

**T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN
ENDOPEROKSİD H SENTAZ 2 (PTGS2), KALRETİKULİN (CALR) VE
KERATİN-19 (KRT19) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA
ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

DUYGU KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL-2020

**T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MDAMB-231 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROTAGLANDİN
ENDOPEROKSİD H SENTAZ 2 (PTGS2), KALRETİKULİN (CALR) VE
KERATİN-19 (KRT19) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA
ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

DUYGU KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL-2020

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT

Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığımı beyan ederiz.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT

Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR

İstinye Üniversitesi

İstinye Üniversitesi

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİD H SENTAZ 2 (PTGS2), KALRETİKULİN (CALR) VE KERATİN-19 (KRT19) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Duygu Kaya
16.01.2020

ÖZET

MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİD H SENTAZ 2 (PTGS2), KALRETİKULİN (CALR) VE KERATİN-19 (KRT19) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Duygu Kaya

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT

2020

Çalışmadaki amaç, bir meme kanseri hücre dizisi olan MDAMB-231’de prostaglandin endoperoksid h sentaz 2 (ptgs2), kalretikulin (calr) ve keratin-19 (krt19) genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır. Bu çalışmada hücre kültürü teknikleri, yarı manuel kit ile RNA izolasyonu, termal döngü cihazında cDNA sentezi ve eş zamanlı kantitatif PCR yöntemleri kullanılmıştır. Kültürlenmiş meme hücre hatlarından total RNA’lar ayrıştırılıp enzimatik olarak tamamlayıcı DNA’lara dönüştürülmüştür. PTGS2, CALR ve KRT19 genlerine özgü tasarlanmış olan primerler ile eş zamanlı PCR yapılmıştır.

Sonuç olarak 3 kez tekrarlı eş zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile MDAMB-231 hücre hattında PTGS2 gen ifadesinde 14,92 kat; CALR gen ifadesinde 1,45 kat; KRT19 geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu üç genin farklı kanserlerde, apoptoz direnci, metastatik dağılımlar, anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerde rol alabildiği tespit edilmiştir. KRT19, CALR, PTGS2 genlerinin meme kanseri gelişiminde rol aldığı ve ileride yapılacak detaylı çalışmalarla prognostik öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, eş-zamanlı PCR, gen anlatımı, PTGS2, CALR, KRT19

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF PROSTAGLANDIN ENDOPEROXID H SYNTHASE 2
(PTGS2), CALRETICULIN (CALR) AND KERATIN-19 (KRT19) GENES
EXPRESSION AT THE TRANSCRIPTION STAGE IN THE MDA-MB-231
BREAST CANCER CELL LINE**

Duygu Kaya

Medical Biology and Genetics Master Program

Advisor's: Asst. Prof. Sureyya BOZKURT

2020

The aim of the study was to determine and compare the gene expression of prostaglandin endoperoxide h synthase 2 (PTGS2), calreticulin (CALR) and keratin-19 (KRT19) genes in MDAMB-231 transcription-level, a breast cancer cell sequence. Cell culture techniques, RNA isolation with semi-manual kit, cDNA synthesis in thermal loop device and real time PCR methods were used in this study. Total RNAs from cultured breast cell lines were isolated and enzymatically converted into complementary DNA. PCR was used simultaneously with designed specific primers for the PTGS2, CALR, and KRT19 genes.

As a result, 3-time simultaneous PCR results were found to be 14.92 times higher in PTGS2 gene expression; 1.45 times higher in CALR gene expression; and 6.72 times higher in KRT19 gene expression in MDA MB-231 cell line by Delta Delta Ct calculation. These three genes have been found to play a role in different cancers, in biological processes such as apoptosis resistance, metastatic distributions, angiogenesis. KRT19, CALR, PTGS2 genes are involved in the development of breast cancer and may will have prognostic significance with detailed studies to be carried out in the future.

Keywords: Breast cancer, Real-time PCR, expression, PTGS2, CALR, KRT19

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan hem de hayatın her alanında motive eden hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT'a, teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi, deney aşamaları, deney malzemelerindeki yardımları, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin az kalacağı gerek deney, gerek tez yazım süresince, her sıkıntılı dönemimde, tüm nazıma katlanıp bana yardım eden değerli arkadaşım Hüseyin Ayhan'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Büşra Köse'ye, Hacer KOTAN'a Ceren AYNACI'ya, Hüma Tuğçe SEZGİN'e, Eqzona QIPA'ya, Elif ÇINAR'a, teşekkürlerimi sunarım.

Deneylelerimiz boyunca her şekilde yardım eden bölüm arkadaşımız Okan Remzi AKAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana gerekli tüm kolaylıkları sağlayan, uygun ortam hazırlayıp destek olan, sabır gösteren değerli iş arkadaşlarıma; değerli hocam Prof.Dr.Mahmut Nezih Çarin'e, stresli dönemimde bana sabır gösteren çalışma arkadaşlarım Lokman Karataş'a ve Ecem Ayşegül Sarıalioğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme ve yoğun çalışmalarım sırasında bana sabır gösterip yardım eden, her türlü nazıma katlanıp destek olan değerli nişanlım Emre Yiğit'e sonsuz teşekkürleri sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY

ETİK BEYANI

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 KANSER	1
1.1.1 Meme Kanseri	2
1.2 MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI VE AŞAMALARI.....	3
1.2.1 Patolojiye, İnvazivliğe ve Prevalansa Dayalı Meme Kanseri Tipleri	3
1.2.1.1 İnvaziv olmayan meme kanseri	3
1.2.1.2 İnvaziv veya infiltrate olan meme kanseri	4
1.2.1.3 İnvaziv karsinomlar	4
1.3 MEME KANSERİ VE ETİYOLOJİSİ.....	5
1.4 MEME KANSERİ GELİŞİMİ VE ETKİLİ OLAN GENLER	5
1.4.1 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	5
1.4.2 İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (HER2 / ERBB2).....	6
1.5 MEME KANSERİNDE SİNYAL YOLLARI	6
1.5.1 Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) Yolu.....	7
1.5.2 PI3K / AKT Yolu	7
1.5.3 Kalsiyum Sinyal Yolu	8
1.5.4 Notch Sinyal Yolu.....	8
1.5.5 Hedhedog Sinyal Yolu	8
1.5.6 JAK / STAT Sinyal Yolu	8
1.5.7 Anti-Apoptotik Sinyal Yolu.....	9
1.6 MEME KANSERİNDE TEDAVİ.....	9
1.7 MDA-MB-231 HÜCRE HATTI	9
1.8 CALR GENİ.....	10
1.9 KRT19 GENİ	11
1.10 PTGS2 GENİ.....	11
2. MATERYAL VE METOD	13
2.1 BESİYERİ DEĞİŞTİRME.....	13
2.2 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN PASAJLANMASI.....	13
2.3 HÜCRE SOYLARININ STOKLANMASI	14
2.4 HEMOSİTOMETRE İLE HÜCRELERİN SAYIMI	14
2.5 TOTAL RNA İZOLASYONU	16
2.6 CDNA SENTEZİ	17
2.7 GERÇEK ZAMANLI PCR.....	18
3. BULGULAR.....	20
3.1 GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARININ ANALİZİ.....	20
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
KAYNAKLAR	27
EKLER.....	37
A. ÖZGEÇMİŞ	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Meme Anatomisi	2
Şekil 1.2. Meme kanseri hücrelerinde çoğalma ve birkaç sinyal yolunun diyagramı .	7
Şekil 1.3. Kültürde MDA-MB-231 hücreleri.....	10
Şekil 2.1. Thoma Lamı Düzeni.....	14
Şekil 2.2. MDA-CNT.....	15
Şekil 3.1. PTGS2 Geninin Ct ve Tm grafiği.....	21
Şekil 3.2. CALR Geninin Ct ve Tm grafiği.....	21
Şekil 3.3. KRT19 Geninin Ct ve Tm grafiği.....	21



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri	17
Tablo 2.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri	17
Tablo 2.3. cDNA sentez reaksiyon aşamaları	18
Tablo 2.4. Primer dizilimleri	18
Tablo 2.5. qPCR reaksiyon bileşenleri	19
Tablo 2.6. qPCR döngüsü.....	19
Tablo 3.1. Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları	22



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
KRT19	: Cytokeratin 19
CALR	: Calreticulin
COX2	: Cyclooxygenase-2
cDNA	: Complementary DNA
DICS	: Ductal Carcinoma In Situ
IDC	: İnvaziv Ductal Karsinomu
ILC	: İnvaziv Lobüler Karsinom
ER	: Östrojen Reseptör
PR	: Progesteron Reseptör
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
HRG	: Heregulin
ERBB2	: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
RAS	: Rat sarcomavirus oncogene family
MEK	: Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
PTB	: Fosfotirozin - Bağlanma
PLCγ	: Fosfodiesteraz fosfolipaz C
TNBC	: Üçlü negatif / bazal benzeri meme kanseri
PTGS2	: Prostaglandin endoperoxide synthase-2
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
rpm	: Rounds per minute
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
μl	: Mikrolitre
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
Tm	: Melting temperature / Erime sıcaklığı
Ct	: Cycle of Treshold
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
Grb2	: Growth Factor Receptor-bound protein 2
OD	: Optic Density
PI3-K	: Fosfoinozid 3-Kinaz
EGR1	: Early Growth Response 1
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
CSC	: Kanser Kök Hücreleri
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Transisyon
PGHS	: Prostaglandin H Sentetaz
NSAII	: Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
CO₂	: Karbondioksit

cm	: Santimetre
M	: Molar
mL	: Mililitre
PGE2	: Prostaglandin E Synthase-2
RTE	: Reverse Transcription Enzyme
$\Delta\Delta Ct$: Delta Delta Cycle of Treshold
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
JAK	: Janus kinaz
STAT	: Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörü



GİRİŞ

Meme kanseri en sık görülen kanser türüdür ve ölüm nedenleri arasında ikinci sırada gelmektedir. Meme kanseri alanında yapılan birçok çalışmada, KRT19, CALR, COX-2 genlerinin tümör gelişimi, ilerlemesi, yayılması ve metastazı açısından önemi vurgulanmıştır. KRT19, CALR, COX-2 genlerinin ekspresyon mekanizmalarının ortaya çıkarılmasının yeni bilgiler sağlayabileceği ve yeni hedefler belirleyebileceği bildirilmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 KANSER

Kanser, genetik değişikliklerin düzenli olan sürece müdahalesi ile başlar. Hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Bu hücreler, tümör adı verilen bir kitle oluşturabilir. Bir tümör kötü veya iyi huylu olabilir.

