

**MEME EPİTELİ VE MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
CAYTAXIN PROTEİN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

Sakine YILMAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ-2015

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME EPİTELİ VE MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE CAYTAXIN PROTEİN
EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

Sakine YILMAZ

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013-209 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA
2015**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Sakine YILMAZ**'ın "**Meme Epiteli ve Meme Kanseri Hücrelerinde Caytaxin Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

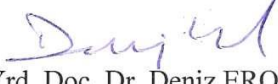
Tez Savunma Tarihi: 09/06/2015



Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye



Yrd. Doç. Dr. Deniz EROL
Fırat Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2015 tarih ve 2015/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri Tarihçesi	3
2.2.1.Etyoloji	4
2.2.1.1.Genetik Nedenler	4
2.2.1.2.Reprodüktif Nedenler	5
2.2.1.3.Çevresel Nedenler	5
2.2.1.4.Hormonal Nedenler	6
2.2.2.Risk Faktörleri	6
2.2.3.Prognostik Faktörler	6
2.2.4.Histopatolojik Sınıflama	7
2.2.4.1. Duktal Karsinoma <i>In Situ</i> (DCIS)	9
2.2.4.2. Lobuler Karsinoma <i>In situ</i> (LCIS)	9
2.2.4.4. İnvaziv Lobuler Karsinom (ILC)	9
2.2.5. Meme Kanserinde TNM Sınıflandırması	10
2.2.7. Tedavi	12
2.2.7.1. Cerrahi Tedavi Yöntemleri	12
2.2.7.1.1. Mastektomiler	12
2.2.7.1.1.1. Radikal Mastektomi	12
2.2.7.1.1.2. Modifiye Radikal Mastektomi (MRM)	12
2.2.7.1.1.3. Total Mastektomi	13
2.2.7.1.2. Meme Koruyucu Cerrahi	13
2.2.7.2. Radyoterapi	13
2.2.7.3. Kemoterapi	13

2.2.7.4. Endokrin Tedavi	15
2.2.7.5. Biyolojik Tedavi	15
2.3. Caytaksin Proteini	16
2.3.1. Cayman Ataksi	16
2.3.2. <i>ATCAY/Atcay</i> Geni	17
2.3.3. Caytaxin Proteini	17
2.3.4. Caytaxin ile Etkileşime Giren Proteinler	19
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	22
3.3. Kullanılan Çözeltiler	23
3.3.1. Lizis Solüsyonu	23
3.3.2. 10X Yürütme Tamponu	24
3.3.3. 10X TBS (Tris-Buffer-Salin)	24
3.3.4. 6X Yükleme Solüsyonu	24
3.3.5. 1X Yürütme Tamponu	24
3.3.6. Transfer Solüsyonu	25
3.3.7. TBS/Tween-20	25
3.3.8. % 30 Akrilamid Stok Jelin Hazırlanması	25
3.4. Çalışmanın Basamakları	25
4. BULGULAR	30
4.1. Kültürü yapılan hücrelerin canlılık ve doluluk oranı	30
4.2. İlk Hücre Kültürü Sonrası Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi	31
4.3. Hücre Hatlarında Caytaxin Ekspresyonunun Belirlenmesi	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
EKLER	49
EK 1: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge	49
ÖZGEÇMİŞ	50

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gűsteren Sayın Hocam Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye,

Yűksek Lisans eğitimim ve tez çalıőmam sırasında yardımını esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Yılmaz İGREMİŐ'e,

Yűksek lisans eđitimimde katkıları bulunan tűm hocalarıma,

Hayatım boyunca aldığım her kararda beni destekledikleri için aileme, tez sűrecinde destek ve ilgilerinden dolayı arkadaşlarım Berna ŐZYAZGAN ve Ayten KILINLI'ya,

Tezimi destekleyen İnűnű Őniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Birimi'ne teŐekkűr ederim.

ÖZET

MEME EPİTELİ VE MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE CAYTAXIN PROTEİN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Amaç: Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en yaygın kanser türüdür. Kompleks heterojen karakterde olan meme kanserinin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Caytaxin proteini, insanda 19. Kromozom üzerinde yer alan *ATCAY* geni tarafından şifrelenmekte ve 13 ekzondan oluşmaktadır. Caytaxin proteinine yönelik yapılan çalışmalarla bu proteinin beyinde korteks, serebellum ve olfaktor bölgelerde yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiştir. Yapısında yüksek oranda korunmuş bir BCH domaini bulundurmaktadır. Fonksiyonlarının bu BCH domaini aracılığı ile gösterdiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Literatürde Caytaxin proteininin meme kanser hücre veya dokularındaki ekspresyon ve ya fonksiyonunu inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu tezde, ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresinde ve meme kanseri hücrelerinde caytaxin ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF10A ölümsüzleştirilmiş meme epiteli kullanıldı. Total protein miktarları Lowry yöntemi ile protein ekspresyonlarının varlığı Western Blot yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Caytaxin'in üç hücre hattında da eksprese olduğu ancak ekspresyon düzeylerinin birbirinden farklı olduğu görüldü. MCF7 hücre hattında MCF10A'ya göre 1.925 kat ($p<0.05$) fazla olduğu, MDA-MB-231 hücre hattında ise 0.632 kat ($p<0.0001$) az olduğu belirlendi.

Sonuç: Caytaxin ekspresyonunun nöral hücrelerle sınırlı olduğu bilgisinin aksine ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresinde ve farklı karakterdeki meme kanseri hücrelerinde değişken miktarlarda eksprese olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Caytaxin, Meme Kanseri, Protein Ekspresyonu

ABSTRACT

DETERMINATION OF CAYTAXIN PROTEIN EKSPRESSION IN BREAST EPITHELIUM AND BREAST CANCER CELLS

Aim: Breast cancer is the most common cancer type among women across the world. The pathogenesis of breast cancer is not well-known because of its complex heterogeneity. Caytaxin protein is encoded by ATCAY gene located on chromosome 19 in human. Many studies showed that Caytaxin is highly expressed in cortex, cerebellum and olfactory regions of human brain. In terms of structure it contains a conserved BCH domain. It is suggested that BCH domain is the functional unit of caytaxin. To the best of our knowledge there is no published data on the expression and roles of Caytaxin in breast cancer in the literature. In this study the expression of Caytaxin is aimed to be determined in immortalized breast epithelium cell and breast cancer cell lines.

Material and Methods: In this study, we examined MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and MCF10A, immortalized epithelium cell line. The total amount of protein was determined by Lowry method and Western Blot method was used to show the expression profile of Caytaxin protein.

Results: The caytaxin expression was detected in all three cell lines. The expression of caytaxin levels were 1.925 fold higher ($p < 0.05$) in MCF7 cells but 0.632 fold lower ($p < 0.0001$) in MDA-MB-231 cells

Conclusion: Our data suggest that Caytaxin is not only expressed in neural cell, but also differentially expressed that in immortalized breast epithelium and breast cancer cell lines

Key words: Caytaxin, Breast Cancer, Protein Expression

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCAY	: Cayman Tip serebellar ataksi
BCH	: BNIP-2 ve Cdc42GAP homoloji domaini
BNIP-2	: BCL2/adenovirus E1B 19kDa etkileşim proteini-2 (insan)
BNIP-H	: Caytaxin Proteini
BRCA1	: Erken Başlangıçlı Meme Kanseri 1 geni
BRCA2	: Erken Başlangıçlı Meme Kanseri 2 geni
CHEK2	: Kontrol noktası kinaz 2
CHIP	: E3 ubiquitin –protein ligaz CHIP
DCIS	: Duktak karsinoma <i>in situ</i>
ER	: Östrojen reseptörü
GST	: Glutatyon S-Transferaz
HBOC	: Kalıtsal Meme ve Yumurtalık Kanseri
HER2	: İnsan erb-b2 tirozin kinaz reseptörü 2
IDC	: İnvaziv duktal karsinoma
ILC	: İnvaziv lobular karsinoma
KGA	: Böbrek tipi glutaminaz
KLC	: Kinezin hafif zinciri
LCIS	: Lobular karsinoma <i>in situ</i>
MCF10A	: Ölümsüzleştirilmiş normal meme epiteli hücre hattı
MCF7	: ER+/PR+ Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	: ER-/PR- Meme kanseri hücre hattı
MLK3	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz (İnsan)
MRM	: Modifiye Radikal Mastektomi
MRM	: Modifiye Radikal mastektomi
O.D	: Otozomal Dominant
PAG	: Fosfatla aktive olan glutaminaz
Pin1	: Peptidil-prolil cis/trans-izomeraz
PR	: Progesteron reseptörü
TNM	: Tümör, Lenf Nodu, Metastaz
TP53	: Tümör protein p53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. 371 aminoasit uzunluğundaki caytaxin proteinin yapısında yer alan BCH domaini ve diğer proteinler ile etkileştiği bölgeler	21
Şekil 4.1. % 70 doluluk oranında lizis'i yapılan hücrelerin morfolojileri	30
Şekil 4.2. Lizatların spektrofotometrede ölçüm sonuçlarını değerlendirmek için hazırlanan 12.5, 10, 7.5, 5 ve 0 µg/µl'lik BSA standardının ölçüm eğrisi	31
Şekil 4.3. Lizatların spektrofotometre de ölçüm sonuçlarını değerlendirmek için 50, 25, 12.5 ve 6.25µg/µl olarak hazırlanan BSA standardının ölçüm eğrisi	32
Şekil 4.4.Caytaxin ölümsüzleştirilmiş meme epitel ve meme kanseri hücre hatlarında eksprese edilmektedir.	33

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Meme kanseri ve meme kanseri ile ilişkili kalıtsal genler	4
Tablo 2.2. İnvaziv meme kanserinde prognostik ve tahmin edilen faktörler	7
Tablo 2.3. AJCC Meme Kanseri için Primer Tümör (T) Sınıflandırması	10
Tablo 2.4. AJCC Meme Kanseri için Klinik Bölgesel Lenf Nodu (N) Sınıflaması	11
Tablo 2.5. Meme kanseri için AJCC evre gruplarına ve Histopatolojik grade dayalı sınıflama sistemi	11
Tablo 2.6. Metastatik meme kanseri için kullanılan ajanlar	14
Tablo 2.7. <i>ATCAY</i> (ENSG00000167654) genine ait transkriptler	18
Tablo 3.4. Lizatların ölçümü ve içerik oranları.....	28
Tablo 4.1. Spektrofotometrede ölçümü yapılan hücre lizatlarının absorbans değerleri.....	32

1. GİRİŞ

Meme Kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Meme kanseri kadınlar arasında bütün kanser vakalarının % 23'ünü ve kanser nedeniyle ölümlerin % 14'ünü oluşturmaktadır (1).

Meme kanseri, 20'li yaşlarda olan kadınlarda nadir görülmektedir. Bununla birlikte görülme sıklığı menopoz ile hızlı bir artış sergilemektedir. Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü bir etkileşim gösteren kompleks multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanseri için en önemli risk faktörü ailesel yatkınlığa neden olan genler (BRCA1 ve BRCA2) olarak bilinse de çoğu vakada nedenlerin çoğu tam anlamıyla bilinmemektedir (2). Özellikle de genlerin fonksiyonları, meme kanseri ile ilişkili mutasyonların prevalansı ve kalıtsal genetik faktörlerin sayısı tam olarak bilinmemektedir.

Kompleks heterojen karakterde olan meme kanserinin bugüne kadar tanımlanmış 30'dan fazla histopatolojik alt tipi bulunmaktadır. Ayrıca Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (HER2) ekspresyon durumuna göre tanımlanmış moleküler alt tipleri tanımlanmıştır (3). Meme kanseri farklı klinik seyirler gösterebilen bir hastalıktır. Bu nedenle hastalığın seyri ve uygulanacak tedavinin belirlenmesi açısından belirli prognostik belirleyiciler kullanılsa da mevcut belirleyiciler yeterli gelmemekte ve hastalığın prognozu açısından yeni tahmini yaklaşımlara ve prognostik faktörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Eskiden bütün meme kanseri tipleri için uygulanan cerrahi tedavi yöntemi Radikal Mastektomi iken hastalıkla ilgili artan bilgiler ve görüntüleme teknikleri yardımıyla tümörün lokalizasyonu, büyüklüğü ve invazyonuna göre meme koruyucu yeni cerrahi teknikler uygulanmaktadır. Kemoterapi ise, 1970'lerden önce tek ajan kullanımı ile başlamış ve ardından çeşitli kombinasyonlarda kullanımına devam edilmiştir. 1898'de radyumun keşfedilmesi ile radyoterapi kanserde tedavi amacıyla kullanılmıştır. Cerrahi operasyon öncesi operasyona kolaylık olması bakımında tümör boyutunun küçültülmesinde ya da cerrahi sonrasında belirlenemeyen tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Meme kanserinin ilerlemesinde östrojen hormonunun aşırı sentezlenmesinin etkili olduğu belirlenmiştir (4). Östrojenin kanser hücreleri üzerindeki etkisini azaltmak için anti-östrojenler ve aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır (5). Bu

uygulamaların dışında östrojenin etkisini tamamen ortadan kaldırmak için yumurtalığın cerrahi ile alınması gibi uygulamalar yapılmaktadır (6). Meme kanserinin kompleks heterojenitesi göz önüne alındığında belirlenen biyolojik özelliklerine bağlı olarak da moleküler hedefli tedaviler uygulanmaktadır (7). Uygulanan yöntemler artmasına rağmen ilaçlara karşı direnç ve ileri evre metastatik kanserler hala büyük bir sorun olarak önümüzde durmaktadır. Bu sorunu aşmak için yeni ilaçlara veya var olan cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormon terapileri ile kombine edilerek kullanılacak yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Bu hedefi gerçekleştirmek için öncelikle kanserin oluşumunu tetikleyen veya başlatan mekanizmaların tam olarak çözülmesi gerekmektedir.

Caytaxin proteini, insanlarda *ATCAY* isimli, 13 ekzonu bulunan bir gen tarafından kodlanır (8). Mutasyonu sonucu Cayman ataksisi isimli bir ataksi sendromuna neden olduğu için *ATCAY* gen ürününün adı Caytaxin olarak belirlenmiştir. Cayman ataksisi, Grand Cayman adalarında görülen otozomal resesif bir hastalıktır (9). İnsanlarda hipotoni, mental fonksiyon bozukluğu, serebellar ataksi, farede de gergin, tereddütlü, güvensiz ve distonik görünüm ile karakterizedir (10). Caytaxin proteini insanda 371 aminoasit uzunluğunda farede 372 aminoasit uzunluğunda ve insan ile % 91 dizi benzerliğindedir. İlk çalışmalarda farelerin sinir sisteminde lokalize olduğu saptanmıştır (11). Sonraki çalışmalarda ise özellikle beyinde korteks, serebellum ve olfaktor bölgelerde yüksek oranda ekspresse olduğu saptanmıştır (9).

