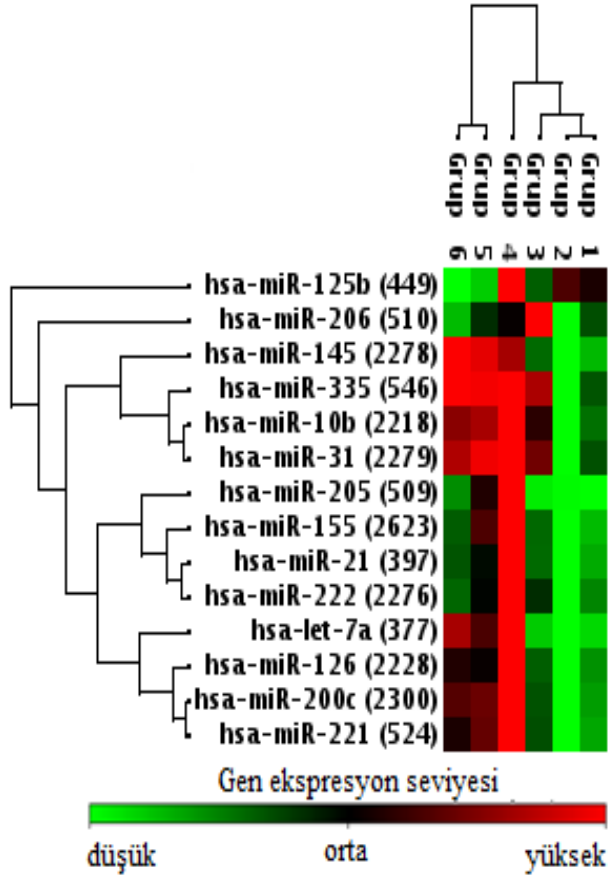
	Mutasyon varlığı	let-7a	miR-10b
	P değerleri		
Tümör boyutu	0.026	0.5	0.867
Kİ67/1000	0.041	0.046	0.032

Son olarak miRNA ekspresyon seviyeleri ve mutasyon varlığı ile klinik özellikler arasında bir bağlantı bulunup bulunmadığını anlayabilmek için Pearson Chi-Square ve Fisher's Exact Test' leri uygulandı. Analiz sonuçlarına göre; mutasyon varlığı tümör lokalizasyonu bakımından değerlendirildiğinde, sağ meme de oluşan tümörlerde istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi. miR-335 ekspresyon seviyesi ile ER ve PR durumu, miR-10b ekspresyon seviyesi ile ER ve PR durumu, miR-126 ekspresyon seviyesi ile ER durumu ve tümör tipi, miR-200c ekspresyon seviyesi ile PR durumu ve tümör tipi arasında istatistiksel olarak anlamlılık elde edildi. İnvaziv duktal karsinoma tipinde miR-126 ve miR200c ekspresyonunun down-regüle olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo-27).

Tablo-27 Hastalara Ait Klinik Özelliklerin Mutasyon Varlığı, miR-335, miR-10b, miR-126 ve miR-200c ile İlişkisi

	Mutasyon	miR-335	miR-10b	miR-126	miR-200c
	varlığı				
P değerleri					
Tümör lokalizasyonu (sağ)	0.023	0.483	0.322	0.179	0.705
Tümör tipi (invaziv duktal k.)	0.188	0.693	0.140	0.033	0.016
ER	0.327	0.001	0.003	0.003	0.185
PR	0.056	0.024	0.047	0.167	0.039

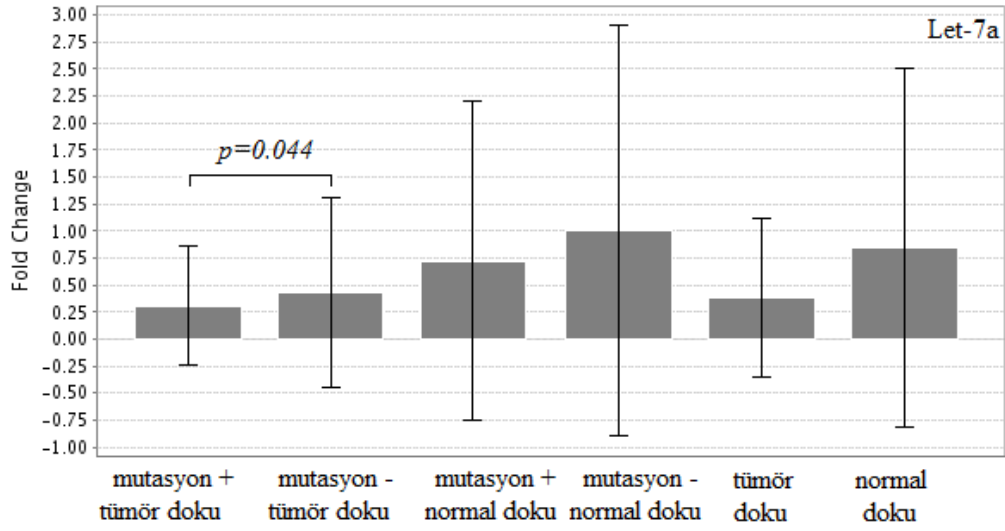
Sabiosciences PCR-Data Analizi olarak (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) web tabanlı program kullanılarak, değerlendirilen hasta gruplarına göre miRNA'ların up-regüle ve down-regüle olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü (Şekil-18) ve istatistiksel olarak anlamlı ve sınırda anlamlılık belirlenen miRNA'ların farklı dokular arasındaki miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerini ifade eden fold change grafikleri oluşturuldu (Şekil-19, Şekil-20, Şekil-21, Şekil-22, Şekil-23, Şekil-24, Şekil-19 Şekil-25).



Şekil-18 Meme Kanserli Hastalarda Değerlendirilen 14 miRNA' nın

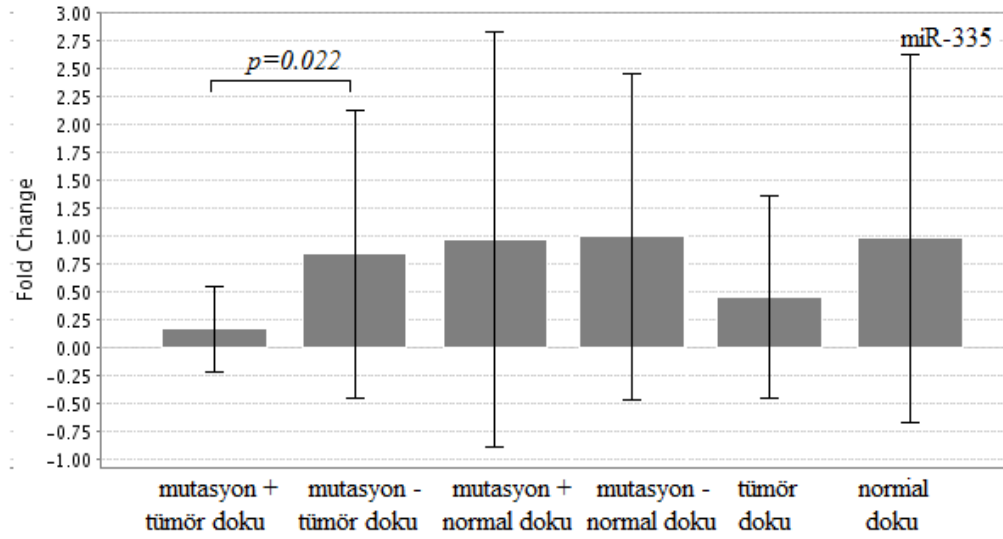
Clustrogram Görüntüsü:

Grup 1: M (+) ve M (-) tümör doku, Grup 2: M (+) tümör doku, Grup 3: M (-) tümör doku, Grup 4: M (+) normal doku, Grup 5: M (+) ve M (-) normal doku, Grup 6: M (-) normal doku



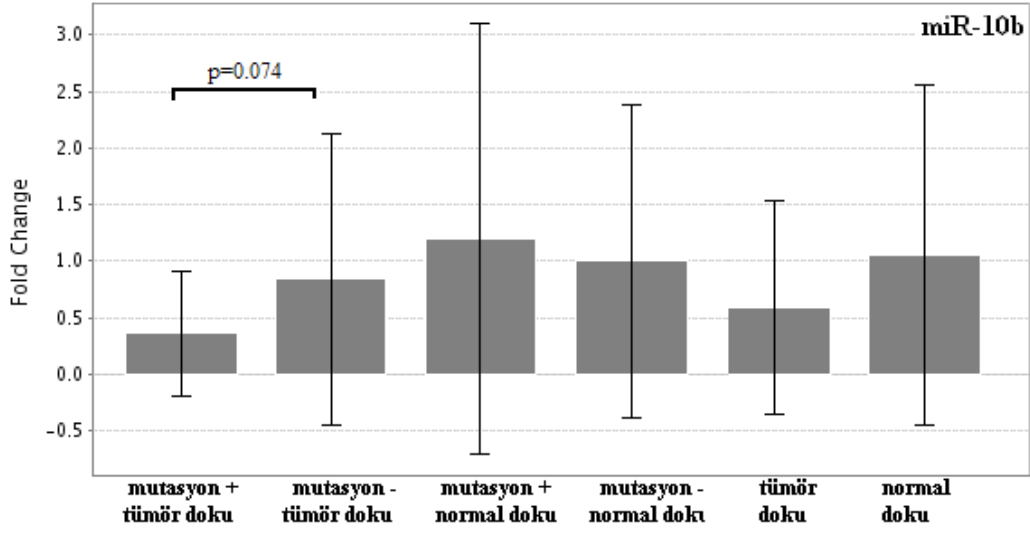
Şekil-19 Let-7a' nın Ekspresyon Düzeyleri*

* Let-7a ekspresyonu; mutasyon – normal ile tümör dokular ve mutasyon + normal ile tümör dokular karşılaştırılarak istatistiksel (sırasıyla $p=0.039$, $p=0.048$) anlamlılık belirlenmiştir.