Metastatik bir tümör çoğaldıkça, kan akımı veya lenfatik sistem kanser hücrelerini vücudun diğer kısımlarına taşıyabilir. Metastaz olarak bilinen bu süreçte kanser hücreleri çoğalır ve yeni tümörlere dönüşebilir (Caughran ve ark.,2018).

Bir kanserin yayıldığı ilk yerlerden biri lenf bezleridir. Lenf bezleri, enfeksiyonla savaşmaya yardımcı olan küçük organlardır. Boyun, kasık bölgesi ve kolların altı gibi vücudun farklı bölgelerinde küme şeklinde bulunurlar.

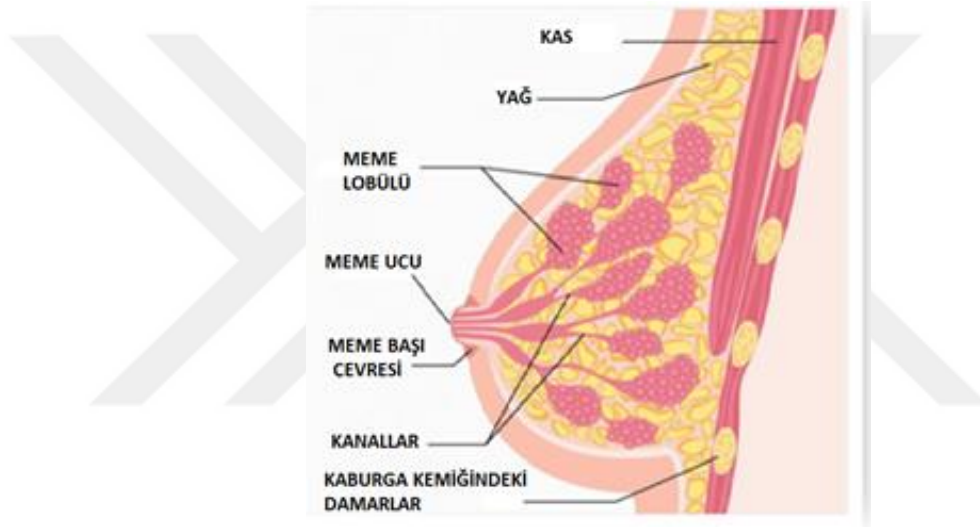
Kanser kan dolaşımı ile kemik, karaciğer, akciğer veya beyin gibi vücudun her bölgesine yayılabilir. Kanser ilk nerede başladıysa ona göre isimlendirilir. Örneğin, meme kanseri akciğerlere yayılırsa, akciğer kanseri değil, metastatik meme kanseri olarak adlandırılır.

Kanser vücudun hemen her yerine yayılabilir. Bazı kanser türleri vücudun belirli bölgelerine yayılma eğilimindedir. Örneğin meme kanseri kemik, karaciğer, akciğer, göğüs duvarı ve beyne yayılma eğilimindedir (Joshi ve ark.,2018).

1.1.1 Meme Kanseri

Kanser, oluştuğu vücut kısmından sonra adlandırılır; bu nedenle, meme kanseri, meme dokusundan kaynaklanan hücrelerin düzensiz büyümesini ve çoğalmasını ifade eder (Khuwaja ve ark.,2004).

Meme, iki ana doku türünden, yani glandüler dokulardan ve stromal dokulardan oluşur. Glandüler dokular süt üreten bezleri ve kanalları barındırırken, stromal dokular memenin yağlı ve lifli bağ dokularını içerir. Meme, hücresel sıvıları ve atıkları gideren lenfatik doku bağışıklık sistemi dokusundan da yapılıdır (Khuwaja ve ark.,2004).



Şekil 1.1. Meme Anatomisi

Meme kanseri uzun yıllardan beri yaygın olan ve farklı alt tipler içeren son derece heterojen bir hastalıktır. Meme kanserinin heterojenitesinin tanınmasında ilk adım, meme kanseri örneklerinin yaklaşık üçte ikisinde fonksiyonel hormonal reseptörlerin varlığının gösterilmesidir. Teknolojilerin geliştirilmesi ve özellikle tamamlayıcı DNA (cDNA) mikrodizilerinin kullanılması bize şimdi binlerce genin eşzamanlı analizini ve gen ekspresyon profilleri / genetik parmak izlerine dayalı yeni, daha rafine edilmiş meme kanserinin alt tiplerinin oluşturulmasını sağlamaktadır (Martín M. ,2006).

1.2 MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI VE AŞAMALARI

1.2.1 Patolojiye, İnvazivliğe ve Prevalansa Dayalı Meme Kanseri Tipleri

Kanallar, lobüller veya aralarındaki doku gibi memenin farklı bölgelerinde bulunan birçok meme kanseri türü vardır. Meme kanseri tipi, etkilenen spesifik hücreler tarafından belirlenir. Hangi hücre orijininin dahil olduğuna bağlı olarak, meme kanserleri, karsinomlar ve sarkomlar olmak üzere iki sınıfta incelenebilir. Karsinomlar, memenin epitelyal bileşeninden kaynaklanan meme kanserleridir. Bunlar, lobülleri düzenleyen hücreler ve süt üretiminden sorumlu terminal kanallarından oluşur. Sarkomlar, memenin stromal bileşenlerinden kaynaklanan, miyofibroblastları içeren çok nadir görülen bir meme kanseridir. Bazı durumlarda tek bir meme tümörü farklı hücre tiplerinin bir kombinasyonu olabilir (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

Çoğu meme kanseri karsinomdur. Büyük karsinom grubunda, primer tümör bölgelerine göre tanımlanmış birçok meme kanseri türü vardır. Çeşitli alt tipler arasında ayırım yapabilmek, her birinin farklı prognozları ve tedavi sonuçları olduğundan hayati öneme sahiptir. Patolojik özellikler ve invazivite kriterlerine göre, yaygın meme kanserleri üç ana gruba ayrılabilir: invaziv olmayan, invaziv ve metastatik meme kanserleri (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

1.2.1.1 *İnvaziv olmayan meme kanseri*

Yerinde Ductal karsinomu (DCIS; ayrıca intraductal karsinom olarak da bilinir): En yaygın meme kanseri türlerinden biri olan DCIS, önceden var olan normal kanalların içinde gelişen invaziv olmayan bir meme kanseridir (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

DCIS'in kendi invazif olmasa da, in situ karsinomların invazif kanser olma potansiyeli yüksektir, bu nedenle erken ve yeterli tedavi, hastanın invaziv kanser geliştirmesini önlemede önemlidir.

1.2.1.2 İnvaziv veya infiltrate olan meme kanseri

İnvaziv meme kanserleri, çevresindeki meme stromal dokusunda büyüyen normal meme lobları ve kanallarının dışına saldıran ve yayılan kanser hücrelerine sahiptir (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

1.2.1.3 İnvaziv karsinomlar

Lenf bezleri veya diğer organlar gibi vücudun diğer bölgelerine yayılma ve metastaz oluşturma ve böylece metastatik meme kanserlerinin sınıflandırmasına giren bir potansiyele sahiptir (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

İlgili doku ve hücre tiplerine dayanarak, invaziv meme kanserleri ayrıca aşağıdaki iki tipe ayrılır:

İnvaziv Duktal Karsinomu (IDC): IDC, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %80'i invaziv duktal karsinomlardan oluşan en yaygın meme kanseri türüdür (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

IDC sınıflandırması birkaç alt tip içerir: Memenin tübüler karsinoması, memenin medüller karsinoması, memenin müköz karsinomu, memenin papiller karsinoması ve memenin kribriform karsinomu (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

İnvaziv Lobüler Karsinom (ILC): ILC, en yaygın ikinci tip meme kanseridir ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. ILC her yaşta kadını etkileyebilse de, yaşlı kadınlarda daha yaygındır. ILC, IDC'den daha erken yaşta, örneğin 60'lı yaşların başında IDC için 50'li yaşların ortasına geçme eğilimindedir (Veronesi ve ark 2005; Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

IDC ve ILC kanserlerinin her biri farklı patolojik özellikler gösterir. Lobüler karsinomlar, ayrı ayrı veya tek hücreler halinde büyür ve bunları duktal karsinomlardan ayıran farklı moleküler ve genetik sapmalara sahiptir. Duktal ve lobüler karsinomlar farklı prognozlara ve tedavi seçeneklerine sahip olabilir ve bu nedenle birbirlerinden açıkça ayırt edilebilmeleri önemlidir (Veronesi ve ark 2005;

Lancet ve ark 2001; Hulka ve ark 1996; Colditz ve ark 2012; Polyak ve ark 2007; Allison ve ark 2012).

1.3 MEME KANSERİ VE ETİYOLOJİSİ

Meme kanseri en sık görülen kanser türüdür ve ikinci önde gelen ölüm nedenlerindedir. Bu hastalık, 45-55 yaşları arasındaki kadınlarda birincil ölüm nedenidir (Jemal ve ark.,2009) Kanserın primer risk faktörleri yaş (Steiner ,2008), yüksek hormon seviyesi (Yager ve ark.,2006), ırk, ekonomik durum ve diyetteki iyot eksikliğidir (Venturi,2001; Stoddard ve ark.,2008).

1.4 MEME KANSERİ GELİŞİMİ VE ETKİLİ OLAN GENLER

Moleküler düzeyde embriyonik gelişim ve kanserin ilerlemesi arasında dikkate değer paralellikler vardır (H. Macias ve ark.,2012; RJ Huebner ve ark.,2014). İnsan gelişimi, hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle iletişim kurmasına izin veren karmaşık sinyal yolları ile sıkı bir şekilde kontrol edilir (Hunter, 2000; Hunter,2007). Temel olarak, kanser, hücrelerin normal olarak çoğalma, hayatta kalma ve göçlerini kontrol eden mekanizmalardan kaçmalarına izin veren genetik ve epigenetik değişiklikler tarafından yönlendirilir (Sever ve ark.,2015). Bu değişikliklerin çoğu, hücre çoğalmasını ve bölünmesini, hücre ölümünü, hücre farklılaşmasını ve hücre hareketliliğini yöneten sinyal yollarına işaret eder (Sever ve ark.,2015). Böylece, proto-onkogenlerin aktif mutasyonları, bu sinyal yollarının hiperaktivasyonuna neden olabilirken, tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi, sinyalleşmenin kritik negatif regülatörlerini ortadan kaldırır (Sever ve ark.,2015).