Bu güne kadar caytaxin proteini ile kanser gelişimi arasında bir ilişkinin var olup olmadığına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada MDA-MB-231, MCF7 ve ölümsüzleştirilmiş normal meme epiteli MCF10A hücreleri kullanılarak caytaxin varlığının ve ekspresyonunun normal ve kanserli hücrelerde nasıl değiştiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme kanseri ile ilgili bilinen ilk yazılı kayıtlar M.Ö. 3000 yıllarına ait olan ve Edwin Smith tarafından 1862’de Mısır’da bulunup okunan papirüslerde kayıtlıdır. 48 vakanın anlatıldığı bu papirüslerde kitle oluşturan ve memeyi göğüs duvarının içine alan soğuk bir lezyondan bahsedilmektedir (12).

M.Ö. 460-160 periyodunda Eski Yunan’da 300 yıl boyunca Hipokrat’ın “bedenin 4 maddeden oluştuğu” hipotezi etkili olmuştur. Hastalığın bu maddeler arasındaki dengenin bozulmasıyla oluştuğunu söylemiş ve uzun bir süre boyunca Batı Tıbbını etkileyerek Galen’in teorilerinin de temelini oluşturmuştur. Hipokrat meme kanserli bir hastayı tanımlayarak menopoz ile kanser arasındaki ilişkiyi ilk kez tanımlamıştır (12).

M.S. 100. yıllarda tarihte ilk kez Leonides sağlam meme dokusu ile birlikte tümörlü dokuyu mastektomi ve aksillar küraj ile çıkararak hastalığı tedavi etmiştir. Ebu Kasım (10.yy), Mondeville (13.yy) ve Lanfranc, Leonides’in tekniğini geliştirmişlerdir (13).

Halsted 19. yy’ın sonlarında; meme kanserinin lokal bir hastalık olduğunu ve lenf sistemi ile aksillaya yayıldığını ve bölgesel lenf ganglionlarının çıkarılmasının tedavi için yeterli olacağını söylemiştir. Ardından gerçekleştirdiği ilk radikal mastektomi sonrası meme cerrahisi operasyonları tüm dünyada uygulanmaya başlanmıştır. Ancak meme kanserinin lokal değil de sistemik bir hastalık olduğunun belirlenmesi ile radikal mastektomi değişikliklere uğramıştır (14).

20. yy’ın başlarında, meme kanserinin tanısı ve tedavisi konusunda iki büyük keşif yapılmıştır. Bunlardan ilki X ışınları ve radyumun, ikincisi de over hormonları ile meme kanseri arasındaki ilişkinin keşfedilmesidir. C. Roentgen 1895’de X ışınlarının dokuya penetre olduğunu ve kanser hücrelerini öldürdüğünü belirlemiştir. 1898’de radyumun keşfinden sonra iyonize radyasyonla meme kanserinin tedavisine başlanmıştır. A. Schinzinger 1899’da ooforektominin tümörü küçülttüğünü ve ilerlemesini yavaşlattığını belirlemiş ve ardından mastektomiye ooforektomi ilave edilmiştir. H. Starling’in 1905’de hormonları tanımlamasının ardından östrojenin

yapımını veya etkilerini azaltan veya yok eden östrojen reseptör modülatörleri ve aromataz inhibitörleri kullanılmaya başlanmıştır (13, 15).

2.2.1.Etyoloji

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan heterojen özellikler gösteren bir hastalıktır. Meme kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir ancak hem epidemiyolojik çalışmalar hem de deney hayvanları ve *in vitro* meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalar meme kanserinin gelişiminde genetik, reproduktif, çevresel ve endokrin faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir (16).

2.2.1.1.Genetik Nedenler

Bütün meme kanseri vakalarının % 5-10'unu kalıtsal nedenli meme kanserleri oluşturmaktadır. Erken başlangıçlı meme ve over kanserlerinin her ikisi için yüksek riskli ailelerin bir kısmından BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar sorumludur (17). Aile öyküsünde meme kanseri olan kişilerde erken yaşta meme kanseri görülme ihtimali artmaktadır (18).

Tablo 2.1. Meme kanseri ve meme kanseri ile ilişkili kalıtsal genler (19).

Gen	Kromozom	Sendrom	Kanser Riski	Kalıtım	Referans
BRCA1	17q21	HBOC	Meme: % 50-90	O.D	(Ford ve ark., 1998)
BRCA2	13q12	HBOC	Meme: % 41-87	O.D	(Ford ve ark., 1998)
CHEK2	22q12	Kalıtsal Meme	Meme: 2-3 kat	O.D.	(Thompson ve ark.,2006)
PTEN	10q23	Cowden	Meme: % 25-50	O.D.	(Black ve ark., 2005)
TP53	17p13	Li-Fraumeni	Meme:30'luyaslarda> % 50	O.D.	(Birch ve ark.,2001)
ATM	11q22-23	Ataksi telangiektasi	Meme: % 17	O.R.	(Thompson ve ark.,2005)

Kalıtsal meme kanserleri, meme kanseri riski üzerinde kurucu etkiye sahip BRCA1, BRCA2 ve TP53 gibi yüksek geçiş özelliğine sahip genlerdeki bir mutasyon varlığının göstergesidir (20, 21). BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki kalıtsal mutasyonlar her etnik ve ırkta bulunmaktadır. Yaklaşık her 500 kişiden 1'i bu genler bakımından taşıyıcıdır. Fakat Aşkenazi Yahudilerinde bu taşıyıcılık oranı 40 kişide 1 olarak belirlenmiştir (22).

2.2.1.2.Reprodüktif Nedenler

Menarş yaşı, ilk doğum yaşı, ilk doğum ile menarş yaşı arasındaki zaman, çocuk sayısı, oral kontraseptif kullanımı ve emzirme gibi reprodüktif yaşam boyunca hormonlara kümülatif maruziyet yaşam süresini etkileyen faktörlerdir (23-25). Yapılan bir çalışmaya göre tümörün reseptör durumu ile ilk hamilelik yaşı arasında ilişki olduğu, geciken ilk doğum yaşının ER+ ve PR+ tümörlerde riski arttırdığı, ER- ve PR- tümörlerde ilk hamilelik yaşı ile tümör riskinin bağlantılı olmadığı belirtilmiştir. İlk hamilelik yaşı ile menarş arasındaki sürenin hem ER-PR- hem de ER+PR+ tümörlerde aynı oranda risk oluşturduğu belirlenmiştir. Emzirme ve oral kontraseptif kullanımının hormon reseptör durumu ile ilgili olmadığı belirlenmiştir (26). Yedi ve daha fazla çocuk sayısının meme kanseri riskini % 39 oranında azalttığı belirlenmiştir. Geç menapozun ve benign meme hastalığı geçirilmiş olması meme kanseri için riski arttırdığı belirlenmiştir (27).

2.2.1.3. Çevresel Nedenler

Alkol tüketimi ile ilgili yapılan birkaç çalışmada alkol tüketim süresi ve miktarının artan meme kanseri riski ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir (28, 29). Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kullanılan alkolün Japonlarda riski arttırdığı Çinli ve Filipinli Amerikalılarda ise Japonlara göre daha az bir risk oluşturduğu belirlenmiştir (30). Yapılan bu çalışmayla alkolün her populasyon için aynı oranda risk oluşturmadığı belirlenmiştir. Ayrıca alkol kullanımının total östrojen seviyesini arttırdığı, bunun da meme kanseri riskini arttırdığı belirlenmiştir (28, 31). Bunun dışında beslenme şeklinin de meme kanseri riskini arttırdığı düşünülebilir. Bu beslenme faktörlerinin bazıları aşırı pişmiş et (32) ve aşırı yağlı beslenmeyi (33) içermektedir. Ancak buradaki faktörlerin

meme kanseri için artan bir risk oluşturması tartışmalıdır. Bitkisel temelli beslenmenin özellikle ER-/PR- tümörler için meme kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir (34). Ayrıca artan vücut ağırlığının riski arttırdığı belirlenmiştir (35).

2.2.1.4.Hormonal Nedenler

Östrojen ve progesteron reseptörleri, genlerle kontrol edilen dimerik yapıda proteinlerdir. Östrojenin reproduktif ve diğer dokularda büyüme, farklılaşma yönünde etkileri vardır. Östrojenin, meme epitel hücrelerinin büyümesini, farklılaşmasını ve yaşam sürelerini etkiler. Her iki steroid hormonun primer dönemlerinin puperte ile menapoz arasındaki dönem olduğu düşünülse de post menopozal dönemdeki adrenal kaynaklı androjenlerin lokal aromatisasyonla östrojen kaynağı oluşturması yaşamın her döneminde etkin olmalarını sağlar (15, 36). Östrojenin karsinojenik sürece katkıda bulunma mekanizması komplekstir, ancak östrojenin hem normal meme hücrelerine hem de malign meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna yol açtığı kanıtlanmıştır (13). Serum östradiol seviyelerinin ölçüldüğü post-menopozal kadınlarda yapılan 6 prospektif çalışmanın meta-analizinde meme kanseri olan kadınların kanlarındaki östradiol seviyelerinin normal olan kadınlara göre % 15 daha fazla olduğu belirlenmiştir (37).

2.2.2.Risk Faktörleri

Meme kanseri çalışmalarında; menarş yaşının , ilk canlı doğum yaşının, önceki biyopsi sayısının iyi anlaşılması olan risk faktörleri olduğu belirtilmektedir (38). Yapılan çalışmalarla belirlenen diğer risk faktörleri olarak yaş, menapoz yaşı, kilo, alkol kullanımı, hormon tedavisi, östrojen-progesteron kombinasyonu ve yüksek kemik mineral yoğunluğu belirlenmiştir (39). Belirtilen bu risk faktörlerine ilaveten sigara kullanımı ve radyasyon maruziyeti, oral kontraseptif kullanımının da dahil olduğu birçok risk faktörü tanımlanmıştır (40, 41).

2.2.3.Prognostik Faktörler

Tümörün büyüme, invazyon ve metastatik potansiyeli açısından gidişatını saptamada ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde yardımcı olarak prognostik faktörlerin belirlenmesi önemlidir. Meme kanserinde prognostik faktörlere yönelik

çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak belirlenen bu faktörler yetersiz kalmakta ve meme kanseri için yeni prognostik faktörler için çalışmalar devam etmektedir. Meme kanseri için belirlenen prognostik faktörler tabloda gösterilmiştir (13).

Tablo 2.2. İnvaziv meme kanserinde prognostik ve tahmin edilen faktörler.

Tümöre Bağlı Faktörler	Hastaya Bağlı Faktörler
Tümör çapı	Yaş
Nodal tutulum	Menopozal durum
Histolojik/Nükleer grade	Aile hikâyesi
Lenfatik/Vasküler invazyon	Meme kanseri hikâyesi
Patolojik evre	İmmünoşüpresyon
Hormon reseptör durumu	Beslenme
DNA içeriği	Önceki Kemoterapi
Yaygın intraduktal komponent	Önceki Radyoterapi

2.2.4.Histopatolojik Sınıflama

Meme kanseri vakalarında tümörün, değerlendirilen çeşitli özellikleri prognoz ve tedaviyi belirlemede büyük önem taşır. Bu konuda en önemli verilerden biri tümörün histopatolojik türüdür. Meme tümörlerinin histolojik sınıflandırılması 1982’de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanmıştır. Ardından 2003 yılında DSÖ tekrar meme tümörlerinin yeni bir sınıflandırmasını yayınlamıştır (42). Buna göre;

Epitelyal Tümörler

1. Benign tümörler
 - İntraduktal papillom
 - Meme başı adenomu
 - Adenom
2. Malign
 - a. Noninvaziv
 - İntraduktal (*in situ* duktal) karsinom

– *In situ* lobuler karsinom

b. İnvaziv

– İnvaziv duktal karsinom

– İntraduktal komponenti baskın invaziv duktal karsinom

– İnvaziv lobuler karsinom

– Müsinöz karsinom

– Medüller karsinom

– Papiller karsinom

– Tübüler karsinom

– Adenoid kistik karsinom

– Sekretuar (Jüvenil) karsinom

– Apokrin karsinom

– Metastatik karsinom

– Meme başının Paget karsinomu

a. Mikst konnektif doku ve epitelyal tümörler

– Fibroadenom

– Filloides tümör

– Karsinosarkom

b. Çeşitli tümörler

– Yumuşak doku tümörleri

– Deri tümörleri

– Hematopoetik ve lenfoid doku tümörleri

c. Meme displazisi / Fibrokistik hastalık

d. Tümöre benzer lezyonlar

– Duktal ektazi

– İnflamatuar psödötümör

– Hamartom ve jinekomasti

2.2.4.1. Duktal Karsinoma *In Situ* (DCIS)

Bazal membran invazyonu yapmayan, *in situ* karsinomların en yaygınıdır (semptomlar ile belirlenenlerin % 3-4 ve görüntüleme ile belirlenen kanserlerin % 17). Özellikle postmenopozal kadınlarda (40-60 yaşlar arasında) görülmektedir. Tüm DCIS'lerin % 30'u multisentrik yerleşimli ve % 60 dan fazlası geniş alanlara yayılan lezyonlar olarak izlenir. Mikropapiller, papiller, solid, komedo, kribriform, saf veya kombine şekillerde bulunabilir. Bu tiplerden en malign karakterde olan komedo tipidir (43, 44).

2.2.4.2. Lobuler Karsinoma *In situ* (LCIS)

Gerçek bir karsinom olmamakla birlikte ciddi derecede lobüler atipik hücrelerin varlığını eksprese etmektedir. Spesifik klinik anormallikler bulunmamaktadır ve özellikle de tümör ya da kitle ele gelmediğinden dolayı insidansını belirlemek zordur. Ayrıca mamografide nadir olarak görülmektedir (43, 44). Patolojik bir kesit incelendiğinde LCIS'in karakteristik makroskopik özellikleri yoktur. LCIS'in teşhisi diğer belirtiler için sağlanan meme biyopsisinde rastlantısal bulgularla olmaktadır. Karakteristik olarak LCIS; vakaların büyük bir kısmında bilateral (% 30) ve multifokaldır (% 50). Mikroskopik olarak, LCIS yüksek çekirdek-stoplazma oranına sahiptir ve küçük, yuvarlak küboidal ya da poligonal hücrelerin oluşturduğu tek tip gruplardan oluşmaktadır (44, 45).

