

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİNLİK GÖSTEREBİLECEK  
MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Senem Noyan

Danışman Öğretim Üyesi  
Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Aralık

2019

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Senem Noyan

İmzası

## ONAY

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu danışmanlığında Senem Noyan tarafından hazırlanan bu çalışma 19/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: İmza:

Üye: İmza:

Üye: İmza:

Üye: İmza:

Üye: İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

Meme Kanserinde Antikanser Etkinlik Gösterebilecek mikroRNA'ların Araştırılması

Senem Noyan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Meme kanseri, dünya çapında tanı konan ve yaşamları boyunca yaklaşık sekiz kadından birini etkileyen en yaygın ikinci kanserdir. Klinik ve biyolojik heterojenitesine rağmen, meme kanseri 50 gen imza (PAM50) veya immünohistokimyasal belirteçlerin gen ifade profillemesine dayanan altı moleküler alt tipe gruplandırılabilir: Luminal A, Luminal B, insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) pozitif, claudin-düşük, bazal benzeri ve normal meme benzeri. HER2 amplifikasyonu ve / veya aşırı ekspresyonu olan tümörler, HER2-pozitif alt tipine sınıflandırılır. Üçlü-negatif meme kanseri (TNBC), ER, PR ve HER2 ekspresyonu olmayan tümörleri temsil eder ve büyük ölçüde bazal alt tip ile örtüşür. miRNA'lar 21-25 nükleotidden oluşan RNA ailesi üyesi olup çoklu hedef genlerin düzenlenmesi yoluyla çeşitli hücresel yolları düzenlerler. Daha yakın yıllarda, kanser biyobelirteçleri olarak mikroRNA'ların (miRNA) ortaya çıkması meme kanserinin “moleküler imzasının” belirlenmesine farklı bir boyut kazandırmıştır. Tez çalışması kapsamında tamoxifen ve trastuzumab cevabı olarak belirlemiş olduğumuz miR-770-5p'nin ilaç ile birlikte (trastuzumab veya tamoxifen) ya da tek başına reseptör pozitif meme kanseri hücrelerdeki ve TNBC hücrelerindeki potansiyel etki mekanizmasının açıklanması hedeflenmiştir. Çalışmada 3 farklı ER (+) / HER2 (+) hücre hattı (MCF-7, BT-474, SK-BR-3) ve 4 farklı TNBC hücre hattı (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-157 ve BT-20) kullanılmış, miR-770-5p'nin bu hücrelerde proliferasyon, motilite ve invazyon üzerine etkisi ve bu süreçlerdeki moleküler etki mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla WST1, Wound healing assay ve xCELLigence real-time cell analyzer yardımıyla proliferasyon, motilite-invazyon deneyleri ve potansiyel hedef genleri belirlemek için qRT-PZR ve western blot deneyleri yapılmıştır. miRNA'nın potansiyel hedef genleri ile yapılan zenginleştirme analizleri sonucunda miR-770-5p'nin HER2/EGFR sinyal iletim sistemi, fokal adezyon yolağı ve EMT sürecini düzenleyerek trastuzumab'ı potansiye ettiği, hücrenin motilite ve invazyon yeteneğini anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, EMT sürecinde miR-770-5p transfekte-MDA-MB-231 hücrelerinde E-Cadherin ifadesinin geri kazandırılmasının miRNA'nın potansiyel hedefi olan DNMT3A aracılığıyla E-Cadherin metilasyon profilini değiştirerek EMT sürecini MET sürecine çevirebileceği gösterilmiştir. miR-770-5p'nin reseptör pozitif ya da TNBC meme kanseri tedavisinde potansiyel terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir.

2019, 204 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Meme Kanseri, Trastuzumab, Tamoxifen, miR-770-5p, Motilite ve İnvazyon.

## ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of microRNAs that may have anticancer activity in breast cancer

Senem Noyan

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Breast cancer (BC) is a highly heterogeneous disease and clinically categorized into four subtypes based on the presence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2 and ki67. Triple-negative breast cancer (TNBC) represents tumors without the expression of ER, PR and HER2. The concept of combining different therapeutic agents for synergistic benefits in treatment has been utilized for decades. MicroRNAs (miRNAs) comprise a class of 22–25 nucleotides long, non-coding, endogenous RNA molecules, which regulate a variety of cellular pathways. In more recent years, the emergence of miRNAs as cancer biomarkers has added an extra dimension to the ‘molecular signatures’ of breast cancer. The aim of the study is to identify the potential signaling mechanisms of miR-770-5p in proliferation, motility and invasion in breast cancer cells. In this study three ER / HER2 positive breast cancer cell lines (MCF-7, BT-474 and SK-BR-3) and four triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-157 and BT-20) were transfected with miR-770-5p. To check its role in proliferation, motility and invasion, WST1 assay, wound healing and invasion assays were performed respectively. Furthermore, potential target genes were analyzed in transfected cells by qRT-PCR and western blot to explain the effect of miR-770-5p in proliferation, motility and invasion. Pathway enrichment analysis results suggested that miR-770-5p might function as a mediator of EGFR signaling, focal adhesion and Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signaling pathways. Overall, our results may suggest miR-770-5p as a pivotal regulator of EMT through DNMT3A regulation and E-Cadherin promoter methylation in TNBC. It might be concluded that the up-regulation of miR-770-5p may play a biological role in motility and invasion signaling pathways in breast cancer cells and it could be suggested as a potential therapeutic target.

2019, 204 pages

**Keywords:** Breast Cancer, Trastuzumab, Tamoxifen, miR-770-5p, Motility and Invasion

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimime katkıları ile beni yönlendirdiği, sağladığı çalışma olanakları ve içimdeki potansiyeli kullanmayı öğrettiği için, sonraki çalışmalarımda bilgisine, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, dostluğu, sabrı ve güveni için değerli danışman hocam Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Çalışma sürecindeki bilimsel katkı ve destekleri ile yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. Hakan Gürdal ve Prof. Dr. Erkan Yılmaz'a

Tez çalışmamı 117Z634 numaralı proje kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu'na (TÜBİTAK-KBAG) ve 18L0415001 numaralı proje kapsamında destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne,

Çalışmada kullandığım materyallerden biri olan MDA-MB-157 hücre hattı için Doç. Dr. Işık Yuluğ'a ve HER3 (ErbB3) antikoru için Prof. Dr. Lale Doğan'a

Birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum, ekip olmanın keyfini yaşattan, iyi ve kötü gündeki dostlukları, bilimsel paylaşımları ile her zaman yanımda olan Yasemin Öztemur Islakoğlu ve Alp Aydos'a

Bana olan inancı ve tanıdığı fırsatlar için, her ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Alikashifoğlu'na

Bu süreçte desteğiyle yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Dilek Aktaş'a

Yardım ve destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarım (BGD Lab üyeleri) Funda Kaya Demirsoy, Ayşegül Yücel Polat, Emine Ezel Çilek, ve Burcu Dolapçı'ya

Bu süreçte dostluklarıyla yanımda olan Özge Cumaoğulları, Gözde Yalçın, Aynur Karadağ ve Emre Akpınar'a

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine,

Bütün eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi sonsuz destekleri için ve koşulsuz yanımda oldukları için aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Senem NOYAN

Aralık, 2019

Bu çalışmayı geleceğim için hayatından ödün eden, hayatımın her aşamasında beni destekleyen ve sonsuz sabır gösteren canım ANNEM'e ithaf ediyorum.



## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. MEME KANSERİ</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. MEME KANSERİ MOLEKÜLER ALT TIPLERİ .....	5
<b>2.2. MEME KANSERİNDE MOTİLİTE-İNVAZYON VE METASTAZ</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. MOTİLİTE VE İNVAZYON .....	6
2.2.2. METASTAZ .....	10
<b>2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ</b> .....	<b>12</b>
2.3.1. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE BÜYÜME FAKTÖRLERİ İNHİBİTÖRLERİ .....	14
2.3.2. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE PI3K/AKT/MTOR İNHİBİTÖRLERİ .....	15
2.3.3. TEDAVİDE TERAPÖTİK HEDEFLERİN KOMBİNE KULLANIMI .....	16
2.3.4. SİNYAL İLETİM SİSTEMLERİ VE NETWORK TABANLI YAKLAŞIMLAR .....	17
<b>2.4. MİKRORNA</b> .....	<b>26</b>
2.4.1. miRNA BİYOGENEZİ .....	26
<b>2.5. miRNA VE MEME KANSERİ</b> .....	<b>27</b>

2.5.1. KANSERİN BELİRLEYİCİ ÖZELLİKLERİNDE ROL ALAN MİRNA'LAR .....	29
2.5.2. MİKRORNA TEMELLİ TEDAVİLER VE KLİNİK UYGULAMALARI .....	31
2.5.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE MİRNA'LAR .....	33
<b>2.6. DENEYSEL MODELLER.....</b>	<b>36</b>
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>40</b>
4.1.1. MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI.....	40
4.1.2. TAMPON ÇÖZELTİLER .....	40
4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR .....	41
4.1.4. ENZİMLER.....	42
4.1.5. KİTLER.....	42
4.1.6. TEZ KAPSAMINDA MATERYALIN KULLANILDIĞI BASAMAKLAR .....	43
<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>44</b>
4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ KURULMASI VE İDAMESİ.....	44
4.2.2. ETKİN MİRNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	44
4.2.3. MİRNA'LARIN PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI .....	45
4.2.4. HÜCRELERİN MİR-770-5P İLE BİRLİKTE İLAÇLARA OLAN DUYARLILIĞININ WST-1 PROTOKOLÜ İLE BELİRLENMESİ.....	45
4.2.5. MOTİLİTE VE İNVAZYON DENEYLERİ .....	46
4.2.6. RNA İZOLASYONU VE QRT-PZR .....	47
4.2.7. PROTEİN İZOLASYONU VE WESTERN BLOT .....	52
4.2.8. DNA İZOLASYONU VE METİLASYON SPESİFİK PZR.....	55
4.2.9. BİYİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	57

## **5. ARASTIRMA BULGULARI..... 58**

### **5.1. RESEPTÖR POZİTİF HÜCRELERDE İLAÇ İLE BİRLİKTE miR-770-5P’NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ ..... 58**

#### **5.1.1. miR-770-5P’NİN HER2 SINYAL İLETİMİNDEKİ ETKİ MEKANİZMASI..... 66**

### **5.2. miR-770-5P’NİN ER/HER2 HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ ..... 68**

### **5.3. ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ (TNBC) HÜCRELERİNDE miR-770-5P’NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON ÜZERİNDEKİ ROLÜ VE POTANSİYEL ETKİ MEKANİZMASI ..... 71**

## **6. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 90**

### **6.1. TARTIŞMA..... 90**

#### **6.1.1. RESEPTÖR POZİTİF HÜCRELERDE İLAÇ İLE BİRLİKTE miR-770-5P PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ..... 90**

#### **6.1.2. ER/HER2 HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ..... 92**

#### **6.1.3. ÜÇLÜ-NEGATİF (TNBC) HÜCRELERDE miR-770-5P’NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON ÜZERİNDEKİ ROLÜ VE POTANSİYEL ETKİ MEKANİZMASI ..... 95**

### **6.2. SONUÇ ..... 97**

#### **6.2.1. RESEPTÖR POZİTİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE miR-770-5P’NİN İLAÇ ETKİNLİĞİ VE ER/HER2, HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNDEKİ ROLÜ ..... 97**

#### **6.2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE miR-770-5P’NİN EMT SÜRECİ VE İNVAZYONDAKİ ROLÜ ..... 100**

## **KAYNAKLAR..... 102**

## **EKLER ..... 133**

### **EK 1. RNA spektrofotometrik ve Bioanalyzer ölçüm sonuçları.....133**

### **EK 2. qRT-PZR sonrasında örneklerin %2 ‘lik jel görüntüsü (temsili).....136**

EK 3. miScript Primer Assay Dizileri.....	137
EK 4. Transfekte hücrelerden elde edilen protein ölçüm sonuçları .....	138
EK 5. DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve temsili jel görüntüsü.....	142
EK 6. Reseptör pozitif hücrelerde trastuzumab ve tamoxifen uygulaması sonucunda ifadesi değişen miRNA'ların üç farklı hücre hattındaki ifade değişimi.....	144
EK 7. MCF-7 hücrelerinde miR-770-5p mimic transfeksiyonu ardından yara iyileşme deneyi sonucunda elde edilen görüntüler.....	145
<b><u>ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b>145</b>
<b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>	<b>151</b>
<b><u>TEZDEN ÇIKAN BİLDİRİLER.....</u></b>	<b>151</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. miRNA biyogenezi. Hayes ve ark.'dan adapte edilmiştir (59). .....	27
Şekil 4.1. İlaç etkinliğinin belirlenmesi için yapılan WST-1 uygulamasının 96 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği.....	46
Şekil 5.1. Tamoxifen ve trastuzumab cevabında değişen mikroRNA'lar .....	59
Şekil 5.2. miR-770-5p 'nin ifadesinin belirlenmesi. ....	60
Şekil 5.3. BT-474 hücrelerinde miR-770-5p'nin proliferasyon üzerine etkisi.....	61
Şekil 5.4. miR-770-5p'nin ilaç ile birlikte proliferasyon üzerine etkisi.....	62
Şekil 5.5. BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde miR-770-5p motilite üzerine etkisi. ....	64
Şekil 5.6. BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde miR-770-5p invazyon üzerine etkisi .....	65
Şekil 5.7. miR-770-5p'nin tek başına ve trastuzumab ile birlikte ErbB2 protein ifadesi üzerine etkisi.....	66
Şekil 5.8. miR-770-5p transfekte BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde total ERK ifadesi. ...	67
Şekil 5.9. Trastuzumab varlığında miR-770-5p'nin AKT ve ERK üzerine etkisi. ....	68
Şekil 5.10. Tamoxifen ya da Trastuzumab varlığında BT-474 hücrelerinde ER, IGF1R, HER2 ve EGFR total protein düzeyleri .....	69
Şekil 5.11. Tamoxifen ya da trastuzumab ile birlikte miR-770-5p'nin BT-474 hücrelerinde ER, IGF1R, HER2 ve EGFR total protein düzeylerine etkisi. ....	71
Şekil 5.12. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde proliferasyon eğrileri. ....	72
Şekil 5.13. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde EGFR sinyal sistemi.....	73
Şekil 5.14. miR-770-5p transfekte üç TNBC hücre hattında EGFR sinyal iletim sisteminin iki temel düzenleyicisi olan AKT ve ERK protein düzeyleri .....	74

Şekil 5.15. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde total mTOR ve total IGF1R düzeyleri. ....	75
Şekil 5.16. TNBC hücrelerinde miR-770-5p'nin motilite üzerine etkisi .....	76
Şekil 5.17. miR-770-5p'nin potansiyel hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi grafiği .....	77
Şekil 5.18. Fokal Adezyon yolağında yer alan genler ile yapılan eş zamanlı qRT-PZR analiz sonuçları .....	78
Şekil 5.19. miR-770-5p tahmini hedef genleri ve motilite ilişkisi. ....	79
Şekil 5.20. miR-770-5p transfekte BT-20 hücrelerinde EGFR, HER3, IGF1R, AKT ve ERK protein düzeyindeki azalma gösterilmiştir.....	80
Şekil 5.21. miR-770-5p'nin TNBC hücre hatlarında invazyon üzerine etkisi. ....	81
Şekil 5.22. Adherens Junction yolağı .....	82
Şekil 5.23. TNBC hücrelerinde EMT belirteçlerinin mRNA düzeyinde ifadeleri .....	83
Şekil 5.24. miR-770-5p varlığında CDH1/TCF3 ilişkisi.....	84
Şekil 5.25. TCF3 ifade düzeyinin meme kanserinde tümör normal arasındaki ve meme kanseri alt tipleri arasındaki durumu .....	85
Şekil 5.26. Üç farklı TNBC hücre hattında E-Cadherin ve Vimentin ifadeleri.....	86
Şekil 5.27. miR-770-5p ve DNMT3A ilişkisi .....	87
Şekil 5.28. MDA-MB-157 hücrelerinde miR-770-5p'nin invazyon üzerine etkisi.....	88
Şekil 5.29. CDH1 ve VIM seviyelerinin miR-770-5p mimic transfekte MDA-MB-157 hücrelerinde incelenmesi .....	88
Şekil 5.30. miR-770-5p varlığında CDH1 metilasyonu .....	89
Şekil 6.1. HER2 sinyalinde mir-770-5p'nin önerilen etki mekanizması.....	92