Meme kanseri, aşırı ifade edilen ve meme kanseri hücrelerinin ilerlemesinde kilit aktörler olarak rol oynayan birçok farklı gen bulunduğundan, heterojen bir hastalıktır. Östrojen reseptörü (ER), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2 / neu), progesteron reseptörü (PR) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) gibi meme kanseri belirteçlerinin ifadesi, meme kanserinin ilerlemesini ve agresifliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Polyak ve ark.,2011; Chan ve ark.,2015; Tang ve ark.,2013).

1.4.1 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

EGFR, reseptör tirozin kinaz ailesinde bulunan bir transmembran reseptörüdür (Mansel ve ark.,2007).

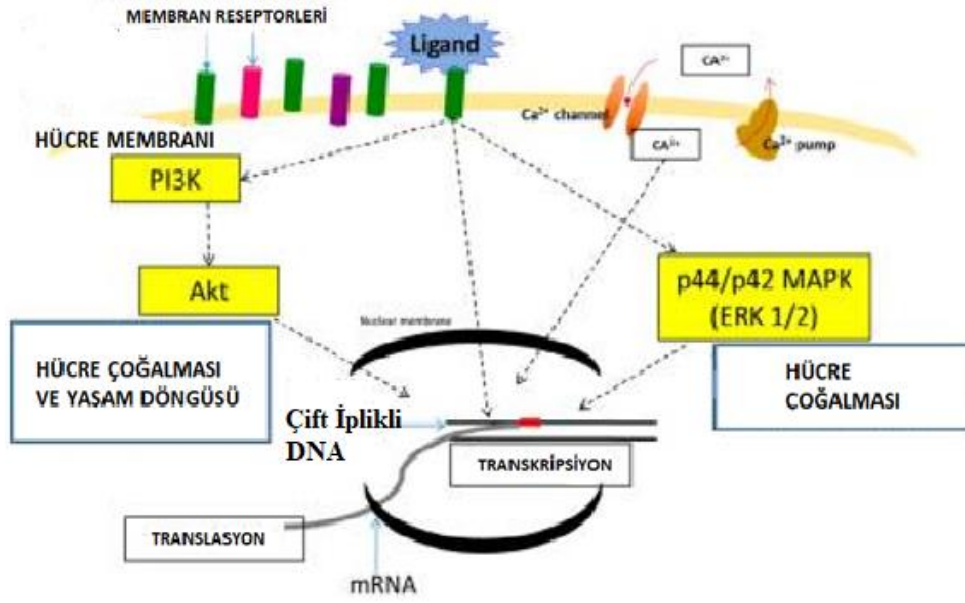
EGFR, meme kanserinin ilerlemesi ile ilişkilendirilen reseptörlerden biridir ve EGFR'nin aşırı ekspresyonu sıklıkla kötü prognoz ile ilişkilidir (Harris ve ark.,1992). MDA-MB-231 göğüs kanseri hücre dizisi üzerinde ve EGF'nin, ERK1 / 2 sinyal yolunun aktivasyonu ile meme kanseri hücrelerinin göçünü uyarabildiği tespit edilmiştir (Price ve ark., 1999; Witsch ve ark.,2010). Moleküler apokrin meme kanseri (MABC) durumunda, meme kanserinin bu moleküler alt tipi, bu alt tip östrojen reseptörünün negatif ekspresyonuna sahip olduğundan kötü prognoz ile ilişkilidir (Liu ve ark.,2018).

1.4.2 İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (HER2 / ERBB2)

HER2, ERBB2 geni tarafından kodlanan reseptör tirozin kinaz ailesinin üyelerindedir. Transmembran reseptörü, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda önemli roller oynar (Gutierrez ve ark.,2011; Rubin ve ark.,2001). Bununla birlikte, bu genin amplifikasyonunun %20 ile %30'u meme kanseri tümörlerinde sıklıkla görülür (Mitri ve ark.,2012). HER2 ile östrojen reseptörü (ER), IGFR ve EGFR gibi diğer hücre zarı reseptörleri arasındaki çapraz geçişler, meme kanseri hücrelerinde MAPK ve PI-3 kinaz yollarında aşağı akış sinyalini başlatabilir (Kamaruzman ve ark.,2018).

1.5 MEME KANSERİNDE SİNYAL YOLLARI

Hücre zarı reseptörleri ve iyon kanalları, hücre sinyalini etkileyen hücre dışı bölgeden hormonlar, nörotransmitterler, antikorlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve iyonlar gibi uyarıcıları alır (Nooren ve ark.,2003). Uyarıcılar ve reseptörler veya iyon kanalları arasındaki etkileşimler, Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz B (PI3K / AKT) ve Ca²⁺ sinyal yollarında olduğu gibi çeşitli sinyal yollarını tetikleyebilir. Sinyal iletim yolları arasındaki etkileşim veya karşılıklı konuşmalar, meme kanseri sinyal kaskadlarının karmaşıklığını artırır, böylece hastalığın iyileştirilmesi sürecini zorlaştırır. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, büyüme, bölünme ve hayatta kalma gibi normal hücre fonksiyonlarının korunmasında rol oynarlar. Bununla birlikte, bu genlerin fonksiyon kazanma veya kayıplarla sonuçlanan delesyon, insersiyon veya nokta mutasyon formundaki mutasyonları, tümörjenez başlatan, sinyalleme yollarını yapısal olarak aktive edebilir (Chial,2008; Basu,2018).



Şekil 1.2. Meme kanseri hücrelerinde çoğalma ve birkaç sinyal yolunun diyagramı

1.5.1 Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) Yolu

Mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'ler), hücre dışı sinyalleri iletme ve çoğaltmada işlev gören proteinlerdir (Schaeffer ve ark.,1999). ERK yolu aktivasyonundan sinyal veren MAPK, reseptör tirozin kinaz (RTK) gibi ligandın hücre zarı reseptörüne bağlanmasıyla düzenli olarak aktive edilir. Bunlar daha sonra örneğin Ras proteininin aktivasyonu için yolun aşağı akış tepkilerini teşvik edecektir. Ras aktivasyonu, gen transkripsiyonu ve ekspresyonu için sinyalleri çekirdeğe iletme üzere ERK1 / 2 sinyal proteinlerinin daha sonra uyarılmasına yol açabilir; Böylece hücre proliferasyonu, sağkalım, apoptoz ve farklılaşma gibi biyolojik olaylar tetiklenebilir (Cargnello ve ark.,2011). MAPK'nın gen ifade düzeyinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar, meme kanseri hücre proliferasyonunda ve hücre göçünde azalma olduğu tespit edilmiştir (Meng ve ark.,2011).

1.5.2 PI3K / AKT Yolu

AKT veya protein kinaz B, hücre proliferasyonu, hayatta kalım, glikojen metabolizmasının ve hareketliliğinin düzenlenmesinde önemli bir faktördür (Vivanco ve ark.,2002). Memelilerde üç izoformda bulunur; AKT1, AKT2 ve AKT3. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), kognat reseptör tirozin kinazdan AKT'ye sinyallerin bağlanması için hayati bir proteindir (Baselga ve ark.,2011). Yapılan çok sayıda

çalışma, meme kanserlerinin %70'inde bu yolda yer alan genlerde birçok mutasyonun varlığını ortaya koymaktadır (Luo ve ark.,2003; Wickenden ve ark.,2010).

1.5.3 Kalsiyum Sinyal Yolu

Kalsiyum (Ca^{2+}) hücre sinyalizasyonunda görev alan önemli ikincil habercil moleküldür. Homeostazını, normal hücre sinyal dizisinde stabil tutmak çok önemlidir. Ca^{2+} , hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesi için siklin bağımlı kinazların (CDK4 ve CDK2) aktivasyonu ile ilgili olduğu için hücre çoğalmasında rol oynar (Roderick ve ark.,2008).

1.5.4 Notch Sinyal Yolu

Notch sinyal yolu, bir hücrede ligandların ve bitişik hücrede Notch reseptörünün etkileşimi ile başlar (Acar ve ark.,2016). Bu sinyal yolu, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, hipoksi, kanser kök hücre aktivitesi, mezenkimal geçiş ve metastaz gibi hücreler ile ilişkilidir. Meme kanserinde Notch reseptörleri ve ligandlarının aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Meme kanseri hücrelerinin hayatta kalımının Notch sinyal yolu ile AKT yolu aktivasyonu üzerinden indüklenebileceği bulunmuştur (Acar ve ark.,2016; Ling ve ark.,2010; Cohen ve ark.,2010).

1.5.5 Hedhedog Sinyal Yolu

Hedhedog sinyal yolu, hücre proliferasyonu, sağkalım, farklılaşma, doku homeostazı, rejenerasyon ve kök hücre bakımı sürecini kontrol eder (Kasper ve ark.,2009). Bazal benzeri meme kanserlerinin çoğu, önemli reseptörlerin (ER-, PR- ve HER2) üçlü negatif fenotipine sahiptir ve kemoterapi tedavilerine dirençlidir. Bazal benzeri meme kanserleri agresif bir büyümeye sahiptir ve diğer organlara metastaz yapma olasılığı yüksektir (Mott ve ark.,2018).

1.5.6 JAK / STAT Sinyal Yolu

Sitokinler (örneğin, interlökinler, interferonlar ve büyüme faktörleri) gibi hücre dışı uyarıcılar, JAK / STAT sinyal yolunu aktive edebilir. JAK veya Janus kinaz ve STAT (sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörü), transkripsiyonu ve gen ekspresyonu için çekirdeğe sinyalleri iletmede transmembran reseptörü ile işbirliği yapan hücre içi proteinlerdir. STAT, JAK'ın substratı olarak işlev görür, fosforile edilir ve gen transkripsiyonunu teşvik etmek için çekirdeğe gider. JAK / STAT sinyal yolu, hematopoezde rol oynar ve enflamatuar yanıt sürecine katılır. Bu sinyal yolu, hücre

çoğalmasını, farklılaşmasını destekleyebilir ve hücrel apoptozun kontrolünde bir rol alır (Crocker ve ark.,2008).

1.5.7 Anti-Apoptotik Sinyal Yolu

Anti-apoptotik sinyal yolu, meme kanserinde bir başka önemli bileşendir. BCL-2, anti-apoptotik bir gen dir. Bu genin, prostat, akciğer, mide, yumurtalık ve meme karsinoması gibi birçok kanserde aşırı ifade edildiği belirlenmiştir (Kirkin ve ark.,2004). BCL-2 (B hücreli lenfoma 2) proteini, kanser hücrelerinin uzun süreli hayatta kalımına yol açan anti-apoptotik bir rol oynar (Oltersdorf ve ark.,2005;Klasa ve ark.,2002;Carpenter ve ark.,2013;Hata ve ark.,2015).