2.2.4.3. İnvaziv Duktal Karsinom (IDC)

En yaygın meme hastalıklarındandır ve invaziv meme kanserlerinin % 80'ini oluşturmaktadır. Yapısal olarak da glandular bir şekil alma eğilimindedir (46).

2.2.4.4. İnvaziv Lobuler Karsinom (ILC)

İnvaziv karsinomların % 15'ini oluşturmaktadır. Daha az yapışkan olma ve tek alanı işgal etme eğilimindedir (46). İnvaziv duktal karsinoma göre multifokal, multisentrik ve bilateral olma sıklığı daha yüksektir.

2.2.5. Meme Kanserinde TNM Sınıflandırması

Meme kanserinin klinik olarak evrenmesi için günümüzde UICC ve AJCC'nin biçimlendirdiği TNM sistemi kullanılmaktadır. Buna göre primer tümörü T, koltuk altı lenf bezlerini N, uzak metastazları ise M temsil etmektedir (13).

T-Primer Tümör

TX Primer tümör değerlendirilemez durumda

T₀ Primer tümör yok

T_i İn situ karsinom

LCIS

DCIS

Meme başının Paget Hastalığı, tümör eşlik etmiyorsa (Paget tümöre eşlik ediyorsa tümör boyutuna göre değerlendirilir)

Tablo 2.3. AJCC Meme Kanseri için Primer Tümör (T) Sınıflandırması (13)

T ₁	Tümör boyutu 2 cm veya daha küçük
T _{1mic}	Mikroinvazyon 0.1 veya daha küçük
T _{1a}	0.1-0.5 cm arası
T _{1b}	0.5-1 cm arası
T _{1c}	1-2 cm arası
T ₂	2-5 cm arası
T ₃	5 cm den büyük
T ₄	Tümör ne boyutta olursa olsun göğüs duvarına ya da meme derisine yayılım
T _{4a}	Göğüs duvarına yayılım
T _{4b}	Meme derisinde ülser ya da ödem, meme derisinde satellit nodüller
T _{4c}	T _{4a} + T _{4b}
T _{4d}	İnflamatuvar karsinom

N-Bölgesel Lenf Nodu

Tablo 2.4. AJCC Meme Kanseri için Klinik Bölgesel Lenf Nodu (N) Sınıflaması (13)

NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral aksiller 1-3 adet lenf nodunda tümör metastazı
N2	İpsilateral aksiller 4-9 adet lenf nodunda tümör metastazı ya da internal mamarien lenf nodu metastazı
N2a	Aksiller lenf nodunda fikse tümör metastazı
N2b	İpsilateral internal mamarien lenf nodunda tümör metastazı
N3	İpsilateral infraklavikuler lenf nodu metastazı beraberinde 10'dan fazla aksiller ya da internal mamarien nod tutulumu
N3a	10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı
N3b	İnternal mamarien lenf nodu ve aksiller lenf nodu metastazı
N3c	Supraklavikuler lenf nodu metastazı

M-Metastaz

MX Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz varlığı

2.2.6. Evrelerin Gruplandırılması

Tablo 2.5. Meme kanseri için AJCC evre gruplarına ve Histopatolojik grade dayalı sınıflama sistemi (13)

EVRELER	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N1	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Tx	N3	M0
IV	Tx	Nx	M1

2.2.7. Tedavi

Meme kanserinin tedavi seçenekleri kanserin evresine, boyutuna, lokalizasyonuna, hastanın fiziksel durumu ve vücudun diğer kısımlarına yayılma durumuna bağlı olarak değişmektedir. Meme kanserinin tedavisindeki zorluklardan en önemlisi en az beş alt tipten oluşan heterojen bir hastalık olmasından kaynaklanmaktadır. Meme kanseri çoğu zaman, başlangıçtan itibaren lenfojen, bazen de hematojen yayılarak sistemik bir hastalık özelliği göstermektedir. Bu nedenle cerrahi tedavi yanında radyoterapi, kemoterapi, hormonoterapi yapılmaktadır.

2.2.7.1. Cerrahi Tedavi Yöntemleri

Meme kanserinin tedavisinde sıklıkla başvurulanan bir yöntemdir ve farklı cerrahi tedavi uygulamaları bulunmaktadır. Meme kanseri için yapılan cerrahi girişimlerini mastektomiler ve meme koruyucu cerrahi olarak iki başlık altında toplayabiliriz.

2.2.7.1.1. Mastektomiler

2.2.7.1.1.1. Radikal Mastektomi

Bu teknik ciddi anlamda fiziksel bozukluklara neden olmaktadır. Girişim tüm meme dokusunun çıkarılması esasına dayanır. İlk olarak Halsted tarafından yapılmış ve uzun süre de kullanılmıştır. Aynı yaşam süresi sağlayan girişimsel olmayan tedavi yöntemlerinin gelişmesi ile bu yöntem hastalar arasında pek tercih edilmemektedir (36).

2.2.7.1.1.2. Modifiye Radikal Mastektomi (MRM)

Meme kanserinin tedavisinde en çok yapılan ameliyattır. İlk kez Patey ve Dyson tarafından yapılmıştır ve Halsted'in radikal mastektomi tekniğinin düzenlenmesiyle oluşturulmuştur. Rekonstrüksiyon için uygun olması, morbiditenin düşük olması, ameliyat süresinin kısa olması yönünden tercih edilmektedir. Evre I-II ve III tümörlerde, konservatif tedavi ile emniyetli sınır sağlanamayan lezyonlarda, hastanın tercih ettiği durumlarda, tümörün 5 cm den büyük olduğu durumlarda MRM yapılabilmektedir (36).

2.2.7.1.1.3. Total Mastektomi

Bu girişimle meme başı, areola, meme cildinin büyük bir kısmı, tüm meme dokusu alınır. Basit mastektomi, salvage kurtarma mastektomisi ve profilaktik mastektomi total mastektomi girişimi altında uygulanan cerrahi yöntemlerdir (36, 47).

2.2.7.1.2. Meme Koruyucu Cerrahi

Meme koruyucu cerrahi ile birlikte uygulanan radyoterapinin, mastektomi girişimleri arasında lokal nüks, yaşam süresi ve hastalıksız sağkalım süresi bakımından anlamlı bir farklılık görülmediği belirlenmiştir. Meme kozmetiği açısından daha iyi sonuçlar ortaya çıkaran meme koruyucu cerrahi erken evre meme kanserlerinin tedavisinde mastektomilerin yerine geçmiştir (36).

2.2.7.2. Radyoterapi

Radyoterapi, meme kanseri hastalarının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Mastektomi sonrası radyoterapinin yararlı olduğuna ilişkin gittikçe artan bir görüş vardır. Radyoterapi hedef kitleyi uygun bir şekilde tedavi ederken komşu sağlam dokuların etkilenmesini minimize edecek şekilde uygulanmalıdır (13). Tarihi serilerde inflamatuvar meme kanserinde 5 yıllık sağkalım yalnız cerrahi ile % 2-10 ve yalnız radyoterapi ile % 3 olarak bildirilmiştir. Yüksek radyasyon dozunun hastalarda ciddi komplikasyonlar oluşturması lokal ve sağkalım oranlarının tek başına radyasyon tedavisi ile sınırlı kalması kombine tedavi yaklaşımlarını ortaya çıkarmıştır (36).

2.2.7.3. Kemoterapi

Kanserli hücrelerin yok edilmesinde ilaçlardan faydalanılan bir yöntemdir. Tedavi için verilen ilaçlar kapsül şeklinde ağızdan ya da enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Verilen ilaçlar kana karıştığı için bütün vücut bu uygulamadan etkilenmektedir.

Erken evre meme kanseri, klinik olarak saptanmış tümörün cerrahi yöntemlerle çıkarıldığı evre I, II ve bazı Evre IIIA olguları kapsamaktadır. Cerrahi sonrası arta kalan ve belirlenemeyen mikrometastatik tümörlerin yok edilmesi amacıyla uygulanan ilaç

tedavisidir (36). Meme kanseri tedavisinde kemoterapi çalışmaları 1970' ler den önce başlanmıştır. Başlangıçta tek ajan kullanımı ile tedavi yapılmaya çalışılmıştır ardından *in vitro* modeller kullanılarak kombine kemoterapi tedavileri geliştirilmiştir. İlk olarak 1969 da prototip kombinasyon siklofosfamid, metotreksat, fluorourasil, vinkristin ve prednison den oluşan kombinasyon denenmiş ve metastatik meme kanseri üzerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ardından taksanların keşfedilmesi ile Paclitaxel ve Docetaxel kullanılmıştır (47, 48) (Tablo 2).

Tablo 2.6. Metastatik meme kanseri için kullanılan ajanlar (47).

İlaç	Cevap oranı (%)
Alkilleyiciler	
Cisplatin	21
Karboplatin	15
Siklofosfamid	34
Ifosfamid	27
Melfalan	23
Antimetabolitler	
Capesitabin	27
5-Fluorourasil	26
Metotreksat	28
Gemcitabin	38
Taksanlar	
Paklitaksel	35
Doksitaksel	41
Vinca alkaloidler	
Vinkristin	20
Vinorelbin	43
Antrasiklinler	
Doksorubisin	35
Epirubisin	29
Mitoksantron	20

2.2.7.4. Endokrin Tedavi

Östrojen meme kanserinin tedavisi için önemli bir hedef olarak östrojen fonksiyonunu düzenleyen yolların tanımlanması meme karsinogenezinde anahtar bir rol oynamaktadır. Östrojen reseptör α (ER α) ve progesteron reseptörü eksprese eden tümörlerin hormonal tedaviye cevap verdiği bilinmektedir (49). Yeni veriler, meme tümör hücrelerinin % 1'in deki ER ve PR aşırı ekspresyonunun endokrin tedaviye potansiyel yanıt içerdiğini göstermektedir (50). Östrojenin kanser hücreleri üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak için östrojen yolağı birkaç farklı strateji ile manipüle edilebilir. Östrojen üretimi, aromataz inhibitörleri (5) ya da over ablasyonu/supresyonu (6) ile azaltılabilir. Alternatif olarak ER α aktivitesi Tamoksifen ya da Raloksifen gibi diğer selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM) kullanılarak ayarlanabilir (51). Ayrıca ER α , selektif bir östrojen reseptör yıkıcı olan Fulvestrant ile etkisi azaltılabilir. Non-steroid bir anti-östrojen olan Tamoksifen etkisini östrojen ile yarışmalı bir şekilde ER'e bağlanarak göstermektedir. Tamoksifen dışında bu grupta Toremifen, Droloksifen, Idoksifen ve TAT-59 yer almaktadır. Anti-östrojenlerin dışında tedavide kullanılan aromataz inhibitörleri, ER-pozitif metastatik meme kanserli post-menopozal hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ajanların hepsi anti tümör aktivitesine sahiptir. Bu grupta yer alan ajanlar ise; Anastrozol, Letrozol, Fadrozol, Vorozol, Formestan ve Eksemestan'dır (47).

2.2.7.5. Biyolojik Tedavi

Meme kanseri, en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen biyolojik özellikleri hala tam anlamıyla bilinmemektedir. Meme kanserinin tedavisi için uygulanan yöntemlerden biride ilerlemiş meme kanserlerinin tedavisinde kullanılan moleküler hedefli tedavidir. Trastuzumab HER-2 pozitif metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde önemli bir tedavi cevabı gösteren onaylanmış ilk hedefli anti-kanser ajanıdır (52). Genellikle trastuzumab kullanımından bir süre sonra primer ya da kazanılmış trastuzumab direnci meydana gelmektedir. Meme kanseri tedavisinde yeni anti-HER-2 monoklonal antikorları pertuzumab ya da ertumaksomab, küçük moleküler tirozin inhibitörü lapatinib, selektif PARP1 inhibitörü olaparib ve mTOR inhibitörü rapamycin analogları geliştirilmiştir (7).

Trastuzumab temelli tedavi stratejisi, ilgi çekici klinik yararları ile HER-2 pozitif meme kanserinin tedavisinde bir dönüm noktası olmasına rağmen Trastuzumab içeren rejimlerin en büyük engeli HER-2 aşırı eksprese eden hastalarda tedavi direnci oluşturmaktadır. HER-2 pozitif hastaların yalnızca % 30'u tedaviye cevap verirken % 70'i direnç geliştirmektedir (53). Gelişen direncin kompleks HER-2 sinyal ağının herhangi bir basamağının değişmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Lapatinib ve Tirozin Kinaz İnhibitörleri, HER-2 reseptörünün katalitik domaini içine ATP bağlanma bölgesine geri dönülmez bir şekilde bağlanıp, HER-2'nin otofosforilasyonunu inhibe etmektedirler. Bu hareket reseptörün aktivitesini önlemenin yanı sıra MAPK yolağı ve PI3K/AKT sinyal kaskadı gibi sonraki basamakların bloke edilmesine neden olmaktadır (54). Lapatinip, trastuzumab ile karşılaştırıldığında üç sebepten dolayı daha avantajlıdır. İlk olarak Lapatinip iki farklı reseptör üzerinde tirozin kinaz inhibitör etkisi yaparken trastuzumab sadece tek reseptöre bağlanmaktadır. İkincisi, lapatinip intrasellular kinaz reseptörlerini doğrudan bloke eder trastuzumab ise ekstrasellular domaine bağlanır. Üçüncüsü, moleküler ağırlığından dolayı kan- beyin bariyerini geçemeyen trastuzumab kanserin beyin metastazı yapmasını engelleyemez lapatinip ise düşük moleküler ağırlığından dolayı bu konuda daha etkilidir (7).

Pertuzumab, HER-2'nin ekstrasellular domainini hedef alan insan monoklonal antikordur. HER-2 dimerizasyon inhibitörü olarak hizmet eden trastuzumabdan farklı bir bölgeye bağlandığı belirlenmiştir (55). Yapılan faz I ve II çalışmalarında pertuzumab'ın anti-kanser aktivitesi tanımlanmıştır (56). Yapılan bir faz II çalışmasında, trastuzumab tedavisi sonrası hastalığı ilerleyen kişilerde ve aşırı HER-2 eksprese eden ileri meme kanserli hastalarda trastuzumab ve pertuzumabdan oluşan rejimde % 50 klinik fayda % 24 tedavi cevabı alındığı belirlenmiştir (57).