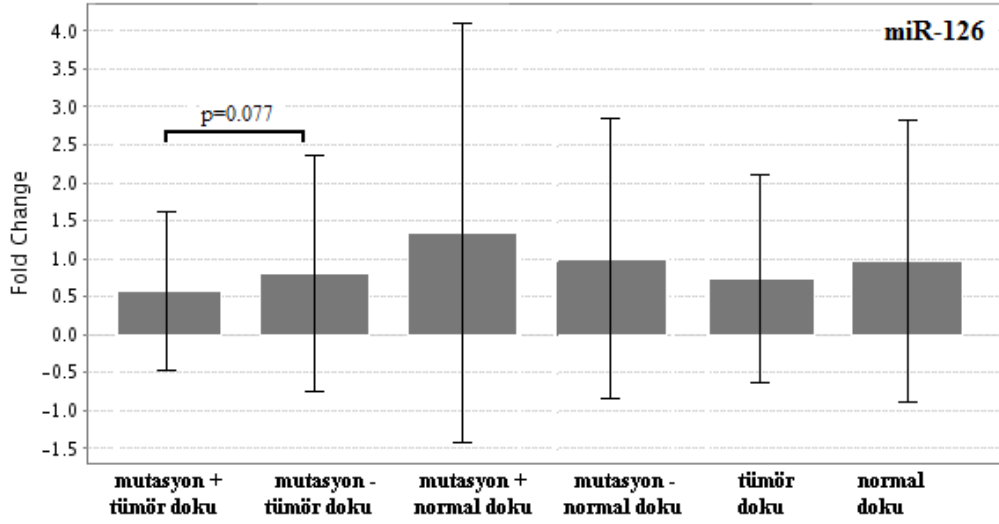


Şekil-20 miR-335' in Ekspresyon Düzeyleri*

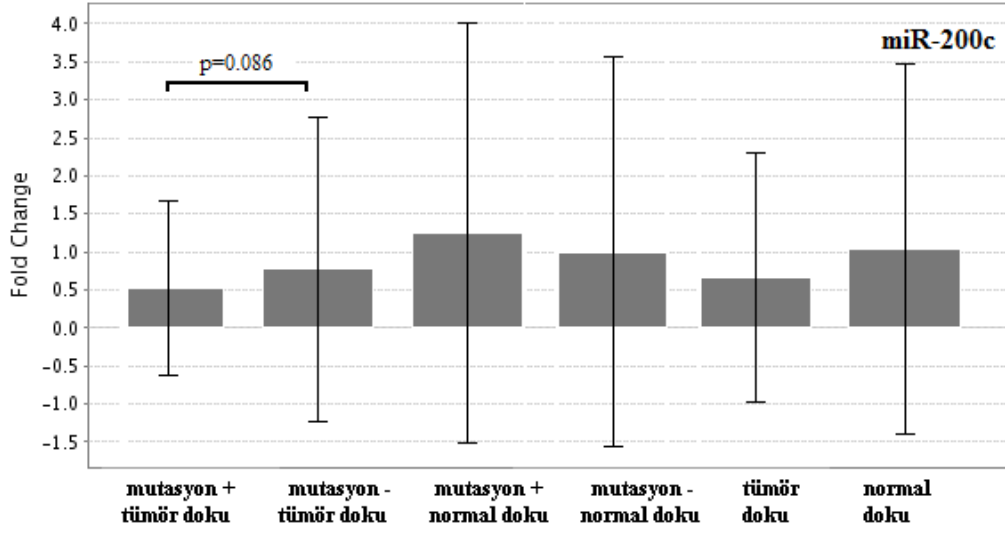
* miR-335 ekspresyonu; mutasyon – normal ile tümör dokular ve mutasyon + normal ile tümör dokular karşılaştırılarak istatistiksel (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.05$) anlamlılık belirlenmiştir.



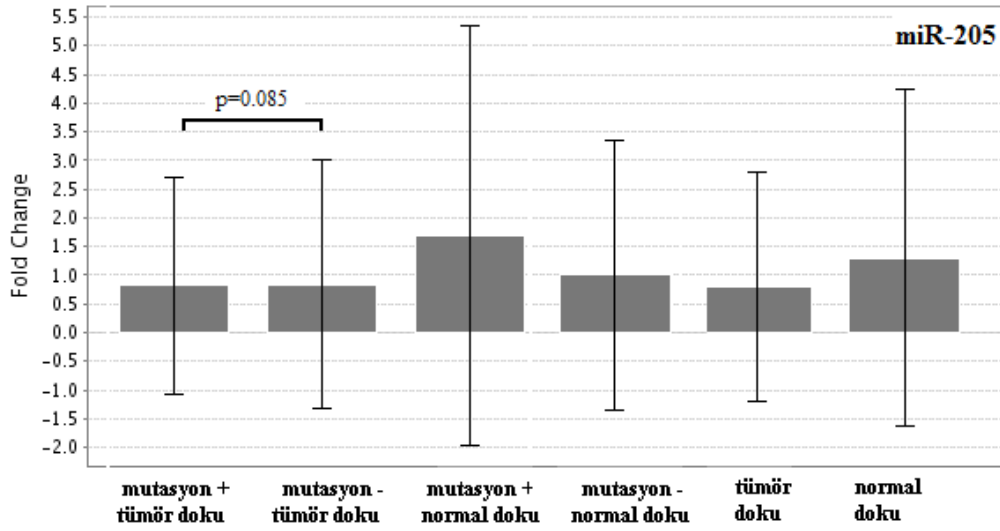
Şekil-21 miR-10b' nin Ekspresyon Düzeyleri



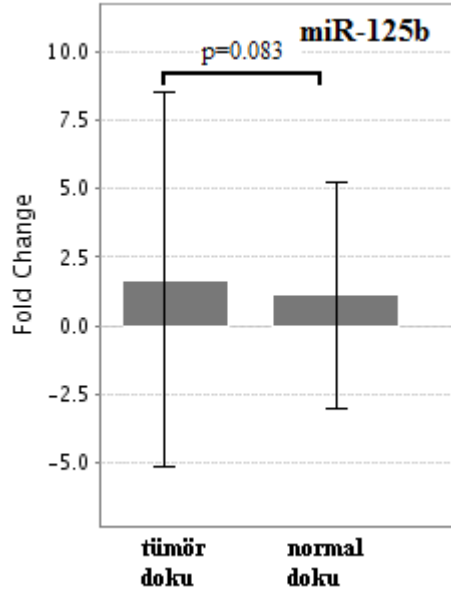
Şekil-22 miR-126' nın Ekspresyon Düzeyleri



Şekil-23 miR-200c' nin Ekspresyon Düzeyleri



Şekil-24 miR-205' in Ekspresyon Düzeyleri



Şekil-25 miR-125b' nin Tümör ve Normal Dokulardaki Ekspresyon Düzeyleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanserleri; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi ve tedaviye yanıtlarına göre farklı özellikleri olan heterojenöz gruplara sahip tümörlerdir (31). Kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup; tanı ve tedavi yöntemleri alanındaki tüm gelişmelere rağmen, ölüm nedenleri arasında akciğer karsinomundan sonra 2. sırada yer alır (230). Cerrahi tedaviden sonra düşük ve yüksek riskli grupları belirlemek için kullanılan ve prognostik açıdan değerli olan histolojik tip, histolojik evre, hormon reseptörü varlığı, HER-2 amplifikasyonu, tümör boyutu, proliferasyon indeksi, nekroz, anjiolenfatik invazyon, meme başı tutulumu, intraduktal tümöral komponent varlığı ve aksiller lenf bezi tutulumu gibi pek çok parametre vardır (21, 230). Ancak, aynı kategoriye sokulan tümör gruplarının klinik olarak çok farklı seyretmesi bazı parametrelerin de ilave edilmesi gerekliliğini akla getirmektedir.

Kanserin genetik temellerini araştıran çalışmalarda, protein kodlamayan küçük RNA molekülleri olan miRNA' ların incelenmesinin gündeme gelmesi ile son on yıldan bu yana, miRNA' lar ve insan kanserleri arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. miRNA' lar; onkogen, tümör baskılayıcı gen ya da bazen her iki şekilde de hareket edebilmektedirler. Germline, somatik mutasyonlar ve polimorfizmler kansere yatkınlığa katkı sağlayabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda miRNA' ların insan kanserlerinin hemen hemen her tipinde yaygın bir şekilde deregüle olduğu belirlenmiş ve miRNA ekspresyonlarının kanser prognozu ile tümörün karakterizasyonu için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur. miRNA ekspresyon seviyeleri hastalığın diagnozu ve prognozu açısından öneme sahiptir ve antikanser tedavi ajanları gibi umut vaat eden moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Meme kanserlerinin de dahil olduğu çeşitli insan kanserlerinde çok sayıda miRNA' nın ekspresyon profillerinde düzensizlikler olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan miRNA profillemeye çalışmalarında meme karsinogenezinde önemli, meme tümör dokuları ile normal dokular arasında deregüle olan miRNA' lar tanımlanmıştır. Fonksiyonel çalışmalar bu miRNA' ların meme kanserlerinde onkogenik (miR-21, miR-10b, miR-27a vb.) ve tümör baskılayıcı (miR-335, miR-126, miR-200c, miR-125a, miR-125b, let-7 vb.) özellikte olduğunu açıkça göstermektedir (192). Ekspresyon seviyeleri değişmiş miRNA' lar ile meme kanseri tümörigenezi ve metastazi arasında da ilişki olduğu belirlenmiştir (174).