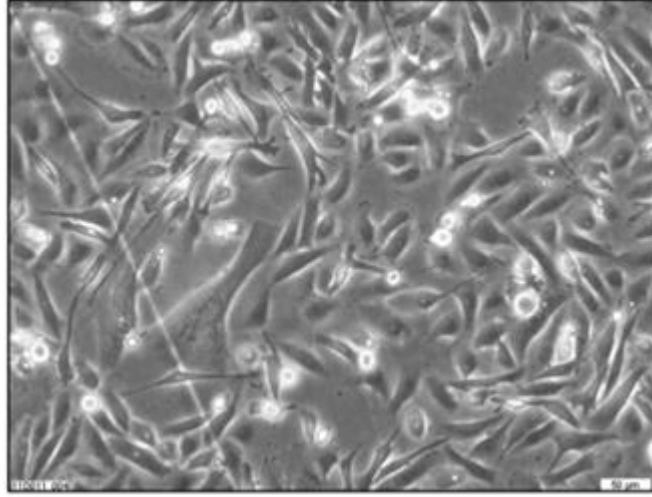
HER2 gibi büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu, PI-3 kinaz sinyalizasyonunun aktivasyonu yoluyla BCL-2 ifadesini değiştirebilir (Carpenter ve ark.,2013). Östrojen reseptörü (ER) ile diğer membran reseptörleri arasındaki çapraz etkileşimler, BCL-2 gen ekspresyonu gibi hedef genlerin transkripsiyonunu indükleyebilir. BCL-2, proapoptotik proteinleri inhibe ederek, kanser hücrelerinin hayatta kalım süresini uzatırlar (Hata ve ark.,2015).

1.6 MEME KANSERİNDE TEDAVİ

Meme kanserinin temel biyolojisinin anlaşılması başarılı tedaviler için yeni hedeflerin belirlenmesine veya meme kanserinin önlenmesine yardımcı olabileceği ümit edilmektedir. İdeal olarak, yeni terapötik veya profilaktik ajanların, meme tümör hücrelerinde kritik biyolojik yolları spesifik olarak hedefleyebileceği düşünülmektedir. Tedavinin 2 temel prensibi lokal nüks olasılığını ve metastatik yayılma riskini azaltmaktır. Radyoterapi, kanserin lokal kontrolünü sağlar. Metastatik nüks riski varsa, sistemik tedavi, hormonal tedavi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi veya bunların herhangi bir kombinasyonu uygulanır. Lokal ilerlemiş hastalıkta, sistemik tedavi, ameliyat için küçük veya hiç rolü olmayan bir palyatif tedavi olarak kullanılır (Rocque ve ark.,2018; Vande ve ark.,2018; Seroussi ve ark.,2018).

1.7 MDA-MB-231 HÜCRE HATTI

MDA-MB-231 hücre hattı tıpta en sık kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biridir. Bu hücre hattı ilk kez metastatik meme adenokarsinoması olan 51 yaşında bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiştir. En sık kullanılan insan meme kanseri hücre hattıdır (Cailleau ve ark.,1978).



Şekil 1.3. Kültürde MDA-MB-231 hücreleri

MDA-MB-231 hücreleri östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptöründen (PR) yoksun olduğu için oldukça agresif, zayıf farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre dizisidir. MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliği, hücre dışı matriksin proteolitik bozunması ile ortaya çıkar (Liu ve ark.,2003; Chavez ve ark.,2010).

ER, PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun eksikliğinin bir sonucu olarak, hücre hattı başlangıçta 'bazal' meme kanseri hücre dizisi olarak sınıflandırılmıştır (Holiday ve ark.,2011).

Üçlü negatif meme kanseri, agresif bir meme kanseri şeklidir ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Üçlü negatif meme kanserinin moleküler temelini anlamak, etkili yeni ilaç gelişimi için çok önemlidir. Kemik metastazı araştırması için MDA-MD-231 hücre hattı, iyi bir araç olarak belirlenmiştir (Simmons ve ark.,2015). Çalışmalarda genellikle farelerin kemiklerine, beyne ve akciğerlerine metastaz yapan MDA-MB-231 hücrelerinin alt klonları da izole edilmiştir. Böylece bu hücre hattı metastaz potansiyel araçları olan genlerin ve yolakların çalışmaların da kullanılmıştır (Chavez ve ark.,2010; Bos ve ark.,2009; Kang ve ark.,2003; Minn ve ark.,2005).

1.8 CALR GENİ

Kalretikulin, endoplazmik retikulumun lümeninde majör bir Ca^{2+} bağlayıcı (depolama) proteini görevi gören çok fonksiyonlu bir proteindir (Perrone ve ark., 1999).

Kalsiyum homeostazı, ER'nin lümenindeki kalretikulinin temel işlevidir (McCauliffe ve ark.,1992). ER dışında, kalretikulin hücre adezyonu (Rooke ve

ark.,1997), gen ekspresyonunun modifikasyonu (Wase ve ark.,1997) ve immün yanıtta (Smith ve ark.,1989) rol oynamaktadır. Kalretikulinin ayrıca hücre proliferasyonu ve metaplastik olaylar ile korele olduğu bildirilmiştir (Wase ve ark.,1997).

Kalretikulin proteini, *CALR* geni tarafından kodlanan ve endoplazmik retikulum içerisinde ve dışarısında kritik görevlere sahip olmakla birlikte protein katlanmasında ve kalsiyum dengesinde anahtar rol oynayan bir proteindir. Kalretikulin, nükleer hormon reseptörleri tarafından gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir modülatör görevi görebilir (Michalak ve ark.,1999).

1.9 *KRT19* GENİ

Sitokeratin 19 (*KRT19*), yapısal sertlikten ve çok amaçlı iskelelerden sorumlu olan bir sitoplazmik ara filament proteindir. Bu gen tarafından kodlanan protein, keratin ailesinin bir üyesidir (Subbroto ve ark.,2018).

Sitokeratin ailesi, 20'den fazla farklı protein içerir ve asidik tip I, temel tip II olmak üzere iki alt gruba bölünmüştür. Temel tip keratinler KRT1 ila KRT8, asidik tip keratinler, KRT9 ila KRT20'yi içerir. Yapısal bütünlüğünü korumanın yanı sıra, keratinler hücre sinyalleşmesinde, stres yanıtında ve apoptozda önemli rol oynar (Coulombe ve ark.,2002).

Krt19 transkripsiyonunun HER2/ERK/SP1 sinyal yolunun aktivasyonu ile arttırıldığı ve Krt19'un HER2 reseptörüne translokasyonu ile sonuçlandığı ortaya çıkmıştır (Ju ve ark.,2015; Ohtsuka ve ark.,2016).

KRT19'un EGR1/PTEN/AKT, Wnt/ β -katenin/çentik ve diğer yollar (Saha ve ark.,2017; Ju ve ark.,2013) gibi sinyal yolu kaskadlarını modüle ederek kanser özelliklerini düzenleyebileceğini ve KRT19'un meme kanseri hücre çoğalmasını, göçünü ve küre oluşumunu teşvik edebileceğini göstermektedir (Ju ve ark.,2013).

1.10 *PTGS2* GENİ

Prostaglandin-endoperoksit sentaz (PTGS), aynı zamanda siklooksijenaz olarak da bilinen prostaglandin biyosentezinde anahtar bir enzimdir ve hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak görev yapar. İki PTGS tipi vardır: PTGS1 ve PTGS2. Bu gen, indüklenbilir izozimi kodlar. İltihaplanma ve mitogeneze rol oynayan prostanoit biyosentezden sorumlu olduğunu düşündüren spesifik uyarıcılar tarafından düzenlenir (Hla T.,1992).

Aynı zamanda siklooksijenaz veya COX olarak da bilinen prostaglandin-endoperoksit sentaz (PTGS), hasarlı hücre zarlarının bir ürünü olan araziidonik asidin prostaglandinlere dönüşümünde sınırlayıcı bir enzimdir (Daneau ve ark.,2010).

PTGS, PTGS1 (COX-1) ve PTGS2 (COX-2) halde bulunur. PTGS1 birçok dokuda yapısal olarak ifade edilir. Mide mukozasında ve böbreklerde fazla ifade edilir. PTGS2 normal koşullar altında ifade edilmezken sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından indüklenen iltihaplanma sırasında yüksek seviyelerde bulunurlar. PTGS2 aktivasyonu, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, apoptoz inhibisyonu, immün yanıt baskılanması ve tümör hücresi istilası ve metastazını artırabilen bir dizi hücre sinyal yolu üzerinde etkili olan prostaglandin E₂'yi (PGE₂) üretir. Hipoksi, tümör hücrelerinde tercihli bir PTGS2 indüksiyonuna yol açar ve tümör hücrelerinin metastatik olma durumunu artırır (Daneau ve ark.,2010).

PTGS2'nin çoğu solid tümör tipinde ifade edildiğine dair güçlü kanıtlar vardır. PTGS2'nin hücreyel ifadesi, karsinogenezin ilk evrelerinde, tümör gelişimi ve invaziv tümör büyümesi yoluyla artmıştır (Ogino ve ark.,2008). PTGS2 genotip, meme kanseri, safra yolu kanseri ve kolorektal kanser ile de ilişkili bulunmuştur (Sakoda ve ark.,2006; Langsenlehner ve ark.,2006; Cox ve ark.,2004).

PTGS2 CpG adası hipermetilasyonu insan prostat kanserinde artmış nüks riski taşımaktadır (Yegnasubramanian ve ark.,2004). PTGS2-pozitif pankreas kanserinde, nimesulid kaynaklı VEGF üretiminin kanser hücreleri tarafından artması, tümör anjiyogenezinin azalmasına yol açan ve tümör dışı hücre tiplerinin VEGF üretimindeki bir düşüş ile dengelenmiştir (Eibl ve ark.,2005). Kanser ve lenf nodu metastazı, zayıf farklılaşma ve artmış tümör büyüklüğü gibi kötü prognoz indükleyicileri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, PTGS-2 bynonsteroidal anti-enflamatuar ilaçların inhibisyonu, çeşitli kanserlere karşı koruyucu bir etkiye neden olmuştur ve meme kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. PTGS2'nin meme kanseri ve hasta prognozu ile ilişkili olduğu konusunda neredeyse fikir birliği vardır. Bununla birlikte, tüm meme kanseri hastalarında PTGS2 geni veya PTGS2 ifadesi anomalileri gözlenmez, bu nedenle PTGS2'nin diyagnostik belirteçler veya ilaç hedefi olarak tanımlanabileceği hala belirsizdir (Daneau ve ark.,2010).