2.3. Caytaksin Proteini

2.3.1. Cayman Ataksi

Serebellar ataksiler bir grup heterojen hastalıktır. Serebellar ataksinin iki formu bulunmaktadır. Non-progresif otozomal resesif serebellar ataksi, Grand Cayman Adalarının izole bir bölgesinde *inbred*(akraba evliliği yapan) bir popülasyonda tanımlanmıştır (58). Bu popülasyon adanın çok az göç alan ya da göç eden oldukça

izole bir bölgesinde yaşamaktadır. Bu hastalık için adanın bu bölgesinde taşıyıcı frekansı 6 kişide 1 olarak belirlenmiştir. İnsanlarda hipotoni, mental fonksiyon bozukluğu, serebellar ataksi, farelerde gergin, tereddütlü, güvensiz ve distonik görünüm ile karakterizedir (59).

2.3.2. *ATCAY/Atcay* Geni

Dr. Benke ve arkadaşları Cayman Adası'nda hastalıktan etkilenen kişilerden elde ettikleri DNA örnekleriyle oluşturdukları DNA havuzuyla kısa tekrar dizisi belirleyicileri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kalıplarını kullanarak Cayman ataksi'ye sebep olan genin kromozomun 19p13.3 lokusu ile bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir (60). Daha sonra yapılan karşılaştırmalı haritalama çalışmalarıyla *ATCAY* geninin faredeki homologunun 10. kromozom üzerinde olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada 3 ataksik fare mutanti tanımlanmıştır fakat sebep olan gen belirlenememiştir (9). İnsan ve fare kromozomu üzerinde etkilenmiş bölge içindeki kritik aralık karşılaştırılmış ve 7 geni kapsayan 150 kb uzunlukta olduğu tanımlanmıştır. Bu kritik aralığın sekansı bilinmeyen tek bir gen için yapılan haritalama çalışmaları ile ortak bir noktada mutasyonlar fark edilmiş ve bu aralıktaki gen, Cayman tip ataksi için *ATCAY* olarak adlandırılmıştır (9).

İnsan *ATCAY* geni, proteine şifre veren 13 ekzondan oluşmaktadır (NCBI, Nucleotid, NG_012638.1). Bomar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sayesinde *ATCAY* geninin ekzon-intron sınırları ve ekzonların ilave sekansları Cayman ataksili kişilerde *ATCAY*'daki iki mutasyon için homolog olduğu belirlenmiştir. İlk mutasyon 301. amino asit olan serinin arjinine dönüşmesine neden olduğu tahmin edilen ekzon 9 da ki Sitozin'in(C) Guanine(G) dönüşümüdür. İkinci mutasyon intron 9'un 3. bazında Guaninin Timine dönüşümüdür (9).

2.3.3. Caytaxin Proteini

Ataksiler için anormal gen ürünleri ataksinler olarak adlandırıldığından dolayı *ATCAY* ile şifrelenen protein Caytaxin olarak adlandırılmaktadır. İnsan caytaxin proteini 371 amino asitten [NCBI Reference Sequence: NP_149053.1] oluşurken bu proteinin faredeki ortoloğu 372 amino asitten [NCBI Reference Sequence:

NP_848777.1] meydana gelmektedir. Bu gen tarafından kodlanan 8 transkript bulunmaktadır. Bunlardan sadece 371 amino asit büyüklüğündeki bir transkript (*ATCAY-001*) fonksiyonel protein ürünü oluşturmaktadır. Bu transkriptlerden 3 tanesi 377 aminoasit büyüklüğündedir ancak fonksiyonel protein ürünü oluşturmamaktadır (Tablo 2.6). *ATCAY-005* transkriptinin oluşturduğu 99 aminoasit uzunluğundaki gen ürününün de aynı şekilde fonksiyonel olmadığı bilinmektedir.

Tablo 0.7. *ATCAY* (ENSG00000167654) genine ait transkriptler.

İsim	Transkript ID	Uzunluk (bp)	Protein ID	Uzunluk (aa)	Biyotip
<i>ATCAY-001</i>	ENST00000450849	5070	ENSP00000390941	371	Protein kodlar
<i>ATCAY-004</i>	ENST00000600960	2904	ENSP00000470842	377	Protein kodlar
<i>ATCAY-202</i>	ENST00000398448	1957	ENSP00000381466	377	Protein kodlar
<i>ATCAY-201</i>	ENST00000301260	1564	ENSP00000301260	377	Protein kodlar
<i>ATCAY-005</i>	ENST00000598136	530	ENSP00000471731	99	Protein kodlar
<i>ATCAY-002</i>	ENST00000597739	1957	ENSP00000472263	74	Anlamsız ürün
<i>ATCAY-006</i>	ENST00000595916	548	Protein ürünü yok	-	İşlenen transkript
<i>ATCAY-009</i>	ENST00000601323	498	Protein ürünü yok	-	İşlenen transkript

Ulaşım: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000167654;r=19:3879862-3928077

Boyd ve arkadaşları yeast two hybrid metodunu kullanarak caytaxinin, Adenovirüs E1B 19 KDa proteini ve anti- apoptotik protein Bcl-2 için bir etkileşim proteini olarak izole edilmiş olan BNIP-2 protein ailesine % 69 dizi benzerliği ve % 59 oranında da amino asit dizi benzerliği gösterdiğini belirlemişlerdir (61). Bu benzerlikten dolayı caytaxin proteini aynı zamanda BNIP-H olarak da adlandırılmaktadır. Benzer şekilde Bomar ve arkadaşları da caytaxinin dizi analizini yaparak BNIP-2 ve KIAA0367 proteinlerine benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir (9). BNIP-2 ve Cdc42GAP homoloji domaini (BCH), başlangıçta BNIP-2 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa etkileşim proteini-2) ve Cdc42GAP/p50RhoGAP arasında yüksek protein sekans homolojisinin bir bölgesi olarak tanımlanmıştır (62, 63). Bu yapısal protein domaini genellikle Sec14 olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak BCH domaini *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 proteinin CRAL-TRIO domaini ile yalnızca % 14'lük bir sekans benzerliği

sergilemektedir. Bu domain retinal, vitamin E, squalen, kolesterol prokürsörü ve inozitol gibi küçük lipofilik moleküllere bağlanmaktadır (9, 64). BCH domaininin yaklaşık 150 amino asit büyüklüğünde olduğu ve apoptoz, hücre göçü, morfogenezis, hücre içi taşıma, hücre transformasyonu ve farklılaşma gibi çeşitli yönleriyle hücre dinamiklerinin kontrolünü kapsadığı ve BNIP-2'nin bu aktivitesinin Cdc42 ile etkileşimine bağlı olduğu bilinmektedir. Caytaxin/BNIP-H proteini de BNIP-2 proteinine benzer şekilde C-terminal bölgesinde yüksek korunmuşlukta BCH domaini bulundurmaktadır (65).

2.3.4. Caytaxin ile Etkileşime Giren Proteinler

Caytaxin ile etkileşime girdiği belirlenen ilk protein CHIP (Hsp 70) etkileşim proteininin karboksil terminali) E3 ubiquitin ligaz'dır (66). CHIP, ısı ve oksidatif strese karşı sinir hücrelerini korumakta (67) aynı zamanda Hsp70/Hsp90 şaperon kompleksi ile etkileşen katlanmamış proteinlerin seçilmesi ve degradasyonunda da merkezi rol oynamaktadır (68). CHIP birçok onkogenik proteinin ve onların substratlarının degradasyonunu ve ubiquitinasyonunu kapsayan U-box tipi ubiquitin ligazdır. CHIP ekspresyon düzeylerinin meme kanseri hücrelerinin metastazı ve tümör büyümesini baskıladığı belirlenmiş ancak CHIP ve tümör ilerlemesi arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammıştır (69). Bu ligazın caytaxin protein mekanizmasını düzenlemek için *in vitro* poliubiquitine edilmiş caytaxin'e doğrudan bağlandığı belirlenmiştir (66).

Caytaxin ile etkileşime giren başka bir protein de Buschdorf ve arkadaşları tarafından caytaxinin hücredeki fizyolojik fonksiyonu hakkında bilgi edinebilmek amacıyla hücresel bağlanma partnerlerini araştırmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. GST-Caytaxin parçalama analizi sayesinde caytaxinin BCH domaini içerisinde iki farklı bölgede caytaxin'e doğrudan bağlanan protein olarak beyinde eksprese edilen fosfatla aktive olan glutaminaz'ın (PAG) yalnızca bir izoformu, böbrek-tipi glutaminaz'ı (KGA) tanımlamışlardır (Şekil 2.1) (62). KGA, glutamini glutamata dönüştüren, beyinde sinirsel dönüşüm için gerekli olan nörotransmitter bir enzimdir. Bu enzimin ürünü olan glutamat, tümör hücrelerinin proliferasyonunda ve devamında enerji kaynağı olarak kullandığı bir yakittir. Glutamatın beyinde aşırı olarak bulunması sinir hücreleri için toksik etki oluştursa da beyindeki tümör hücreleri için tümör büyümesine neden olmaktadır (70). Ters yönde glutamat sentezinin engellenmesi ile hem nöronal

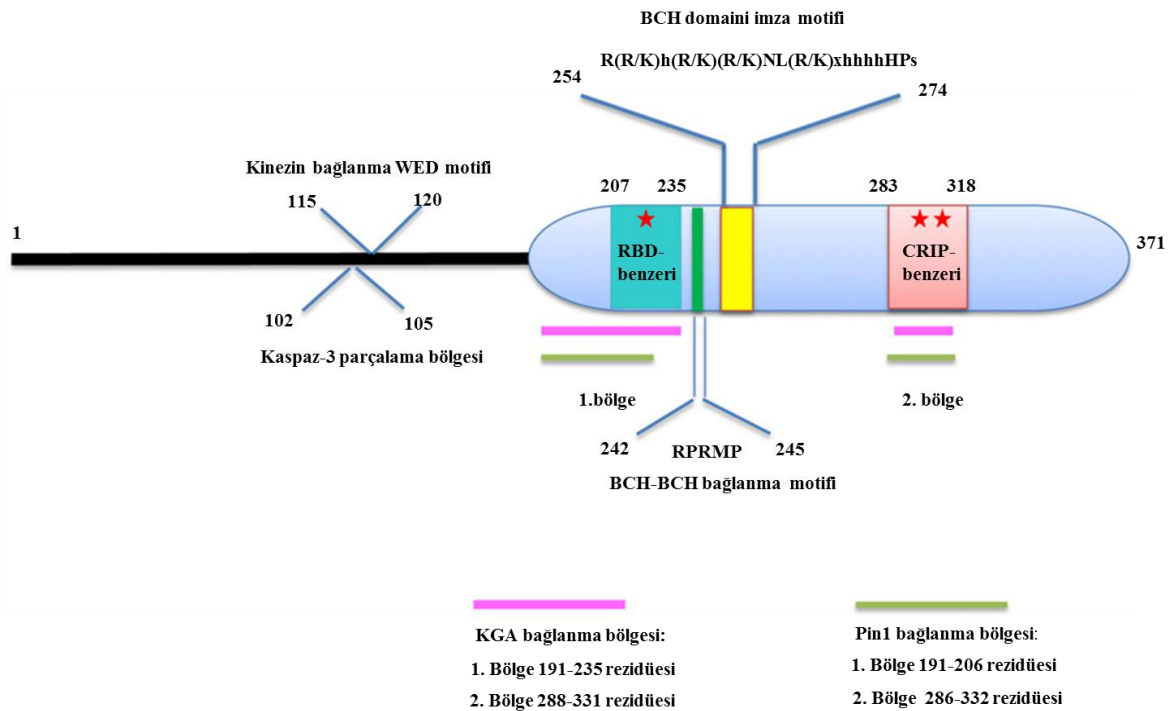
tümörlerde hem de kolon, akciğer, tiroit ve meme karsinomlarında tümör boyutunun küçülmesini sağlamaktadır (71). Caytaxin'in glutamat sentezi üzerindeki rolü ise; KGA'ya bağlanarak sinirsel dönüşüm boyunca sinapslarda glutamat sentezini düzenlemesidir. Buschdorf ve arkadaşları caytaxin'in aşırı ekspresyonunun KGA'nın seviyesinin, aktivitesinin ve lokalizasyonunun düzenlenmesi için gerekli olduğunu belirlemişlerdir. Caytaxinsiz akson terminallerindeki KGA seviyelerinin azalacağını bunun sonucu olarak glutamat seviyesinde bir artış ve glutaminaz aktivitesinde yükselme ile birlikte toksisiteye sebep olup ayrıca sinirsel dönüşümün etkileneceğini hipotez etmişlerdir (62).

Caytaxin proteininin BCH domainine doğrudan bağlandığı belirlenen diğer bir protein yine Buschdorf ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Caytaxin'in BCH domaini içinde korunmuş serin/threonin motifine bağlanabilen proteinler için aday bölge yaklaşımı ile peptidil-prolil cis/trans-izomeraz'ı (Pin1) tanımlamışlardır (Şekil 2.1) (72). Pin1, Alzheimer (73), Parkinson gibi bir grup nörodejeneratif hastalıkla bağlantılı olan, hücre döngüsünü kapsayan proteinlerin yapısını, fosforilasyon durumunu ve stabilitesini etkilediği bilinen bir proteindir (74). Buschdorf ve arkadaşları, Pin1'in sinir büyüme faktör uyarısı sonrası BNIP-H'nin BCH domaini içerisinde iki farklı bölgeden bağlandığını belirlemişlerdir. Ayrıca farklılaşan sinir hücrelerinde sitozol ve nöritlerde birlikte lokalize oldukları belirlenmiştir (72).

Aoyama ve arkadaşları, yeast two hybrid metodunu kullanarak caytaxin'e yeni bir bağlantı paterni olarak Kinezin Hafif Zincirini (KLC) tanımladılar. Kinezin-1'in bir bileşeni olan KLC'nin, caytaxin proteininin N-terminal kısmına doğrudan bağlanarak, mikrotübül bağımlı bir mekanizma ile nöritlerin aksonlarından distal bölgelerine doğru taşındığını belirlemişlerdir (Şekil 2.1). KLC1'in tetratikopeptid tekrar bölgelerinin caytaxinin ELEWED sekansını tanıdığı, bu motifin calsyntenins gibi KLC ile etkileşen kinezin kargo proteinleri ve BNIP-2 aile üyeleri arasında yüksek oranda korunmuş bir yapı olduğu anlaşılmıştır. Ayoma ve arkadaşları Caytaxin'in kinezin-1'e bağlandığını ve mitokondriye spesifik olan bir kargonun hücre içinde taşınmasında aracılık eden adaptör olarak fonksiyon gösterdiğini hipotez etmişlerdir (75).