Croce ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmalarında (212), farklı tümör tiplerinde onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikteki miRNA' ların fonksiyonları ve kanserdeki etkisi üzerinde durmuşlardır. Let-7 ailesi üyelerinin özellikle akciğer, meme, mide ve kolon kanserlerinde düşük seviyede ekspresyon gösterdiğini, bu durumun kısa sağkalım ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle, let-7a-2' nin düşük ekspresyonunun akciğer kanserlerinde kısa sağkalım ile korele olduğunu ifade etmişlerdir. Onkogenik özellik gösteren miR-10b' nin ise meme kanserlerinde düşük ekspresyon gösterdiği, metastatik meme kanserlerinde ise ekspresyonunda artış olduğu ifade edilmiş ve bu artışın metastatik potansiyel ve invazyon ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Diğer grup miRNA' lardan miR-143 ve miR-145' in ise solid tümörlerde (meme ve kolon kanserlerinde) ve hematolojik malignansilerde (CLL ve B-hücreli lenfoma) ekspresyon seviyesi düşüktür. Meme kanserlerinde onkogen gibi hareket eden miRNA' lardan olan miR-21 ve miR-155' in, özellikle farklı tipteki tümör örneklerinde, normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında sıklıkla ekspresyon düzeyleri yüksektir. miR-21' in; glioblastomlar, meme ve rahim ağzı kanserleri, uterus myosarkomları ve diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DLBCL)' da, miR-155' in ise pediatrik Burkitt lenfoma, Hodgkin hastalığı, DLBCL, meme, akciğer, kolon ve pankreas kanserlerinde ekspresyon seviyeleri yüksektir. Özellikle akciğer kanserlerinde miR-21' in yüksek seviyedeki ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (178, 212, 213).

Mevcut çalışmada erken yaş ve/veya aile hikayesi olan *BRCA1/2* genlerinin mutasyon analizleri gerçekleştirilmiş meme kanserli hastaların dokularında, meme kanser gelişiminde diagnostik, prognostik ve ilaç direnci ile ilgili önemli olabilecek 14 miRNA' nın ekspresyon düzeylerindeki değişimleri değerlendirildi. Mutasyon taşıyan vakaların dokularında let-7a ve miR-335 ekspresyon seviyelerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.044$, $p=0.022$). İlgili miRNA' lar ile ilgili literatürde çok sayıda ekspresyon çalışmaları olmasına rağmen, çalışmada değerlendirilen hasta grubunun *BRCA1/2* mutasyonları analiz edilen vakalardan oluşması elde edilen bulguların özgünlüğünü oluşturmaktadır. *BRCA1/2* genlerindeki mutasyonlar nedeniyle gelişen meme kanserleri diğerlerinden daha agresif seyretmekte ve bu tip kanserlerde rutin kemoterapi yaklaşımları etkin olmamaktadır (125, 131, 136-138, 142-144).

Kim ve arkadaşlarının (231) yaptıkları çalışmada, meme kanserli hastalarda antitümör ve antimetastatik belirleyici olarak let-7a' nın terapötik etkisi ortaya konmuştur. Ayrıca let-7a' nın tümör gelişimini ve metastazı inhibe ettiği daha önce yapılan

çalışmalarda da belirlenmiştir (173-176, 196, 199, 200). Sempere ve arkadaşları da let-7a ve miR-21' in ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri luminal epitel hücrelerin normal dokuları ve malign dokuları arasında karşılaştırmışlar ve malign hücrelerde miR-21 ekspresyon seviyesi sıklıkla artmış iken let-7a ekspresyon seviyesinin ise azaldığını belirlemişlerdir (232). Mevcut çalışmamızdaki meme tümörlü dokularda let-7a ekspresyonu down-regüle olarak belirlendi (Şekil 19).

Heyn ve arkadaşları (222) sporadik gelişen meme kanserlerinde miR-335' in rolünü araştırmışlar ve meme kanser gelişiminde miR-335 ekspresyon seviyesindeki azalışın *BRCAl* ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. *BRCAl* mRNA' sının ekspresyonunun up-regülasyonu, miR-335' in overekspresyonu ile sonuçlanmıştır. miRNA ekspresyon seviyesinin *BRCAl* transkript seviyesi ile pozitif korelasyon göstermesi, bu tümör baskılayıcı genin miR-335 aracılı regülasyonunu destekler niteliktedir. miR-335 overekspresyonu, apoptozun artmasına ve hücre canlılığının azalmasına yol açmıştır. Bu da bu miRNA' nın tümör baskılayıcı fonksiyonunu ortaya koymaktadır. miR-335' in *BRCAl* kaskadının aktivasyonu ile farklı hedefleri (ERa, IGF1R, SP1, ID4) etkilediği gösterilmiştir (222). Tavazoie ve arkadaşları (220) ise miR-335' in meme kanser hücrelerinde metastazı baskılayıcı olarak hareket ettiğini çalışmalarında belirtmişlerdir. miR-335' in down-regülasyonunun agresif tümör tipi ve kötü prognoz ile korelasyon gösterdiği yine bu çalışmada belirtilmiştir (220). MM Hafez ve arkadaşları da (233) 8 miRNA' nın ve 8 metastaz ile ilişkili genin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları değerlendirmişler ve özellikle miR-10, miR-21, miR-155, miR-373, miR-30b, miR-126, miR-17p ve miR-335' in meme kanserli tümör dokularında normal dokular ile karşılaştırıldığında down-regüle olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışma, ilgili miRNA' ların tümör metastazı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (233). Mevcut çalışmamızda miR-335' in ekspresyonunun mutasyon taşıyan hasta grubunda down-regüle olarak belirlenmesi, mutasyon taşıyan bireylerdeki agresif seyreden meme kanserlerinde bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Mevcut bulgu, miR-335' in *BRCAl/2* genlerinin etkili oldukları yolaklar ile ilişkili olabileceğini de ortaya koymaktadır (Şekil 5-9).

Dolayısıyla *BRCA* mutasyonu taşıyan meme kanserli hastalarda let-7a ve miR-335 ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi sahibi olunabilir. Böylece hastaya uygulanacak bireye özgü tedavi protokollerine katkı sağlanabilir. Bu durum hastalıkla daha etkin şekilde mücadele

etmeyi ve daha iyi bir klinik iyileşmeyi beraberinde getirir ve ilgili hasta grubunun yaşam kalitesini yükseltir.

Çalışmada meme kanserli hastalara ait dokularda miR-125b' nin ekspresyon seviyesindeki artış anlamlılığa yakın belirlendi ($p=0.083$). Yapılan araştırmalarda ilgili miRNA' nın meme kanserli dokularda down-regüle olduğu bildirilmesine rağmen; Rajabi ve arkadaşlarının (234) farklı özelliklere sahip meme kanser hücre hatları ile gerçekleştirdikleri çalışmada sadece metastatik hücre hatlarında miR-125b' nin up-regüle olduğu ve bu durumun metastaz ile direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir (234). Günümüzde primer meme tümörlerinde miR-125b' nin up-regüle ekspresyonunun belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda değerlendirilen erken yaş ve/veya aile hikayesi bulunan kötü prognoz potansiyeli yüksek olan vakalarda bu miRNA' nın upregüle olması, ilgili hasta grubunda metastatik süreç ile ilgili aday bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği konusunda elde edilmiş önbulgudur. Bu nedenle; hasta sayısı artırılarak istatistiksel anlamlılık belirlendiği takdirde, kötü prognoz potansiyeli olan yüksek riskli meme kanserli hastalarda miR-125b' nin bir biyobelirteç olabileceği tahmin edilmektedir.