Şekil 6.2. miR-770-5p'nin HER2/EGFR/IGF1R karşılıklı etkileşim (crosstalk) üzerine etkisi. .... 94



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, kullanılan besiyeri ve içerikleri. ....	40
Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyonu .....	48
Çizelge 4.3. Eş-zamanlı PZR reaksiyonu .....	49
Çizelge 4.6. qRT-PZR için kullanılan primer dizileri. ....	49
Çizelge 4.4. miRNA RT reaksiyonu.....	51
Çizelge 4.5. miRNA qRT-PZR reaksiyonu .....	51
Çizelge 4.7. Resolving jel yüzdeleri ve içerikleri.....	52
Çizelge 4.8. Stacking jel içeriği.....	53
Çizelge 4.9. Western Blotlama için kullanılan antikor listesi .....	54
Çizelge 4.10. Metilasyon spesifik PZR koşulları .....	56
Çizelge 4.11. Metilasyon spesifik CDH1 primer dizileri (178). ....	56
Çizelge 5.1. miR-770-5p hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi verileri.....	63



## SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
ABP	Aktin bağlama proteinleri
Ago	Argonat
AI	Aromataz inhibitörü
AR	Amphiregulin
ATCC	American Type Culture Collection
BL	Bazal benzeri
bp	Baz çifti
BTC	Betacellulin
DHT	Dihidrotestosteron
dk	Dakika
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
EPG	Epigen
EPR	Epiregulin
ER	Östrojen reseptörü
ER+	Östrojen reseptörü pozitif
ERα	Östrojen reseptörü alfa

ER $\beta$	Östrojen reseptörü beta
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
GPCR	G protein-bağlı reseptör
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
HER2+	HER2-pozitif
HR+	Hormon reseptör pozitif
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF1	İnsülin büyüme faktörü-1
IGF1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü tip 1 reseptörü
IRS-1	İnsülin reseptör Substrat 1
LAR	Luminal androjen reseptörü
LNN	Lenf nodu negatif
MAPK	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MBC	Metastatik meme kanseri
miRNA	MikroRNA
ML	Mezenkimal benzeri
MSL	Mezenkimal kök hücre benzeri
MS-PZR	Metilasyon spesifik PZR
ng	Nanogram

°C	Santigrat derece
PDGF	Trombosit türevli büyüme faktörü
PDX	Hastadan türetilmiş xenograft modeli
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PKC	Protein kinaz C
<i>PKCa</i>	Protein kinaz C alfa
PR	Progesteron reseptörü
qRT-PZR	Eş zamanlı PZR
RISC	RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks
RTK	Reseptör tirozin kinaz
Scr	Scrambled kontrol
TBST	TBS-Tween
TGF	Transforming büyüme faktörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
ul	Mikrolitre
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
VEGFR	Vasküler endotelial büyüme faktörü resptörü
VIM	Vimentin
WHA	Wound Healing Assay

## 1. GİRİŞ

Kadınlarda meme kanseri insidansı sekizde birdir ve yeni tanı alan kanser vakalarının %30'unun meme kanseri olacağı tahmin edilmektedir (1). Tüm kanserlerde mortalite eğilimleriyle uyumlu olarak, meme kanserinin genel sağkalım oranı son on yılda artmıştır. Bununla birlikte, meme kanseri hastalarının yaklaşık % 24'ü ilk olarak 40 yaşın altında teşhis edilir ve meme kanseri bu yaş grubunda önemli ölüm nedenidir. Ek olarak, 40 yaş öncesi kanser teşhisi genellikle Afrikalı-Amerikalılar ve BRCA1/2 mutasyon taşıyıcılarında yapılmaktadır (2).

Meme kanseri heterojenitesi iyi bilinmekte olup yaygın şekilde rutin belirteçler kullanılarak belirlenir. Klinik olarak, meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), HER2 ve Ki-67'nin varlığına bağlı olup rutin olarak dört alt tipe ayrılmaktadır (3). Transkriptomik verinin eklenmesiyle ER ve PR pozitif tümörlerin birçoğu yaygın olarak görülen lüminal A ve lüminal B alt tiplerine sınıflandırılmıştır (4,5). HER2 amplifikasyonu ve / veya aşırı ekspresyonu olan tümörler, HER2-pozitif alt tipe sınıflandırılır. Üçlü-negatif meme kanseri (TNBC), ER, PR ve HER2 ekspresyonu olmayan tümörleri temsil eder ve büyük ölçüde bazal alt tip ile örtüşür. TNBC, meme kanserinin sadece % 15-20'sini temsil etmesine rağmen, TNBC'deki nüks ve mortalite, diğer alt tiplerden önemli ölçüde daha yüksektir (6). TNBC'nin malignitesi ve metastatik meme kanserinin ölüm hızı göz önüne alındığında bu alt tipin tedavisi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Meme kanserinin ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala yeterince anlaşılamamaktadır, bu da hastalığın teşhisinde, yönetiminde ve tedavisinde büyük zorluklara sebep olmaktadır. Meme kanseri, belirgin ancak karmaşık histopatolojik paternler ve klinik davranışlar içeren oldukça heterojen bir hastalıktır (7,8). mRNA profillemesine odaklanan mikrodizin tabanlı yüksek verimlilik yaklaşımları meme kanserinin moleküler düzeyde sınıflandırmasına katkı sağlamıştır (4,9). Son yıllarda, kanser biyobelirteçleri olarak mikroRNA'ların (miRNA'ların) ortaya çıkması, meme kanserinin 'moleküler imzalarına' boyut kazandırmıştır (10–12).

miRNA'lar, bitkilerde ve hayvanlarda fizyolojik olarak bulunan 18-25 nükleotid uzunluğunda, yüksek oranda korunmuş, kodlamayan RNA'lardır (13–15). miRNA çoğunlukla hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanır ve bu durum mRNA degradasyonuna veya translasyonel inhibisyonuna yol açar (16). miRNA, RNA polimeraz II ile kök ilmik yapılarına katlanan pri-miRNA dizilerine kopyalanır. pri-miRNA, pre-miRNA yapıları oluşturmak için Drosha kompleksi tarafından ayrılır. pre-miRNA, exportin-5-RanGTP ve diğer adaptör proteinlerine bağlanarak sitoplazmaya taşınır. Dicer miRNA'ları küçük miRNA'lara işler. miRNA'lar ve hedefleri arasındaki eksik tamamlayıcılık nedeniyle, bir miRNA 100'den fazla geni hedefleyebilir. Bu özellik miRNA'ları en büyük düzenleyici/regülatör sınıflarından biri yapar ve hücrel süreçleri düzenlemek için koordine şekilde hareket etmelerini sağlar. Proteinlerin % 60'nı modüle etme/düzenleme yeteneklerinden dolayı miRNA'lar kanserde güçlü onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak görev yapar (17,18).

miRNA ifadesi, belirli dokulara gelişim aşamalarında oldukça spesifiktir ve proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve kök hücre yenilenmesi gibi çeşitli temel hücrel işlemlerde rol oynar (19,20). Dolayısıyla, miRNA'ların düzensizliğinin kanser dahil birçok hastalıkta sıkça yer alması şaşırtıcı değildir (21,22). Yüksek verimli sistemler aracılı yapılan miRNA profillemesi ile meme, pankreas, mide, beyin, kan, akciğer, karaciğer ve kolorektal gibi çok çeşitli kanserlerde farklı "miRNA imzaları" ortaya çıkmıştır (22). miRNA imzaları çeşitli epitelyal kanserleri sınıflandırmak ve karakterize etmek için kullanılmıştır.

mikroRNA'lar ile ilgili bilimsel çalışmalar, 20 yıl önceki keşiflerden günümüze kadar geçen zamanda uzun yol kat etmiştir. Klinik teşhiste biyolojik belirteç olma potansiyellerinin yanı sıra çeşitli hastalıkların tedavisinde düzenleyici olarak kullanılma fikri heyecan vericidir. Yakın gelecekte, yeni moleküler tanı kriterleri olarak kullanılma potansiyelleri ve mikroRNA temelli terapinin seçici protein inhibitörleri ile yarışabilme kapasitesi konusu daha net hale gelecektir.

Terapötik hedefler olarak miRNA'ların değeri yaygın olarak bilinmektedir. 10 yıl içinde, klinik uygulamalarda, insana özgü birçok miRNA keşfedilmiştir ve bu miRNA'ların klinikte yararlı olabileceği düşünülmektedir. Keşfedilen bu miRNA'ların birçoğu ex-vivo kapsamlı araştırmalar ile ilgili alanlarda terapötik imkânlar önerirken; bazıları ise klinik

olarak ilgili hayvan modellerinde ve pre-klinik çalışmalarda geçerliliğini korumuştur. Tümör kaynaklarını, alt tipleri, onkojenik mutasyonları ve kanser yatkınlığını ayırt edebilmek ve önemli hücresel süreçleri düzenlemek için, miRNA'ların kanser prognozunu ve / veya spesifik tedavilere yanıtı önceden tahmin edebileceği öngörülmektedir. Etki mekanizması itibariyle genomda temel düzenleyiciler olarak işlev görebilme özelliği miRNA'nın ilaç hedefi olmasını sağlamış ve bu molekülleri gelecekte ürün geliştirmede umut verici adaylar haline getirmiştir. Bu moleküllerin klinikte kullanılması için ciddi bir engel, etkili bir gönderim sisteminin bulunmamasıdır. Tedavi edici miRNA'ların zayıf farmakokinetiği, miRNA kararlılığını artıran ve hedef dokular tarafından hücreye alımını artıran adjuvan taşıyıcı sistemler üretilmesi için acil bir gereksinim ortaya koymuştur. Lipozomal ve polimer esaslı gönderim teknolojilerini kullanan terapötik siRNA'lar ile elde edilen klinik denemeler cesaret vericidir ve terapötik miRNA'ların klinik gelişimini hızlandırması beklenmektedir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, 1.3 milyondan fazla vaka ile dünyada en yaygın kanser tiplerinden biri olup her yıl 450.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır (23). Klinik ve biyolojik heterojenitesine rağmen, meme kanseri 50 gen imza (PAM50) veya immünohistokimyasal belirteçlerin gen ifade profillemesine dayanan 6 moleküler alt tipe gruplandırılabilir: Luminal A, Luminal B, insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) pozitif, *claudin-low*, bazal benzeri ve normal meme benzeri (24,25). Luminal alt tipler, östrojen reseptörünün (ER) ekspresyonu ile karakterizedir ve potansiyel olarak endokrin terapi ile hedeflenebilirler. Luminal A alt tipi, yüksek Ki-67 boyaması ve genellikle *ERBB2* olarak da adlandırılan HER2'nin aşırı ekspresyonu ile karakterize Luminal B alt tipiyle karşılaştırıldığında, çoğunlukla daha yüksek ER ifadesi nedeniyle, daha iyi bir prognoza ve azalmış nüks oranına sahiptir (26,27). HER2'nin zenginleştiği alt tip, HER2 gen lokusundaki aşırı ifade ile tanımlanır. Oldukça agresif ve metastaza eğilimli olduğu bilinmesine rağmen, HER2-pozitif (HER2+) meme kanseri vakaları bu alt tipte fazla ifade edilen HER2 reseptörünü hedef alan trastuzumab (Herceptin) monoklonal antikörünün klinik başarısından büyük oranda faydalanmışlardır (26). Bazal benzeri meme kanseri kötü prognozu ve sınırlı tedavi seçenekleri ile bilinmektedir (28). Üçlü negatif meme kanserinin (TNBC) immünohistokimyasal olarak tanımlanan alt tipine büyük ölçüde benzemektedir. Diğer iki alt tip olan *claudin-low* ve normal meme benzeri alt tipler için ise hedef temelli tedavilerin eksikliği nedeniyle bazal benzeri alt tipe benzer şekilde kemoterapötik maddeler ve radyasyon ile sınırlı tedaviler uygulanmaktadır (25,29).

Bu alt tiplerin hedeflenen tedavilerine karşı direnç oluşumu bildirilmiştir. ER-pozitif (ER+) vakalar için endokrin tedavi uygulanırken, tedaviye direnç oluşumu ER'nin down-regülasyonu ve ilişkili sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleşir. Benzer şekilde, HER2 ile zenginleştirilmiş hastalardaki trastuzumab tedavisi, reseptörün ekspresyonuna bağlı olduğu için direnç, HER2'nin ifadesinin azalması, *ErbB* ailesinin diğer üyelerinin ifade artışı ya da aşağı akış sinyal moleküllerindeki mutasyonların sağkalım ve çoğalmayı aktif hale getirilmesiyle meydana gelir (30). Klasik kemoterapiye karşı direnç genellikle ilaçların metabolizmasını ya da hücrelerdeki konsantrasyonlarını etkileyen mekanizmalar ile

gelişmektedir. Genel direnç mekanizmaları strese yanıt olarak hücrelerin apoptoz veya hücre döngüsünün durdurulmasının duyarsızlaşmasını içerir.

### 2.1.1. MEME KANSERİ MOLEKÜLER ALT TIPLERİ

Gen ifade mikrodizin teknolojisinin ortaya çıkmasıyla, başlangıçta meme kanseri beş alt tipe ayrılmıştır. Bu alt tipler, Luminal A, luminal B, HER2, bazal benzeri (BL) ve normal benzeri olarak sıralanabilir (4). BL tümörler yüksek keratin 5/6 ve 17 ekspresyonuna sahiptir; tersine, Luminal alt tip luminal keratin 8/18'i ifade eder (5). Klinik belirteçlere bağlı olarak, TNBC'nin % 79'u BL alt tipi olarak tanımlanır (31). Artan örnekler, yeni genlerin dahil edilmesi ve fare modelleriyle karşılaştırılması sonucunda *claudin-low* adı verilen ek bir alt tip ortaya çıkmıştır (32). *Claudin-low* tümörler, epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) yer alan genlerin ekspresyonunun artması ile histolojik olarak üçlü negatiftir (33). Bu 6 alt tip tanı ve tedavi sürecinde faydalı olsa da, her alt tipte ek karmaşıklık vardır. Aslında, alt tipler içinde bile, bazal grup gen ekspresyon paterni düşünüldüğünde, hayatta kalma değişimleri bulunmaktadır (34). Lehmann ve ark. gen ekspresyonu ve gen ontolojisi temelinde TNBC tümörlerini 6 alt tipte kategorize etmiştir (35). BL1 ve BL2 alt tiplerinde temsili gen ontolojileri hücre döngüsü, EGF ve MET yollarını içerir. İmmünomodülatör alt tip, çoklu immün sinyal yolu açısından zenginleşmiştir. Mezenkimal benzeri (ML) ve mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) alt tipleri hücre farklılaşması ile bağlantılı yüksek gen ekspresyonuna sahiptir. Luminal androjen reseptörü (LAR) alt tipi artan androjen ekspresyonu ve zenginleştirilmiş androjen ve östrojen metabolizması ile işaretlenmiştir. Son zamanlarda, Burstein ve ark. TNBC hastalarını dört alt tipe ayırmıştır: LAR, mezenkimal, BL immün baskılanmış ve mRNA ekspresyonuna ve çeşitli kümeleme yöntemlerine dayanan BL immün-aktif edilmiş (36). İmmünolojik bilginin kullanıldığı alternatif bir yaklaşımda, TNBC tümörleri, düşük bağışıklık tepkisi olan LAR, BL ve yüksek bağışıklık tepkisi olan BL olmak üzere üç alt tipte toplanmıştır (37). Gen ifadesine dayanan bu çok çeşitli sınıflandırmalar göz önüne alındığında, bazal meme kanseri gelişimini düzenleyen genomik olaylar incelenmiş ve birçok bazal tümörde 5. kromozom q kolu delesyonunun (5q delesyonu) tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır (38). Ayrıca, meme kanserinin diğer heterojen özellikleri, epigenetik ve protein ekspresyon seviyesinde kaydedilmiştir (23). Meme kanserinin alt tipleri arasındaki gen ifade farklılıkları, terapötik cevap ile ilişkilidir.