Itoh ve arkadaşları Caytaxin'in hücre sinyal kaskadı ve apoptoz sürecinde de rol oynayan bir proteaz olan kaspaz-3 ile parçalandığını belirlemişlerdir (10). Caytaxin, Pin1 proteini ile MEK2/ERK aktivasyonu sırasında etkileşmektedir. Ancak tam

uzunluktaki caytaxin proteininin C-terminal bölgesinden 106 (aspartat). amino asitten (Şekil 2.1) kaspaz-3 ile kesilmesi sonucunda oluşan C106 fragmentinin ERK fosforilasyonunu inhibe etmesi ile etkileşim engellenmektedir. Caytaxin'in kaspaz-3 ile parçalanması sonrası oluşan fragmentlerin hücre içerisinde iki farklı lokalizasyona sahip olduğu anlaşılmıştır. N-terminal fragmentin yapısında bulundurduğu lösince zengin nükleer taşıma sinyali benzeri sekans nedeniyle nükleer kısmı olarak lokalize olduğu, C-terminal fragmentin ve tam uzunluktaki caytaxin'in de sitozolde yer aldığı görülmüştür. Caytaxin proteininin C-terminalinin kaspaz-3 ile parçalanmasının muhtemelen glutamat seviyelerini azaltmak için olduğu ve bu fonksiyonun da ERK aktivasyonunun inhibe edilmesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir (10). Itoh ve arkadaşları tam uzunluktaki ve parçalanmış haldeki caytaxin proteinlerinin her ikisinin de glutamatın sinirsel iletişimdeki fonksiyonunu düzenlediğini hipotez etmişlerdir (10). MEK2 proteini gelişimde, homeostazda ve kanserleşmede önemli roller oynayan ERK/MAPK yolağının ara basamağında yer alan bir proteindir. Bunun dışında Castello ve Noonan gibi kalıtsal hastalıklarda ilişkili bir proteindir (76).



Şekil 2.1. 371 aminoasit uzunluğundaki caytaxin proteininin yapısında yer alan BCH domaini ve diğer proteinler ile etkileştiği bölgeler (77)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar markaları ile birlikte aşağıda listelenmiştir.

- Vorteks (Heidolph)
- Isı Bloğu (Benchmark BSH1001-E)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard)
- Western Blott tankı (Bio-Rad Mini-Protean Tetra System)
- Kemoluminesan Görüntüleme Cihazı (ChemiDoc-It² 510 Imager)
- Shaker (Benchmark Scientific Blot 3D Rotater Mixer 230)
- İnkübatör (Thermo Scientific Heracell 150i)
- Laminar Kabin (Thermo scientific)
- Santrifüj (Hettich eba-20)
- Su Banyosu (Memmert)
- Hassas Terazî (Ohaus)
- pH metre (Mettler Toledo Five EasyTM)
- Otoklav (Hirayama Hiclave HG-80)
- Su arıtma cihazı (Direct-Q 3UV)
- Buz cihazı (Scotsman AF 80)

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler aşağıda listelenmiştir.

- TEMED (Acros Organics, Cas No: 110-18-9)
- 2-Propanol (C₃H₈O) (Sigma, Cas No: 67-63-0)
- Depolayıcı Buffer (0.5M Tris-HCl, %0.4 SDS, pH 6.8) (National Diagnostic, EC-893)
- Ayırıcı Buffer (1,5M TRIS-HCl, % 0.4 SDS, pH 8.8) (National Diagnostic, EC-892)
- SDS (Sodiumdodecylsulfate)(Fisher Scientific, Cas No: 151-21-3)
- TWEEN20 (Sigma-Aldrich, Cas No: 9005-64-5)

- Akrilamid (Sigma, Cas No: 79-06-1)
- Bisakrilamid (Amresco, 0172)
- Amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈) (Merck)
- Tris-Base (Fisher Scientific, BP152-1)
- Bromophenol Blue (Bio Basic, Cas No: 115-39-9)
- Xylene Cyanole (Sigma, Cas No: 2650-17-1)
- Gliserol (Sigma, Cas No: 56-81-5)
- Sodyum ortovanadat (Na₃VO₄) (Acros Organics, Cas No: 13721-39-6)
- Glisin (MP, Cat. No: 808822)
- Sodyum florid (NaF)(Acros Organics, Cas: 7681-49-4)
- TritonX-100 (Sigma, Cas:9002-93-1)
- 2-Mercatoethanol (Acros Organics, Cas: 60-24-2)
- DMEM F-12-1:1 mixture (Lonza, Cat No: BE04-687Q)
- MEBM Medium ve MEBM kit (Lonza, Cat No: CC-4136)
- Tripsin/EDTA (Multicell, Cat No: 325-042-EL)
- Pen/Strep (Lonza, Cat No: DE17-602E)
- Hourse Serum (Lonza)
- Luminol (ChemiGlow, Lot: MH162758)
- Peroksit (ChemiGlow, Lot: MH162758)
- MEGM kit ve MEBM besi yeri (Lonza, Cat No: CC-4136)

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Lizis Solüsyonu

100 ml için;

- % 1 Triton-X, 1 ml
- 150 mM NaCl, 876 mg
- 25 mM Tris, 303 mg

50 ml dH₂O üzerine 303 mg Tris eklendi ve çözünene kadar karıştırıldı. Çözündükten sonra pH 7.6'ya ayarlandı. Karışıma 876 mg NaCl eklenerek çözdürüldü. Sonra 1m Triton-X-100 eklendi ve çözdürüldü. Son pH 7.9'a getirilerek +4°C de

muhafaza edildi. Hücresel proteinlerin elde edilmesi amacıyla hücrelerin parçalanmasında kullanıldı.

3.3.2. 10X Yürütme Tamponu

1 L 10X'lik stok solüsyon için;

- 30 gr Tris
- 144 gr Glisin

1 lt'ye tamamlandı ve çözdürüldü. +4°C de muhafaza edildi

3.3.3. 10X TBS (Tris-Buffer-Salin)

1 L stok için;

- 31.5 gr Tris-HCl
- 80 gr NaCl

1 lt'ye tamamlanarak çözdürüldü ve pH 7.6' ya ayarlandı.

3.3.4. 6X Yükleme Solüsyonu

- 7 ml 0.5 M Tris-HCl
- 3.6 ml Gliserol
- 1 gr SDS
- 1.2 mg Bromofenol Blue

15 ml'lik falkon tüp içerisine 1 gr SDS alındı ve 0.5 M Tris-HCl'den 7 ml eklenerek çözdürüldü (pH 6.8). 1.2 mg Bromofenol-Blue eklendi ve çözdürüldü. Ardından 3.6 gr gliserol ilave edilerek çözdürüldü. Solüsyon -20°C de muhafaza edildi.

3.3.5. 1X Yürütme Tamponu

- 100 ml 10X yürütme tamponu
- % 10 SDS 10ml
- 890 ml dH₂O

Jele yüklenen proteinlerin elektrik akımı ile jelde büyüklüklerine göre ayrıştırılması için tampon olarak kullanıldı,

3.3.6. Transfer Solüsyonu

100 ml 10X'lik Yürütme Buffer'ı

-700 ml dH₂O

-200 ml metanol

Jeldeki proteinlerin nitroaselüloz membrana transfer edilmesi için soğuk olarak (+4°C) kullanıldı

3.3.7. TBS/Tween-20

– 900 ml dH₂O

– 100 ml TBS

– 2 ml Tween-20

Membranın antikor muamelesi ve yıkamalarında kullanılmak için oda sıcaklığında tutuldu.

3.3.8. % 30 Akrilamid Stok Jelin Hazırlanması

18.75 gr Akrilamid ve 0.5 gr Bisakrilamid, dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı ve çözdürüldü. 0.45 µM'lik filtre ile süzdürüldü. pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra son hacim 64 ml'ye tamamlandı.

3.4. Çalışmanın Basamakları

Hücre Kültürü

MDA-MB-231 ve MCF7 hücreleri % 10 Fetal Sığır Serum (FBS), 5 ml Penisilin/streptomisin ve 2 ml L-Glutamin içeren DMEM F-12-1:1 büyüme medyumu ile 25 cm²'lik flasklara ekildi. Laboratuvar koşullarımızda hücrelerin haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yeterli oldu. Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabin içinde gerçekleştirildi ve hücreler % 5 CO₂ ve 37°C de kültüre edildi (78).

MCF10A hücreleri, MEGM kit (2 ml BPE, 0.5ml EGF, 0.5 ml İnsülin, 0.5 ml hidrokortizon, 0.5 ml GA-1000), % 5'lik 200 µl kolera toksini, 5 ml Pen/Strep ve % 10 at serumu içeren MEBM büyüme medyumu ile 25 cm²'lik flasklara ekildi. Hücrelerin pasajlanması ve besi yerleri yukarıda belirtildiği gibi yapıldı.

Hücrelerin Çözülmesi

+4 °C de bulunan DMEM F-12-1:1 ve MEBM besi yerleri 37°C ye ısıtıldı. Her bir hücre hattı için 25 cm²'lik flasklar hazırlandı. Kryovial içindeki hücreler -80°C den çıkarılarak hızlıca çözüldü. Çözünmüş olan hücreler pipet ile birkaç kez süspanse edilerek 15 ml'lik tüplere alındı. Hücreler üzerine 4 ml besi yeri eklendi ve 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst kısım atılarak pellet üzerine 3 ml besi yeri eklenip 25 cm²'lik flasklara alındı ve hacim 6 ml'ye tamamlandı.

Hücrelerin Pasajlanması

Doluluk oranına ulaşan hücrelerin besi yerleri atıldı. 25 cm²'lik flasklara 2 ml tripsin ilave edildi. Tripsin eklenen kültür kapları 5 dakika % 5 CO₂ içeren 37°C deki inkübatörde bekletildi. Faz kontrast mikroskopta hücrelerin morfolojilerine bakıldı ve flask yüzeyinden kalkmayan hücreler için flask tabanına hafif el darbeleriyle vurularak kaldırıldı. Hücreler flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra tripsin'in etkisini inhibe etmek için 3'er ml besi yeri eklendi. Hücreler steril 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 1700 rpm de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve elde edilen pellet miktarına göre hücreler DMEM F-12-1:1 ve MEBM besi yerleri ile süspanse edildi ve 25 cm²'lik flasklara alındı. Hücrelerin eşit dağılım göstermesi için flasklar dairesel hareketlerle çalkalandı. Hücrelerin durumu faz kontrast ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hücreler % 5 CO₂ içeren 37°C deki inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin Dondurulması

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 10 ml dondurma medyumu için; % 10 dimetilsülfoksit (DMSO), % 20 DMEM F12-1:1, % 70 FBS olacak şekilde hazırlandı. Pasajlama işlemindeki basamaklar uygulanarak santrifüj sonrası elde edilen hücreler

kullanıldı. Pellet üzerine dondurma medyumunu ilave edildi ve birkaç kez pipetleme sonrası her bir kryovial içine 1 ml süspansiyon konuldu. Hücreler -80°C de dondurulan hücreler daha sonra sıvı azot tankına alınarak saklandı.

Hücre Lizatı Eldesi

25 cm²'lik flasklarda kültürü yapılan hücreler, tripsin yardımıyla kaldırıldı. Hücreler 15 ml'lik tüplere alındı ve hemositometre ile sayımı yapıldı. Ardından 1700 rpm de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml PBS ilave edilerek hücreler ependorf tüplere alındı. Ependorf tüpler 5000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine hücre sayısına bağlı olarak (2 milyon hücre için 160 µl lizis tampon) lizis solüsyonu (2 ml Lizis solüsyonuna 2 µl NaF ve 2 µl Na₃VO₄ gelecek şekilde) ilave edildi. Süspansiyon 15 saniye vortekslendi ve buz üzerine alınarak 10 dakika beklendi, bu işlem 3 kez tekrarlandı. Ardından süspansiyon 13000 rpm' de 10 dakika +4 °C de santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir ependorf'e alındı (79).

Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Lizis yapılan hücrelerdeki total proteininin belirlenmesi için orijinal yöntemle bağlı kalınarak hazırlanmış modifiye Lowry protein analizinden faydalanıldı (80). Bu yöntem temel olarak 3 stok solüsyondan oluşan Lowry solüsyonu ve Folin-Ciocalteus's phenol reaktifinden meydana gelmektedir.

Solüsyon A : 0,1 N NaOH ile hazırlanmış % 2'lik Na₂CO₃

Solüsyon B₁ : % 2'lik Na-K Tartarat

Solüsyon B₂ : % 1'lik C₂SO₄.5H₂O

Lowry Solüsyonu, 100 (Solüsyon A): 1 (Solüsyon B₁): 1 (Solüsyon B₂) den oluşmaktadır.

BSA (Bovine Serum Albumin) Standardının Oluşturulması:

10mg BSA, 1ml dH₂O'da çözülürerek oluşturulan ana stoktan 50, 25, 12.5, 6.25 µg/µl'lik konsantrasyonlar şeklinde hazırlandı.

Hücre lizatlarının ölçümü:

Tablo 3.4. Lizatların ölçümü ve içerik oranları

	Blank (µl)	Standart (µl)	Lizat (µl)
dH ₂ O	10	YOK	YOK
BSA	YOK	10	YOK
Lizat	YOK	YOK	10
Lowry Solüsyonu	200	200	200
Folin-Ciocalteus's phenol reaktifi	20	20	20

Hazırlanan örnekler 96 kuyulu plate'e yüklenip 750 nm'de plate okuyucuda ölçüm yapıldı.

Western Blot Analizi

5 ml % 6'lık depolayıcı Jel için;

- 3 ml dH₂O
- 0.67 ml % 30 ACA/bisACA
- 1.25 ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8
- 50 µl % 10 SDS
- 50 µl % 10 APS
- 10 µl TEMED kullanıldı.

8ml % 18'lik Ayırıcı jel için;

- 2.25 ml dH₂O
- 3.6 ml % 30 ACA/bisACA
- 2 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
- 80 µl % 10 SDS
- 80 µl % 10 APS
- 8 µl TEMED kullanıldı.

Her hücre hattı lizatından 50 µg total protein içeren örnekler sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile 90V'da yürütüldü. Jelde yürütülen proteinler nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında membran, Tween 20 içeren TBS (Tris-Buffer-Salin) (TBS/T) ile hazırlanan % 5'lik süt

tozu solüsyonunda 1 saat blotlandı ve 3 kez TBS/T ile 10'ar dakika aralarla yıkandı. % 2.5'lük süt tozunda 1:1000 oranında seyreltilen monoklonal caytaxin antikoru ile bir gece +4°C de inkübe edildi. Ardından 3 kez TBS/T ile 10'ar dakika yıkandı ve TBS/T de hazırlanan % 2.5'lük süt tozu solüsyonunda horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi (81) . Membran yıkamalar sonrasında 1:1 oranında karıştırılan luminol ve peroksit ile muamele edilerek UVP ChemiDoc-It² kemolüminesan görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin antikoru kullanıldı ve sekonder antikor muamelesi sonrasında yıkamalar yapılarak görüntülendi. Çalışmalar 5 kez tekrarlandı. Bant yoğunlukları UVP life science software Vision WorksLS Image Acquisition and Analysis Software Version: 8.0 RC 1.2 kullanılarak belirlendi.