Çalışmada tüm miRNA' lar sağkalım analizi ile değerlendirilerek; miR-10b, miR-335, miR-31 ve miR-205 ekspresyonları, hastalıklı yaşam süreleri ele alındığında meme kanserli hastaların tümünde istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0.001$, $p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.05$) belirlenmiştir. Hastalıktan bağımsız yaşam süreleri ele alınarak yapılan değerlendirme de ise miR-10b, miR-335 ve miR-31 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.02$, $p=0.04$, $p=0.05$), miR-205 ekspresyonu ise anlamlılığa yakın belirlenmiştir ($p=0.07$). Mutasyon pozitif hasta grubu ile mutasyon negatif hasta grubu karşılaştırıldığında ise, her 4 miRNA' nın da mutasyon pozitif grupta down-regüle olduğu belirlendi. Meme kanserli vakalarda hastaların sağkalım süreleri ile ilgili miRNA' ların ekspresyonlarının down-regüle olmasındaki ilişki, meme kanserli hastalarda miR-10b, miR-335, miR-31 ve miR-205' in kötü prognozla ilişkili olabilirliğini ortaya koymaktadır.

miRNA' ların ekspresyon seviyeleri ile hastaların almış oldukları tedaviler tüm meme kanserli vakalarda ve yalnızca BRCA mutasyonu taşıyan grupta hastalıklı ve hastalıktan bağımsız yaşam süreleri karşılaştırılarak değerlendirildi. Her iki grupta let-7a ekspresyonu herceptin tedavisi ile (hastalıklı $p=0.001$, $p=0.05$ ve hastalıktan bağımsız $p=0.001$, $p=0.05$), miR-31 ekspresyonu hormon tedavisi ile (hastalıklı $p=0.04$, $p=0.02$ ve hastalıktan bağımsız $p=0.05$, $p=0.03$) sağkalım ilişkisi istatistiksel olarak analiz edildi. Bu iki miRNA' nın meme kanserlerinde down-regülasyonu, alınan herceptin ve hormon

tedavisine yanıt açısından direnç oluşturabilir. Tüm vakalarda hastalıklı yaşam süreleri değerlendirilerek yapılan sağkalım analizi sonucunda hormon tedavisi almış hastalarda miR-335 ekspresyon seviyesindeki azalış istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p=0.01$). Hastalıktan bağımsız yapılan karşılaştırma da ise tüm meme kanserli vakalarda ve mutasyon taşıyan hasta grubunda miR-335 ekspresyon düzeyi alınan hormon tedavisi ile anlamlı bulundu ($p=0.01$, $p=0.02$). İlgili miRNA' nın ekspresyon seviyesindeki azalış meme tümörlerinde hormonal tedaviye yanıtta direnç oluşturmaktadır. Elde edilen bu sonuçlara göre; mutasyon varlığı gözetilmeksizin tüm meme kanserli vakalarda let-7a, miR-31 ve miR-335 ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek, hastaların herceptin ve hormon tedavisine verecekleri yanıtlar tahmin edilebilir. Tüm meme kanserli vakalarda radyasyon tedavisi alan hastalar ile miR-31 ekspresyon seviyesi hastalıklı yaşama süreleri göz önüne alınarak karşılaştırıldığında ise istatistiksel bir anlamlılık belirlenmedi ($p=0.12$). *BRC A* mutasyonu taşıyan hasta grubunda miR-31' in ekspresyon düzeyindeki azalışın, hastaların almış olduğu radyasyon tedavisi ile arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi ($p=0.03$). miR-31 ekspresyon seviyesindeki azalış, mutasyon taşıyan hastalarda alınan radyasyon tedavisine direnç oluşturmaktadır. Dolayısıyla hastalıklı yaşam süreleri boyunca ilgili vakalarda, miR-31' in ekspresyon düzeyi değerlendirilerek hastaların radyasyon tedavisine yanıt alınıp alınamayacağı konusunda bilgi edinilebilir.

Mutasyon varlığında miRNA ekspresyon seviyeleri ve hastalara ait klinik özellikler karşılaştırıldığında, mutasyon belirlenmiş vakalarda tümör lokalizasyonu ($p=0.023$), ekspresyonlarında farklılık belirlenen miRNA' lardan; miR-335 ekspresyon seviyesindeki azalış ile ER ve PR durumu ($p=0.001$, $p=0.024$), miR-10b ekspresyon seviyesindeki azalış ile ER ve PR durumu ($p=0.003$, $p=0.047$), miR-126 ekspresyon seviyesindeki azalış ile ER durumu ve tümör tipi ($p=0.003$, $p=0.033$) ve miR-200c ekspresyon seviyesindeki azalış ile PR durumu ve tümör tipi ($p=0.039$, $p=0.016$) arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi. Literatürde, bu miRNA' ların down-regülasyonunun kötü prognoz ve metastaz gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (188, 221, 222, 228 ve 229). Özellikle endokrin tedaviden yanıt alınamayan ER ve PR negatif, kötü prognoz potansiyeli olan meme kanserli hastalarda miR-335, miR-10b, miR-126 ve miR-200c ekspresyon seviyelerinin analizi, tedaviye yanıt ile ilgili bilgi edinilmesine ve tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesine katkı sağlar niteliktedir.

Mutasyon varlığında tümör büyüklüğü ve Ki67 proliferasyon indeksi doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilerek istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.026$,

$p=0.041$). *BRCA* mutasyonu taşıyan vakalarda tümör büyüklüğü mutasyon taşımayanlara nazaran daha büyüktür. Mutasyon varlığında Kİ67 değeri de mutasyon olmayanlara göre daha büyüktür. Ayrıca, ekspresyon seviyelerinde farklılık belirlenen miRNA' lardan, let-7a ve miR-10b' nin ekspresyon seviyelerindeki azalış ile Kİ67 değeri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.046$, $p=0.032$). Let-7a ve miR-10b ekspresyonunda azalış belirlenen vakalarda, Kİ67 indeks değeri daha büyüktür. Ki-67 değişkeninin; tümör büyüklüğü, histolojik derece, vasküler invazyon ve aksiller lenf nodu tutulumu ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (235). Kİ67' nin agresif tümörlerde oranı yüksektir ve yüksek Kİ67 oranı kötü prognostik faktör olarak ifade edilir (236). Bu bilgiler ışığında; meme tümörlerinde Kİ67 indeksinin yüksek olması meme kanseri gelişimi ve kötü prognozu için olumsuz bir faktör olduğu görülmektedir. Let-7a ve miR-10b ekspresyon seviyelerindeki farklılık ile hücre proliferasyonunun belirleyicisi olan Kİ67 indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmesi, *BRCA* mutasyonu taşıyan vakalarda ilgili miRNA' ların kötü prognoz takibinde kullanılabilir biyobelirteçler olabileceğini destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, mevcut çalışma *BRCA* mutasyonları ile ilişkilendirilen meme kanserli hastalarda; miRNA ekspresyon değişimlerinin tanı, tedavisi ve takibinde etkili biyobelirteç olarak yararlanılabileceği fikriyle kurgulanmış literatürdeki ilk çalışmadır. Elde edilen bulgular ışığında; *BRCA* mutasyonu taşıyan kötü prognoz potansiyeli olan erken yaş ve ailesel meme kanserli hastalarda let-7a ve miR-335 ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi edinilebilir. Böylece diğer meme kanserli hastalar ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, farklı etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine katkı oluşturarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır. Çalışmada elde edilen bulgular; *BRCA* mutasyonu taşıyan meme kanserli hastalarda kötü prognoz takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir.

Çalışmada elde edilen bulgular, yapılacak bundan sonraki ileri fonksiyonel çalışmalar için yol gösterici olmakla birlikte, az sayıdaki miRNA' nın değerlendirilmesinden dolayı sınırlıdır. Çok sayıdaki miRNA' nın çok daha fazla sayıdaki örnek ile çalışılmasına olanak sağlayacak daha kapsamlı çalışmaların planlanması hedeflenmelidir.

6. KAYNAKLAR

1. BARTELS CL, TSONGALIS GJ. MicroRNAs: Novel biomarkers for human cancer. *Clinical Chemistry*, 55: 4623-4631, 2009.
2. PILLAI RS, BHATTACHARYYA SN, FILIPOWICZ W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17: 118-126, 2007.
3. IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, CAMPIGLIO M, MÉNARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65: 7065-7070, 2005.
4. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834-838, 2005.
5. VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, AMBS S, CIMMINO A, PETROCCA F, VISIONE R, IORIO M, ROLDO C, FERRACIN M, PRUEITT RL, YANAIHARA N, LANZA G, SCARPA A, VECCHIONE A, NEGRINI M, HARRIS CC, CROCE CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 2257-2261, 2006.
6. ZHANG L, HUANG J, YANG N, GRESHOCK J, MEGRAW MS, GIANNAKAKIS A, LIANG S, NAYLOR TL, BARCHETTI A, WARD MR, YAO G, MEDINA A, O'BRIEN-JENKINS A, KATSAROS D, HATZIGEORGIOU A, GIMOTTY PA, WEBER BL, COUKOS G. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9136-9141, 2006.
7. CALIN GA, CROCE CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6: 857-866, 2006.
8. CALIN GA, CROCE CM. MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. *Cancer Research*, 66: 7390-7394, 2006.
9. CHO WC. OncomiRs: The discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular Cancer*, 6: 1-7, 2007.
10. ZHANG B, PAN X, COBB GP, ANDERSON TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302: 1-12, 2007.
11. BARROS FF, POWE DG, ELLIS IO, GREEN AR. Understanding the HER family in breast cancer: Interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology*, 56: 560-572, 2010.
12. GROSSHANS H, FILIPOWICZ W. The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451: 414-416, 2006.
13. CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 15524-15529, 2002.