2. MATERYAL VE METOD

Besiyeri RPMI-1640 içerisinde %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 Penicilin/streptomisin eklenerek hazırlanmıştır.

Hücre Kültürlerinin Stoktan Çıkartılması:

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80°C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmüştür. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınıp ve falkon tüp, 21°C 800 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısım aspire edilip ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik flaslara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

2.1 BESİYERİ DEĞİŞTİRME

Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak (aspire edilerek) 1X PBS; 25 cm²'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm²'lik flask içerisine 4 ml ilave edilir ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra 25cm²'lik flask içerisine 5 ml, 75 cm²'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklenmiştir.

2.2 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN PASAJLANMASI

Hücre kültürleri, flask yüzeyini % 60-70 kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm²'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS ilave edilip hücrelerin yüzeyleri hafifçe yıkanmıştır. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınmıştır. 21 °C 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edilip elde edilen hücre peleti 1 ml besiyerinde çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 75 cm²'lik flaslara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren

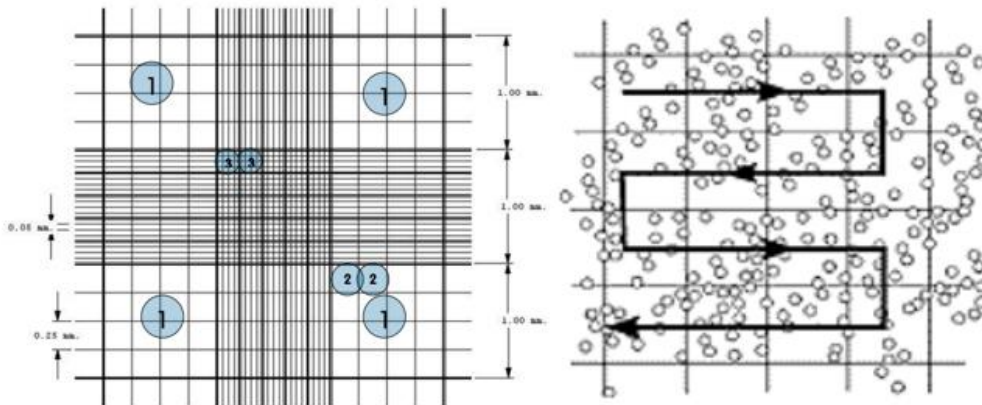
ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmıştır.

2.3 HÜCRE SOYLARININ STOKLANMASI

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılıp ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için % 0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml’lik falkon tüp içerisine alınarak 21°C 800 rpm’de 5 dk santrifüj yapıp ve sonra süpernatant kısım aspire edilmiştir. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılıp ve hemen -80°C’ye kaldırılmıştır.

2.4 HEMOSİTOMETRE İLE HÜCRELERİN SAYIMI

Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak iyice karışmaları sağlanmıştır. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyulup ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 2.1. Thoma Lamı Düzeni

1 büyük karenin hacmi;

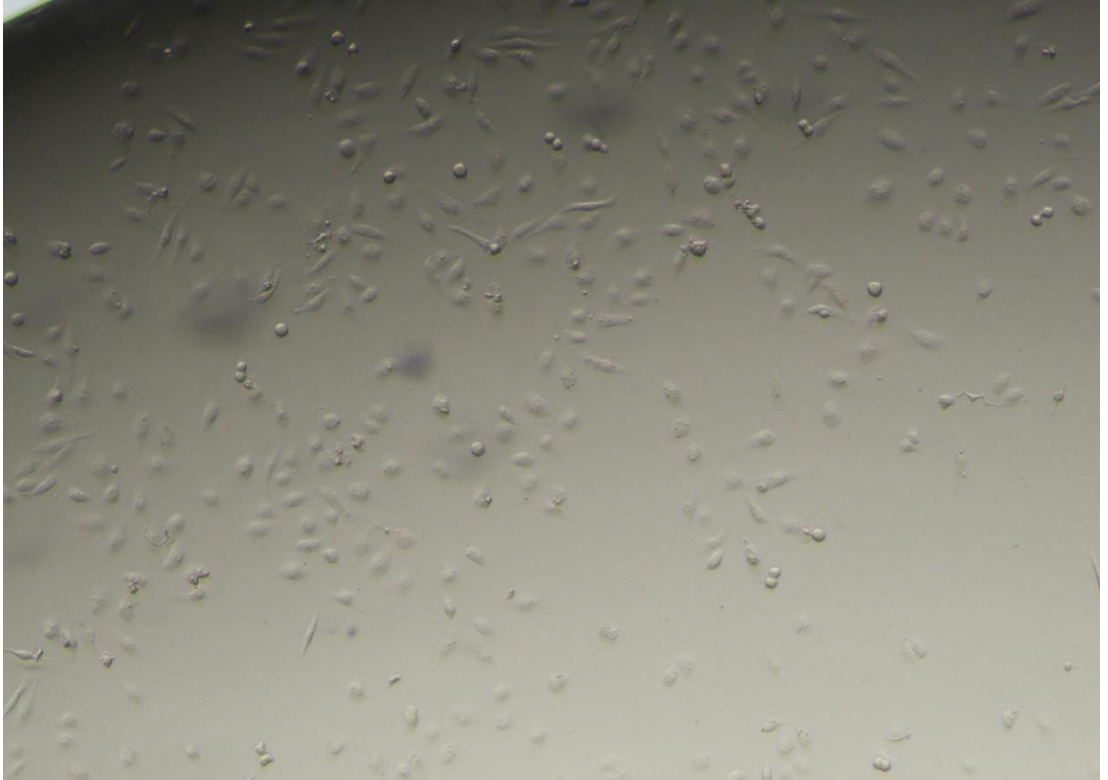
$$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$$

Bölmenin derinliği; $0,1\text{mm} = 0,01 \text{ cm}$

$$0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml} = 0,1 \mu\text{l}$$

$$\text{Konsantrasyon (hücre/ml)} = \frac{\text{Hücre Sayısı} \times 10.000}{\text{Sayılan Alan} \times \text{Dilüsyon}}$$

Sulandırma katsayısı (dilüsyon); 1:10 dilüsyon için; 0,1



Şekil 2.2. MDA-CNT

2.5 TOTAL RNA İZOLASYONU

Kültür yapılmış olan 1×10^6 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanılmıştır. Çeker ocakta trizol içerikli TRK solüsyonuna 1 mililitre/20 mikrolitre beta-merkaptotanol eklenmiştir. Beta-merkaptotanol disülfid bağlarını kırar ve RNAaz DNAaz gibi enzimlerin, enzim işlevselliği için gereken üç boyutlu konformasyonu bozarak istediğimiz nükleik asidi elde etmemize olanak sağlar. Daha sonra 1 mililitre besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 mikrolitre TRK solüsyonu eklenerek homojenizasyon yapılmıştır.

TRK içindeki Trizol, fenol ve guanidium izotiyosiyanatın bir çözeltisidir, proteinleri denatüre eder. Bu kimyasallar, nükleik asitlerin yapısına zarar vermez, hücre bileşenlerini bozar ve proteinleri denatüre eder, proteinleri ortamdaki ayrılacak istenen nükleik asitlerden kurtarır.

Hücre lizatına 500 mikrolitre %70 etil alkol ilave edilip vortekslenmiştir. Hücre lizatı, kit içerisinde bulunan döndürme kolonlu toplama tüpüne aktarılmıştır. 60 saniye 10.000 g'de santrifüjlenip toplama tüpüne inen sıvı boşaltılmıştır.

RNA Yıkama Tamponu I'den 500 mikrolitre kolonlu tüpe eklenip ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Tüpe inen sıvı boşaltılmıştır. %99'luk etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 mikrolitre eklenir ve santrifüj tekrarlanır. Tüpe inen sıvı boşaltılmıştır.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten alınıp ve yeni bir koleksiyon tüpüne oturtulup 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra kolonlu tüp, boş 1,5 mililitrelik santrifüj tüpüne alınıp ve 60 mikrolitre steril distile su eklenerek 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. RNA, su ile çözünüp kolondan ayrılmıştır. Elde edilen RNA -80°C dereceye kaldırılmıştır.

“SPECTROstar Nano absorbance plate reader” cihazı ve LVis Plate ile RNA konsantrasyon ve saflık oranı ölçülmüştür. Konsantrasyon ölçümü ve optik yoğunluk değeri (OD) Tablo 2.1'de ki gibidir.

Tablo 2.1. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

Blank: Su			
	Örnek	OD Değeri	Konsantrasyon
1	MDAMB-231	1,77	9,11 ng

2.6 CDNA SENTEZİ

cDNA sentezi için Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription Kit ürünü kullanıldı. Sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

1.10 ml RNA 0,2'lik tüplere alınmıştır.

2.65°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir.

3.1 dakika buzda bekletilmiştir.

4.Mix aşağıdaki 2.2. Tablo' da ki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 2.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar
5X Reaksiyon tamponu	5 µl
dNTP	2 µl
Randomize primerler	5,25 µl
RNaz inhibitörü	0,5 M
DTT	1,25 M
RTE	1 M
RNA örnekleri	10 µl
Toplam hacim	25 µl

5.Total mix miktarı 30 olacak şekilde ayarlanmıştır.

6.Tablo 2.3'te bulunan sıcaklık ve inkübasyon değerlerine göre PCR'a yükleme yapılmıştır.

Tablo 2.3. cDNA sentez reaksiyon aşamaları

cDNA Döngü Aşamaları	
Primer bağlanması	65°C 5 dakika, 4°C 5 dakika
DNA polimerizasyonu	25°C 10 dakika, 50°C 60 dakika
Enzim deaktivasyonu	85°C 5 dakika

2.7 GERÇEK ZAMANLI PCR

qPCR çalışmasında genlerin ifade düzeylerini incelemek için, öncelikle primerler tasarlanmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıda Tablo 2.4'teki gibidir.

Tablo 2.4. Primer dizilimleri

CALR Forward	AAGTTCTACGGTGACGAGGAG
CALR Reverse	GTCGATGTTCTGCTCATGTTTC
PTGS2 Forward	ATCATTCAACCAGGCAAATTGC
PTGS2 Reverse	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG
KRT19 Forward	CGGGACAAATTCTTGGTGCC
KRT19 Reverse	ATCCAGCACCCCTGCGCAGGCC

“Corbett Research Real-time PCR Thermal Cycler” cihazı amplifikasyon için kullanılmıştır. Reaksiyon tüpüne 2X konsantrasyondaki Sybr Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün) içerikli reaksiyon karışımından 10 mikrolitre eklenmiştir. Reverse ve forward primerlerin her birinden 1,5 mikrolitre eklendi ve 4 mikro litre cDNA örneği ile 4 mikrolite nükleazdan arındırılmış su eklenmiştir (2.5. isimli tabloya bakınız.) Reaksiyonun döngü aşamaları 2.6. Tablodaki gibi yapılmıştır.