## 2.2. MEME KANSERİNDE MOTİLİTE-İNVAZYON VE METASTAZ

Çeyrek asırlık hızlı gelişmelerin ardından, kanser araştırmaları kanserin genomdaki dinamik değişimleri içeren bir hastalık olduğunu ortaya çıkaran zengin ve karmaşık bir bilgi birikimi yaratmıştır. Temelde onkogenlerde *gain of function* (fonksiyon kazanımı) zellik gösteren mutasyonların veya tümör baskılayıcı genlerde *loss of function* (fonksiyon kaybı) zelliği olan mutasyonların keşfedilmesi, kanser hücrelerinde meydana gelen değişiklikler ve deneysel modellerde kanser fenotiplerinin ortaya çıkarılmasına neden olmuştur (39). Kanser belirteçleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında edinilen 6 biyolojik kabiliyeti içerir. Bu belirteçler, neoplastik hastalığın karmaşıklığını rasyonelleştirmek için bir organizasyon prensibi oluşturur. Bu prensipler; proliferatif sinyalin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçış, hücre ölümüne direnç, hücre lmszliğnn sağlaması, anjiyojenezin indüklenmesi, motilite ve metastaz aktivasyonunu içerir (40).

### 2.2.1. MOTİLİTE VE İNVAZYON

Tümör hücre motilitesi, invazyon ve metastaz için gereklidir. Hücre göçü ve invazyon, kanser hücrelerinin metastatik yayılmasında ve kanser hastalarında en önemli ölüm nedeni olan metastaz oluşumunda kritik parametrelerdir. G yeteneğine sahip kanser hücreleri, çeşitli sinyal ağlarının aktivitesini içeren moleküler süreçleri yeniden düzenleyerek hücre-hücre ve hücre-matriks yapışmalarını ve aktin hücre iskeletini moleküler ve hücrenel değişikliklere uğratırlar. Çok sayıda moleküler sinyal iletim ağı, tek hücreli amoeboid g, mezenkimal g ve kolektif hücre g dahil olmak üzere kanser hücrelerinde farklı güç ve invazyon türlerini tanımlar.

Normalden kanser durumuna geçiş sırasında, epitel hücreleri göç etme ve böylece invazyon eğilimi kazanır. Bunun sonucu uzak metastaz oluşumdur. İnvazyon için, tümör hücrelerinin hücre şeklinde aşırı değişiklikler geçirmesi gerekir. Bu işlem sırasında, hücredeki aktin filamentlerinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu dinamik kontrol altında olmalıdır. Bu durum invaziv hücrenin stromal hücrelerden, hücre dışı matriks ve endotel hücre katmanından geçebilmesi için gereklidir. Tümör hücrelerinin infiltrasyon bölgesine giren lökositlere benzer bir hücre etkileşim mekanizması kullandığı varsayılmaktadır. Ayrıca, invaziv hücre g kanser hücrelerinin spesifik bir yeteneği

değildir. Hücre göçü ve invazyon, trofoblast implantasyonu, sinir gelişimi, yara iyileşmesi, mukoza ve epidermal rejenerasyon ve anjiyojenezde zorunlu işlemlerdir (41).

Hücre göçü esas olarak, çok çeşitli aktin bağlama proteinlerinden (ABP) etkilenen aktin polimerizasyonuna ve hücre içi organizasyona bağlıdır. ABP aktivitesinin düzenlenmesine fosfoinosititler ve kalsiyum gibi ikinci haberciler aracılık eder. Bu ikinci haberciler vasıtasıyla sinyal iletimi, membran reseptörleri, örneğin reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) ve adezyon molekülü etkileşimleri (örn. integrinler ve selektinler) ve fokal adezyon kinazları tarafından başlatılır ve düzenlenir (41).

Hücrenin aktin hücre iskeletinin organizasyonu ve yeniden düzenlenmesi ile ilgili çok sayıda molekül tanımlanmıştır. Bunlar arasında integrinler ve selektinler gibi tutunma molekülleri, epidermal büyüme faktörü reseptörü-EGFR ve c-erbB-2 gibi transmembran reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), fosfolipitler, fokal adezyon kinazları (FAK), GTPazlar ve kalsiyum sayılabilir. İlk olarak beyin tümörleri ve mesane kanserinde EGFR reseptör ifadesi ile tümör yayılımı arasında bir ilişki gösterilmiştir. Daha sonra RTK olan c-erbB-2'nin, kanser hücrelerinin invazivliğini ve metastatik potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (41).

Bir reseptör tirozin kinaz olan c-erbB-2, ikinci haberci sinyallerini yönlendirmede ve böylece aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde ve kanser hücrelerinin hareketliliğinde önemli rol oynar. Bu durum, esas olarak enzimleri, örneğin, sinyal moleküllerini modifiye eden fosfolipaz Cg1 ve GTPazları içeren bir dizi sinyalleme yolu ile meydana gelir. Ayrıca, aktin ile ilgili protein 2/3 (Arp2/3), Wiskott-Aldrich sendromu proteini, profilin ve diğer proteinleri içeren büyük multiprotein kompleksleri aktin reorganizasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (41). Tümör hücre göçünde rol alan aktin yeniden yapılanma modunun karmaşık resmi, yavaş yavaş hücrel sinyal yollarının sislerinden ortaya çıkmaktadır, ancak bu hala net bir görüş değildir.

Karsinomların başlangıcında önemli bir adım olarak kabul edilen invazyon, metastazın ortaya çıkmasına neden olur. İnvazyon, tümör hücrelerinin birincil tümörden ayrılmasına ve göç etmesine olanak tanıyan koordine edilmiş bir dizi hücrel ve moleküler mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Tümör invazyonu sırasında hücre tutunması ve migrasyonundaki değişiklikler, epitelial mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılan ve

intravazyon gibi metastatik kaskadın diğer evrelerinde aktif bir role sahip olan önemli bir gelişme sürecini anımsatır (42).

### **2.2.1.1. EMT (Epitelyal Mezankimal Geçiş)**

EMT (Epitelyal mezankimal geçiş) pek çok hayvan türünde embriyonik gelişim sırasında kritik bir aşamadır. EMT 'nin ayırıcı özelliklerinden biri, *CDH1* geni tarafından kodlanan ve karsinoma ilerlemesinde invazyonun baskılayıcısı olduğu düşünülen E-cadherin'in fonksiyonel kaybıdır (43). Malignant tümör progresyonu sırasında E-cadherin regülasyonunun karakterizasyonu, tümör invazyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalara önemli bilgi sağlamıştır. Özellikle, *CDH1*'in transkripsiyonel baskılanması, yakın zamanda, tümör ilerlemesi sırasında temel bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Aslında, *CDH1* 'i güçlü bir şekilde baskılayan birçok transkripsiyon faktörünün (Snail, ZEB ve bazik heliks-loop-heliks (bHLH) ailelerinin üyeleri gibi) tümör ilerlemesinde görev aldığı bilinmekte ve bu nedenle potansiyel klinik aday molekül olarak düşünülmektedir (44).

Günümüzde SNAIL süper ailesi SNAIL ve Scratch ailesi olarak ikiye ayrılır. Omurgalılarda SNAIL ailesi üyeleri *SNAI1*, *SNAI2*, *SNAI3* olarak tanımlanmıştır (45). SNAIL ailesinin üyeleri dört bölgeyi içeren korunmuş bir C-terminal bölgesi, altı çinko parmak (C2H2 tipi) ve farklı N-terminal bölgesi gibi ortak organizasyonu içeren çinko parmak transkripsiyon faktörleridir. Çinko parmaklar, C/A(CAGGTG) konsensus E2 kutusu tipi elementleri tanımlayan dizi-spesifik DNA-bağlama alanları olarak işlev görür. Bu transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel baskılayıcılar olduğu düşünülmektedir. Baskılayıcı kapasitesi, SNAG domaine bağımlıdır. SNAG domaini, proteinin N-terminal kısmındaki korunmuş 7-9 aminoasitten oluşur. *SNAI1* mezoderm oluşumu, gastrulasyon ve nöral krest oluşumu sırasında ve aynı zamanda epitelyal mezenkimal geçişin (EMT) gerekli olduğu gelişim süreçlerinde ifade edilir (43).

Transkripsiyon faktörlerinden diğer bir aile olan ZEB ailesi, sırasıyla *ZFHX1A* ve *ZFHX1B* genleri tarafından kodlanan ZEB1 (EF1) ve ZEB2 (SIP1) olarak bilinen iki üyeden oluşur. Bu grup, proteinin ucunda iki çinko parmak kümesinin ve merkezi bir homeodomain varlığı ile karakterizedir. ZEB faktörleri, gelişme sırasında merkezi sinir sistemi, kalp, iskelet kası ve hematopoietik hücrelerde ifade edilir (43,46).

### **2.2.1.2. EMT Moleküler Düzenlenmesi**

*CDHI*'in transkripsiyonel baskılayıcısı ve EMT'nin tetikleyicisi olarak bilinen SNAIL ailesi üyelerinin karakterizasyonu, invazyonun moleküler mekanizmalarına yeni bir anlayış kazandıran önemli gelişmelerden biridir. O zamandan beri diğer *CDHI* baskılayıcıları ve EMT indükleyicileri tanımlanmıştır. Literatürde, bu faktörlerin tümör ilerleyişindeki önemi nedeniyle, çalışma prensiplerini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır (43,45). *SNAI1* ve *SNAI2* (Slug olarak da bilinir) gelişimsel EMT 'ye ve diğer süreçlere katılan Snail süper ailesine ait çinko parmak transkripsiyonel baskılayıcılardır (47). ZEB ailesinin iki üyesi olan ZEB1 (*TCF8*) ve ZEB2 (SMAD etkileşen protein 1 (*SIP1*) olarak da bilinir) E-cadherin'i baskılayarak EMT'nin indüksiyonunu düzenleyen anahtar faktörler olarak ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda farklı insan tümörlerinin malignitesinde de rol oynarlar. E47 (E2A geni tarafından kodlanan, *TCF3* olarak da bilinir), *TCF4* (E2-2 olarak da bilinir) gibi transkripsiyon faktörleri ve *TWIST1*, *CDHI* baskılayıcısı ve EMT uyarıcısı olarak görev alan geniş bir protein ailesinin üyeleridir (43). Bu nedenle, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda bu faktörlerin ifadesini ve fonksiyonunu düzenleyen hücresel ve moleküler mekanizmaları anlamak önemlidir.

SNAIL proteinlerinin gelişim sürecinde önemli bir adım olan EMT üzerindeki etkisinin bilinmesi bu proteinlerin ifadelerini düzenleyen sinyal iletim ağının tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Gelişme sırasında EMT hem omurgasız hem de omurgalı sistemlerde reseptör tirozin kinazlar (fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi farklı sinyaller tarafından aktive edilen RTK'lar), BMP (*bone morphogenetic protein*) ve WNT sinyalleri ile indüklenir (45,48). Hücre hatları ve transgenik fare modelleri üzerindeki çalışmalar, benzer sinyal yollarının, karsinogenez ile ilişkili EMT'de *SNAI1*'i ve daha az ölçüde *SNAI2*'yi düzenlediğini doğrulamıştır (43,45). Önemli ölçüde, TGF $\beta$ , RTKs-Ras, Notch, Hedgehog ve / veya Wnt veya  $\beta$ -katenin yolları gibi bazı yollar arasında karşılıklı etkileşim bulunmaktadır. Özellikle, tümör hücre hatlarında bu yolların çoğu *SNAI1* aracılı *CDHI* baskılamasını veya  $\beta$ -katenin sinyali ile birlikte çalışarak EMT veya *SNAI2* ekspresyonunun indüksiyonunu koordine eder. Son yıllarda, memelilerde *CDHI* baskılamasının düzenlenmesine katılan prostaglandin E2 (*PGE2*) gibi ek sinyaller ortaya çıkmıştır (49,50). Bu sinyal sistemi *SNAI1* ve *ZEB1* ekspresyonunun başlatılmasını sağlar.

İlginç bir şekilde, bu yollardan bazıları TWIST (VEGF ve Wnt) veya ZEB faktörlerini (TGF $\beta$ -BMP) de indüklemekle birlikte bir kısmı *SNAI1* ve *SNAI2* veya ZEB faktörlerine spesifik görünmektedir. *CDH1* baskılayıcılarının steroid ve ilgili reseptörler tarafından düzenlenmesi bazı hormona bağımlı kanser hücrelerinde analiz edilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde androjen analogu dihidrotestosteron (DHT), *SNAI2*'yi ve daha az oranda *SNAI1* ekspresyonunu indükleyebilir. Östrojen reseptörü (ER) aracılığıyla sinyal, meme kanseri hücrelerinde *SNAI1* ekspresyonunu *MTA3* mekanizması yoluyla negatif şekilde düzenler. Bu nedenle, *MTA3* veya ER kaybı ve *SNAI1* upregülasyonu meme kanserinde kötü prognosis ile ilişkilidir (43). Buna karşılık, *ZEB1* östrojen sinyal kaskadı tarafından indüklenebilir, ancak bu bulgunun tümör gelişimindeki biyolojik önemi bilinmemektedir. *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* ve *ZEB2* 'nin spesifik kromatin yeniden yapılandırma komplekslerinde görev alması, tümör ilerlemesi ve EMT sırasında transkripsiyonel baskılama ile *CDH1* 'in epigenetik olarak susturulması arasında dinamik bir bağlantıyı desteklemektedir.

### **2.2.2. METASTAZ**

Lenfatik sistem veya dolaşım sistemi yoluyla meme kanseri metastazı mortalitenin en önemli nedenidir. Meme kanserinde metastaz, bölgesel lenf nodları aracılığıyla akciğerlere, karaciğere, beyine ve kemiklere belirgin bir yayılımla karakterizedir (51). Ayrıca, distal metastaz oranları ve bölgeleri tanı ve yaşa göre değişebilir. Metastazların en sık rastlanan yeri kemiktir, sıklıkla % 50'ye varan distal metastazların ilk bölgesidir (52), sırasıyla akciğerler ve karaciğer ikinci ve üçüncü en yaygın metastatik bölgelerdir. Metastatik meme kanseri hastalarının % 10-15'inde beyin metastazı gelişmiş ve meme kanseri en yaygın beyin metastaz kaynağı haline gelmiştir (53). Benzer bir metastaz dağılımı, relaps sonrası (post-tedavi), birden fazla metastaz bölgesi olan hastaların % 22'sinde görülür (53,54).

Kemik metastazı meme kanserinde en yaygın metastatik bölge olmaya devam etmektedir (55). Bununla birlikte, bazal kanserlerin öncelikle akciğerlere metastaz yaptığı bulunmuştur. İlginç bir şekilde, lümenli kanserler de daha düşük beyin metastazı oranına sahip olma eğilimindedir. 1990'ların sonlarında HER2+ meme kanserleri için trastuzumab tabanlı tedavilerin uygulanmasına rağmen, HER2+ alt tipi için beyin metastazı yüksek

düzeydedir (56). Trastuzumab'ın kan beyin bariyerini geçmesi beklenmediğinden, bu oranların etkilendiği düşünülmemektedir.