14. COWLAND JB, HOTHER C, GRONBAEK K. MicroRNAs and cancer. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 115: 1090-1106, 2007.
15. GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer Statistics 2000. *A Cancer Journal of Clinicians*, 50: 7-33, 2000.
16. BORING CC, SQUIRES TS, TONG T. *A Cancer Journal of Clinicians*, 43: 4-26, 1993.
17. HOOVER R. Breast Cancer: Geographic, Migrant and Time-Trend Patterns, *Accomplishments in Cancer Research*, New York, page 403-425, 1996.
18. SILVENBERG E, LUBERA J. Cancer Statistics 1987. *A Cancer Journal of Clinicians*, 37: 2-19, 1987.
19. RAVDIN PM, CRONIN KA, HOWLADER N, BERG CD, CHLEBOWSKI RT, FEUER EJ, EDWARDS BK, BERRY DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 356: 1670-1674, 2007.
20. HORTOBAGYI GN, ESSERMAN L, BUCHHOLZ TA. Neoplasm of the breast, 7th edition, *Cancer Medicine*, London, page 1584-1643, 2006.
21. TAVASOLLI FA, DEVILEE P. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs, IARC Press, Lyon, page 9-113, 2003.
22. GIORDANO SH, COHEN DS, BUZDAR AU, PERKINS G, HORTOBAGYI GN. Breast carcinoma in men: A population-based study. *Cancer*, 101: 51-57, 2004.
23. GUSTERSON AB, ROSS TD, HEATH JV, STEIN T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7: 143-148, 2005.
24. SCHNITT SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 2: 60-64, 2010.
25. GUARNERI V, CONTE PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 1: 149-161, 2004.
26. İLVAN Ş. Meme karsinomu patolojisi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, STE sempozyum dizisi, İstanbul, sayfa 65-71, 2004.
27. KENEMANS P, VERSTRAETEN RA, VERHEIJEN RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 49: 34-43, 2004.
28. SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARON JS, NOBEL A, SHIBIN D, JOHNSEN H, PESICH R, GEISLER S, DEMETER J, PEROU CM, LONNING PE, BROWN PO, BORRESEN-DALE A, BOTSTEIN D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8418-8423, 2003.
29. SORLIE T, WANG Y, XIAO C, JOHNSEN H, NAUME B, SAMAHA R, BORRESEN-DALE A. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: Gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*, 7: 1-15, 2006.
30. RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, LEE AH, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 109: 25-32, 2007.
31. FULFORD LG, EASTON DF, REIS-FILHO JS, SOFRONIS A, GILLETT CE, LAKHANI SR, HANBY A. Specific morphological features predictive for the basal

- phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, 49: 22-34, 2006.
32. EROLES P, BOSCH A, PÉREZ-FIDALGO JA, LLUCH A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38: 698-707, 2012.
 33. SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, MARTIAT P, FOX SB, HARRIS AL, LIU ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 10393-10398, 2003.
 34. HAVERTY PM, FRÍDLYAND J, LI L, GETZ G, BEROUKHIM R, LOHR S, WU TD, CAVET G, ZHANG Z, CHANT J. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 47: 530-542, 2008.
 35. BOSCH A, EROLES P, ZARAGOZA R, VINA JR, LLUCH A. Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews*, 36: 206-215, 2010.
 36. NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, CHEANG M, KARACA G, HU Z, HERNANDEZ-BOUSSARD T, LIVASY C, COWAN D, DRESSLER L, AKSLEN LA, RAGAZ J, GOWN AM, GILKS CB, VAN DE RIJN M, PEROU CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10: 5367-5374, 2004.
 37. PEROU CM, SØRLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
 38. SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10869-10874, 2001.
 39. KENNECKE H, YERUSHALMI R, WOODS R, CHEANG MC, VODUC D, SPEERS CH, NIELSEN TO, GELMON K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 28: 3271-3277, 2010.
 40. LOI S, HAIBE-KAINS B, DESMEDT C, LALLEMAND F, TUTT AM, GILLET C, ELLIS P, HARRIS A, BERGH J, FOEKENS JA, KLIJN JG, LARSIMONT D, BUYSE M, BONTEMPI G, DELORENZI M, PICCART MJ, SOTIRIOU C. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 1239-1246, 2007.
 41. FAN C, OH DS, WESSELS L, WEIGELT B, NUYTEN DS, NOBEL AB, VAN'T VEER LJ, PEROU CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 355: 560-569, 2006.
 42. PARKER JS, MULLINS M, CHEANG MC, LEUNG S, VODUC D, VICKERY T, DAVIES S, FAURON C, HE X, HU Z, QUACKENBUSH JF, STIJLEMAN IJ, PALAZZO J, MARRON JS, NOBEL AB, MARDIS E, NIELSEN TO, ELLIS MJ,

- PEROU CM, BERNARD PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 1160-1167, 2009.
43. PRAT A, PEROU CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5: 5-23, 2011.
 44. SOTIRIOU C, PUSZTAI L. Gene expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360: 790-800, 2009.
 45. DICKSON RB, LIPMAN ME, HARRIS JR, MORROW M, LIPPMAN ME, HELLMAN S. *Oncogenes and Supressor Genes In: Disease of the Breast*, Philadelphia, page 221-235, 1996.
 46. GELMANN EP. *Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, volume 1, Boston, page 499-517, 1998.
 47. BARH D, PARIDA S, PARIDA BP, VISWANATHAN G. Let-7, miR-125, miR-205 and miR-296 are prospective therapeutic agents in breast cancer molecular medicine, volume 12, *Gene Therapy and Molecular Biology*, India, page 189-206, 2008.
 48. KLIJN JGM, BERNIS PMJJ, SCHMITS PLM, FOEKENS JA. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: A review on 5232 patients. *Endocrine Reviews*, 13: 3-17, 1992.
 49. DANG CV. C-myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 1-11, 1999.
 50. BERNIS EM, FOEKENS JA, VAN PUTTEN WL, VAN STAVEREN IL, PORTENGEN H, DE KONING WC, KLIJN JG. Prognostic factors in human primary breast cancer: Comparison of c-myc and HER-2/Neu amplification. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 13-19, 1992.
 51. BERNIS EM, KLIJN JG, VAN STARVEREN IL, PORTENGEN H, DE KONING WC, FOEKENS JA. Prevalence of amplification of the oncogene c-myc, HER-2/Neu and int-2 in one thousand human breast tumors: Correlation with steroid receptor status. *European Journal of Cancer*, 28: 697-700, 1992.
 52. OSBORNE C, WILSON P, TRIPATHY D. Oncogenec and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. *Oncologist*, 9: 361-77, 2004.
 53. LIAO DJ, DICKSON RB. C-Myc in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 7: 143-164, 2000.
 54. VON LINTIG FC, DREILINGER AD, VARKI NM, WALLACE AM, CASTEEL DE, BOSS GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Reseach and Treatment*, 62: 51-62, 2000.
 55. DICKSONRB, LIPPMAN ME. *Cancer of the breast*, In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th edition, Philadephia, page 1541-1557, 1997.
 56. ZUKERBERG LR, YANG WL, GADD M, WOOSTER R. Cyclin D1 (prad1) protein expression in breast cancer: Approximately one third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Modern Pathology*, 8: 560-567, 1995.
 57. KEMOMARSI K, CONTE D.J, TOYOFUKU W, FOX MP, SCAMBIA G. Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*, 11: 941-950, 1995.
 58. CAIRNS P, POLASCIK TJ, EBY Y, TOKINO K, CALIFANO J, MERLO A, MAO L, HERATH J, JENKINS R, WESTRA W. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary breast carcinoma. *Nature Genetics*, 11: 210-212, 1995.

59. WEIGEL MT, DOWSETT M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine Related Cancer*, 17: 245-262, 2010.
60. GASPARINI G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*, 1: 37-44, 2000.
61. SALVEN P, LYMBOUSSAKI A, HEIKKILÄ P, JÄÄSKELA-SAARI H, ENHOLM B, AASE K, VON EULER G, ERIKSSON U, ALITALO K, JOENSUU H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *The American Journal of Pathology*, 153: 103-108, 1998.
62. GUIDI AJ, SCHNITT SJ, FISCHER L, TOGNAZZI K, HARRIS JR, DVORAK HF, BROWN LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 80: 1945-1953, 1997.
63. BROWN LF, GUIDI AJ, SCHNITT SJ, VAN DE WATER L, IRUELA-ARISPE ML, YEO TK, TOGNAZZI K, DVORAK HF. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research*, 5: 1041-1056, 1999.
64. DE BONO JS, ROWINSKY EK. The ErbB receptor family: A therapeutic target for cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 19-26, 2002.
65. YARDEN Y, SLIWKOWSKI MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews*, 2: 127-37, 2001.
66. LIN N, WINER EP. Small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Research*, 6: 204-210, 2004.
67. SARTOR CI. Mechanisms of Disease: Radiosensitization by epidermal growth factor receptor inhibitors. *Nature Clinical Practice Oncology*, 1: 80-87, 2004.
68. BRENNAN PJ, KUMAGAI T, BEREZOV A, MURALI R, GREENE MI. HER-2/Neu: Mechanisms of dimerization/ oligomerization. *Oncogene*, 19: 6093-6101, 2000.
69. TORREGROSA D, BOLUFER P, LLUCH A, LÓPEZ JA, BARRAGÁN E, RUIZ A, GUILLEM V, MUNÁRRIZ B, GARCÍA CONDE J. Prognostic significance of CerbB2/Neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clinica Chimica Acta*, 262: 99-119, 1997.
70. HUNG MC, LAU YK. Basic science of HER-2/Neu: A review. *Seminars in Oncology*, 4: 51-59, 1999.
71. KLAPPER LN, GLATHE S, VAISMAN N, HYNES NE, ANDREWS GC, SELA M, YARDEN Y. The ErbB2/HER-2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma derived growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 4995-5000, 1999.
72. WANG LM, KUO A, ALIMANDI M, VERI MC, LEE CC, KAPOOR V, ELLMORE N, CHEN XH, PIERCE JH. ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6809-6814, 1998.
73. PRENZEL N, FISCHER OM, STREIT S, HART S, ULLRICH A. The epidermal growth factor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine Related Cancer*, 8: 11-31, 2001.