Tablo 2.5. qPCR reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µl
Forward primer	1,5 µl
Reverse primer	1,5 µl
cDNA	4 µl
Su	4 µl
Toplam hacim:	21 µl

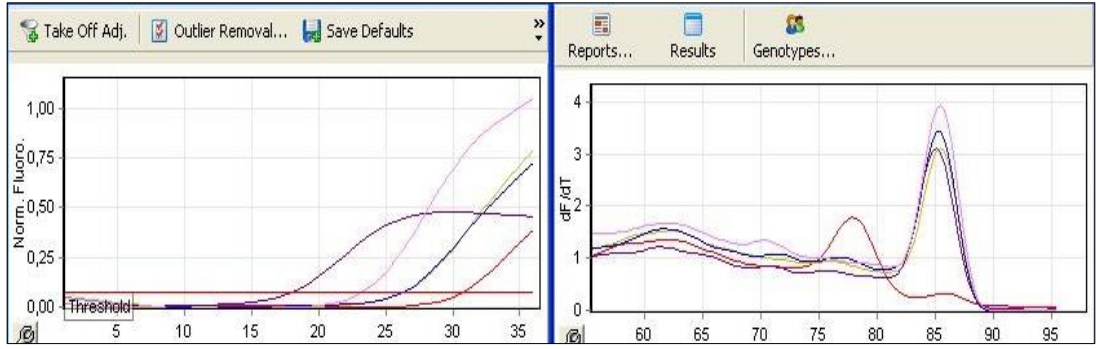
Tablo 2.6. qPCR döngüsü

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 °C 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 °C 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C 30 saniye
	3. Uzama	72 °C 30 saniye
Sonlanma		72 °C 10 dakika
X 36 DÖNGÜ		

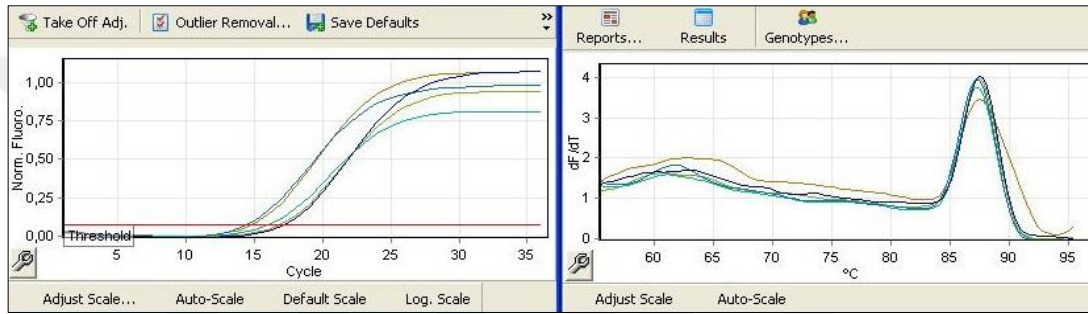
3. BULGULAR

3.1 GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARININ ANALİZİ

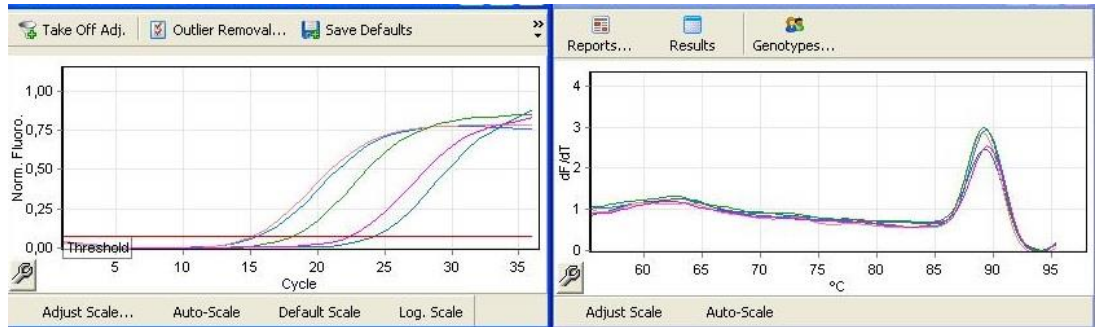
Gerçek zamanlı PCR analizinde, referans olarak kullanılan GAPDH geni ile PTGS2, CALR ve KRT19 genlerinin Ct ve Tm değerlerini Tablo 3.1’ de belirtilmiştir. İfade analizi, üç tekrarlı deney seti sonucu çıkan Ct değerlerinin ortalaması şeklinde alınmaktadır (Rao ve ark., 2013). Her genin Ct değeri, house-keeping olarak isimlendirilen ifade seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan genin Ct değerinden çıkartılmıştır. Bu değer, “delta Ct” olarak isimlendirilir. Sonrasında deneyde kullanılan genlerin delta Ct değerleri, kontrol geninin delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak “delta delta Ct” değerleri olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için 2 üzeri negatif kuvveti alınmıştır.



Şekil 3.1. PTGS2 Geninin Ct ve Tm grafiği



Şekil 3.2. CALR Geninin Ct ve Tm grafiği



Şekil 3.3. KRT19 Geninin Ct ve Tm grafiği

Tablo 3.1. Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	MDA-MB-231	Delta Ct Δ Ct	Ekspresyon Deęiřimi
	Ortalama Ct değeri	(MDA-MB-231)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GAPDH (house-keeping gen)	29,31		
KRT19	22,28	7,95	6,72
CALR	30,23	13,1	1,45
PTGS2	23,16	7,07	14,92

Tablo 3.1’de, housekeeping gen *GAPDH* olmak üzere, MDA MB 231 hücre hattında *PTGS2*, *KRT19* ve *CALR* genlerinin ifade seviyeleri verilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre her üç genin ifade seviyesinde de artış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır.

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı gerçek zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile MDA-MB-231 hücre hattında *PTGS2* gen ifadesinde 14,92 kat; *CALR* gen ifadesinde 1,45 kat; *KRT19* geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış olduğu saptanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin başında gelen bir sağlık sorunudur. Görülme sıklığı giderek artmakta olup, Türkiye'nin de içinde yer aldığı gelişen ülkelerde daha fazla görülmektedir (Murray ve ark.,1997). Kalretikulin proteini, CALR geni tarafından kodlanan ve endoplazmik retikulum içerisinde ve dışarısında kritik görevlere sahip olmakla birlikte, özellikle protein katlanmasında ve kalsiyum dengesinde anahtar rol oynayan bir proteindir (Michalak ve ark.,1999). Akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, glioblastoma, gastrointestinal kanser, meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde CALR ifade düzeylerinde değişiklikler görülmüştür ve bunun sonucunda da kanser oluşumunu kolaylaştırmış ya da baskılamıştır.

Bu tez çalışmasında *CALR* geninin ifadesi, meme hücre hattı MDA- MB-231 de qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında, *CALR* geninin ifadesinde 1,45 kat artış tespit edilmiştir.

Zamanian ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanserinde malign lezyonların invazivliği ile *CALR* ifade düzeyi arasında doğru- korelasyon olduğunu göstermiştir (Zamanian ve ark.,2016). Chen ve arkadaşları ise bizim çalışmamıza benzer şekilde, yaptıkları çalışmada dahil ettikleri 30 gastrik kanser hastasının % 67' sinde *CALR* geninin anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu, hücre proliferasyonunu ve göçünü arttırdığını gözlemlemişlerdir (Chen ve ark.,2009).

Lwin ve arkadaşlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarını dahil ettiği çalışmada ise *CALR* ifade düzeyinin MDA-MB-231 hücre hattında anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptamışlardır (Lwin ve ark.,2010). Kageyama ve arkadaşlarının mesane kanserinde yaptığı çalışmada ise hasta idrar örneklerinde kalretikulin miktarının yüksek olduğu belirlenmiş ve araştırmacılar tarafından bu kanser türü için biyobelirteç olarak kullanılması önerilmiştir (Kageyama ve ark.,2009).

Ayrıca akciğer kanser hücre hatlarının dahil edildiği çalışmalarda, kalretikulin ifade düzeyinde meydana gelen azalmaların proliferasyonu arttırdığı belirlenmiştir (Bergner ve ark.,2009 ; Chen ve ark.,2007).

Bir sitoplazmik ara filament proteini olarak *KRT19*, yapısal sertlikten ve çok amaçlı yapı iskelelerinden ve ayrıca epitel hücre ve dokuların bir belirteci olmaktan

sorumlu olabilir (Coulombe ve ark.,2004). Yaptığımız çalışmada KRT19 gen ifade düzeyinin 6,72 kat artışı gözlemlenmiştir. Subbroto Kumar ve arkadaşları 2018 yılında KRT19 ekspresyonunun bazı hastalardan türetilmiş meme kanseri dokularında zayıfladığını ve KRT19 ekspresyonunun düşük olduğu meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile anlamlı şekilde korele olduğunu bulmuşlardır (Subbroto ve ark.,2018).

KRT'lerin, sinyal yollarını düzenleyen ve hücre apoptozuna, hücre döngüsü inhibisyonu, istila ve metastaza aracılık edebilen adaptörler, efektörler, kinazlar ve reseptörler gibi birkaç sinyal iletim molekülü ile etkileşime girebileceği de bilinmektedir (Coulombe ve ark.,2004 ;Hendrix ve ark.,1996). Bununla birlikte *KRT19* ifadesinin, meme kanseri kök hücre benzeri hücrelerde ve hücre hatlarında kanser ilerlemesi ile negatif ilişkili olduğu da bilinmektedir (Saha ve ark., 2017; Ju ve ark.,2013 ; Bambang ve ark., 1964-1974). *KRT19* ifadesi meme kanserinde klinik sonuçlarla anlamlı şekilde ilişkilidir.

Kabir NN ve arkadaşları 2014 yılında 2.400 hastanın gen ifade profillerini kullanarak, keratin 19'u (KRT19) meme kanserinde oldukça düzensiz bir gen olarak tanımlamıştır. KRT19 ekspresyonunun hasta ırkından bağımsız, ancak hastalık derecesi ve ER, PR veya HER2 ekspresyonu ile korele olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda KRT19 ifadesinin prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabilceğini göstermişlerdir (Kabir ve ark., 2014).