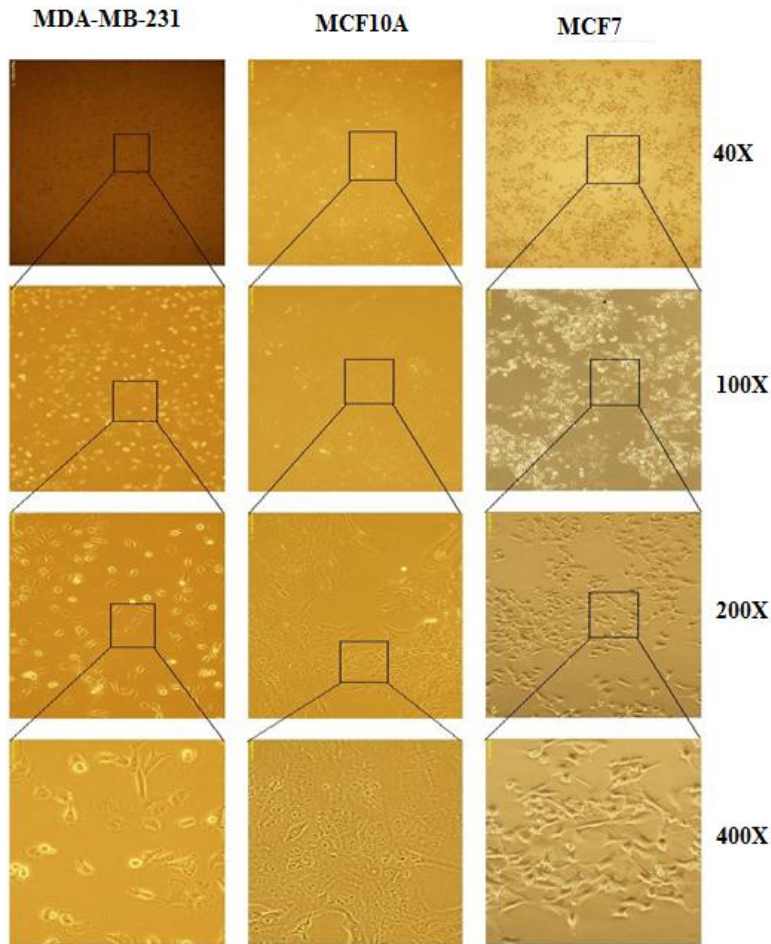
3.5. İstatistik Yöntemler

UVP life science software Vision WorksLS Image Acquisition and Analysis Software Version: 8.0 RC 1.2 kullanılarak elde edilen bant yoğunluklarından protein miktarları belirlendi. Student T testi kullanılarak MCF10A ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi ile MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerin arasındaki caytaxin protein ekspresyon farkları analiz edildi. p değerinin 0.05'ten küçük olduğu farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kültürü yapılan hücrelerin canlılık ve doluluk oranı

Çalışmada ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücre hattı (MCF10A) ve iki meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231ve MCF7) kullanıldı. Çalışmalarda tüm hücre hatlarında % 70'lik doluluk oranına gelene kadar inkübe edildi. Hücrelerin % 70 doluluk oranında morfolojilerinin sağlıklı olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).

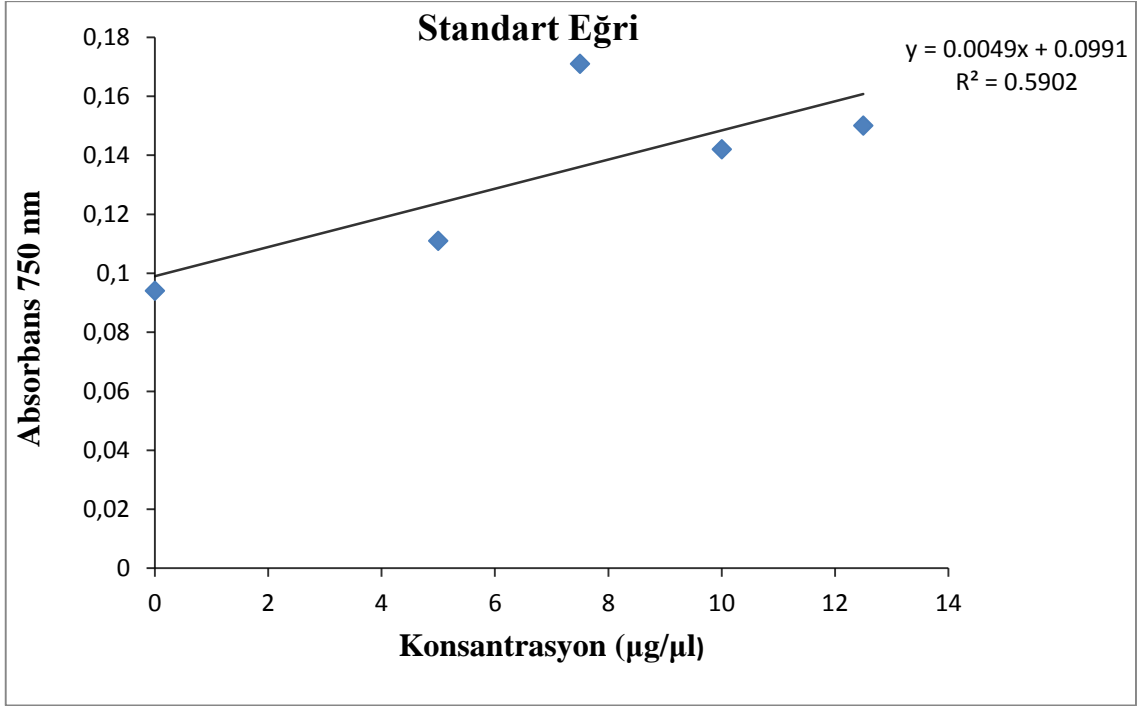


Şekil 4.1. % 70 doluluk oranında lizis'i yapılan hücrelerin morfolojileri

Doluluk oranı geçilmediğinden dolayı hücrelerin karakterlerini kaybetmedikleri ve morfolojilerinde bir değişim olmadığı görülmektedir.

4.2. İlk Hücre Kültürü Sonrası Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

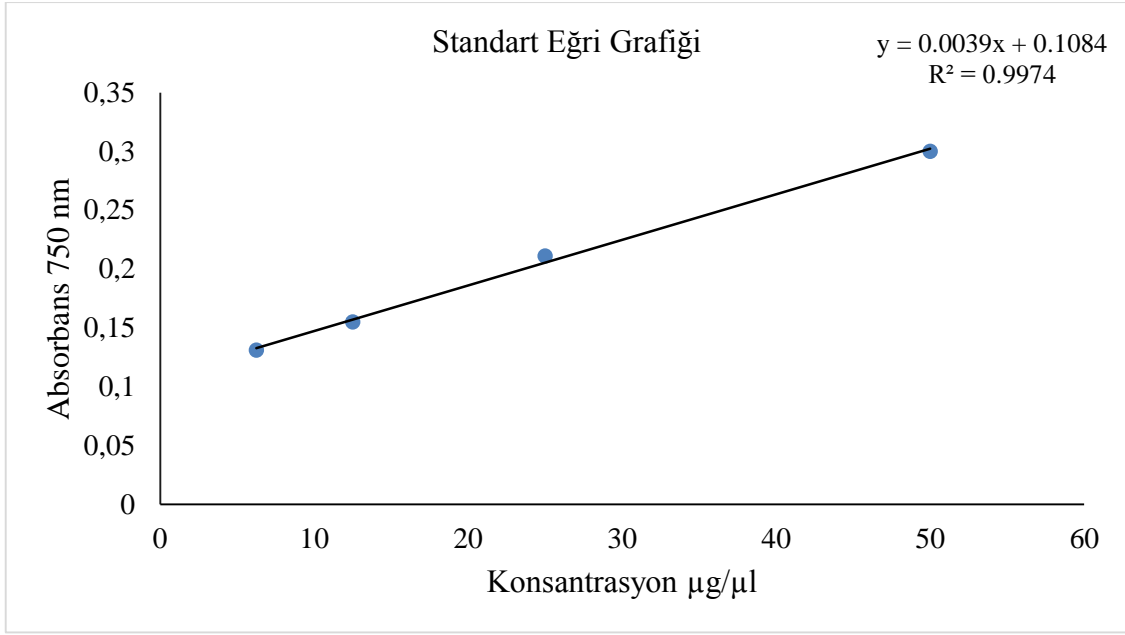
Western blotlamada eşit protein yüklemesi için her bir lizatın protein içeriklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Total protein miktarının belirlenmesi için lowry yöntemine göre yapılan ilk denemede R^2 değeri 0.5902 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuç kullandığımız yöntemin optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Lizatların spektrofotometrede ölçüm sonuçlarını değerlendirmek için hazırlanan 12,5, 10, 7,5, 5 ve 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'lik BSA standardının ölçüm eğrisi

Lowry Yönteminin laboratuvarımıza standardizasyonu için kullanılan Lowry solüsyonundaki kimyasallarının miktarları değiştirildi. Elde edilen yeni konsantrasyon eğrisinde R^2 değeri 0.9974 olarak saptandı. Yapılan tekrarlar sonucunda R^2 değeri her defasında 0.99'un üzerinde tespit edildiğinden yeni kimyasal oranları kullandığımız Lowry yöntemi tüm deneyler için kullanıldı. Lowry yöntemi laboratuvarımızda optimize edilmiş haliyle materyal metod kısmında yer almaktadır.

Yapılan hücre kültürü sonrasında hücre lizatlarında total protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Tablo 4.1)



Şekil 4.3. Lizatların spektrofotometre de ölçüm sonuçlarını değerlendirmek için 50, 25, 12.5 ve 6.25µg/µl olarak hazırlanan BSA standardının ölçüm eğrisi

Tablo 4.1. Spektrofotometrede ölçümü yapılan hücre lizatlarının absorbans değerleri

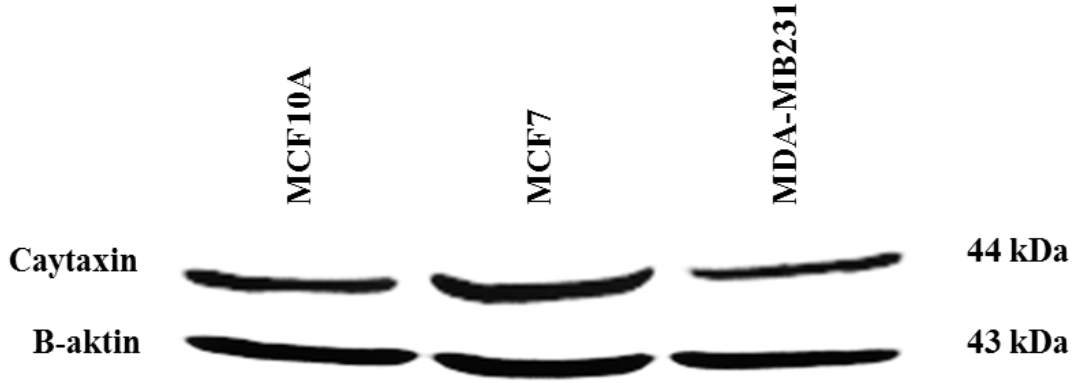
	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
Absorbans	0.415	0.539	0.326

Standart eğriden elde edilen $y=0.0039x+0.1084$ denklemi kullanılarak her örnekten yükleme yapılacak miktar belirlendi.

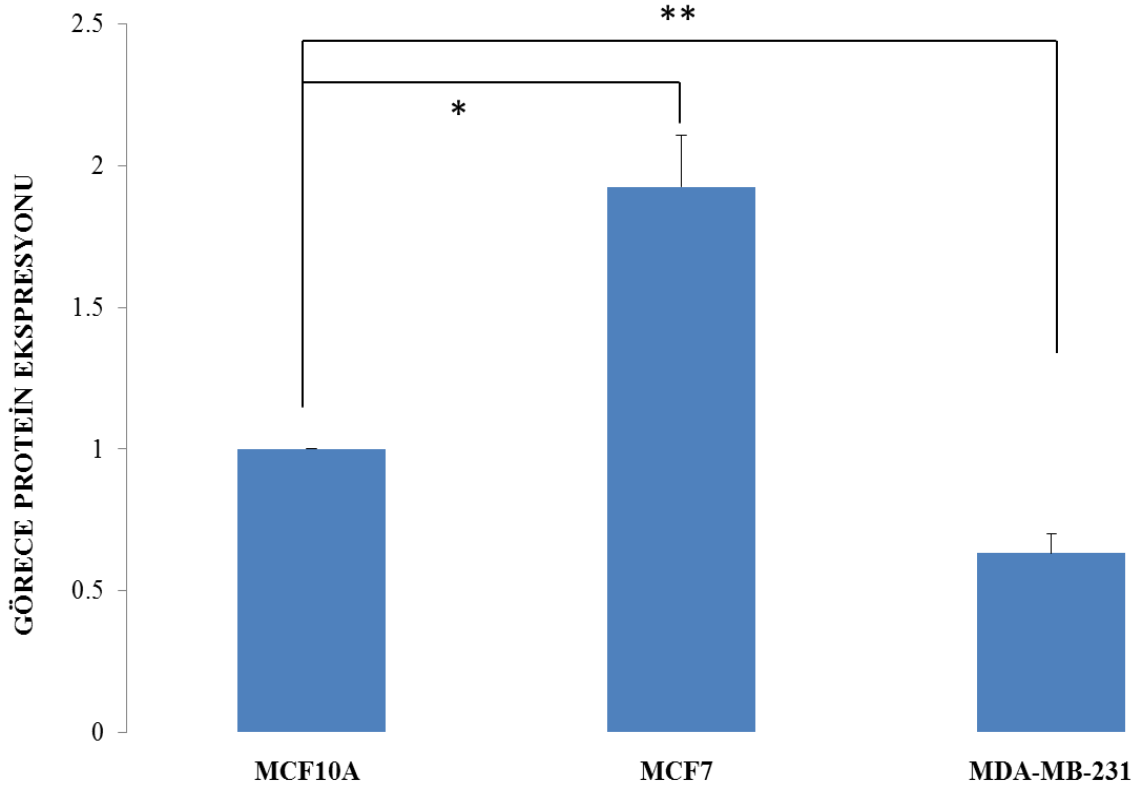
4.3. Hücre Hatlarında Caytaxin Ekspresyonunun Belirlenmesi

Literatürde bulunan çalışmalarda caytaxin ekspresyonunun nöronal dokulara sınırlı olduğu belirtilmiştir (9). Çalışmamızda meme kanseri ve ölümsüzleştirilmiş meme epiteli hücrelerinde caytaxin ekspresyonu araştırıldı. Bulgularımıza göre ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücrelerindeki caytaxin ekspresyonu ile kıyaslandığında MCF7 meme kanseri hücrelerinde 1.925 ± 0.826 ($p<0.05$) kat daha fazla caytaxin ekspresyonu görülürken, MDA-MB-231'de 0.632 ± 0.117 ($p<0.0001$) kat daha az caytaxin ekspresyonu olduğu görüldü (Şekil 4.4).