### **2.2.2.1. Meme Kanseri Alt Tipleri ve Metastaz Durumları**

Hali hazırda, bireyin meme kanserinin şiddeti, TNM evrelemesine dayanmaktadır, burada T tümör boyutunu tanımlar, N lenf nodu durumunu (+/-) tanımlar ve M, herhangi bir uzak metastaz ile ilgilidir (0/1). TNM evrelemesine ek olarak, meme kanseri de büyüklüğe ve metastatik yayılmaya bağlı olarak I-V evrelerine ayrılabilir. Anlamlı bir şekilde, bu birleşik evreleme, tedavi seçimini belirlemek için klinikte kullanılır. Bununla birlikte, TNM evrelemesinde, örnekleme yardımcı lenf düğümlerindeki sınırlamalar nedeniyle aşırı evreleme ve belirsizliklerinde dahil olduğu sınırlamaları ve dezavantajları vardır. Ayrıca, dört meme kanseri moleküler alt tipi farklı hastalık ilerlemesi, hayatta kalma ve nüks oranlarını içerir. Luminal alt tipler, daha yavaş metastatik yayılma, daha düşük rekürrens oranları ve HER2+ ya da bazal alt tiplerden daha iyi sonuçlara sahip olma eğilimindedir (55,57). Bu fark, histolojik alt tipten veya tespit zamanından bağımsız olarak, meme kanserinin erken evrelerinde saptanan bazal karsinomların çoğunluğunu içerir. Medyan sağkalımı karşılaştırırken (birinci distal metastaz zamanından itibaren), luminal A ve B alt tiplerinin (2.2 ve 1.6 yıl) HER2+ alt tipine (1.3 yıl) kıyasla genel hayatta kalma süresini göstermektedir. Bununla birlikte, bazal alt tip en kötü genel sağkalım oranına (0.7 yıl) sahiptir (53).

Relaps oranları, en yüksek olan HER2+ alt tip (% 51.4), büyük ölçüde luminal B (% 42.9), bazal (% 35.1) ve luminal A (% 27.8) şeklinde sıralanabilir. En düşük nüks oranına ek olarak, luminal A nüksü diğer alt tiplerden daha sonra da ortaya çıkar. Klinik olarak, HER2+ kanserlerin kötü prognozu vardır; Bununla birlikte, anti-HER2 tedavilerinin gelişmesinden sonra sağkalımda bir iyileşme olmuştur (% 72.2'den % 78.6'ya). Luminal B'nin luminal A'ya kıyasla diğer visseral organlara (karaciğer gibi) metastaz oranının daha yüksek olmasına rağmen, kemik en yaygın primer metastatik bölge olarak durumu korur. Bazal alt tip genellikle geç başlangıçlı, daha büyük ortalama tümör boyutu ve en düşük genel sağkalım ile karakterizedir (58).

### 2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Meme kanseri, hormon reseptörleri olan östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ile reseptör tirozin kinaz *erbB-2* 'nin (*ERBB2* veya HER2) statüsüne (+/-) göre alt kategorilere ayrılabilir. Ayrıca, son yıllarda geliştirilen genetik testler meme kanserini moleküler alt tiplerine ayırmada katkı sağlamıştır (9). Şu anda dört ana moleküler alt tip vardır: lüminal A, ~% 50-60 meme kanseri; lüminal B, % 10-20; HER2 +, % 15-20 ve geriye kalan % 10-20 oranında Bazal alt tip olarak kabul edilmektedir. Ortak moleküler meme kanseri alt tiplerini daha alt kategorilere ayırmak, klinisyenlerin hastaya özgü kanser tedavileri geliştirebilmelerini sağlamıştır. Özellikle Onkotip DX testi, kansere bağlı 16 gen ve 5 referans geni değerlendirmekte ve sonuçlar ile hastalığın olası yeniden ortaya çıkışlarını tahmin etmekte ve hastanın kemoterapi alması gerekip gerekmediğini değerlendirmek için kullanılmaktadır (53).

Meme kanserinin yaklaşık % 70 'inde östrojen reseptörü alfa (ER $\alpha$ ) ifadesi olup bu reseptör lüminal A veya lüminal B'nin moleküler alt tiplerinde bulunan bir reseptördür (59). ER $\alpha$ -pozitif meme kanserinde proliferasyon östrojen sinyaline dayanır ve bu nedenle bu hormona duyarlı tümörlerin büyümesini durdurmak veya yavaşlatmak için en etkili strateji, endokrin terapisi kullanarak tümördeki östrojen etkisini bloke etmektir. Günümüzde ER $\alpha$  meme kanseri için kullanılan endokrin terapi seçenekleri şunlardır: ER $\alpha$  fonksiyonunu antagonize eden selektif ER modülatörü tamoxifen; ER $\alpha$  'nın ifadesini azaltmak için anti-östrojen olan fulvestrant ve aromataz enzimini bloke ederek periferik dokularda östrojen üretimini baskılayan letrozol, anastrozol ve exemestan gibi aromataz inhibitörleri (AI).

Tümör hücreleri özellikle lüminal meme kanseri hücreleri, çoklu fenotipik ve genotipik hücre alt popülasyonları ile karakterize edilen çarpıcı heterojenite sergiler. Bu hücre alt popülasyonlarını tanımlamak, onları hedeflemek için rasyonel yöntemler geliştirmek ve her birinin hormon direncine nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için önemlidir. Endokrin direncin moleküler mekanizmaları üzerine son zamanlarda daha fazla odaklanılmıştır, bunlar: (i) östrojen yokluğunda yapısal olarak aktif olan ve klasik endokrin muamelesi ile bastırılması daha zor olan mutant ER'nin varlığı; (ii) reseptörün aktivitesini büyük ölçüde arttıracak ER koaktivatörlerinin ifade artışı ya da amplifikasyonu; (iii) büyüme faktörü

ve büyüme faktörü reseptörü içeren alternatif onkojenik sinyal yollarının yukarı regülasyonu ve (iv) onkojenik proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan gen bölgelerinin çoğaltılması veya aşırı ekspresyonu kanser hücresinin hayatta kalmasını, invazyon ve metastaz yeteneğini artırır (30).

HER2'nin aşırı ekspresyonu, meme kanserlerinin yaklaşık % 30'unu içerir ve kötü klinik ile ilişkilidir (60). Ayrıca, over, prostat, mide ve diğer kanserlerde, HER2 aşırı ekspresyonu bu reseptörü prognostik belirteç haline getirmiş ve HER2'nin antitümör tedavisi için çok önemli bir hedef olduğunu göstermiştir.

HER2'ye yönelik tedavide kullanılan Trastuzumab (Herceptin), HER2 hücre dışı alanını hedef alan hümanize bir monoklonal antikordur ve HER2-pozitif metastatik meme kanserinde (MBC) kemoterapi ile birlikte kullanımı için 1998'de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (61). Trastuzumab'ın anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri, muhtemelen antikora bağımlı hücrel sitotoksosite, hücre dışı domain kesiminin inhibisyonu, azalmış DNA onarımı, azalmış hücre içi sinyal iletimi ve anti-anjiyojenik etkilerin bir kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (61). Bununla birlikte, primer ve sekonder direnç sıklıkla görülür. Olası mekanizmalar arasında, diğer ErbB üyeleri veya insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) ile HER2 arasındaki karşılıklı etkileşim (crosstalk), HER2'nin trastuzumab bağlanma bölgesi içermeyen HER2-p95 formunun varlığı, PTEN eksikliği, PI3K/Akt sinyalinin aktivasyonu ve ErbB2 reseptörünün trastuzumab aracılı endositozunu etkileyen Rac1'in varlığı yer almaktadır (61).

Geçmişte, farklı meme kanseri alt tipleri olan hastalar için tedavi seçeneklerine ilişkin kararlar histolojik özelliklere dayanmaktaydı. Örneğin, hormon tedavisi ER ve / veya PR pozitif meme kanseri hastaları için standart tedavidir ve trastuzumab, pertuzumab gibi monoklonal antikolar, lapatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri aracılı HER2 odaklı tedavi HER2-pozitif tümörler için standarttır. TNBC'de bu üç reseptörün bulunmaması nedeniyle, bu hastalar için hala birincil seçenek kemoterapidir. TNBC, kemoterapiye yanıt veren alt tip olmasına rağmen (% 22), TNBC hastalarının nüks ve metastazı oranı TNBC dışı tümörlerden daha yüksektir (62). TNBC hastalarının terapötik sonuçlarını iyileştirmeye



yönelik acil ihtiyaç, moleküler özelliklerin bu alt tipe ilişkilendirilmesi, terapötik yanıtlar ve yeni hedeflerin belirlenmesini birçok çalışmanın odak noktası haline getirmiştir.

TNBC tedavisinde potansiyel hedefleri araştırmak için, TNBC hastalarının tedaviye verdiği yanıtın doğasında bulunan genomik etkiler incelenmiştir. Silver ve ark. promoter metilasyonu ve p53 mutasyonlarına bağlı olarak *BRCA1* ekspresyonunun değişmesinin, cisplatin tedavisinde iyi yanıt ile korele olduğunu göstermiştir (63). Benzer şekilde, yüksek *CD73* ekspresyonu da TNBC hastalarında doksorubisin'e direnç ile ilişkilendirilmiştir (64). BL tümörlerinin genomik spektrumuna odaklanan bir başka çalışma, BL tümörlerinde genomik değişikliklerin p53 ve *PIK3CA* mutasyonları, *RBI* ve *PTEN* kaybı, siklin E1'in amplifikasyonu ve artan *HIF1-a* ve *Myc* ekspresyonu içerdiğini göstermiştir (23). Birincil tümöre ek olarak, Balko ve ark. neoadjuvan kemoterapi sonrasında meme kanserinde *ATM*, *BRCA1/2*, ve *CDKN2A*'daki fonksiyon kaybı ve *CDK4*, *JAK2*, *MCL1*, *EGFR* ve *AKT1* gibi genlerde ilave amplifikasyon belirlemiştir (65). Bu bulgular, TNBC için hedef odaklı tedavilerin gelişimini etkileyebilecek ek bilgiler sağlar. TNBC'lerde gen ifade çalışmalarına ve kanserlerin ortak özelliklerine dayanarak *in vitro*, *in vivo* ve klinik denemelerdeki çalışmalarda birkaç potansiyel hedef belirlenmiştir. Bu hedefler içerisinde yer alan büyüme faktör reseptörleri ve aşağı akış sinyal elemanlarından olan PI3K/Akt/mTOR yolağını hedefleyen çalışmalar bulunmaktadır.

### **2.3.1. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE BÜYÜME FAKTÖRLERİ İNHİBİTÖRLERİ**

EGFR, VEGFR ve FGFR TNBC hastalarında aşırı eksprese edilmiş temel büyüme faktör reseptörleri arasındadır (23,65,66). Ligand bağlanması üzerine, bu büyüme faktör reseptörleri tümör büyümesini ve anjiyogenezini teşvik eden aşağı akış sinyalini aktive eder. EGFR inhibitörleri (monoklonal antikolar veya tirozin kinaz inhibitörleri), klinikte küçük hücreli akciğer kanserini tedavi etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Cisplatin ile birlikte cetuximab (anti-EGFR antikor) uygulaması, metastatik TNBC hastalarında genel sağkalım cevap oranını önemli ölçüde arttırmıştır (67). Bununla birlikte, başka bir klinik faz I denemesinde, erlotinib (EGFR inhibitörü) ile birlikte bendamustin (alkilleyici ajan) uygulaması sonucunda metastatik TNBC hastalarında ciddi lenfopeni not edilmiş ve

11 hastadan sadece birinin kısmi cevap gösterdiği raporlanmıştır (ClinicalTrials.gov, NCT00834678) (68).

Klinik deneyleri tamamlanan ve FDA tarafından TNBC kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan seçici FGF inhibitörleri halen bulunmamaktadır. Ancak, PD173074 (FGFR inhibitörü) ile yapılan ön çalışmalarda, artmış CAL-51 ve FGFR2 ifadesi gösteren BL meme kanseri hücre hattı xenograft modelinde hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (66,69).

Bevacizumab (VEGFR inhibitörü) küçük hücreli akciğer kanseri, metastatik kolorektal kanser ve diğer kanserlerde tedavi amaçlı kullanılır. Bununla birlikte, HER2 ve metastatik meme kanserinde bevacizumab ve kemoterapinin kombinasyonu genel sağkalımı önemli ölçüde iyileştirmediği raporlanmıştır (70). Tamamlanmış bir Faz III klinik çalışmasında, kemoterapi ile birlikte bevacizumab uygulamasının, genel olarak hayatta kalma veya invazyon süresini uzatmadığı, TNBC hastalarında bevacizumab ve kemoterapi kombinasyonunun yararlarını tanımlamak için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini bildirmiştir (71).

### **2.3.2. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE PI3K/AKT/MTOR İNHİBİTÖRLERİ**

*PIK3CA* mutasyon sıklığının hem luminal hem de HER2+ alt tipi tümörlerde % 32 ila 49 arasında değiştiği kaydedilmiştir. Buna karşılık, bazal alt tip tümörler, *PTEN* kaybı ve *AKT3*'ün amplifikasyonu için zenginleştirilmiştir (23). TNBC'de ise *PIK3CA* mutasyon oranı anlamlı olarak arttığı bilinmektedir (35,65). Bu bulgular göz önüne alınarak yapılan bir çalışmada, *PI3K* inhibitörü ile birlikte bicalutamid'in androjen reseptör pozitif (AR+) TNBC hücrelerinin büyümesini sinerjistik olarak inhibe ettiği raporlanmıştır (72). Everolimus (mTOR inhibitörü) ile birlikte exemestan (aromataz inhibitörü), hormon reseptörü pozitif metastatik meme kanserinin sağkalımını uzattığı ve klinik kullanım için onaylandığı bildirilmiştir (73). Bunun üzerine, TNBC'de bilinen mTOR'un aktivasyonu için MDA-MB-231 hücrelerinin ortotopik olarak enjekte edildiği fare modeline kemoterapi reaktifleri (karboplatin ve docetakselin) ile birlikte BEZ235 (PI3K/mTOR inhibitörü) verilmesinin tümör büyümesini inhibe etme etkisini arttırdığı belirlenmiştir (74). Ek olarak, klinik çalışmalar TNBC'de kemoterapi ile birlikte PI3K veya mTOR inhibitörlerinin kombinasyonlarının klinik yararlarını değerlendirmiştir. Metastatik TNBC'de GDC-0941

(PI3K inhibitörü) ile birlikte cisplatin uygulaması faz II denemesi sonlandırılmıştır (ClinicalTrials.gov, NCT01918306). Bir başka Faz II denemesi, metastatik TNBC hastalarının %36'sının everolimus ve karboplatin kombinasyonundan faydalandığını göstermiştir (ClinicalTrials.gov, NCT01127763) (75). Ek olarak, PI3K/mTOR yolunu hedefleyen inhibitörlere karşı gelişen dirençle ilgili birkaç geri bildirim mekanizması tanımlanmıştır (76).

### 2.3.3. TEDAVİDE TERAPÖTİK HEDEFLERİN KOMBİNE KULLANIMI

Farklı terapötik ajanların tedavide sinerjistik faydalar için birlikte kullanılması son yıllarda uygulanmaktadır. Hücre hatları, bu hücre hatları ile oluşturulan fare modelleri ve hastadan türetilmiş xenograft modeli (PDX'ler) ile birlikte yapılan çalışmalar meme kanserinin çeşitli kombinasyon terapilerine verdiği yanıtı aydınlatmak için önemli bir fırsat sağlar.

TNBC'de tedavi sonuçlarının iyileştirilmesi için kullanılan stratejilerden biri, araştırmalar sonucu ortaya çıkan genler de dahil olmak üzere mevcut kemoterapiye verilen tepkilere aracılık eden hedeflerin birleştirilmesidir. Bu verilere önemli ölçüde katkıda bulunan bir yöntem hem sentetik öldürücü etkileşimleri ortaya çıkaran hem de hedefli tedaviye direnç kazandıran genleri tanımlayan hücre hatlarında ilaç kombinasyonunun taranmasıdır. Örneğin, bu yaklaşım ile NOTCH1 yolu aktivasyonunun PI3K inhibitörlerine karşı gelişen dirence neden olduğu belirlenmiştir (77). PI3K inhibitörlerinin meme kanserindeki önemi ve PI3K inhibitörlerine sık direnç gösterilmesi nedeniyle bu çalışma oldukça önemlidir. Castel ve ark. *PDK1* ve *SGK1*'in aracılık ettiği yeni bir PI3K direnç mekanizmasını tanımlamışlardır (78). PI3K inhibisyonu ve direnç gelişimi ile birlikte *SGK1* aracılı *mTORC1* aktivitesi dikkat çekicidir (78). *PDK1* inhibitörünün eklenmesi daha sonra bu hücre hatlarında PI3K inhibitörünün hassasiyetini geri kazandırmıştır. MEK inhibitörleri inhibitör tedavisi ile hedef yukarı regülasyonunun bir başka örneği gözlenmiştir. MEK inhibitörü uygulanan TNBC hücrelerinde VEGFR2, AXL ve PDGFR-P gibi birkaç reseptör tirozin kinaz aktivitesinin arttığı not edilmiştir. AZD6244 (MEK inhibitörü) ve sorafenib (çoklu reseptör kinaz inhibitörü) kombinasyonunun, tümör büyümesinin sinerjik inhibisyonuna yol açtığı raporlanmıştır (79).