Keratin 19 (K19), insan hepatoselüler karsinomunda (HCC) kötü prognoz ve yayılımın bilinen bir belirteçidir. Takayuki Kawai ve arkadaşları 2015 yılında K19' un HCC'de yeni bir kanser kök hücresi (CSC) markörü ve terapötik hedefi olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemişlerdir. K19, EMT ve TGFb / Smad sinyalleşmesi ile bağlantılı yeni bir CSC işaretleyicisi olarak, TGFbR1 inhibisyonu için iyi bir terapötik hedef olacağını ortaya koymuşlardır (Kawai ve ark., 2015).

Prostaglandin metabolizmasının enflamatuar süreçlerde önemli bir rol oynadığı ve ayrıca kansere neden olan kanserojeniz, tümör farklılaşması ve tümör büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Siklooksijenaz-2 (COX-2) prostaglandin sentezini tetiklediği için kilit bir enzimdir.

Prostaglandin H sentetaz (PGHS) olarak da bilinen siklooksijenaz enzim sistemi, iki farklı izoenzimlerden, siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2'den (COX-2) oluşur. Siklooksijenaz-2 enzim sistemi ile meme kanserojenezi arasında önemli bir ilişki vardır. Cox2 ifadesi düzeyinin MDAMB 231 hücre hattında ki değişimini tespit etmek için yaptığımız çalışmada, ekspresyon düzeyinde 14,92 kat artış olduğunu tespit edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, yüksek seviyelerde prostaglandin ve COX-2'nin kolon, mide ve mesane tümörleri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde eksprese edildiğini göstermiştir (Sano ve ark.,1995; Ristimaki ve ark.,1997; Yoshimura ve ark.,2000; Mohammed ve ark., 1999).

Ari Ristimaki ve arkadaşları 2012 yılında 1576 kişiyi dahil ettikleri meme kanseri çalışmasında ilk kez artan Cox-2 proteini ekspresyonun, kötü prognoz için belirteç olarak kullanılabileceğini ve sağkalımın azalmasıyla anlamlı şekilde korele olduğunu ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri diğer bir bulgu ise, karsinomların % 37.4'ünde yüksek düzeyde Cox-2 protein ekspresyonunu tespit etmeleridir (Ari Ristimaki ve ark.,2012).

Soslow Ra ve arkadaşları (2000 Aralık) Akciğer tümörlerinin % 90'ında (skuamöz hücreli karsinomlar ve adenokarsinomlar), kolon adenokarsinomlarının %71'inde ve meme tümörlerinin % 56'sında (DCIS ve sızan duktal ve lobüler karsinomlar), COX-2'yi orta ile güçlü düzeyde anlamlı şekilde farklı göstermişlerdir. Meme karsinomları arasında, DCIS'in COX-2'yi eksprese etme oranlarının invaziv karsinomlardan daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Soslow ve ark.,2000).

COX-2 ifadesinde, akciğer, kolon ve memenin iyi ve orta derecede farklı karsinomlarında artış gözlenirken, COX-1'in yapısal olarak düşük seviyelerde ifade edildiğini ortaya koymuşlardır (Soslow ve ark.,2000).

2003 yılında Shim jeong ve arkadaşları, çalıştıkları meme kanseri örneklerinin %72'sinde COX-2 pozitifliği göstermişlerdir ve COX-2 geninin aşırı ifadesini, tümör büyüklüğü ve ileri evre ile anlamlı olarak korele olduğunu bulmuşlardır. COX-2'nin meme kanseri gelişimine katkıda bulunabileceğini ve meme kanserinde prognostik bir gösterge olarak kullanılabileceğini ve seçici COX-2 inhibitörlerinin meme kanserinin

kemoprevensiyonunda ve adjuvan tedavisinde yararlı olabileceğini göstermişlerdir (Shim ve ark.,2003).

Ghahremanfard ve arkadaşları ise 2013 yılında yaptığı çalışmada COX-2'nin aşırı ifadesinin, lenf nodu tutulumunun derecesi ile pozitif ilişkili olduğunu, ancak HER2, ER ve PR reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkili olmadığını gözlemlemişlerdir (Ghahremanfard ve ark.,2013).

SinghRanger ve arkadaşları (2008) ile Zhao ve arkadaşları (1996) hormon reseptörü pozitif meme karsinomunda COX-2 mRNA ekspresyonunda bizim çalışmamıza benzer şekilde artış bulmuşlardır. Bu bulgular ışığında, hormon-reseptör negatif meme kanserinde COX-2 protein ifadesinin azaldığını gözlemlemişlerdir. COX-2 mRNA ekspresyonu, tüm meme karsinomlarının ortalama %90'ında tespit edilir. mRNA ve protein ekspresyon seviyelerindeki fark muhtemelen transkripsiyon sonrası işleme ve translasyon sonrası değişikliklere dayanmaktadır (SinghRanger ve ark., 2008; Zhao ve ark., 1996).

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı eş zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile MDA MB-231 hücre hattında *PTGS2* gen ifadesinde 14,92 kat; *CALR* gen ifadesinde 1,45 kat; *KRT19* geninin ifadesinde ise 6,72 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu üç genin farklı kanserlerde, apoptoz direnci, metastatik dağılımlar, anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerde rol alabileceği saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda, bu üç genin meme kanseri gelişiminde rol aldığı ve ileride yapılacak detaylı çalışmalarla prognostik öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

Acar, A., Simoes, B.M., Clarke, R.B., Brennan, K. (2016). A role for Notch signaling in breast cancer and endocrine resistance. *Stem Cells Int.* 2498764

Basu, A.K., (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int. J. Mol. Sci.*19:970.

Baselga, J., (2011). Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist.* 2011;16(Suppl. 1):12–19. doi: 10.1634/theoncologist. S1-12.

Bambang, IF., Lu, D., Li, HP., Chiu LL., Lau QC., Koay E., Zhang DH Cytokeratin. (2009). Cytokeratin 19 (*KRT19*) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells. *Exp. Celi Res.*; 315.

Bergner, A., Kellner, J., Tufman, A. (2009). Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 28:25.

BS ,Hulka., (1996). Epidemiology of susceptibility to breast cancer *Prog Clin Biol Res* , 395 , Pages 159 – 174

Bos ,PD., Zhang ,XH., Nadal, C., Shu, W., Gomis , RR., Nguyen, DX., Minn AJ., van de Vijver MJ., Gerald, WL., Foekens, JA., Massagué, J., (2009). *Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain.* *Nature.* 459(7249):1005-1009.

Cancer Res February 1 2002 Prognostic Significance of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer (62) (3) 632-635;

Chavez, KJ., Garimella, SV., Lipkowitz S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* 32(1- 2):35–48.

Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19:414–422.

Chen, CN., Chang, CC., Su, TE., Hsu, WM., Jeng, YM., Ho, MC., Hsieh, FJ., Lee, PH., Kuo, ML., Lee, H., Chang, KJ. (2009). Identification of calreticulin as a

prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 16: 524-33.

Chavez, KJ., Garimella, SV., Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* 32(12):35–48.

Coulombe, PA., Omary, MB. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology* 14 (1):110-122

Cailleau, R., Olive, M., Cruciger, QV. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 14(11):911– 915.

Caughran, J., Braun, TM., Breslin, TM., et al. 2018 The effect of the 2009 USPSTF breast cancer screening recommendations on breast cancer in Michigan: a longitudinal study. *Breast J.* 24(5):730-737.

Carpenter, R.L., Lo, H.W. (2013). Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* (Suppl. 7):003.

Chan, M., Chang, M.C., González, R., Lategan, B., del Barco E., Vera-Badillo F., Quesada, P., Goldstein, R., Cruz, I., Ocana, A. (2015). Outcomes of estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast cancer. *PLoS ONE.* 10:e0132449. doi: 10.1371/journal.pone.0132449.

Chen, CN., Su, TE., Lu, YC. (2007). Calreticulin regulates cell proliferation and migration in gastric cancer cell line AGS. *FASEB J.* 21:928.6.

Coulombe, PA., Wong P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments decimated as dynamic and multi-purpose scaffolds. *Nat. Celi Biol.* 6 : 699–706.

Cohen B., Shimizu, M., Izrailit, J., Ng, N.F., Buchman, Y., Pan, J.G., Dering, J., Reedijk, M, Cyclin. (2010). D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 123:113–124.

Cargnello, M., Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR. 75:50–83.

Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nat. Educ.* 1:33.

Cox, D.G., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A., Canzian, F., Moreno, V. Br. J. (2004). Cancer polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 91: 339-343

Daneau G., Boidot R., Martinive P., Feron, O. Clin. (2010). Cancer Res Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the transcriptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases. *Clin Cancer Res.* 16(2):410-9

McCauliffe, D.P., Yang, Y.S., Wilson, J., R. D. Sontheimer and J.D. Capra. (1992). “The 5’ Flanking Region of the Human Calreticulin Gene Share Homology with the Human GRP78, GRP94, and Protein Disulfide Isomerase Promoter”, *J. Biol. Chem.* vol. 267, pp. 2557-2562

Eibl, G., Takata, Y., Boros, L.G., Liu, J., Okada, Y., Reber, ve ark., (2005). Cancer Res. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res.* 65(3):982-90.

Ghahremanfard, F., Toussy, J.A., Kazeminezhad, B., & Ramezani, F. (2013). Role of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in breast cancer differentiation and its relationship with hormone receptors status. 8 (4): 235-240.

Gutierrez, C., Schiff R. (2011) HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135:55–62

Hata, A.N., Engelman, J.A., Faber, A.C. (2015). The BCL-2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer Discov.* 5:475–487.

Hendrix, MJC., Seftor, EA., Chu, Y-W., Trevor, KT., & Seftor, REB. (1997). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. In P.

Frost, I. Hart, & R. Kerbel (Eds.), *Cancer and Metastasis Reviews* (pp. 15: 507-525). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Macias, H., Hinck, L. (2012) Mammary gland development Wiley Interdiscip Rev *Dev Biol*, 1 (4), s. 533 – 557

Harris, A.L., Nicholson, S., Sainsbury, R., Wright, C., Farndon, J. (1992). Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 11:181–187.

Holiday, DL., Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13(14):215

Hla, T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA.:89(16)7384-7388 PMID: 1380156

Ju, JH., Yang, W., Lee, KM., Oh, S., Nam, K., Shim, S., ve ark. (2013). Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 19 : 4335-4346.