74. VELU TJ, BEGUINOT L, VASS WC, WILLINGHAM MC, MERLINO GT, PASTANI I, LOWY DR. Epidermal growth factor dependent transformation by human EGF-receptor-*proto-oncogene*. *Science*, 238: 1408-1410, 1987.
75. ROWINSKY EK, WINDLE JJ, VON HOFF DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 3631-3652, 1999.
76. LEE JT, MCCUBREY JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 16: 486-507, 2002.
77. KOLCH W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical Journal*, 351: 289-305, 2000.
78. ADJEI AA. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Drugs of the Future*, 26: 1087-1098, 2001.
79. VIVANCO I, SAWYERS CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews*, 2: 489-501, 2002.
80. CIOCCA DR, FUJIMURA FK, TANDON AK, CLARK GM, MARK C, LEE-CHEN GJ, POUNDS GW, VENDELY P, OWENS MA, PANDIAN MR. Correlation of HER-2/Neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 84: 1279-1282, 1992.
81. DOWNWARD J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 262-267, 1998.
82. CANTLEY LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, 296: 1655-1657, 2002.
83. MICHAEL JOHN FRY. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: How big a role might it play? *Breast Cancer Research*, 3: 304-312, 2001.
84. MILLS GB, LU Y, FANG X, WANG H, EDER A, MAO M, SWABY R, CHENG KW, STOKOE D, SIMINOVITCH K, JAFFE R, GRAY J. The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. *Seminars in Oncology*. 28: 125-41, 2001.
85. NAKATANI K, THOMPSON DA, BARTHEL A, SAKAUE H, LIU W, WEIGEL RJ, ROTH RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 21528-21532, 1999.
86. BELLACOSA A, DE FEO D, GODWIN AK, BELL DW, CHENG JQ, ALTOMARE DA, WAN M, DUBEAU L, SCAMBIA G, MASCIULLO V, FERRANDINA G, BENEDETTI PANICI P, MANCUSO S, NERI G, TESTA JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, 64: 280-285, 1995.
87. ROMMEL C, CLARKE BA, ZIMMERMANN S, NUÑEZ L, ROSSMAN R, REID K, MOELLING K, YANCOPOULOS GD, GLASS DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286: 1738-1741, 1999.
88. VAZQUEZ F, SELLERS WR. The PTEN tumor suppressor protein: An antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1470: 21-35, 2000.
89. CANTLEY LC, NEEL BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 4240-4245, 1999.
90. GRANVILLE CA, MEMMOTT RM, GILLS JJ, DENNIS PA. Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clinical Cancer Research*, 12: 679-689, 2006.
 91. RAMANA CV, CHATTERJEE-KISHORE M, NGUYEN H, STARK GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, 19: 2619-2627, 2000.
 92. GARCIA R, JOVE R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science*, 5: 79-85, 1998.
 93. CATLETT-FALCONE R, DALTON WS, JOVE R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. *Signal transducer and activator of transcription. Current Opinion in Oncology*, 11: 490-496, 1999.
 94. BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, JOVE R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19: 2474-2488, 2000.
 95. BROMBERG J. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Research*, 2: 86-90, 2000.
 96. VANLIER J, TIEMANN CA, HILBERS PA, VAN RIEL NA. A Bayesian approach to targeted experiment design. *Bioinformatics*, 15: 1136-1142, 2012.
 97. YAMAMOTO T, IKAWA S, AKIYAMA T, SEMBA K, NOMURA N, MIYAJIMA N, SAITO T, TOYOSHIMA K. Similarity of protein encoded by the human *cerbB2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319: 230-234, 1986.
 98. PERREN TJ. *CerbB2* oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 63: 328-332, 1991.
 99. KUREBAYASHI JJ. Biological and clinical significance of HER-2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*, 8: 45-51, 2001.
 100. PICCART M, LOHRISCH C, LEO AD, LARSIMONT D. The predictive value of HER-2 in breast cancer. *Oncology*, 61: 73-82, 2001.
 101. DEAN-COLOMB W, ESTEVA FJ. HER-2 positive breast cancer: Herceptin and beyond. *European Journal of Cancer*, 44: 2806-2812, 2008.
 102. HENSON ES, GIBSON SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cellular Signalling*, 18: 2089-2097, 2006.
 103. BADACHE A, GONÇALVES A. The ErbB2 signalling network as a target for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 11: 13-25, 2006.
 104. WEIGEL MT, DOWSETT M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine Related Cancer*, 17: 245-262, 2010.
 105. ROSAI J. The Breast, In: *Surgical Pathology*, 9th edition, Mosby, Edinburg, page 1787-1827, 2004.
 106. LESTER SC. The Breast, In: *Pathologic Basis of Disease*, 7th edition, Elsevier, Philadelphia, page 1120-1149, 2005.
 107. GRANN VR, TROXEL AB, ZOJWALLA NJ, JACOBSON JS, HERSHMAN D, NEUGUT AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer*, 103: 2241-2251, 2005.
 108. CLARK GM, OSBORNE CK, MCGUIRE WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1: 1102-1109, 1984.

109. HILSENBECK SG, RAVDIN PM, DE MOOR CA, CHAMNESS GC, OSBORNE CK, CLARK GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 52: 227-237, 1998.
110. OSBORNE CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Research and Treatment*, 51: 227-38, 1998.
111. HARRIS JR, MORROW M, NORTON L. Malignant tumours of the breast cancer, In: *Cancer, 5th edition, Principles & Practice of Oncology*, Philadelphia, page 1557-1616, 1997.
112. LACROIX M, TOILLON RA, LECLERCQ G. P53 and breast cancer, an update. *Endocrine Related Cancer*, 13: 293-325, 2006.
113. NORBERG T, JANSSON T, SJØGREN S, MÅRTENSSON C, ANDRÉASSON I, FJÄLLSKOG ML, LINDMAN H, NORDGREN H, LINDGREN A, HOLMBERG L, BERGH J. Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncologica*, 35: 96-102, 1996.
114. LANE DP. P53; guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16, 1992
115. CATTORETTI G, RILKE F, ANDREDA S, MATO LDA, DELIA D. P53 expression in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 41:178-183, 1998.
116. SIRVENT JJ, FORTUNO MAR A, OLONA M, ORTI A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histology and Histopathology*, 16: 99-106, 2001.
117. ALI IU, SCHRIML LM, DEAN M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: A tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 1922-1932, 1999.
118. DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, ROSS JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Modern Pathology*, 14: 672-676, 2001.
119. BOSE S, WANG SI, TERRY MB. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene*, 17: 123-127, 1998.
120. WENG LP, SMITH WM, DAHIA PL, ZIEBOLD U, GIL E, ENG C. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 Arrest followed by cell death. *Cancer Research*, 59: 5808-5814, 1999.
121. FABBRI M, IVAN M, CIMMINO A, NEGRINI M, CALIN GA. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7: 1009-1019, 2007.
122. SOZZI G, VERONESE M, BEGRINI M, BAFFA R, COTTICELLI M, INOUE H, TORNIELLI S, PILOTTI S, DE GREGORI L, PASTORINO , PIEROTTI M, OHTA M, HUEBNER K, CROCE C. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26, 1996.
123. TSENG JE, KEMP BL, KHURI FR, KURIE JM, LEE JS, ZHOU X, LIU D, HONG WK, MAO L. Loss of FHIT is frequent in stage 1 non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Research*, 59: 4798-4803, 1999.
124. MICHAEL D, BEER DG, WILKE CW, MILLER DE, GLOVER TW. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene*, 15: 1653-1659, 1997.
125. CAVALLI LR, SINGH B, ISAACS C, DICKSON RB, HADDAD BR. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/BRCA2 carriers with breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 149: 38-43, 2004.

126. PANDIS N, JIN Y, GORUNOVA L, PETERSSON C, BARDI G, IDVALL I, JOHANSSON B, INGVAR C, MANDAHL N, MITELMAN F. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of 8 karyotypic subgroups. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 12: 173-185, 1995.
127. YURA Y, MANDAI M, KONISHI I, HAMID AA, TSURUTA Y, KUSAKARI T. Loss of Fhit protein expression in high-grade and advanced stage endometrial carcinomas. *Anticancer Research*, 23: 2837-2843, 2003.
128. HUANG LW, CHAO SL, CHEN TJ. Reduced FHIT expression in cervical carcinoma: Correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecologic Oncology*, 90: 331-337, 2003.
129. XU HJ, HU SX, CAGLE PT, MOORE GE, BENEDICT WF. Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research*, 51: 2735-2739, 1991.
130. MALKIN D, LI FP, STRONG LC, FRAUMENI JF JR, NELSON CE, KIM DH, KASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TAINSKY MA, ET AL. Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science*, 250: 1233-1238, 1990.
131. POLYAK K. Breast cancer gene discovery. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4: 1-18, 2002.
132. MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W, ET AL. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266: 66-71, 1994.
133. WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, QUIRK Y, FORD D, COLLINS N, NGUYEN K, SEAL S, TRAN T, AVERILL D, ET AL. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science*, 181: 2088-2090, 1994.
134. DONTU G, EL-ASHRY D, WICHA MS. Breast cancer stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15: 193-197, 2004.
135. PINILLA SM, HONRADO E, HARDISSON D. Caveolin1 expression is associated with a basal like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 99: 85-90, 2006.
136. ALPERT TE, HAFFTY BG. Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Clinical Breast Cancer*, 5: 37-42, 2004.
137. WANG C, HORIUCHI A, IMAI T. Expression of Brca1 protein in benign, borderline and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *Journal of Pathology*, 202: 215-223, 2004.
138. RAFNAR T, BENEDIKTSDOTTIR KR, ELDON BJ. BRCA2, but not BRCA1, mutations account for familial ovarian cancer in Iceland: A population-based study. *European Journal of Cancer*, 40: 2788-2793, 2004.
139. LUX MP, ACKERMANN S, NESTLE-KRÄMLING C, GOECKE TO, NIEDERACHER D, BODDEN-HEIDRICH R, BENDER HG, BECKMANN MW, FASCHING PA. Use of intensified early cancer detection in high-risk patients with familial breast and ovarian cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 14: 399-411, 2005.
140. HONRADO E, BENITEZ J, PALACIOS J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: Genetic testing and therapeutic implications. *Modern Pathology*, 18: 1305-1320, 2005.