A-



B-



Şekil 4.4. Caytaxin ölümsüzleştirilmiş meme epitel ve meme kanseri hücre hatlarında eksprese edilmektedir. A- Tüm hücre hatlarında caytaxin ekspresyonu western blot tekniği ile gösterildi. B- MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında caytaxin ekspresyonu ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücre hattına göre anlamlı derecede farklıdır. (* p<0.05, ** p<0.0001)

5. TARTIŞMA

Bu tezde 371 aminoasit uzunlukta olan caytaxin proteinin kanser hücrelerindeki ekspresyon durumuna bakıldı. Kanserde ki durumunun belirlenmesi için MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları, kanser ile normal hücrelerdeki ekspresyonunu değerlendirmek için MCF10A ölümsüzleştirilmiş normal meme epitel hücre hattı kullanıldı. Yapılan çalışma sonrasında caytaxin proteininin meme kanseri hücre hatlarında eksprese edildiği, ekspresyon düzeylerinin ise ölümsüzleştirilmiş normal meme epiteline göre MCF7’de daha fazla, MDA-MB-231’de ise daha düşük olduğu belirlendi.

Bu güne kadar caytaxin proteini ile ilgili yapılan çalışmalarda bu proteinin beyin korteks, serebellum ve olfaktor bölgelerde baskın olduğu belirlenmiştir (9). Sikora ve arkadaşlarının farelerle yaptıkları fenotip ve caytaxin ekspresyonu eşleştirme çalışmasında, çeşitli fare, rat normal nöral dokular ve çeşitli tümör dokuları yanında insan nöroblastoma, insan glioma hücrelerinde de caytaxin ekspresyonuna bakılmıştır. Bu çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında caytaxin ekspresyonu gösterilmişken A172, 132-1N1 insan glioma hücrelerinde ise caytaxin ekspresyonu gösterilememiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan kanser hücre hatları yine bir nöral dokudan köken almaktadır ve bu kanserlerdeki caytaxin fonksiyonları hakkında herhangi bir bilgi verilmemektedir (82). Literatürde caytaxin proteininin kanserle olan ilişkisi ile ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar indirekt çalışmalar olup endojen caytaxin seviyelerinin veya endojen caytaxin fonksiyonlarının irdelendiği çalışmalar değildir. Bu çalışmalarda rat feokromasitoma hücre hattı PC12 (62), insan embriyonik böbrek hücreleri HEK293T (75), fare embriyonik karsinoma P19 (62) ve MCF7 (75) meme kanseri hücre hatlarına caytaxin eksprese eden plazmidler transfekte edilmiştir. MCF7 hücre hattı ile yapılan çalışmada GFP işaretli caytaxin eksprese eden plazmid transfekte edilmiş, oluşan GFP işaretli caytaxin’in hücrenin ileri (leading) uçlarına yerleştiği gösterilmiş olup bunun dışında bir çalışma yapılmamıştır. Yaptığımız bu çalışma ile caytaxin proteininin ilk kez hem ölümsüzleştirilmiş normal meme epitel hücre hattında hem de meme kanseri hücre hatlarında eksprese edildiğini

belirlemiş olduk. Caytaxin'in hücredeki ekspresyonunun hangi mekanizmalar ile aktive edildiği ve meme kanserinde ne tür fonksiyonlar gösterdiği bilinmemektedir.

Sonuçta literatürden farklı olarak bu proteinin normal meme epitelinde ve meme kanseri hücre hatlarında da eksprese edildiği ilk kez belirlendi. Çalışmamızda ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücre hattı MCF10A ile MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları caytaxin ekspresyonu açısından kıyaslandığında caytaxin ekspresyonunun MCF7 hücre hattında daha yüksek MDA-MB-231 hücre hattında ise daha az olduğu tespit edilmiştir. Hücre hatları arasındaki bu ekspresyon farklarının ise birkaç nedeni olabilir. İlk olarak, bu farklılık kullanılan hücre hatlarının özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. MCF7 hücre hattı, ER+/PR+ iken MDA-MB-231 hücre hattı ER-/PR- tir (83, 84). MCF7 hücreleri sahip oldukları bu reseptörler ile hücrede MAPK, cAMP ve mTOR sinyal kaskadlarını aktive etmektedirler (85, 86). Caytaxin proteininin hücrede ekspresyonunu sağlayan ya da arttıran mekanizma bilinmediğinden, bu sinyal mekanizmalarından birinin veya bir kaçının östrojen ile aktive olması ile caytaxin ekspresyonunda artış meydana geldiği düşünülebilir. Literatürde östrojenin bazı proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. MCF7 hücrelerinde artan östrojen miktarının SIRT6 (87), siklin D1 (88), CerS4, CerS6 (89), E-kadherin (90), KRT19 (90) ve katepsin D (91) gibi pek çok proteinin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. Caytaxinin de bu proteinlerden biri olabileceği düşünülebilir.

İkinci olarak, ekspresyon farklılığı daha önce belirtildiği üzere caytaxinin kaspaz-3'ün substratı olmasıdır (10). Kaspazlar, çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunmuş, sistein aspartat-spesifik proteazların bir ailesidir ve apoptozun merkezi düzenleyicileri olarak fonksiyon göstermektedirler (92). Kaspazlar apoptotik mekanizmanın değişmez oyuncularını olarak bilirse de yapılan çalışmalar bu protein sınıfının apoptoz dışında birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir. Kaspaz-3'ün B hücre proliferasyonunu düzenleyerek adaptif immün cevabı etkileyebildiği, bu nedenle B hücre homeostazının düzenlenmesinde gerekli olduğu anlaşılmıştır (93). Lens epitel hücreleri, eritroblastlar, megakaryositler ve keratinositler gibi belirli hücre tiplerinin terminal farklılaşması çekirdeğin eliminasyonunu gerektirmektedir. Kaspaz-3'ün de bu çekirdek apoptozunda rol oynadığı görülmüştür (94). Benzer şekilde iskelet kası hücrelerinin farklılaşması da kaspaz-3 aktivitesine bağlıdır (95). Kaspaz-3'ün rol oynadığı diğer bir olayda embriyonik kök hücrelerde, 3 germ tabakasının oluşturularak

somatik hücre tiplerine farklılaşmadır. Kaspaz-3 eksikliğinde embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasında defektler olduğu görülmüştür yani kaspaz aktivitesinin embriyonik kök hücrelerde farklılaşmaya aracılık ettiği belirlenmiştir (96). Yukarıda belirtilen rollerinin dışında sinirsel gelişimde ve sinaptik aktivitede düzenleyici bir molekül olarak fonksiyon gösterdiği anlaşılmıştır (92). Kaspaz-3 tam uzunluktaki caytaxin proteinin 106. pozisyonda bulunan aspartat aminoasidinden keserek N- ve C-terminal olmak üzere iki farklı fragment oluşturmaktadır (10). Sitozoldeki caytaxinin kaspaz-3 tarafından parçalanması da hücreler arasındaki ekspresyon farklılığını açıklayabilir. Bu durumda parçalanmış kısımların western blot membranında tespit edilmesi beklenebilir. Ancak oluşan fragmentlerin çalışmada kullanılan antikorla tanınmama veya proteinlerin jelde yürütülmesi sırasında daha hızlı hareket ederek jelin dışına çıkmış olma ihtimalleri göz önüne alınmalıdır. MCF7 hücre hattında kaspaz-3'ün kodlandığı gende meydana gelen mutasyon sonrası aktif kaspaz-3'ün oluşturulamaması MCF7'deki caytaxin ekspresyon artışını açıklayabilir. Benzer şekilde kaspaz-3 eksprese etmeyen B lenfosit hücrelerinde, p21 protein seviyesinin arttığı bunun nedeninin ise; p21'in kaspaz-3'ün substratı olması ve kaspaz-3 eksikliğinden dolayı p21 miktarının artmasıdır (97).

Son olarak, MLK3, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ile aktive edilen ve göç, invazyon, proliferasyon ve apoptozda önemli fonksiyonları olan bir proteindir. Blessing ve arkadaşlarının SKOV3 ve TOV21G over kanseri hücre hatları ile yaptıkları çalışmada MLK3'ün CHIP E3 Ubiquitin Ligaz tarafından ubiquitlendiği ve proteozomlarla yıkılıp ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (98). Caytaxin ile etkileşime girdiği belirlenen ilk protein CHIP E3 Ubiquitin ligaz'dır. Caytaxin'in CHIP E3 ubiquitin ligaz tarafından ubiquitinlenip yıkılmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (66). Çalışmamızda elde ettiğimiz hücreler arası caytaxin ekspresyon farklılığı, MLK3 proteininin yıkımında olduğu gibi, caytaxinin CHIP E3 Ubiquitin Ligaz aracılı yıkımından kaynaklanabilir. Bu hipoteze göre CHIP E3 Ubiquitin Ligaz aktivitesi MDA-MB-231 hücrelerinde artarken MCF7 hücrelerinde baskılanmış olmalıdır. Bu hipotezin CHIP E3 Ubiquitin Ligaz aşırı ekspresyonu ve proteozom inhibitörleri kullanılarak test edilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, caytaxin'in sahip olduğu BCH domaini, glutamat sentezine olan etkileri, kaspaz-3 ile ilişkisi, ubiquitinasyon yolu ile parçalanması, MAPK yolağı ile ilişkileri aracılığıyla meme kanseri patogenezeine katkı sunduğı hipotezi test edildi. Literatürde hakkında çok az bilgi bulunan caytaxin proteininin ekspresyon düzeyleri araştırıldı ve literatürden farklı olarak caytaxin'in hem meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA-MB-231'de hem de ölümsüzleştirilmiş normal meme epitel hücre hattı MCF10A'da eksprese edildiğı belirlendi. Ancak bu proteinin ekspresyon düzeylerinin ne anlama geldiğı ve kanser oluşum ve ilerleme süreçlerindeki rolünün ne olduğı konusunda kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. ve Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61 (2), 69-90.
2. Claus, E. B., Schildkraut, J. M., Thompson, W. D. ve Risch, N. J. (1996). The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*, 77 (11), 2318-24.
3. Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., Prat, A., Perou, C. M. & Sherman, M. E. (2014). How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst* 106.
4. Samavat, H. ve Kurzer, M. S. (2014). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett*
5. Smith, I. E. ve Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 348 (24), 2431-42.
6. Clarke, M. J. (1998). Ovarian ablation in breast cancer, 1896 to 1998: milestones along hierarchy of evidence from case report to Cochrane review. *BMJ*, 317 (7167), 1246-8.
7. Fang, L., Barekati, Z., Zhang, B., Liu, Z. ve Zhong, X. (2011). Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss Med Wkly*, 141 w13231.
8. Seal, R. L., Gordon, S. M., Lush, M. J., Wright, M. W. & Bruford, E. A. (2011). genenames.org: the HGNC resources in 2011. *Nucleic Acids Res* (39), D514-9.
9. Bomar, J. M., Benke, P. J., Slattery, E. L., et al. (2003). Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse. *Nat Genet*, 35 (3), 264-9.
10. Itoh, M., Li, S., Ohta, K., Yamada, A., Hayakawa-Yano, Y., Ueda, M., Hida, Y., Suzuki, Y., Ohta, E., Mizuno, A., Banno, Y. ve Nakagawa, T. (2011). Cayman ataxia-related protein is a presynapse-specific caspase-3 substrate. *Neurochem Res*, 36 (7), 1304-13.
11. Lorden, J. F., McKeon, T. W., Baker, H. J., Cox, N. & Walkley, S. U. (1984). Characterization of the rat mutant dystonic: a new animal model of dystonia musculorum deformans. *J Neurosci* (4), 1925-32.

12. Ariel, I. M. ve Cleary, J. B. (1987). McGraw-Hill.
13. Beenken S.W., Wanger F.B., Bland K.I. (2004). KI Bland and Copeland III. St Loise: Saunders-Elsevier
14. Haagensen, C. D. (1986). Saunders.
15. Donegan W.L., Spratt J.S. (2002). History of Breast Cancer (5.bsk). St Louisville: Saunders
16. Kuzey G.M. (2007). Temel Patoloji. Ankara: Güneş Kitabevi
17. Yiannakopoulou, E. (2014). Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*, 37 (1), 1-8.
18. Apostolou, P. ve Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*, (2013), 747318.
19. Mahdi, K. M., Nassiri, M. R. ve Nasiri, K. (2013). Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (6), 3403-09.
20. Silva, F. C., Lisboa, B. C., Figueiredo, M. C., Torrezan, G. T., Santos, E. M., Krepischi, A. C., Rossi, B. M., Achatz, M. I. ve Carraro, D. M. (2014). Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet*, 15 55.
21. Tonin, P., Weber, B., Offit, K., Couch, F., Rebbeck, T. R., Neuhausen, S., Godwin, A. K., Daly, M., Wagner-Costalos, J., Berman, D., Grana, G., Fox, E., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Krainer, M., Haber, D. A., Struewing, J. P., Warner, E., Rosen, B., Lerman, C., Peshkin, B., Norton, L., Serova, O., Foulkes, W. D., Garber, J. E. ve et al. (1996). Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med*, 2 (11), 1179-83.
22. Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108 (2), 171-82
23. Althuis, M. D., Fergenbaum, J. H., Garcia-Closas, M., Brinton, L. A., Madigan, M. P. ve Sherman, M. E. (2004). Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (10), 1558-68.