J Clin Invest, K. Polyak. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 117 (11), s 3155 – 3163

Ju, J.H.; Oh, S.; Lee, K.M.; Yang, W.; Nam, K.S.; Moon, H.G.; Noh, D.Y.; Kim, C.G.; Park, G.; Park, J.B. (2015). Cytokeratin19 induced by HER2/ERK binds and stabilizes HER2 on cell membranes. *Cell Death Differ.* 22, 665–676

Joshi, H., Press, MF. (2018) Molecular oncology of breast cancer. In: Bland KI., Copeland, EM., Klimberg, VS., Gradishar, WJ., eds. *The Breast*. Philadelphia, PA: Elsevier 22.

Ju, J.-H.; Yang, W.; Lee, K.; Oh, S.; Nam, K.; Shim, S.; Shin, S.Y.; Gye, M.C.; Chu, I.-S.; Shin, I. (2013). Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 19, 4335–4346

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, MJ. (2009). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 59:225-49.

Kamaruzman, N.I., Tiash, S., Ashaie, M., Chowdhury, E.H. (2018). siRNAs Targeting Growth Factor Receptor and Anti-Apoptotic Genes Synergistically Kill Breast Cancer Cells through Inhibition of MAPK and PI-3 Kinase Pathways. *Biomedicines*. 6:73.

Kageyama, S., Isono, T., Matsuda, S. (2009). Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Int J Urol*. 16:481–486.

Kabir, NN, Rönstrand, L. ve Kazi, (2014). *JU Mol Biol Rep* 41: 7729.

Kawai, T., Yasuchika, K., Ishii, T., Katayama, H., Yoshitoshi, E.Y., Ogiso, S., Kita, S., Yasuda, K., Fukumitsu, K., Mizumoto M. (2015). Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 21:3081–3091.

Kang, Y., Siegel, PM., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, SM., Cordon-Cardo C, Guise, TA., Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3(6):537-549.

Rooke, K., BriquetLaugier, V., Xia, Y.R., A.J. Lusi and M.H. Doolittle. (1997). “Mapping of the gene for calreticulin to mouse chromosome 8”. *Mamm. Genome*, vol. 8, pp. 870-87

Khuwaja, G. A., Abu-Rezq, A. N. (2004). Bimodal breast cancer classification system. *Pattern Analysis and application*. 7:235–242.

Kirkin, V., Joos, S., Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1644:229–249.

Klasa, R.J., Gillum, A.M., Klem, R.E., Frankel, S.R. (2002). Oblimersen Bcl-2 antisense: Facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*.12:193–213.

Kasper, M., Jaks, V., Fiaschi, M., Toftgård, R. (2009). Hedgehog signaling in breast cancer. *Carcinogenesis*. 30:903–911.

Liu, H., Zang, C., Fenner, MH., Possinger K., Elstner E. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat*, (2003). 79(1):63-7.

Langsenlehner, U., Yazdani-Biuki, B., Eder, T., Renner, W., Wascher, T.C., Paulweber, B., Weitzer, W., Samonigg, H., Krippel, P. Clin. (2006). *Cancer Res.* The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk.

Liu, X., Feng, C., Liu, J., Liu, J., Li, C., Xu, C., Niu, Y. (2018). The importance of EGFR as a biomarker in molecular apocrine breast cancer. *Hum. Pathol.* 77:1–10.

Ling, H., Sylvestre, J.R., Jolicoeur, P. (2010). Notch1-induced mammary tumor development is cyclin D1-dependent and correlates with expansion of pre-malignant multipotent duct-limited progenitors. *Oncogene.* 29:4543–4554.

Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell.* 4:257–262.

Lwin, Z., Guo, C., Salim, A. (2010). Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol* 23, 1559–1566

Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., et al. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 436(7050):518-524.

Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., et al. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumours. *J Clin Invest.* 115(1):44-55.

Wase, M., Mesaeli, N., Spencer, C., Michalak, M. (1997). “Regulation of Calreticulin Gene Expression by Calcium”, *J. Cell Biol.*, vol. 138, pp. 547557

Smith, M. J., Koch, G.L. (1989). “Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, Calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein”. *EMBO J.* vol. 8, pp. 3581-3586

Mott, L., Su, K., Pack, D. (2018). Evaluation of FOXC1 as a therapeutic target for basal-like breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 25:84–91. Mitri Z., Constantine T., O’Regan R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* 743193.

Mansel, R.E., Fodstad, O., Jiang, W.G. (2007). *Metastasis of Breast Cancer*. Springer; Dordrecht, The Netherlands. pp. 1–5.

Meng, F., Zhang, H., Liu, G., Kreike, B., Chen, W., Sethi S., ve ark. (2011). p38gamma mitogen-activated protein kinase contributes to oncogenic properties maintenance and resistance to poly (ADP-ribose)-polymerase-1 inhibition in breast cancer. *Neoplasia*. 13:472–482.

Michalak, M., Corbett, EF., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M. (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 344:281–92.

Martín M. *Clin Transl Oncol*. (2006). 8(1):7-14.

Mohammadreza, Z., Lama, AQH., Abhi, V., Sabariah, AR., Shamarina, S., Rozita, R. (2016). Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways.

Murray, CJL., Lopez AD. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 349: 1269-1276

NCBI. CALR calreticulin. (2019) [Homo sapiens (human)] “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/811>” Gene ID: 811

Nooren, I.M.A., Thornton, J.M. (2003). CHAPTER 4—Molecular Sociology A2—Bradshaw, Ralph A. In: Dennis E.A., editor. *Handbook of Cell Signaling*. Academic Press; Burlington, NJ, USA. pp. 21–26.

Ohtsuka, T., Sakaguchi, M., Yamamoto, H., Tomida, S., Takata, K., Shien, K., ve ark. (2016). Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway. *Sci. Rep.* 6, 39557

Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, ve ark. (2008). *Cancer Res*. Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Amstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 435:677–681.

Price, J.T., Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., Thompson, E.W. (1999). Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res.* 59:5475–5478.

Perrone, L., Tell, G., D Lauro, R. (1999). Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor-1 by binding to its homeodomain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4640-4645.

Rubin, I., Yarden, Y. The Basic Biology of HER2. *Ann. Oncol.* (2001). 12(Suppl. 1):S3–S8.

Roderick, H.L., Cook, S.J. (2008). Ca²⁺ signaling checkpoints in cancer: Remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer.* 8:361–375.

Rocque, GB., Williams, CP., Kenzik, KM., Jackson, BE., Azuero, A, Halilova, KI, ve ark. (2018) Concordance with NCCN treatment guidelines: Relations with health care utilization, cost, and mortality in breast cancer patients with secondary metastasis. *Cancer* 01;124(21):4231-4240.

RJ Huebner, AJ Ewald Cellular basis of breast tubulogenesis *Semin Cell Dev Biol* , 31 (2014) , s. 124 – 131

Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., ve ark. (2000). 15 COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. 89(12): 2637–2645.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013). An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71.

Sever, R., Brugge, JS . (2015). Signal Transduction in Cancer Cold Spring Harb Perspect Med. 5(4): a006098.

Saha, S., Choi, H., Kim, B., Dayem, A., Yang, G., Kim, K., ve ark. (2017). KRT19 directly interacts with β-catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. *Oncogene*, 36, 332

Steiner, E., Klubert, D. (2008). Assessing Breast Cancer Risk in Women. *Am Fam Physician.*; 78(12):1361-1366.

Stoddard, FR., Brooks, AD., Eskin, BA., Johannes, GJ. (2008). Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine. *Int J Med Sci.* 5(4):189-196.

Schaeffer, H.J., Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19:2435–2444.

Saha S., Choi H., Kim B., Dayem A., Yang G., Kim K., ve ark. (2016-2017) KRT19 directly interacts with β -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties 36: 332–349.

Seroussi, B., Lamy, JB., Muro, N., Larburu, N., Sekar, BD., Guézennec, G., ve ark. (2018). Implementing Guideline-Based, Experience-Based, and Case-Based Approaches to Enrich Decision Support for the Management of Breast Cancer Patients in the DESIREE Project. *Stud Health Technol Inform.* 255:190-194.

Shim, J., An, H., Lee, Y. (2003) Overexpression of Cyclooxygenase-2 Is Associated with Breast Carcinoma and Its Poor Prognostic Factors. *Mod Pathol* **16**, 1199–1204

Subbroto, KS., Kyeongseok, K., Gwang-Mo, Y., Hye, YC., Ssang-Goo, C. (2018). Cytokeratin 19 (*KRT19*) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells *Int J Mol Sci.* 19 (5): 1423

Sakoda, L.C., Gao, Y.T., Chen, B.E., Chen, J., Rosenberg, P.S., Rashid, A., ve ark. (2006). Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene polymorphisms and risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China. *Carcinogenesis.*

Hunter, T. (2000), *Cell, Signaling Issue 1*, Pages 113-127

Hunter, T. (2007). The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond *Mol Celi*, Pages 730 – 738

Tang, L., Han, X. (2013). The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed. Pharmacother.* 67:179–182.

Venturi, S. (2001). Is there a role for iodine in breast diseases?. *Breast.* 10(5):379-382.

Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2:489–501.

Vande, PP., Toledano, D., Corsini, C., Escriba, E., Laporte, M., Bertet H, ve ark. (2018). Role of the general practitioner in the care of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: General practitioner and patient perspectives. *Mol Genet Genomic Med.* 6(6):957-965.

Zhao, Y., Agarwal, VR., Mendelson, CR., Simpson, ER. (1996). Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene, *Endocrinology*, Volume 137, Issue 12 Pages 5739–5742.

Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalzo, M.L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P.C., Bova, G.S., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. (2004). *Cancer Res.* Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer.

Yager, JD., Davidson, NE. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 354(3):270-282

Witsch, E., Sela, M., Yarden, Y. (2009). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology.* 25:85–101.

Wickenden, J.A., Watson, C.J. (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: A play in 3 Akts. *Breast Cancer Res.*12:202.

Zamanian, M., Qader, Hamadne, LA., Veerakumarasivam, A., Abdul, Rahman S., Shohaimi, S. (2016). Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways. *Cancer Cell Int.* 16:56

EKLER

A. ÖZGEÇMİŞ

İsim - Soyisim: Duygu Kaya

Açık adres: Altınşehir mahalle, Şengül sokak, No:13/10, Ümraniye, İstanbul

Telefon: +90 535 700 34 99

E-posta adresi: duyukaya237@gmail.com

Doğum tarihi ve yeri: 03 Temmuz 1991 Üsküdar, İstanbul, Türkiye

Eğitim:

İstinye Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı (2017 – 2019)

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009 – 2013)

İstanbul Kadıköy Lisesi (2005 – 2009)