### 2.3.4. SİNYAL İLETİM SİSTEMLERİ VE NETWORK TABANLI YAKLAŞIMLAR

Meme kanserinden elde edilen gen ekspresyonu verileri ile zenginleştirme analizi (80) veya hücre sinyali yolu aktivasyonunu öngörmek için bir Bayesian yaklaşımı kullanarak tümör içindeki aktif sinyal bileşenleri hakkında önemli bilgiler elde edilebilir (81–83). Bu tahminleri bilinen inhibitörler ile birleştirmek optimal tedaviyi belirlemek için kullanılabilir. Örneğin, her bir meme kanseri alt tipinin, bu yollar için önemli heterojenliği koruyarak, belirli yollarda zenginleştirildiği gösterilmiştir (34). Bu, bir alt tipteki tümörlerin aynı ilaçlara farklı tepkiler vermesi durumunda cevaptaki değişkenliği açıklayabilir. Bu tip verileri kullanarak terapötik gelişimde yapılan ilk çalışmalar, kombine tedavilerle hedefli terapötik ajana karşı direncin üstesinden gelmeye odaklanmıştır. Örneğin, TNBC'de PI3K/Akt/mTOR yolağına direnç, bu yol inhibitörlerinin bir JAK2 inhibitörü ile birleştirilmesiyle ele alınmıştır (NVP-BSK805) (84). Yapılan bir çalışmada sinyal aktivasyon paterni analiz edildikten sonra meme tümörlerinin heterojen alt tipleri için özel kombine tedavilerin geliştirilmesi sonucunda tümör büyümesinin önemli şekilde azaldığı gösterilmiştir (85).

#### 2.3.4.1. ErbB (HER) Resptörleri ve Sinyal İletim Sistemi

İnsan genomunda 60'dan fazla reseptör tirozin kinaz (RTK) tanımlanmıştır (86). RTK üst familyasının alt sınıfı, ERBB veya epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörlerini içeren dört üyeden oluşur: HER1/EGFR (ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) ve HER4 (ERBB4). Diğer RTK'lar gibi, ErbB (HER) reseptörleri, N-terminali hücre dışı domaine, transmembran sarmalına ve sitoplazmik alana sahip transmembran proteinleridir (87). Hücre dışı domain, ligand bağlayıcı alt domainler (domain I ve III) ve reseptör dimerizasyon alt dominleri (domain II ve IV) dahil olmak üzere dört alt domain içerir (88). Hücre içi bölge tirozin kinaz domaini ve bir C-terminal düzenleyici kısımdan oluşur. ERBB reseptörlerine ligand bağlanması, reseptör homo- ve heterodimerlerinin oluşumunu ve intrinsik kinaz bölgesinin aktivasyonunu indükler, sitoplazmik kuyruk içindeki spesifik tirozin kaynakları üzerinde fosforilasyona neden olur. Bu fosforlanmış kısımlar hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan bir dizi protein için kenetlenme bölgesi olarak işlev görür.

170 kDa ağırlığında bir polipeptit zinciri olan EGFR, HER ailesi reseptörlerinden biridir (89). EGFR ve HER4, çeşitli ligandlara bağlanmayı takiben hem homodimer hem de heterodimer olarak sinyal iletimi sağlayabilen fonksiyonel RTK'lar iken; HER2 ve HER3 bu iki üyeden farklıdır. HER2, ligand bağlanma bölgesi içermeyen bir reseptördür. HER3'ün ise, kinaz aktivitesi eksiktir. Bununla birlikte, ligand kaynaklı heterodimerizasyon yoluyla, tüm HER reseptörleri hücre sinyalleşmesine aracılık etmek için tamamen aktive edilebilir (90,91).

EGF'nin yanı sıra, HER reseptörlerine bağlanıp sinyali aktifleştirmek için 10 ligand tanımlanmıştır. Bu ligandlar EGF ailesinin peptit büyüme faktörlerinden oluşur ve bağlanma ortaklarına göre üç gruba ayrılır: EGF, amphiregulin (AR), epigen (EPG) ve transforming büyüme faktörü (TGF), özellikle EGFR'ye bağlanan bir grubu oluşturur. EGF, betacellulin (BTC) ve epiregulin (EPR) hem EGFR hem de HER4'e bağlanan ikinci grubu oluşturur. NRG1, NRG2, NRG3 ve NRG4 içeren dört neurogulin, HER4'e bağlanan üçüncü grubu oluşturur. Bununla birlikte, NRG1 ve NRG2 HER3'e de bağlanır. Ayırt edici bağlanma özgülüğü ve afinitesi sayesinde her ligand, dört HER reseptörünün aktivasyonunu ve sinyalini düzenler (90,92–94).

HER2, hücrelerde aşırı ifade edildiğinde kendiliğinden homodimer oluşturur ve diğer bütün HER reseptörleri, tercihen HER2 ile dimerize olur (92). Homo veya heterodimerizasyon yoluyla C-terminali düzenleme bölgesindeki çoklu tirozin bölgelerinin fosforilasyonu sonucunda bütün HER reseptör sinyal ağı aktive edilir. Tirozin fosforilasyon bölgelerinin haritalanmasıyla ilginç özellikler ortaya çıkarılmıştır. Hem EGFR hem de HER4, birçok farklı akış aşağı proteinlere bağlanır. EGFR; *Grb2*, *Src*, *Shc*, *PLC-γ1*, *Crk*, *Ptp-2c*, *Stat5* ve *SHP1*'e bağlanır. HER4 ise *RasA1*, *Abl*, *Syk*, *Crk*, *Grb2* ve *Vav2*'ye bağlanır. HER3 p85'e bağlanan çok sayıda tirozin bölgesi içerir ve dolayısıyla HER3 PI3K-Akt yolunu kuvvetle aktive eder. Öte yandan, HER2 çoğunlukla Erk yolağının *Shc/Grb2* aracılı aktivasyonunu sağlar. Bağlanma spesifikliğine dayanarak, HER2 homodimerinin çoğunlukla Ras-ERK yolağının aktivasyonunu uyardığı bilinmektedir (95).

ErbB reseptörlerinin gelişim sırasında önemi yapılan araştırmalar ile açıkça anlaşılmaktadır. Ayrıca, EGFR ve ERBB2 birçok kanser türünün gelişiminde rol oynamaktadır. EGFR, insan tümörleri ile doğrudan ilişkili ilk tirozin kinaz reseptörüdür (91). ErbB ailesi üyeleri

çoğu zaman birçok kanser türünde aşırı eksprese edilir, çoğaltılır veya mutasyona uğrar ve bu durum onları önemli terapötik hedefler yapar. EGFR'nin gliomalarda ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda çoğaltıldığı, ErbB2 amplifikasyonlarının meme, yumurtalık, mesane, küçük hücreli olmayan akciğer karsinoması ve diğer birkaç tümör tipinde görüldüğü bildirilmiştir (96).

Meme kanserinde ErbB (HER) tirozin kinaz reseptörlerinin aktive olduğu bilinmekte ve bu reseptörleri hedefleyen monoklonal aktikor tedavileri ya da kinaz inhibitörleri klinikte uygulanmaktadır. Tedaviye karşı gelişen direnç mekanizmasında sinyal iletim sistemi içinde yer alan aşağı akış elemanlarının tanımlanması ve bu molekülleri hedefleyen kombine tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önemlidir.

#### **2.3.4.2. PI3K-mTOR ve RAS-ERK Yolaklarının Meme Kanserinde Rolü**

##### **2.3.4.2.1. PI3K-mTOR Yolağı ve Kanserdeki Rolü**

PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı, insan kanserlerinde en düzensiz sinyal iletim sistemlerinden biridir. Bu yolak, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, büyümesini ve yayılmasını destekleyen metabolizma, motilite, büyüme ve proliferasyon gibi temel hücresel süreçleri kontrol eder. Bu yol, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *AKT*, *TSC1*, *TSC2*, *LKB1* (*STK11* olarak da bilinir), mTOR ve diğer onkojenler veya tümör baskılayıcı genleri içeren çeşitli genomik değişiklikler dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla kanserde anormal şekilde aktivite gösterebilir (97). Bu değişiklikler sıklıkla birçok tümör tipinde tespit edilmiştir ve PI3K-AKT-mTOR yolağının terapötik hedeflenmesi için olanak sağlar. Ek olarak, klinik öncesi ve erken klinik deneylerin sonuçları, bu yaklaşımların potansiyel etkinliğini desteklemiştir. PI3K-AKT-mTOR yolağının hedeflenmesini içeren araştırmalar, PI3K ve AKT inhibitörleri ve allosterik mTOR ve katalitik mTOR kinaz inhibitörleri gibi farklı ilaç sınıfının gelişmesine yol açmıştır (98). Günümüzde bu proteinlerin 40 farklı inhibitörü, klinik gelişimin çeşitli aşamalarına ulaşmıştır, ancak sadece birkaçı - mTOR inhibitörlerinden temsirolimus ve everolimus ve PI3K inhibitörlerinden idelalisib ve copanlisib - hastaların tedavisinde klinik kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır (97). Bununla birlikte, bu ilaçların tek başına sınırlı etkinliği vardır. Onlara yanıt veren moleküler faktörler ve terapötik dirence karşı hareket edebilecek optimal ilaç kombinasyonları henüz belirlenmemiştir. Ayrıca PI3K-AKT-mTOR yolağı inhibitörlerinin

kullanımı ile hangi ilaçların veya ilaç sınıflarının hangi kanser tipinde kullanılması gerektiği ve rasyonel kombinasyon stratejilerinin geliştirilmesinin daha iyi klinik yarar sağlayıp sağlayamayacağı ve daha fazla düzenleyici bileşiğin onay almasına yol açıp açmadığı sorusu gibi pek çok soru hala cevapsız kalmaktadır.

Moleküler değişimlerin aracılık ettiği PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun aktivasyonu, antikanser terapilerine karşı direncin yanı sıra, tümör gelişiminin desteklenmesinde de etkilidir. PI3K/Akt/mTOR yolu, ErbB ailesi reseptörleri, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R) ve diğerleri gibi transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleri ile aktive edilebilir (99). Ek olarak, aktifleştirilmiş RAS gibi G protein-bağlı reseptörler, katalitik alt-birimi yoluyla PI3K'yi uyarabilir (98). Fonksiyonel PI3K, plazma membranına transloke edilir, sonuçta fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2)'in fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3)'a fosforilasyonuna yol açar. Bu adım, PIP3'ü PIP2'ye defosforile eden PTEN tarafından negatif olarak düzenlenir. PIP3 serin-treonin kinaz fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (*PKK1*) AKT'yi (treonin308) fosforlar. Fosforile edilmiş AKT, pro-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri *BAD* ve *BAX* 'ı inhibe ederek veya p53 aracılı apoptozu antagonize eden *MDM2* 'nin fosforilasyonunu sağlayarak hücre sağkalımını artırır.

#### **2.3.4.2.2. RAS-ERK Yolağı ve Kanserdeki Rolü**

ERK, Ras onkoproteininin ana efektörü olarak işlev gören bir MAPK (mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz) 'dir. MAPK yolağının bileşenleri GTPaz ve efektör kinazdır. ERK-MAPK yolundaki bu bileşenler Ras GTPaz ve protein kinazlar olan Raf, MEK ve ERK 'dir. Ras ve ERK-MAPK yolağı büyüme faktörleri, polipeptit hormonları, nörotransmitterler, kemokinler ve kendilerine ait RTK'ler (reseptör tirozin kinazlar) ve GPCR'ler (G protein-bağlı reseptörler) aracılığıyla ya da direkt PKC (protein kinaz C) ile aktive edilirler (100,101). Aktifleştirilmiş ERK, RSK (p90 ribozomal S6 kinaz) ve transkripsiyon faktörleri gibi efektörleri dahil sitoplazmik sinyal proteinlerini fosforlar. ERK nükleer hedefleri, IEG (Immediate Early Gene) ekspresyonunu indüklemeye önemli bir rol oynayan *TCF* (Ternary Complex Factor) transkripsiyon faktörlerini içerir. c-Fos ve c-Myc gibi IEG ürünleri, hücre yaşamını, hücre bölünmesini ve hücre hareketliliğini destekleyen genleri uyarır (102,103). Şaşırtıcı bir şekilde, Ras-ERK sinyallemesinin fizyolojik olmayan aşırı aktivasyonu, CDK (sikline bağımlı kinaz) inhibitörlerinin

ekspresyonunu ve hücre döngüsü durdurulmasını tetikleyebilir (104). Aktif ERK'nin hedef özgünlüğü, substrat mevcudiyeti (hücre tipi, hücre döngüsü fazı ve hücre dışı ortam), ERK *scaffold* yapısı ve hücre içi lokalizasyonu ile kontrol edilir.

RAS-RAF-mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) / hücre dışı sinyal-regüle kinaz (ERK) kinaz (MEK) -ERK ve fosfosinositid 3-kinaz (PI3K)-PTEN-AKT sinyal yolları tümör başlangıcını ve tümör ilerlemesini destekleyen sinyal transdüksiyon ağında rol oynar. Bu durum sıklıkla görülen *RAS*, *RAF*, *PI3KCA*, *AKT* ve *PTEN* mutasyonlarının yanı sıra malignitelere bulunan AKT 'nin amplifikasyonudur (105,106). Sinyal iletim ağları pek çok molekül ile kontrol edildiğinden, reseptörlerin aşağı akışındaki molekülleri hedefleme yolları, daha fazla terapötik etkinlik ve daha geniş uygulanabilirliğe yol açabilir. Örneğin MEK yoluyla sinyal transdüksiyonunun ortadan kaldırılması, hem aktive edilmiş hücre yüzeyi reseptörlerinden hem de mutant *RAS* ve *BRAF* 'dan kaynaklanan proliferasyon-destekleyici ve anti-apoptotik sinyallerin inhibe edilmesine olanak sağlar.

Meme kanserinde RAF-MEK-ERK sinyalizasyon kaskadı aktivasyonu artan metastaz riski ile ilişkilidir (107). Ayrıca, RAF-MEK-ERK yolu ve östrojen reseptörü (ER $\alpha$ ) arasındaki karşılıklı etkileşim tamoksifen direncine neden olabilir (108). Bu bulgular meme kanserinde RAF-MEK-ERK yolunu tedavi edici bir hedef olarak doğrulamakla birlikte, MEK inhibitörlerinin klinik çalışmaları sadece sınırlı anti-tümör aktivitesi göstermiştir (109). MEK inhibisyonuna karşı kötü klinik yanıtın altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır ve hasta seçimini yönlendirmek için uygun MEK inhibitörlerine karşı herhangi bir duyarlılık veya direnç belirteci henüz tanımlanmamıştır (110).