24. Kampert, J. B., Whittemore, A. S. ve Paffenbarger, R. S., Jr. (1988). Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol*, 128 (5), 962-979.
25. Trichopoulos, D., MacMahon, B. ve Cole, P. (1972). Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 48 (3), 605-13.
26. Ritte, R., Tikk, K., Lukanova, A., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Dossus, L., Fournier, A., Clavel-Chapelon, F., Grote, V., Boeing, H., Aleksandrova, K., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Berrino, F., Mattiello, A., Tumino, R., Sacerdote, C., Quiros, J. R., Buckland, G., Molina-Montes, E., Chirlaque, M. D., Ardanaz, E., Amiano, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Gils, C. H., Peeters, P. H., Wareham, N., Khaw, K. T., Key, T. J., Travis, R. C., Weiderpass, E., Dumeaux, V., Lund, E., Sund, M., Andersson, A., Romieu, I., Rinaldi, S., Vineis, P., Merritt, M. A., Riboli, E. ve Kaaks, R. (2013). Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer: a cohort study. *BMC Cancer*, 13 584.
27. Hartz, A. J. ve He, T. (2013). Cohort study of risk factors for breast cancer in post menopausal women. *Epidemiol Health*, (35), 2013003.
28. Nagata, C., Kabuto, M., Takatsuka, N. ve Shimizu, H. (1997). Associations of alcohol, height, and reproductive factors with serum hormone concentrations in postmenopausal Japanese women. Steroid hormones in Japanese postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat*, 44 (3), 235-41.
29. Bowlin, S. J., Leske, M. C., Varma, A., Nasca, P., Weinstein, A. ve Caplan, L. (1997). Breast cancer risk and alcohol consumption: results from a large case-control study. *Int J Epidemiol*, 26 (5), 915-23.
30. Wu, A. H., Vigen, C., Razavi, P., Tseng, C. C. ve Stanczyk, F. Z. (2012). Alcohol and breast cancer risk among Asian-American women in Los Angeles County. *Breast Cancer Res*, 14 (6), 151.
31. Reichman, M. E., Judd, J. T., Longcope, C., Schatzkin, A., Clevidence, B. A., Nair, P. P., Campbell, W. S. ve Taylor, P. R. (1993). Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 85 (9), 722-7.

32. Zheng, W., Gustafson, D. R., Sinha, R., Cerhan, J. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K. E., Kushi, L. H., Sellers, T. A. ve Folsom, A. R. (1998). Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90 (22), 1724-9.
33. Boyd, N. F., Martin, L. J., Noffel, M., Lockwood, G. A. ve Trichler, D. L. (1993). A meta-analysis of studies of dietary fat and breast cancer risk. *Br J Cancer*, 68 (3), 627-36.
34. Link, L. B., Canchola, A. J., Bernstein, L., Clarke, C. A., Stram, D. O., Ursin, G. ve Horn-Ross, P. L. (2013). Dietary patterns and breast cancer risk in the California Teachers Study cohort. *Am J Clin Nutr*, 98 (6), 1524-32.
35. Sangrajrang, S., Chaiwerawattana, A., Ploysawang, P., Nooklang, K., Jamsri, P. ve Somharnwong, S. (2013). Obesity, diet and physical inactivity and risk of breast cancer in thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (11), 7023-7.
36. Engin K. (2005). Meme Kanserleri. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi
37. Thomas, H. V., Reeves, G. K. & Key, T. J. (1997). Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control*,(8), 922-8.
38. Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C. ve Mulvihill, J. J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*, 81 (24), 1879-86.
39. Cauley, J. A., Song, J., Dowsett, S. A., Mershon, J. L. ve Cummings, S. R. (2007). Risk factors for breast cancer in older women: the relative contribution of bone mineral density and other established risk factors. *Breast Cancer Res Treat*, 102 (2), 181-8.
40. Parkin, D. M., Boyd, L. & Walker, L. C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*, (105 Suppl 2), 77-81.
41. Parkin, D. M., Namboozee, S., Wabwire-Mangen, F. & Wabinga, H. R. (2010). Changing cancer incidence in Kampala, Uganda, 1991-2006. *Int J Cancer* (126), 1187-95.
42. Aydıner, A., Topuz, E., Aykan, Faruk. (2006). Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri

43. Simpson, P. T., Gale, T., Fulford, L. G., Reis-Filho, J. S. ve Lakhani, S. R. (2003). The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. *Breast Cancer Res*, 5 (5), 258-62.
44. O'Malley, F. P. (2010). Lobular neoplasia: morphology, biological potential and management in core biopsies. *Mod Pathol*, (23 Suppl 2) 14-25.
45. Beute, B. J., Kalisher, L. ve Hutter, R. V. (1991). Lobular carcinoma in situ of the breast: clinical, pathologic, and mammographic features. *AJR Am J Roentgenol*, 157 (2), 257-65.
46. Beenken S.W.,Wanger F.B.,Bland K.I. (2004). KI Bland and Copeland II. St Loise: Saunders-Elsevier
47. Roses, D.F. (2005). Breast Cancer (2.bsk). New York: Elsevier
48. Lopez-Tarruella, S. ve Martin, M. (2009). Recent advances in systemic therapy: advances in adjuvant systemic chemotherapy of early breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11 (2), 204
49. Osborne, C. K., Yochmowitz, M. G., Knight, W. A., 3rd ve McGuire, W. L. (1980). The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46 (12 Suppl), 2884-8.
50. Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K. ve Allred, D. C. (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17 (5), 1474-81.
51. Osborne, C. K., Zhao, H. ve Fuqua, S. A. (2000). Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol*, 18 (17), 3172-86.
52. Leyland-Jones, B. (2002). Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol*, 3 (3), 137-44.
53. Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J. ve Press, M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20 (3), 719-26.

54. Tevaarwerk, A. J. ve Kolesar, J. M. (2009). Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin Ther*, (31 Pt 2), 2332-48.
55. Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M. ve Sliwkowski, M. X. (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5 (4), 317-28.
56. De, P. ve Leyland-Jones, B. (2010). Whither HER2-related therapeutics? *J Clin Oncol*, 28 (7), 1091-96.
57. Baselga, J., Gelmon, K. A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P., Miles, D., Bianchi, G., Cortes, J., McNally, V. A., Ross, G. A., Fumoleau, P. ve Gianni, L. (2010). Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*, 28 (7), 1138-44.
58. Johnson, W.G., Murphy, M., Murphy, W.I., Bloom, A.D. (1978). Recessive Congenital cerebellar disorder in a genetic isolate: CPD type VII?. *Neurology*, (28),352-3
59. Brown, L., Mueller, M., Benke, P.J. (1984). A non progressive cerebellar ataxia n Grand Cayman Island. *Neurology*, (34), 273.
60. Nystuen, A., Benke, P. J., Merren, J., Stone, E. M. ve Sheffield, V. C. (1996). A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. *Hum Mol Genet*, 5 (4), 525-31.
61. Boyd, J. M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L. K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C. ve Chinnadurai, G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*, 79 (2), 341-51.
62. Buschdorf, J. P., Li Chew, L., Zhang, B., Cao, Q., Liang, F. Y., Liou, Y. C., Zhou, Y. T. ve Low, B. C. (2006). Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J Cell Sci*, 119 (Pt 16), 3337-50.

63. Zhou, Y. T., Guy, G. R. ve Low, B. C. (2005). BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Exp Cell Res*, 303 (2), 263-74.
64. Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., Manor, D. ve Atkinson, J. (2003). Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry*, 42 (21), 6467-74.
65. Gupta, A. B., Wee, L. E., Zhou, Y. T., Hortsch, M. ve Low, B. C. (2012). Cross-species analyses identify the BNIP-2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain as a distinct functional subclass of the CRAL_TRIO/Sec14 superfamily. *PLoS One*, 7 (3), 33863.
66. Grelle, G., Kostka, S., Otto, A., Kersten, B., Genser, K. F., Muller, E. C., Walter, S., Boddich, A., Stelzl, U., Hanig, C., Volkmer-Engert, R., Landgraf, C., Alberti, S., Hohfeld, J., Strodicke, M. ve Wanker, E. E. (2006). Identification of VCP/p97, carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP), and amphiphysin II interaction partners using membrane-based human proteome arrays. *Mol Cell Proteomics*, 5 (2), 234-44.
67. Cabral Miranda, F., Adao-Novaes, J., Hauswirth, W. W., Linden, R., Petrs-Silva, H. & Chiarini, L. B. (2014). CHIP, a carboxy terminus HSP-70 interacting protein, prevents cell death induced by endoplasmic reticulum stress in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* (8), 438.
68. Dickey, C. A., Patterson, C., Dickson, D. & Petrucelli, L. (2007). Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*, (13), 32-8.
69. Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S. H., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K. & Yanagisawa, J. (2009). The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol*, (11), 312-9
70. Takano, T., Lin, J. H., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J. & Nedergaard, M. (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med*, (7), 1010-5.
71. Shin, S. S., Martino, J. J. & Chen, S. (2008). Metabotropic glutamate receptors (mGlu) and cellular transformation. *Neuropharmacology*, (55), 396-402.

72. Buschdorf, J. P., Chew, L. L., Soh, U. J., Liou, Y. C. ve Low, B. C. (2008). Nerve growth factor stimulates interaction of Cayman ataxia protein BNIP-H/Caytaxin with peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in differentiating neurons. *PLoS One*, 3 (7), 2686.
73. Driver, J. A., Zhou, X. Z. ve Lu, K. P. (2014). Regulation of protein conformation by Pin1 offers novel disease mechanisms and therapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Discov Med*, 17 (92), 93-99.
74. Liou, Y. C., Zhou, X. Z. ve Lu, K. P. (2011). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci*, 36 (10), 501-514.
75. Aoyama, T., Hata, S., Nakao, T., Tanigawa, Y., Oka, C. ve Kawaichi, M. (2009). Cayman ataxia protein caytaxin is transported by kinesin along neurites through binding to kinesin light chains. *J Cell Sci*, 122 (Pt 22), 4177-85.
76. Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*,(7), 295-308.
77. Pan, C. Q. & Low, B. C. (2012). Functional plasticity of the BNIP-2 and Cdc42GAP Homology (BCH) domain in cell signaling and cell dynamics. *FEBS Lett*,(586), 2674-91.
78. Tekedereli, I., Alpay, S. N., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, H. D., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G. & Ozpolat, B. (2013). Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*,(2), 121.
79. Shao, L., Tekedereli, I., Wang, J., Yuca, E., Tsang, S., Sood, A., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B. & Ittmann, M. (2012). Highly specific targeting of the TMPRSS2/ERG fusion gene using liposomal nanovectors. *Clin Cancer Res*,(18), 6648-57.
80. Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R. & Goulding, K. W. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol Biochem*, (67), 166-173.

81. Borahay, M. A., Lu, F., Ozpolat, B., Tekedereli, I., Gurates, B., Karipcin, S. & Kilic, G. S. (2013). Mullerian inhibiting substance suppresses proliferation and induces apoptosis and autophagy in endometriosis cells in vitro. *ISRN Obstet Gynecol*,(2013), 361489.
82. Sikora, K. M., Nosavanh, L. M., Kantheti, P., Burmeister, M. & Hortsch, M. (2012). Expression of Caytaxin protein in Cayman Ataxia mouse models correlates with phenotype severity. *PLoS One*, (7), 50570.
83. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adelaide, J., Cervera, N., Fekairi, S., Xerri, L., Jacquemier, J., Birnbaum, D. & Bertucci, F. (2006). Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*,(25), 2273-84.
84. Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. & Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*,(10), 515-27.
85. Soltysik, K. & Czekaj, P. (2013). Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J Physiol Pharmacol*,(64), 129-42.
86. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, (146), 624-32.
87. Khongkow, M., Olmos, Y., Gong, C., Gomes, A. R., Monteiro, L. J., Yague, E., Cavaco, T. B., Khongkow, P., Man, E. P., Laohasinnarong, S., Koo, C. Y., Harada-Shoji, N., Tsang, J. W., Coombes, R. C., Schwer, B., Khoo, U. S. & Lam, E. W. (2013). SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis*,(34), 1476-86.
88. Mauro, L., Pellegrino, M., Giordano, F., Ricchio, E., Rizza, P., De Amicis, F., Catalano, S., Bonofiglio, D., Panno, M. L. & Ando, S. (2015). Estrogen receptor-alpha drives adiponectin effects on cyclin D1 expression in breast cancer cells. *FASEB J*.

89. Schiffmann, S., Sandner, J., Birod, K., Wobst, I., Angioni, C., Ruckhaberle, E., Kaufmann, M., Ackermann, H., Lotsch, J., Schmidt, H., Geisslinger, G. & Grosch, S. (2009). Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis*,(30), 745-52.
90. Bateman, N. W., Sun, M., Hood, B. L., Flint, M. S. & Conrads, T. P. (2010). Defining central themes in breast cancer biology by differential proteomics: conserved regulation of cell spreading and focal adhesion kinase. *J Proteome Res*, (9), 5311-24.
91. In, S. J., Kim, S. H., Go, R. E., Hwang, K. A. & Choi, K. C. (2015). Benzophenone-1 and Nonylphenol Stimulated MCF-7 Breast Cancer Growth by Regulating Cell Cycle and Metastasis-Related Genes Via an Estrogen Receptor alpha-Dependent Pathway. *J Toxicol Environ Health A*,(78), 492-505.
92. D'Amelio, M., Cavallucci, V. & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ*,(17), 1104-14
93. Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G. S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G. E., Paige, C. J. & Mak, T. W. (2003). Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol*,(4), 1016-22.
94. Bassnett, S. & Mataic, D. (1997). Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol*,(137), 37-49.
95. Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S. & Megeney, L. A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (99), 11025-30.
96. Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A. & Zwaka, T. P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, (2), 595-601.
97. Levkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J. M. & Ross, R. (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*,(1), 553-63.

98. Blessing, N. A., Brockman, A. L. & Chadee, D. N. (2014). The E3 ligase CHIP mediates ubiquitination and degradation of mixed-lineage kinase 3. *Mol Cell Biol*,(34), 3132-43

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge

13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayı ile T.C. Resmi Gazetede yayınlanan “klinik araştırmalar hakkında yönetmelik’in Birinci Bölümünün 2. Maddesinin 1. Fıkrası (Bu yönetmelik, biyoyararlanım ve biyoedeğerlik çalışmaları dahil, ruhsat veya izin alınmamış olsa dahi insanlar üzerinde yapılacak olan ilaç, tıbbi ve biyolojik ürünler ile bitkisel ürünlerin klinik araştırmaları, klinik araştırma yerlerini ve bu araştırmaları gerçekleştirilecek gerçek veya tüzel kişileri kapsar.) gereğince bu çalışmanın, bir klinik araştırma değil sadece laboratuvar çalışması olması sebebiyle Etik Kurul kararı alınmamıştır.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİSEL

Adı Soyadı : Sakine YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya- 1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (Türkçe) Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D – Araş. Gör. (2015-***)

İLETİŞİM

E-posta adresi : sakineyilmaz_89@hotmail.com