141. SILVERBERG SG, DELELLIS RA, FRABLE WJ, LIVOLSI VA, WICK MR. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, volume 1, 4th edition, Elsevier Inc, China, page 1-2656, 2006.
142. AGNARSSON BA, JONASSON JG, BJÖRNSDOTTIR IB, BARKARDOTTIR RB, EGILSSON V, SIGURDSSON H. Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 47: 121-127, 1998.
143. MARCUS JN, WATSON P, PAGE DL, NAROD SA, TONIN P, LENOIR GM, SEROVA O, LYNCH HT. BRCA2 hereditary breast cancer pathophenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, 44: 275-277, 1997.
144. PALACIOS J, HONRADO E, OSORIO A. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 90: 5-14, 2005.
145. WIJNHOFEN BP, MICHAEL MZ, WATSON DI. MicroRNAs and cancer. *The British Journal of Surgery*, 94: 23-30, 2007.
146. SHENOUDA SK, ALAHARI SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Reviews*, 28: 369-378, 2009.
147. LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854, 1993.
148. RUVKUN G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 294: 797-799, 2001.
149. REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901-906, 2000.
150. PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN B, MÜLLER P, SPRING J, SRINIVASAN A, FISHMAN M, FINNERTY J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408: 86-89, 2000.
151. LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858, 2001.
152. KWAK PB, IWASAKI S, TOMARI Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science*, 101: 2309-2315, 2010.
153. LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RÅDMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419, 2003.
154. ESQUELA-KERSCHER A, SLACK FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *National Reviews Cancer*, 6: 259-269, 2006.
155. LUND E, GUTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, KUTAY U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303: 95-98, 2004.
156. ZHANG H, KOLB FA, BRONDANI V, BILLY E, FILIPOWICZ W. Human dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO Journal*, 21: 5875-5885, 2002.

157. BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366, 2001.
158. GREGORY RI, CHENDRIMADA TP, COOCH N, SHIEKHATTAR R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123: 631-640, 2005.
159. IORIO MV, CROCE CM. MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 5848-5856, 2009.
160. DI LEVA G, CALIN GA, CROCE CM. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Research*, 78: 180-189, 2006.
161. FILIPOWICZ W, BHATTACHARYYA SN, SONENBERG N. Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews*, 9: 102-114, 2008.
162. SAUNDERS MA, LIANG H, LI W. Human polymorphism at microRNAs and microRNAs target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3300-3305, 2007.
163. MENDELL JT. MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*, 4: 1179-1184, 2005.
164. SUN W, LI YSJ, HUANG HD, SHYY JYJ, CHIEN S. MicroRNA: A master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12: 1-27, 2010.
165. PILLAI RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11: 1753-1761, 2005.
166. PANG JC, KWOK WK, CHEN Z, NG HK. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathology*, 117: 599-611, 2009.
167. STARK A, BRENNECKE J, BUSHATI N, RUSSELL RB, COHEN SM. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution. *Cell*, 123: 1133-1146, 2005.
168. LEWIS BP, SHIH IH, JONES-RHOADES MW, BARTEL DP, BURGE CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115: 787-798, 2003.
169. BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL RB, COHEN SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLOS Biology*, 3: 85-100, 2005.
170. LEWIS BP, BURGE CB, BARTEL DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120: 15-20, 2005.
171. LIM LP, LAU NC, GARRETT-ENGELE P, GRIMSON A, SCHELTER JM, CASTLE J, BARTEL DP, LINSLEY PS, JOHNSON JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433: 769-773, 2005.
172. CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2999-3004, 2004.
173. IORIO MV, CASALINIA P, TAGLIABUEA E, MENARDA S, CROCE CM. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 44: 2753-2759, 2008.
174. O'DAY E, LAL A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12: 201-211, 2010.

175. JOHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, BYROM M, JARVIS R, CHENG A, LABOURIER E, REINERT KL, BROWN D, SLACK FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635-647, 2005.
176. TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, OSADA H, ENDOH H, HARANO T, YATABE Y, NAGINO M, NIMURA Y, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 64: 3753-3756, 2004.
177. TAM W, BEN-YEHUDA D, HAYWARD WS. Bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 1490-1502, 1997.
178. KLUIVER J, POPPEMA S, DE JONG D, BLOKZIJL T, HARMS G, JACOBS S, KROESEN BJ, VAN DEN BERG A. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of Pathology*, 207: 243-249, 2005.
179. LEE YS, DUTTA A. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4: 199-227, 2009.
180. YANAIHARA N, CAPLEN N, BOWMAN E, SEIKE M, KUMAMOTO K, YI M, STEPHENS RM, OKAMOTO A, YOKOTA J, TANAKA T, CALIN GA, LIU CG, CROCE CM, HARRIS CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9: 189-198, 2006.
181. MURAKAMI Y, YASUDA T, SAIGO K, URASHIMA T, TOYODA H, OKANOUE T, SHIMOTOHNO K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 25: 2537-2545, 2006.
182. ROLDO C, MISSIAGLIA E, HAGAN JP, FALCONI M, CAPELLI P, BERSANI S, CALIN GA, VOLINIA S, LIU CG, SCARPA A, CROCE CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 4677-4684, 2006.
183. LEE EJ, GUSEV Y, JIANG J, NUOVO GJ, LERNER MR, FRANKEL WL, MORGAN DL, POSTIER RG, BRACKETT DJ, SCHMITTGEN TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 120: 1046-1054, 2007.
184. KRICHEVSKY AM, SONNTAG KC, ISACSON O, KOSIK KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, 24: 857-864, 2006.
185. MENG F, HENSON R, LANG M, WEHBE H, MAHESHWARI S, MENDELL JT, JIANG J, SCHMITTGEN TD, PATEL T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*, 130: 2113-2129, 2006.
186. BANDRÉS E, CUBEDO E, AGIRRE X, MALUMBRES R, ZÁRATE R, RAMIREZ N, ABAJO A, NAVARRO A, MORENO I, MONZÓ M, GARCÍA-FONCILLAS J. Identification by realtime PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer*, 5: 29-39, 2006.
187. GARZON R, PICHIORRI F, PALUMBO T, VISENTINI M, AQEILAN R, CIMMINO A, WANG H, SUN H, VOLINIA S, ALDER H, CALIN GA, LIU CG, ANDREEFF M, CROCE CM. MicroRNA gene expression during retinoic acid-

- induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 26: 4148-4157, 2007.
188. COCHRANE DR, HOWE EN, SPOELSTRA NS, RICHER JK. Loss of miR-200c: A marker of aggressiveness and chemoresistance in female reproductive cancers. *Journal of Oncology*, 10: 82-94, 2010
 189. ZHOU M, LIU Z, ZHAO Y, DING Y, LIU H, XI Y, XIONG W, LI G, LU J, FODSTAD O, RIKER AI, TAN M. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 21496-21507, 2010.
 190. RODRIGUEZ-GONZÁLEZ FG, SIEUWERTS AM, SMID M, LOOK MP, MEIJER-VAN GELDER ME, DE WEERD V, SLEIJFER S, MARTENS JW, FOEKENS JA. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127: 43-51, 2011.
 191. MILLER TE, GHOSHAL K, RAMASWAMY B, ROY S, DATTA J, SHAPIRO CL, JACOB S, MAJUMDER S. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 29897-29903, 2008.
 192. VERGHESE ET, HANBY AM, SPEIRS V, HUGHES TA. Small is beautiful: MicroRNAs and breast cancer-where are we now? *The Journal of Pathology*, 215: 214-221, 2008.
 193. SELCUKLU SD, YAKİCİER MC, ERSON AE. An investigation of microRNAs mapping to breast cancer related genomic gain and loss regions. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 189: 15-23, 2009.
 194. SHEN J, AMBROSONE CB, ZHAO H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *International Journal of Cancer*, 124: 1178-1182, 2009.
 195. GEORGES M, COPPIETERS W, CHARLIER C. Polymorphic miRNA mediated gen regulation: Contribution to phenotypic variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17: 166 -176, 2007.
 196. NANA-SINKAM SP, CROCE CM. MicroRNAs as therapeutic targets in cancer. *Translational Research*, 157: 216-225, 2011.
 197. MICHAEL MZ, O' CONNOR SM, VAN HOLST PELLEKAAN NG, YOUNG GP, JAMES RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 1: 882-891, 2003.
 198. LEHMANN U, HASEMEIER B, RÖMERMANN D, MÜLLER M, LÄNGER F, KREIPE H. Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 91: 214-220, 2007.
 199. CROCE CM, CALIN GA. MicroRNAs, cancer and stem cell division. *Cell*, 122: 5-7, 2005.
 200. FINDLAY VJ. MicroRNAs and breast cancer. *The Open Cancer Journal*, 3: 55-61, 2010.
 201. MCMANUS MT. MicroRNAs and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 13: 253-258, 2003.
 202. LÖFFLER D, BROCKE-HEIDRICH K, PFEIFER G, STOCSITS C, HACKERMÜLLER J, KRETZSCHMAR AK, BURGER R, GRAMATZKI M, BLUMERT C, BAUER K, CVIJIC H, ULLMANN AK, STADLER PF, HORN F. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-

- mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 110: 1330-1333, 2007.
203. MENG F, HENSON R, WEHBE-JANEK H, GHOSHAL K, JACOB ST, PATEL T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133: 647-658, 2007.
 204. FRANKEL LB, CHRISTOFFERSEN NR, JACOBSEN A, LINDOW M, KROGH A, LUND AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 1026-1033, 2008.
 205. CALIN GA, FERRACIN M, CIMMINO A, DI LEVA G, SHIMIZU M, WOJCIK SE, IORIO MV, VISIONE R, SEVER NI, FABBRI M, IULIANO R, PALUMBO T, PICHIORRI F, ROLDO C, GARZON R, SEVIGNANI C, RASSENTI L, ALDER H, VOLINIA S, LIU CG, KIPPS TJ, NEGRINI M, CROCE CM. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 353: 1793-801, 2005.
 206. GARZON R, VOLINIA S, LIU CG, FERNANDEZ-CYMERING C, PALUMBO T, PICHIORRI F, FABBRI M, COOMBES K, ALDER H, NAKAMURA T, FLOMENBERG N, MARCUCCI G, CALIN GA, KORNBLAU SM, KANTARJIAN H, BLOOMFIELD CD, ANDREEFF M, CROCE CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111: 3183-3189, 2008.
 207. CIAFRÈ SA, GALARDI S, MANGIOLA A, FERRACIN M, LIU CG, SABATINO G, NEGRINI M, MAIRA G, CROCE CM, FARACE MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334: 1351-1358, 2005.
 208. MENG F, HENSON R, WEHBE-JANEK H, GHOSHAL K, JACOB ST, PATEL T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133: 647-658, 2007.
 209. KONG W, HE L, COPPOLA M, GUO J, ESPOSITO NN, COPPOLA D, CHENG JQ. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 17869-17879, 2010.
 210. CHEN J, WANG BC, TANG JH. Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 106: 260-266, 2012.
 211. LIN PY, YU SL, YANG PC. MicroRNA in lung cancer. *British Journal of Cancer*, 103: 1144-1148, 2010.
 212. FABBRI M, CROCE CM, CALIN GA. MicroRNAs. *Cancer Journal*, 14: 1-6, 2008.
 213. EIS PS, TAM W, SUN L, CHADBURN A, LI Z, GOMEZ MF, LUND E, DAHLBERG JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3627-3632, 2005.
 214. RADOJICIC J, ZARAVINOS A, VREKOUSSIS T, KAFOUSI M, SPANDIDOS DA, STATHOPOULOS EN. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and HER-2/Neu) breast cancer. *Cell Cycle*, 10: 507-517, 2011.
 215. LE QUESNE J, CALDAS C. MicroRNAs and breast cancer. *Molecular Oncology*, 4: 230-241, 2011.
 216. SHAH MY, CALIN GA. MicroRNAs miR-221 and miR-222: A new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Medicine*, 3: 56-60, 2011.

217. STINSON S, LACKNER MR, ADAI AT, YU N, KIM HJ, O'BRIEN C, SPOERKE J, JHUNJHUNWALA S, BOYD Z, JANUARIO T, NEWMAN RJ, YUE P, BOURGON R, MODRUSAN Z, STERN HM, WARMING S, DE SAUVAGE FJ, AMLER L, YEH RF, DORNAN D. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Science Signaling*, 4: 41-46, 2011.
218. ZHAO JJ, LIN J, YANG H, KONG W, HE L, MA X, COPPOLA D, CHENG JQ. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 31079-31086, 2008.
219. NEGRINI M, CALIN GA. Breast cancer metastasis: A microRNA story. *Breast Cancer Research*, 10: 203-207, 2008.
220. TAVAZOIE SF, ALARCON C, OSKARSSON T, PADUA D, WANG Q, BOS PD, GERALD WL, MASSAGUE J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451: 147-152, 2008.
221. SHI M, LIU D, DUAN H, SHEN B, GUO N. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 29: 785-799, 2010.
222. HEYN H, ENGELMANN M, SCHREEK S, AHRENS P, LEHMANN U, KREIPE H, SCHLEGELBERGER B, BEGER C. MicroRNA miR-335 is crucial for the BRCA1 regulatory cascade in breast cancer development. *International Journal of Cancer*, 129: 2797-806, 2011.
223. VALASTYAN S, WEINBERG RA. MicroRNA-31: A crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle*, 9: 2124-2129, 2010.
224. VALASTYAN S, REINHARDT F, BENAICH N, CALOGRIAS D, SZÁSZ AM, WANG ZC, BROCK JE, RICHARDSON AL, WEINBERG RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*, 137: 1032-1046, 2009.
225. IORIO MV, CASALINI P, PIOVAN C, DI LEVA G, MERLO A, TRIULZI T, MÉNARD S, CROCE CM, TAGLIABUE E. MicroRNA-205 regulates HER-3 in human breast cancer. *Cancer Research*, 69: 2195-2200, 2009.
226. ADACHI R, HORIUCHI S, SAKURAZAWA Y, HASEGAWA T, SATO K, SAKAMAKI T. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411: 804-808, 2011.
227. KONDO N, TOYAMA T, SUGIURA H, FUJII Y, YAMASHITA H. MicroRNA-206 expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Research*, 68: 5004-5008, 2008.
228. IYEVLEVA AG, KULIGINA ESH, MITIUSHKINA NV, TOGO AV, MIKI Y, IMYANITOV EN. High level of miR-21, miR-10b and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131: 1049-1059, 2012.
229. JURMEISTER S, BAUMANN M, BALWIERZ A, KEKLİKOGLU I, WARD A, UHLMANN S, ZHANG JD, WIEMANN S, SAHIN Ö. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Molecular and Cellular Biology*, 32: 633-651, 2012.
230. KUMAR V, COTRAN RS, STANLEY L. *Basic Pathology*, 7th edition, WB Saunders Company, Philadelphia, page 191-193, 2003.
231. KIM SJ, SHIN JY, LEE KD, BAE YK, SUNG KW, NAM SJ, CHUN KH. MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through

- downregulation of C-C chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Research*, 1: 14-28, 2012.
232. SEMPERE LF, CHRISTENSEN M, SİLAHTAROGLU A, BAK M, HEATH CV, SCHWARTZ G, WELLS W, KAUPPINEN S, COLE CN. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Research*, 67: 11612-11620, 2007.
233. HAFEZ MM, HASSAN ZK, ZEKRI AR, GABER AA, AL REJAIE SS, SAYED-AHMED MM, AL SHABANAH O. MicroRNAs and metastasis-related gene expression in Egyptian breast cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 591-598, 2012.
234. RAJABI H, JIN C, AHMAD R, MCCLARY AC, JOSHI MD, KUFÉ D. Mucin 1 oncoprotein expression is suppressed by the miR-125b oncomir. *Genes& Cancer*, 1: 62-68, 2010.
235. TRIHIA H, MURRAY S, PRICE K, GELBER RD, GOLOUH R, GOLDBIRSCHE A, COATES AS, COLLINS J, CASTIGLIONE-GERTSCH M, GUSTERSON BA. Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters and other prognostic factors-a surrogate marker? *Cancer*, 97: 1321-1331, 2003.
236. DE AZAMBUJA E, CARDOSO F, DE CASTRO G JR, COLOZZA M, MANO MS, DURBECQ V, SOTIRIOU C, LARSIMONT D, PICCART-GEBHART MJ, PAESMANS M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *British Journal of Cancer*, 96: 1504-1513, 2007.

7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm; emek, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan çok değerli hocam, danışmanım Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e, eğitimime katkı sağlayan, yakın ilgi ve sabırlarını benden esirgemeyerek; bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran, değerli hocam Prof. Dr. Berrin TUNCA' ya, eğitime ve bilime önem veren, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman sevgi ve saygı ile anacağım değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ' ye ve ayrıca Uludağ Üniversitesi'nde öğrencilik yaşamım boyunca bana emeği geçen değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bilgisi, karakteri ve yardımseverliği ile bana çok şey öğrettiğine inandığım, karşılaştığım her türlü sorunda benden yardımını esirgemeyen ve tez çalışmamda büyük emeği geçen, her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi çok değerli hocam Prof. Dr. Şehsuvar GÖKGÖZ' e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum, zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, bir çok sıkıntılı andan hoşluklar yaratmaya çalıştığımız; destek ve dostluklarını her zaman minnetle anacağım çok değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Grv. Gülçin TEZCAN' a, yüksek lisans öğrencileri Seçil AK' a ve Elif DEMİRDÖĞEN' e ve ayrıca desteklerini hissettiğim tüm arkadaşlarıma, tezimin kaynaklar kısmında yer alan tüm araştırmacı ve yazarlara teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birbirimize karşı saygı, sevgi ve yardımlarımızı hiçbir zaman esirgemediğimiz, bana verdikleri destek ve dostluklarını minnetle anacağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nın tüm personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işleri şefi Emine ÖZGÜRGEN' e ve tüm personele teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde destekçilerim olan, beni yetiştirip maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen, hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılı Bursa doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Altıparmak F.A. İlköğretim Okulu' nda tamamladım. Bursa Atatürk Anadolu Lisesi' nden 2000 yılında mezun oldum. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim ve 2005 yılında mezun oldum. Bir süre dışarıda çalıştıktan sonra 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitimime halen devam etmekteyim.