### **2.3.4.3. Sinyal Yolları Arasındaki Karşılıklı Etkileşim (Crosstalk)**

#### **2.3.4.3.1. RAS-ERK / PI3K-mTOR Karşılıklı Etkileşimi**

Ras-ERK ve PI3K-mTOR sinyal yolları hücrede hayatta kalma, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma ve motiliteyi kontrol eden başlıca mekanizmalarıdır. Bu yolların bileşenleri, bilim insanlarının proto-onkojenleri klonlamaya başladığında ve 1980'lerde hücre kinaz aktivitelerini aydınlatmaya başladığında ilk keşfedilenler arasındaydı. Ras-ERK ve PI3K-mTOR normalde farklı uyaranlar tarafından aktive edilen lineer sinyalizasyon kanalları olarak modellenmiştir, ancak erken deneyler bile birbirlerini düzenlemek ve aşağı akış



fonksiyonlarını koordine etmek için keşisebileceğini ima etmiştir. Bu keşişimin kapsamı ve kanser terapisindeki önemi ortaya çıkmıştır. Yolak aktivasyonunun yoğunluğu ve süresi, uyarının gücü ve geribildirim döngüleri tarafından düzenlenir. Ras-ERK aktivasyonunda yer alan agonistler sadece PI3K-mTORC1'e sinyal iletenler moleküller ile kısmen örtüşürler. PMA (forbol 12-miristat 13-asetat), genellikle Ras-ERK yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Buna karşılık, insülin ve IGF1 (insülin büyüme faktörü-1) daha zayıf Ras-ERK aktivatörleri, ancak güçlü PI3K-mTORC1 aktivatörleridir. Ek olarak, spesifik büyüme faktörleri ile sinyal yolu aktivasyonunun derecesi, genellikle büyüme faktörünün miktarına, kendi ortak RTK'larının hücre yüzeyi lokalizasyonuna ve reseptör aile üyelerinin ve diğer proteinlerin ekspresyonuna bağlıdır. Sinyal dinamikleri de genellikle Ras-ERK ve PI3K-mTORC1 yollarında yer alan pozitif ilerleme ve negatif geri besleme döngülerinden büyük ölçüde etkilenir.

Ras-ERK ve PI3K-mTORC1 yol entegrasyonu ile ilgili ilk ipuçlarından biri, p70S6K aktivasyonuna PI3K bağımlı ya da bağımsız girişleri tanımlandığı 1990'ların başında ortaya çıkmıştır. Aradan geçen yıllarda, birçok mekanizma ve etkileşim modu ortaya çıkarılmıştır. Bunlar, substratlar üzerinde çapraz inhibisyon, çapraz aktivasyon ve yolağın yakınlığını (*pathway convergence*) içerir (103).

Ras-ERK ve PI3K-AKT yolları birbirlerinin aktivitelerini olumsuz olarak düzenleyebilir. Böyle bir çapraz inhibisyon çoğu zaman bir yolun kimyasal olarak bloke edilmesiyle ortaya çıkar ve böylece çapraz inhibisyonu serbest bırakır ve diğer yolu etkin biçimde aktive eder (103). Ras-ERK yolu PI3K, TSC2 ve mTORC1'i düzenleyerek PI3K-mTORC1 sinyalini çapraz olarak aktive eder. Ras-GTP, PI3K'yi doğrudan bağlayıp allosterik olarak etkinleştirebilir. RAS-ERK yolunun kuvvetli aktivasyonu, ERK ve RSK tarafından sinyal entegrasyonu TSC kompleksine sinyal göndererek mTORC1 aktivitesine de yol açabilir. ERK ve RSK bölgeleri, AKT tarafından fosforlanmış olanlardan farklıdır, fakat aynı şekilde TSC'nin GAP fonksiyonunu inhibe etmek ve mTORC1 aktivitesini ve tümör oluşumunu teşvik etmek için işlev görür (103). Aktif hale gelen ERK, RSK, AKT ve S6K, hücrenin hayatta kalma, proliferasyon, metabolizma ve motilitesini teşvik etmek için aynı substrat üzerinde hareket ederler (103).

ERK ve PI3K yolları, hücre döngüsü ve sağkalım (örn., Siklin D) ile ilişkili olan ve çeşitli çapraz geri bildirimlerle yapısal olarak düzenlenen aynı transkripsiyon faktörlerini işlevsel olarak birlikte düzenler. ERK ve PI3K yolları gibi son derece bağlantılı biyolojik ağ sistemlerinin, dışsal bozulmalara karşı sağlamlığa sahip olduğu bildirilmiştir. Kompleks metabolik ağ içinde alternatif yollar kullanan metabolik akıların yeniden düzenlenmesi, enzimlerin işlev bozukluğunun dengelenmesi için önemli bir mekanizmadır. Yapılan deneyler ile ERK ve PI3K yollarının kombine blokajının, tek hedef inhibisyonu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (111).

#### **2.3.4.3.2. ER-IGFR-HER2 Karşılıklı Etkileşimi (Crosstalk)**

Kanser ve insulin benzeri büyüme faktör -1 reseptörü (IGF1R) arasındaki ilk ilişki 20 yıl öncesine dayanır. Meme tümörlerinde IGF-IR'nin aşırı ifadesi % 87 civarındadır (112). Farklı pek çok çalışma IGF1R 'nin hücre büyümesi, invazyon ve metastaz üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu belirtmiştir (113). Çok yakın geçmişte, ilaç direnci vasıtasıyla HER2 ve IGF1R arasında karşılıklı etkileşim varlığı gösterilmiştir. HER2'den bağımsız olarak, IGF1R PI3K/Akt sinyal yolağını aktive eder ve hücre prliferasyonunu sağlar. Her iki reseptörden birinin hedeflenmesi diğerinin aktivasyonunun artmasına neden olduğu gözlenmiştir (114). Trastuzumab dirençli meme kanseri hücre hatlarında IGF1R ve HER2 ya da IGF1R ve HER2 / HER3 heterodimerizasyonu görülmüştür (115). Karışıklığın diğer bir kısmı ise, Worthington ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada vurgulanmıştır. Çalışmada, HER2'in IGF-1'in salgılanmasını artıran IGF bağlayıcı protein 3'ün ifadesini azalttığı ve böylece IGF1R sinyal iletim sistemini indüklediği gözlenmiştir (116).

Meme kanseri hücrelerinde östrojenin proliferatif etkisi ER'nin büyüme faktör sinyal sistemi bileşenlerinin ifadesinin düzenlenmesine katkı sağlayabilir. Çalışmalar tamoxifen gibi anti-östrojenlerin IGF aracılı büyümeyi engellediğini ve anti-IGF stratejilerinin östrojen aracılı büyümeyi durdurabileceğini göstermiştir. Pek çok çalışmada östrojenin IGF sinyal sisteminde etkili olduğunu ve IGF sinyalinin östrojen varlığına duyarlı olduğunu bildirilmiştir.

Östrojen meme kanseri hücrelerinde hem IGF1R hem de IRS-1 ifadesini artırarak IGF sinyalini ve reseptör altında yer alan yolakları etkinleştirir (117). MCF-7L hücrelerinde östrojenin IRS-1 ifadesini düzenlediği gösterilmiştir. Östrojen varlığında tümör büyümeye

başladığında, sadece IRS-1 seviyesinin yükselmediği aynı zamanda fosforlandığı belirtilmektedir. Bu tümörler aynı zamanda IRS-1 aracılı sinyal iletim sistemini indükleyen yüksek miktarda fosforile MAPK içerir. Östrojen uzaklaştırıldığında tümör büyümesi durur ve IRS-1 ifadesi ve MAPK aktivitesi azalır (117). Bu durum IGF1R, IRS-1 ve östrojen arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu gösterir.

Östrojen artışı büyüme faktör iletim sistemi bileşenlerini pozitif etkilemesinin yanında bazı bileşenleri negatif etkiler. Östrojen meme kanseri hücrelerinde büyümeyi durduran IGFBP-3'ün ifadesini azaltır (118,119). Ayrıca östrojen IGF-IIR ifadesini azaltır. IGF-IIR IGF-II'ye yüksek afinite gösterir ancak hücre dışı sinyale aktarılamaz. Böylece reseptörün meme kanseri proliferasyonunu engellemesine neden olur (119).

Östrojen hücre büyüme sinyalini artırırken anti-östrojenler ters etki göstererek büyüme faktör bileşenlerinin ifadesini azaltırlar. Böylece anti-östrojenler IGFBP-3 ifadesini artırarak IGF sinyalini durdururlar (118) ve IGF1R ile IRS-1 ifadesini azaltırlar (120,121). Anti-östrojenler aynı zamanda ER'nin IGF odaklı ligand bağımsız aktivasyonunu engelleyerek IGF1R ve IRS-1 fosforilasyonunu da azaltır. Bu mekanizma iki yolak arasındaki karşılıklı etkileşimin karmaşıklığına ışık tutar.

Östrojen IGF sinyal bileşenlerinin ve IGF sinyali için gerekli c-fos, c-jun, c-myc gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadesini düzenler (122). Östrojen aynı zamanda siklin D1, p21 gibi hücre döngüsü elemanlarının ifadesini de kontrol eder (123). IGF ve ER hücre döngüsünde sinerjistik etki gösterir.

Büyüme faktörü reseptörü sinyal yolları, kanser büyümesini ER sinyali ile uyum içinde veya onu bypass ederek uyarabilir. Klinik kanıtlar, büyüme faktörü reseptörü sinyalinin endokrin direncine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Tamoxifen'e dirençli hücrelerde raportör gen assay çalışmaları, EGFR / MAPK destekli ER / AF-1 fosforilasyonunun, tamoxifen'in agonistik davranışını arttırdığını ve östrojen tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu sağladığını gösterir. Ayrıca, meme kanseri vakalarında ko-aktivatör AIB1'in aşırı ekspresyonu ve EGFR / HER2 / MAPK 'ye bağlı fosforilasyon da tamoxifene karşı direnç ile ilişkilidir ve HER2'nin ektopik olarak aşırı ifade edildiği MCF-7 hücrelerinde, tamoxifen direncine aracılık edebileceği önerilmiştir (124).

HER ailesi homo- ve heterodimerlerinin farklı sinyalleşme kapasiteleri vardır ve HER2-HER3 heterodimerinin ligand kaynaklı fosforilasyon ve akış aşağı sinyalin aktivasyonu bakımından aktif olduğu düşünülmektedir. PI3K yolu, HER2 ile adaptör proteinleri vasıtasıyla veya HER3 ile doğrudan etkileşim yoluyla aktive edilebilir. Trastuzumab'ın ligand kaynaklı HER2-HER3 heterodimerlerinin oluşumunu etkili bir şekilde bozmadığına dair kanıtlar göz önüne alındığında, HER3'ün aşırı ekspresyonu ve yüksek seviyelerde ligandla uyarılmış HER2-HER3 heterodimerlerinin oluşumu trastuzumab direncine katkıda bulunabilir. HER3'e ek olarak, EGFR trastuzumab direncinde rol oynayabilir. Ritter ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar trastuzumab-dirençli hücre hatları ve zenograft modellerinin EGFR fosforilasyonu, EGFR/HER2 heterodimerlerini ve HER ailesinin EGF, heparin bağlayıcı EGF ve heregülini aşırı eksprese ettiğini göstermiştir. Ayrıca, ikili EGFR/HER2 tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı ile HER2 fosforilasyonunun ve hücresele proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir (125).

HER2 reseptöründeki değişiklikler ve aktive ettiği yolların dışında, büyüme faktörü sinyalini yönlendirmeye yardımcı olan diğer reseptör tirozin kinazlarındaki değişiklikler de trastuzumab direncine aracılık edebilir. HER2 (+) hücre hatlarında yüksek seviyelerde IGF-1 reseptörü (IGF-1R) ekspresyonu, trastuzumab cevabındaki azalma ile ilişkilidir (126). HER2 ile IGF-1R arasındaki karşılıklı etkileşim sonucunda HER2'nin fosforilasyonu ve PI3K aktivasyonunun IGF-1 uyarımı nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, IGF-1R sinyalinin inhibisyonu, HER2 fosforilasyonunu bloke eder ve trastuzumab duyarlılığını geri kazandırır (127).

Reseptörler arasındaki karşılıklı etkileşim (crosstalk) ve transfosforilasyon, HER2 reseptörü tarafından çoklu sinyal yollarını aktive ederek meme tümörü oluşumunu tetikler ve ayrıca bu karşılıklı etkileşim ilaca direnç göstermesi için kullanılan önemli bir mekanizmadır. ErbB ailesinin diğer üyelerinin etkileşimi ve aktivasyonu, HER2 hedefli antikör olan trastuzumab'a azalan etkiye katkıda bulunabilir. Ek olarak, IGF-1R ile etkileşim ve reseptörler arası *crosstalk* trastuzumab'a dirençli hale gelen meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. HER2/ER arasındaki karşılıklı etkileşimin ER(+) / HER2(+) meme kanserlerinde endokrin ajanlara direnç gösterdiği bildirilmiştir. Klinik çalışmalar, endokrin dirençli meme kanserinde büyüme faktörü sinyalinin inhibisyonunun terapötik bir strateji olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, HER2 ve diğer büyüme faktörü

reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimlerin anti-neoplastik terapileri nasıl etkilediğinin açık bir şekilde anlaşılması, HER2 aşırı eksprese eden meme kanserlerine karşı kullanım için ek hedefli ajanların tasarlanmasına ve test edilmesine yol açabilir.

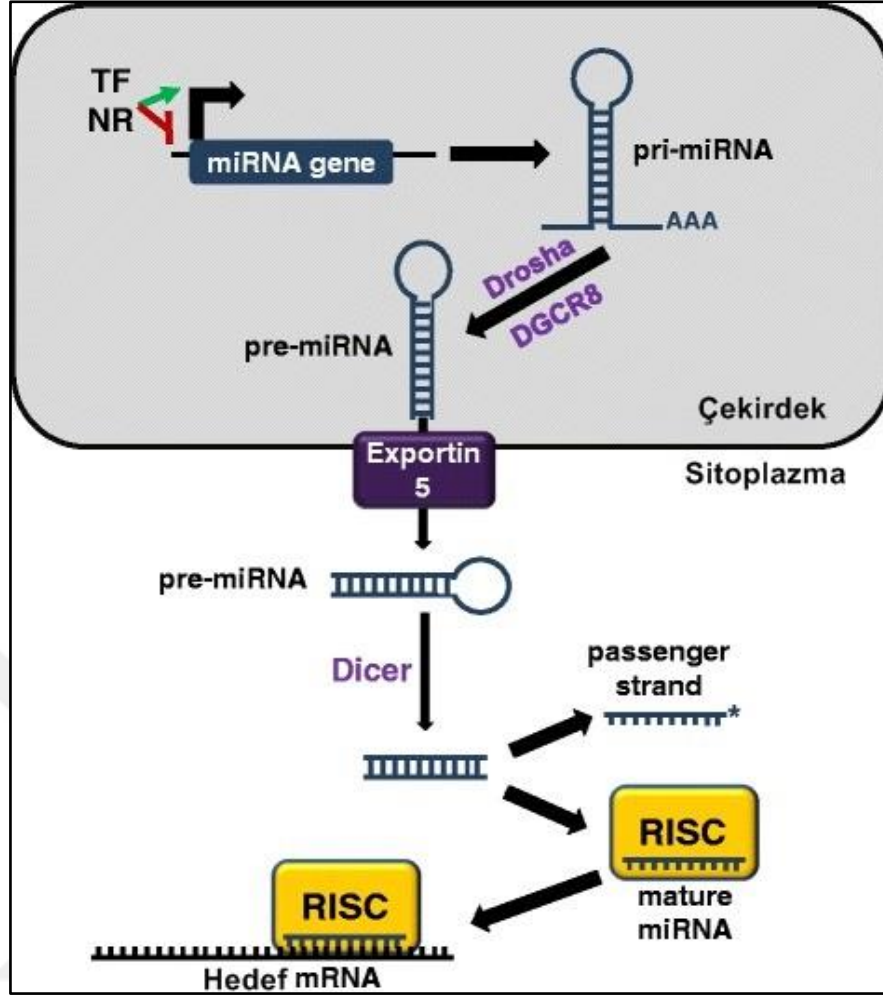
## 2.4. MİKRORNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar) ilk olarak *Caenorhabditis Elegans*'da doksanlı yıllarında keşfedilmiştir (128). MikroRNA'lar, hedef mRNA'larının degradasyonu sağlayarak veya translasyonu inhibe ederek gen regülatörleri olarak işlev gören 21-25 nükleotidden oluşan küçük RNA sınıfıdır.

miRNA'ların hücre gelişimine, farklılaşmasına, proliferasyonuna ve apoptoz süreçlerine dahil olduğu gösterilmiştir (128). Hastalıkla ilişkili olarak karakterize edilen ilk miRNA, kronik lenfositik lösemide ve daha sonra, diffüz büyük B-hücreli lenfoma hastalarında dolaşımda belirlenmiştir (129). Ardından yapılan pek çok çalışma aracılığıyla miRNA'ların diğer birçok hastalık ve kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (130). O zamandan beri, insanlarda > 2000 miRNA tanımlanmıştır ve bu miRNA'lar tüm genlerinin tahmini % 60'nı düzenler (18,131). miRNA, kanserde hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik mekanizmalar (*oncomirs*) yoluyla etki gösterebilir (128). Kanserde onkojenik yeniden düzenlemelere dahil olan kırılğan bölgeler ve diğer genomik bölgelerin kanserle ilişkili miRNA'nın üretimini etkilediği düşünülmektedir.

### 2.4.1. MİRNA BİYOGENEZİ

miRNA'lar, RNA III tipi nükleaz olan Droscha tarafından çekirdekte işlenen pri-miRNA'lar olarak adlandırılan öncülerden oluşturulur. Bu pri-miRNA'lar *Drocha/DGCR8* enzimleri ile pre-miRNA'lara işlenir ve Exportin-5 tarafından sitoplazmaya taşınır. pre-miRNA hetero-dupleks (miRNA:miRNA) oluşturan başka bir RNase III enzimi olan Dicer tarafından kesilir. Bu miRNA dupleksi daha sonra ayrılır ve olgun hedef miRNA molekülü, Argonat (Ago) protein ailesinin bir üyesine bağlandığı RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks (RISC) içine eklenir ve hedef mRNA translasyonel olarak baskılanır. Diğer miRNA molekülü (miRNA\*) normal olarak bozulur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. miRNA biyogenezisi. Hayes ve ark.'dan adapte edilmiştir (59).

Aktif miRNA, membrana bağlı hücre dışı bölümlerde (eksozomlar) paketlenmiş veya RNA bağlayıcı proteinlere bağlanmış hücrelerden salınabilir. Eksozomlar, diğer hücreleri ve çevrelerini etkileyebildikleri için başka bir hücre dışı sinyalleme metodu sağlarlar. Ayrıca, eksozomlar doğrudan kanserde rol oynamaktadır (132). Önemli bir şekilde miRNA'lar, farklı miRNA profilleri sergileyen farklı hücre ve tümör tiplerinden farklı şekilde eksozomlarda salgılanır veya seçici olarak paketlenir.

## 2.5. MİRNA VE MEME KANSERİ

Meme kanserinde moleküler profillemeye, kanserde miRNA'ların düzensizliği konusunda ilginç gözlemler ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada miRNA profili meme tümörlerinin luminal ve bazal epitel alt kümelerini ayırt etmek için kullanılmıştır (12). Diğer çalışmalarda, miRNA'lar, meme kanseri alt tiplerini hormon durumlarına, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörüne

(ErBB2/HER2) dayalı ayırt edici moleküller olarak kullanılmıştır (133,134). Bu, miRNA'ların terapötik müdahalelerde potansiyel teşhis ve prognostik belirteçler olarak kullanılması ihtimalini doğurmuştur. Mikrodizin yöntemi kullanılarak yapılan mRNA profili, meme kanserini dört alt tipe ayırmıştır: lümen A (ER + ve düşük dereceli), lümenal B (ER + ve yüksek dereceli), HER2 ve bazal benzeri (öncelikle üçlü negatif).

mikroRNA'lar meme kanseri alt tiplerini sınıflandırmak ve hastalık ilerlemesini izlemek için ek bir mekanizma sağlama potansiyeline sahiptir. Bir dizi çalışma, ana moleküler meme kanseri alt tiplerini tanımlamak için bir yol olarak dokudaki mikroRNA'ları araştırmıştır. Önemli şekilde, yapılan son çalışmalar tarafından mikroRNA'ların (miR-210, miR-328, miR-484 ve miR-874) prognozu veya rekürrens riskini öngörme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, mikroRNA'ların tedaviye ait spesifik cevabı belirleyebileceği gösterilmiştir (134,135).

miRNA profillemesi meme kanserinin ilerlemesinde çok sayıda miRNA'nın rolünü tanımlamak için kullanılmıştır. Örneğin, miRNA işlenmesinin en önemli bileşenlerinden biri olan Dicer ekspresyonu, özellikle metastatik meme kanserinde miR-103 ve miR-107'nin yukarı regülasyonu ile zayıflatılır (136). miR-200 ailesinin epitel fenotipinin bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir ve sıklıkla invaziv ve metastatik meme kanserinde ifadesi azalmaktadır (22).

miRNA'ların kanserdeki rollerinden dolayı miRNA imzaları, meme kanserinin daha fazla alt tiplenmesini sağlamak ve proliferasyon, metastaz veya terapötik direnci öngörmek için yeni klinik teşhis hedefleri olarak takip edilmektedir. miRNA'nın biyobelirteç hedefleri olarak potansiyeli, kandaki stabiliteyi ve tekrarlanan donma-çözülme döngülerine dayanma kabiliyetleri ile daha da artmaktadır. Sonuç olarak, yapılan araştırmalar miRNA'ların meme kanserinin çeşitli aşamalarında önemli roller oynadığını ve yakın zamanda Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan kanserlerin belirleyici özelliklerinde görev alabileceğini göstermiştir.

## 2.5.1. KANSERİN BELİRLEYİCİ ÖZELLİKLERİNDE ROL ALAN MİRNA'LAR

### 2.5.1.1. Proliferasyonun Düzenlenmesinde miRNA'lar

miRNA'lar, çoklu hedef genlerin düzenlenmesi yoluyla çeşitli hücrel yolakları düzenler (137). Proliferatif ve anti-apoptotik aktivite gösteren miRNA'ların kanser hücrelerinde arttığı ve onkogenezi desteklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı genler olarak işlev gören bazı miRNA'lar hücre çoğalmasını azaltır ve apoptozu tetikler ve bu miRNA'ların ifade seviyeleri kanser hücrelerinde azalır (138). Hücre proliferasyonu, hem mitojenik büyüme sinyalleri hem de anti-proliferatif sinyaller tarafından düzenlenir (139).

miR-24, hücre tipine spesifik şekilde tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev yapan hücrel gelişimi ve çoğalmayı yönetir. pre-miR-24-2, miR-24'e göre olgun miR-24-2\* 'nin tercihli bir şekilde işlenmesi yoluyla MCF-7 meme kanseri hücre hattında tümör baskılayıcı olarak görev yapar. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde miR-24-2\* 'nin ektopik ekspresyonu, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak hücrel hayatta kalmanın baskılanmasıyla sonuçlanır. miR-24-2\* 'nin aşırı ekspresyonu, protein kinaz C alfa'nın (*PKCa*) baskılanması yoluyla hücre sağkalımının azalmasına neden olur (140). Aktive edilmiş *PKCa*, kanserin gelişimi ve ilerlemesine yardımcı olan sağkalım genlerini uyarmak için Raf-MEK-ERK yolunun aktivasyonu ile işlev görür.

miR-100, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) / rapamisin (mTOR) yolağının regülatörüdür ve artan miR-100 ifadesi proliferasyon, hayatta kalma sinyallerine etki ederek meme kanserinde tümör oluşumunu inhibe eder. İnvaziv meme tümörleri ile iyi huylu hasta örnekleri karşılaştırıldığında miR-100 ifadesinde dört kat azalma olduğu görülmüştür (141). Meme kanseri hücrelerinde miR-100'ün ifadesinin azalması, proliferasyonu ve sağkalımı teşvik eden onkogen olan insülin benzeri büyüme faktörü 2 'nin yukarı doğru düzenlenmesine yol açabilir.

miR-301'in lenf nodu negatif (LNN) meme kanserinde yeni bir oncomiR olduğu bildirilmiştir. miR-301, meme kanserinde aşırı ifade edilir ve miR-301'in baskılanması, hücre proliferasyonunu azaltır. miR-301'in artan ekspresyonu, MDA-MB-231 hücreleriyle oluşturulan fare modelinde proliferasyon, migrasyon, invazyon, anjiyogenez ve tümör oluşumuna neden olmuştur. miR-301'in bu onkojenik rolüne *PTEN*, *FOXF2* ve *Col2A1*



genlerini içeren anahtar sinyal yollarının düzenlenmesinin aracılık ettiği düşünülmektedir (142).

Meme kanseri proliferasyonunda östrojen reseptörü (ER) sinyalinin rolü uzun yıllardır yaygın olarak çalışılmıştır. Östrojen için iki reseptör vardır: *ERα* ve *Erβ* (143). miR-17-5p'nin translasyon baskılayıcısı olduğu ve meme kanserinde amplifiye olan *AIB1* onkogenini regüle ederek hücre proliferasyonunun kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir (144). *AIB1* geni meme, yumurtalık, pankreas ve mide kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde artan ifade profili gösterir (22).

Kanserde EGFR sinyal iletim sistemi bileşenlerinin miRNA'lar tarafından düzenlendiği bilinmektedir (145). EGFR'nin kendisi miR-7 tarafından düzenlenir, bu durum kanser hücre hatlarında hücre döngüsünün durmasını ve hücre ölümünü uyarabilir (146). Ayrıca, EGFR-odaklı hücre döngüsü proteinlerini düzenleyen ve hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe eden tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilen üç miRNA (miR-124, miR-147 ve miR-193a-3p) tanımlanmıştır (147).

### **2.5.1.2. İnvazyon ve Metastazda miRNA'lar**

Metastaz meme kanserinde baskın ölüm nedenidir. (i) yerel istila, (ii) intravazasyon, (iii) dolaşımda hayatta kalma, (iv) uzak bir organ bölgesinde tutunma aşaması, (v) ekstrasvazasyon, (vi) mikrometastaz ve (vii) metastatik kolonizasyon oluşumunu içeren çok aşamalı bir süreçtir. Yapılan çalışmalar ile meme kanseri metastazında dolaşımda yer alan ve düzensiz (yukarı veya aşağı regüle) bir dizi miRNA tanımlanmıştır. Metastazın önemi ve karmaşıklıkları göz önüne alındığında miRNA'ların invazyon-metastaz kademesine dahil olması şaşırtıcı değildir. miRNA'ların metastazdaki durumları iyi karakterize edilmiştir ve miRNA araştırmasının çok çalışılan alanlarından biridir.

Metastazı teşvik eden ya da baskılayan birden fazla miRNA tanımlanmıştır (22). Metastaz süreci ile ilişkili ilk miRNA miR-10b'dir (148). *TWIST*, hücrelerin tutunmasına yardımcı olan bir homeobox faktörü olan *HOXD10*'u inhibe eden miR-10b'nin transkripsiyonunu indükler. *HOXD10*'un ana rollerinden biri, bir metastaz efektörü olan Ras homolog aile üyesi G'yi (*Rho-G*) inhibe etmektir. Böylece, *HOXD10*'un miR-10b tarafından inhibisyonu, sonuçta hücre migrasyonunu ve invazyonu teşvik eder (148).

Wnt /  $\beta$ -catenin sinyalinin epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) ve metastazı tetiklediği bilinmektedir. miR-301a 'nın pro-metastatik meme kanseri hastalarından elde edilen primer tümör örneklerinde metastazı belirgin bir Şekilde yukarı regüle ettiği rapor edilmiştir. miR-301a, Wnt /  $\beta$ -catenin sinyal kaskadı için negatif bir regülatör olan *PTEN*'i doğrudan bastırır ve aktive olan Wnt /  $\beta$ -catenin sinyali ile meme kanserinde invazyon ve metastazı destekler (149).

miR-720 ekspresyonunun, primer meme kanserinde özellikle metastatik tümörlerde anlamlı bir Şekilde azaldığı gösterilmiş ve miR-720'nin azalan ekspresyonu 105 primer meme kanseri vakasında lenf nodu metastazı ile de ilişkilendirilmiştir. Metastazın bilinen bir promotörü olan *TWIST1*, miR-720'nin doğrudan fonksiyonel hedefidir. Meme kanseri hücrelerinde miR-720'nin ektopik ekspresyonunun, epitel belirteçlerin (E-cadherin ve  $\beta$ -catenin) ifadesini arttırarak ve mezenkimal belirteçlerin (N-cadherin, fibronektin, vimentin ve matriks metaloproteinaz-2) ifadesini azaltarak hücre invazivliğini ve gcn önemli ölçüde önlediği hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (150).

Dolaşımda farklı metastatik bölgelerle ilişkili miRNA'yı tanımlamak, klinisyenlere hastalık evresini değerlendirmek ve ilerlemeyi izlemek için başka güçlü bir tanı aracı sağlayabilir. Elde edilen veriler birlikte göz önüne alındığında miRNA'lar, proliferasyondan apoptoza kadar çeşitli hücre sel sinyal yollarına müdahale etmektedir. miRNA'ların, hücre sel içeriğe bağlı olabilen tümör baskılayıcı ya da onkojenik etkiye sahip olduğu giderek daha açık bir Şekilde görülmektedir. Heterojen olan meme kanserinin erken teşhis ve tedavisinde görev alan miRNA imzalarının belirlenmesi meme kanserinin önlenebilir veya tedavi edilebilir hale getirilmesi için yeni bir uygulama alanı oluşturabilir.

## **2.5.2. MİKRORNA TEMELLİ TEDAVİLER VE KLİNİK UYGULAMALARI**

Mevcut klinik çalışmaların çoğu miRNA'ların hastalık sınıflandırması, prognozu ve ilaç etkinliği için biyobelirteçler olarak kullanılması içindir ve meme kanseri bu konuda en çok çalışma yapılan kanser tipidir. Birkaç vakada spesifik mikroRNA'lar belirlenmiş ve uygun biyobelirteçlerin çıkarılması için ekspresyon-profilleme platformları kullanılmıştır. Biyobelirteç çalışmalarına ek olarak, mikroRNA'lar ve anti-mikroRNA yapıları şu anda kanser için potansiyel terapötikler olarak araştırılmaktadır. Bu tip moleküllerin sunulmasıyla ortaya çıkan zorluklara rağmen, mikroRNA tabanlı terapötikler için şu anda

iki klinik çalışma bulunmaktadır. Hedeflenen mikroRNA'lar, doğrudan tümör hücrelerini hedeflemek için kullanılabilir veya diğer terapileri geliştirmek için kullanılabilir. Örneğin, miR-100'ün kemoterapi dirençli tümörün ilaç direncini azaltmada potansiyel bir kullanımı olabilir. Akciğer kanseri (151) ve kemoterapiye dirençli over kanserinde miR-199b-5p'nin epigenetik susturulması da örnek olarak verilebilir (152).

En gelişmiş mikroRNA çalışması, hepatit C tedavisi için antimiR-122 (Miravirsen) kullanımını içerir (153), bu da viral RNA'da direnç göstermeyen bir azalma olduğunu gösterir. Miravirsen, miR-122'nin antisense dizisinden oluşur aynı zamanda, bozunmaya karşı direnç ve hedefine karşı artan bir afinite sağlayan modifiye bir kilitli nükleik asit (LNA) yapısına sahiptir. Yapılan yeni çalışmalar, Miravirsen'in hedefinin miR-122'nin olgun formu olmasına rağmen, aynı zamanda pri- ve pre-miR-122'nin azalmış işlenmesine neden olan afiniteye (154) ve terapötik etkisinin artırılmasına da sahip olduğunu göstermiştir.

Özellikle kanser için ilk mikroRNA tabanlı tedavi, MRX34: lipozomal nanopartiküllerde yüklü bir sentetik miR-34a taklitidir (155). miR-34a, p53'ün aşağı akışında tümör baskılayıcı bir mikroRNA'dır. Kanser hücrelerinde bulunan kendini yenileme, göç etme potansiyeli ve kemoterapiye direnç gibi temel ayırt edici özellikleri antagonize eder (156). MRX34, birincil karaciğer kanseri ve karaciğer metastazları için bir faz I klinik çalışmadır ve 2014 yılı sonunda tamamlanmıştır. MRX34 nanopartiküller karaciğerde kolayca birikmekte ve insan dışı primatlarda MRX34'ün ölçümü tam kanda tatmin edici 7.7 saatlik bir yarı ömür oluşturmuştur (157). Hayvan çalışmalarında lipit bazlı lokal ve sistemik miR-34a verilmesi de akciğer kanseri için olumlu sonuçlar göstermiştir (158).

MikroRNA tabanlı terapötikler için direnç, kombinasyonel mikroRNA tabanlı tedaviler kullanılarak aşılabilecek bir faktör olabilir. Benzer bir etki ile, bazı anti-mikroRNA terapileri, mikroRNA'ların tüm ailelerini hedef alma potansiyeline sahiptir (159) ve direnç olasılığını azaltır. MikroRNA temelli tedavilerin araştırılması hala emekleme aşamasındadır ve bu tedavilerin yan etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, diğer mikroRNA'ların işlenmesinin, mikroRNA işleme makinelerinin, depo mikroRNA'lar ile aşırı yüklenmesi muhtemeldir ve bunun etkileri belirsizdir.

### 2.5.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE MİRNA'LAR

Günümüzde erken evre meme kanseri için cerrahi temel tedavidir. Bununla birlikte, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisi kullanımı, yaşam oranlarını büyük ölçüde artırmıştır. Metastatik meme kanserinin tedavisi için, meme koruyucu cerrahi veya mastektomi ve neoadjuvan ortamda kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Progresif hastalıklarda (evre IV), kemoterapi ve radyoterapi, hormon tedavisi ile birlikte başlıca tedavilerdir (160). Özgün metastatik miRNA'nın tanımlanması meme kanserini kategorize etme ve tedavi seçimlerini bilgilendirme ve iyileştirme potansiyeli açısından önemlidir. Ayrıca, terapötikler olarak spesifik miRNA'nın kullanılabilmesi ileride geçerli bir tedavi seçeneği olma potansiyeline sahiptir. Günümüzde, kanseri tedavi etmek için miRNA kullanmanın etkinliğini araştıran güncel klinik çalışmalar mevcuttur.

Genel olarak, miRNA temelli terapötiklerin geliştirilmesi için iki yaklaşım vardır: miRNA antagonistleri (inhibitör) ve miRNA taklitçileri (mimic). Hasta dokularında fonksiyon kazanımı gösteren endojen miRNA'ları inhibe etmek için miRNA antagonistleri üretilmiştir. Bu yaklaşım kavramsal olarak, küçük molekül inhibitörleri ve kısa interferans yapan RNA'lar (siRNA'lar) gibi tek bir gen ürününü hedef alan diğer inhibitör terapötikler ile benzerdir. Genellikle, aktif miRNA zincirine yüksek afinite ile bağlanan kimyasal olarak modifiye edilmiş miRNA öncü zinciri (anti-miR veya antagomiR) içerir. Bağlanma sıklıkla geri döndürülemez olduğu için, yeni miRNA dupleksi RISC tarafından işlenemez ve / veya parçalanamaz. Bu yaklaşımda potansiyel endişe, antagonistin spesifik olmayacak şekilde diğer RNA'lara bağlanarak istenmeyen yan etkilere neden olabileceğidir.

miRNA mimikleri fonksiyon kaybını düzeltmek için kullanılır. “miRNA replasman terapisi” olarak da bilinen bu yaklaşım, normal olarak sağlıklı hücrelerde ifade edilen miRNA'ları fonksiyonu bozulan hücrelere yeniden tanıtmayı amaçlar. Çoğu durumda, bu miRNA'ların yeniden fonksiyon kazanması, normal hücreler için gerekli yolların yeniden etkinleştirilmesine ve hastalığı yönlendiren yolların engellenmesine yol açar. miRNA taklitçileri, terapötik siRNA'larda da kullanılan teknolojileri kullanarak sistemik olarak verilebilir. Ayrıca, miRNA mimiklerinin normal dokularda oldukça spesifik ve iyi tolere edilmesi beklenir. Bu varsayım ile, miRNA taklitlerinin doğal olarak oluşan eşdeğer ile aynı diziyi taşıması ve aynı gen kümesini hedeflemesi beklenmektedir. Çoğu normal

hücre zaten söz konusu miRNA'yı ifade ettiğinden, mimik tarafından etkilenen hücresel iletim sistemleri zaten endojen miRNA tarafından aktive veya inaktive edildiği için, normal dokuya miRNA mimiklerinin verilmesinin yan etki ile indüklemesi pek olası değildir.

Terapötik maddeler olarak miRNA'ları çevreleyen araştırmalar günden güne artmaktadır. Yakın zamanda keşfedilen miRNA'lara rağmen, birçok aday zaten ürüne dönüşerek klinikte ilerlemiş bulunmaktadır. Şaşırtıcı olmayacak şekilde, miRNA biyolojisi üzerine yapılan bilimsel araştırmaların patlaması, bu alanda son 10 yıl içinde yapılan patent başvuru dosyalarının sayısındaki önemli artışın bir yansıması olarak ortaya çıkmıştır. Mevcut ticari kullanımları ve gelişimi, miRNA 'ların tanı ve tedavideki anlık görüntüsünü sunmak için Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki miRNA patent alanlarını ve miRNA temelli ürün ve hizmetler geliştiren bazı biyoteknoloji şirketleri tanımlanabilir. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki miRNA patent manzarasının genel bir resmini elde etmek için, patent veritabanında miRNA'lar ve bunların kullanımı ile ilgili tüm yayınlanmış başvurular ve patentler için bir arama yapıldığında toplam 2136 yayınlanmış patent belgesi ortaya çıkmış bunlardan 1661'i ABD yayınları, 475'i Avrupa yayınları olarak bildirilmiştir (161). Gen düzenlemesi ile ilgili uygulamalar ve patentler dosyalama işlemlerinin % 12'sini oluştururken, miRNA gönderim araçları veya yöntemleri ile ilgili patent dokümanları başvuruların % 14'ünü oluşturmaktadır. Spesifik hastalıklarla ilgili olarak, kanser tedavi yöntemleri ile ilgili diğeri hastalık gruplarına kıyasla daha fazla sayıda başvuru yapılmıştır. Kanserden sonra, en yaygın başvurular viral enfeksiyonlar özellikle hepatit C (% 6), göz hastalıkları (% 5), inflamatuvar hastalıklar (% 5), kardiyovasküler hastalıklar (% 4) ve nörolojik rahatsızlıklar (% 4) olarak sıralanabilir (161). Yeni şirketler, daha geniş tabanlı nükleik asit tedavileri geliştirmek yerine belirli endikasyonlar için belirli miRNA terapötiklerini piyasaya sunma çabalarını yoğunlaştırmıştır. 2007'de kurulmuş olan üç şirket (miRagen Therapeutics, Regulus Therapeutics ve Mirna Therapeutics), farklı hastalık durumlarında rol oynayan ve süreci düzenleyen ilaç adaylarını geliştirmek için çeşitli miRNA'ları tanımlamıştır.

### **2.5.3.1. Meme Kanserinde Tedaviye Direnc Gelişiminde Yer Alan miRNA'lar**

Meme kanseri hücrelerini kemoterapi, radyoterapi veya hedef odaklı terapiye duyarlı hale getirmek yada çeşitli tedavi stratejilerine karşı gelişen direnci yönlendirmek için çok sayıda miRNA bildirilmiştir.

HER2 odaklı tedavi yaklaşımları, HER2 reseptörünü antagonize eden veya bloke eden ilaçları içermektedir. Bu grup içerisinde trastuzumab veya pertuzumab gibi HER2 reseptörünü hedefleyen monoklonal antikolar ile tirozin kinaz inhibitörleri olan lapatinib, neratinib ve afatinib yer almaktadır (61). Epigenetik susturma nedeniyle miR-375 kaybı miRNA'nın doğrudan hedefi olan insülin benzeri büyüme faktörü tip 1 reseptörü (*IGF1R*) aracılı mekanizma ile trastuzumab direncine katkıda bulunur. miR-375 yokluğunda, *IGF1R*, trastuzumab ile tedavi edilen meme kanseri hastalarında alternatif büyüme faktörü reseptörü olarak işlev görmektedir (162). *IGF1R*'i hedefleyen ve böylece lapatinib, neratinib ve afatinib gibi HER2 'yi hedef alan ilaçların etkinliğini arttıran bir başka miRNA, miR-630'dur (163). miR-542-3p, trastuzumab tedavisine duyarlılığı arttırırken, bununla birlikte *AKT* 'yi hedef almaktadır. miR-542-3p'nin kaybı, HER2+ meme kanseri hücrelerini ilaca daha dirençli hale getirir, apoptotik hücrelerin sayısını azaltır ve G1 / S kontrol noktasının engellenmesini sağlar (164). miR-200c 'nin tümör baskılayıcı özelliği, meme kanseri hücrelerini doksorubisin, 5-fluorourasil ve epirubisin gibi kemoterapötik ilaçlara duyarlı hale getirmesinin yanısıra *ZNF217* ve *ZEB1* 'in ifadesini azaltarak HER2+ meme kanseri hücrelerinde trastuzumab cevabını etkinleştirir (25,165). HER2+ vakalarda hedefe yönelik tedavi direncinde onkojenik rolü olan miR-221, meme kanseri hücrelerinin apoptozdan kaçışına ve *PTEN*'i hedefleyerek trastuzumab direncine aracılık eder (166). Diğer bir onkojenik miRNA olan miR-21 sadece radyoterapiye ve doksorubisin direncine aracılık etmekle kalmaz, aynı zamanda IL-6/STAT3/NF-κB aracılı sinyal yolağını ve ayrıca PI3K yolağını indükler ve böylece hücre trastuzumab'a direnç kazanır (60).

Meme kanserinde endokrin direncinin mekanizmaları genellikle ER geninin hipermetilasyonu aracılı ERα ifadesinin kaybını içerir. Ayrıca HER2, IGF1R veya FGFR sinyal yolaklarının artmış aktivitesi, MAPK veya PI3K sinyal iletim sistemlerini aktive eder ve böylece ER bağımsız proliferasyon ve anti-apoptotik sinyalleri sürdürerek tamoxifene karşı direnç kazandırmaktadır (59). miR-320a ER+ meme kanseri hücrelerini

endokrin terapiye duyarlı hale getiren miRNA'lardan biridir. Aslında, miR-320a cAMP ile düzenlenen fosfoprotein ve östrojen ile ilgili reseptör gammanın ifadesini azaltarak ER+ dirençli meme kanseri hücrelerin tamoxifene duyarlılığını artırır (167).

### **2.5.3.2. Metastatik Meme Kanserlerinde miRNA'lar**

Metastazın farklı aşamalarında ifade edilen miRNA'ların tanımlanması ve kategorize edilmesi, bu biyobelirteçlerin terapötik potansiyelini hızlandırırken, altta yatan kanser mekanizmalarını aydınlatılabilir. Halen, birçok çalışma metastatik meme kanseri dokusunun miRNA ifade profillerini (upregülasyon veya downregülasyon) araştırmakta, meme kanseri başlangıcı, progresyonu ve tedavi ile ilgili süreçleri aydınlatmaya çalışmaktadır. Anlamlı olarak, meme kanseri modellerinde (miR-31, miR-126 veya miR-335 gibi) ifadesi azaldığı gözlemlenen miRNA'nın ekspresyonunun geri kazanılmasının, *in vivo* olarak metastazı baskılayabildiği gösterilmiştir (168). Ek olarak, kanser kök hücrelerinin metastazı etkileyebileceği öne sürülmüştür (169). Meme kanserine özgü miRNA'nın tanımlanmasının ve bunların fonksiyonel ilişkisinin, özellikle genç hastalarda, tümörlerin erken teşhis ve tedavisinde iyileşmelere yol açacağı umulmaktadır.

## **2.6. DENEYSEL MODELLER**

Meme kanseri, dünya çapında tanı konan ve yaşamları boyunca yaklaşık sekiz kadından birini etkileyen en yaygın ikinci kanserdir (170). Her yıl 1.3 milyon kadını etkilemekte olup tüm kanser vakalarının % 23'ünü ve kansere bağlı ölümlerin % 14'ünü (465.000) oluşturmaktadır (171). Meme kanserinin en agresif formu olan metastaz, kanserin meme dokusundan vücudun diğer bölgelerine yayılması, tümör hacminin önemli ölçüde artması ve sıklıkla ölüm ile sonuçlanmasıyla ortaya çıkar. Meme kanseri metastazı, çevredeki dokunun lokal invazyonuyla başlayan, kan veya lenfatik damarlara yayılan ve tümör hücrelerinin distal organlara yayılmasıyla sonlanan bir yolu takip eder (53). Modern tedavilere rağmen, metastatik meme kanseri (MBC) genellikle tedavi edilemez. Günümüzde ilk 3 yıl içinde hastaların % 10-15'inde distal metastaz (M1) görülmektedir (171). Ayrıca, tanı anında lenf nodu tutulumu olmayan meme kanserli kadınların yaklaşık üçte biri distal metastaz geliştirir (53). Anlamlı olarak, metastaz oranı ve yeri büyük ölçüde değişebilir ve bu durumun primer tümör alt tipine bağlı olduğu düşünülmektedir. Açıkça,

metastatik meme kanserinin hem teşhis hem de tedavisi için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

Hücre kültürü deneylerinden fare modellerine ve PDX örneklerine kadar değişen farklı modeller, meme kanseri araştırmalarında benzersiz avantajlara sahiptir. Örneğin, hücre hatları rutin olarak meme kanserinde doğal olan özellikleri ve mekanizmaları anlamak için kullanılır. Hücre hattı araştırmalarının avantajı, ilaca direnç veya duyarlılık hakkında hızlı şekilde bilgi elde etmek için yüksek verimli taramaya izin vermesidir. Diğer bir araştırma yolu fare modellerinin kullanılması olmuştur. Transgenik, *knock-out* ve kimyasal mutajenlere kadar çeşitli modeller, tümör gelişimi, tümör mikroçevresi ve metastazı incelemek için kullanılmıştır. Ek olarak, transgenik farelerdeki tümör genomik bilgisinin çözülmesi, transgenik fare modelleri ile insan meme kanseri arasındaki benzerliği göstermiştir. Örneğin, insan meme kanserine benzerlik gösteren, hem MMTV-Myc hem de MMTV-Met transgenik farelerde önemli gen ekspresyonu heterojenliği gözlenmiştir (172–174). Fare modellerinin temel karakterizasyonuna ek olarak, son çalışmalar, transgenik farelerin tedavinin geliştirilmesinde umut verici bir rol oynadığını göstermiştir. Drost ve ark. farklı *BRCA1* mutasyonları taşıyan transgenik farelerin, hedefli tedaviye karşı farklı tepkilere sahip olduğunu ve ilaç direncinde görev alan *BRCA1* protein bölgesinin tanımlanması gerekliliğini belirlemişlerdir (175). Transgenik farelerde bu hedeflerin belirlenmesinde daha yeni bir gelişme, özellikle TNBC araştırmalarında PDX modellerinin geliştirilmesi olmuştur. Bu PDX'ler hem birincil hem de metastatik meme kanserinin moleküler özelliklerini özetler (176). *BRCA1* ile ilişkili ilaç direnci çalışmasında, PDX numunesinin orijinal meme kanseri hastasına benzer şekilde PARP inhibitörlerine karşı dirence sahip olduğu gösterilmiştir (177). Sonuç olarak meme kanserini anlamanın odağı, hedefli terapi ve kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesinde önemli ilerlemelere yol açacaktır.



### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Meme kanseri heterojenik bir hastalık olup çeşitli tümör özellikleri farklı tedavi cevaplarını oluşturmaktadır. Çok-sebepli, kompleks bir genetik hastalık olan meme kanseri moleküler düzeyde yüksek işlem hacimli mikrodizin çalışmaları aracılığıyla detaylı bir şekilde araştırılmış ve moleküler alt tiplere (Luminal A, Luminal B ve HER2) normal-benzeri ve bazal benzeri (üçlü-negatif: ER-, PR-, HER2-) ve reseptör ifade durumuna göre de (ER-, PR-, HER2-) farklı klinik alt tiplere sınıflandırılmıştır. Bu alt tipler farklı biyolojik davranışlar ve tedavi duyarlılığı göstermektedir. Bu nedenle hem moleküler sınıflandırmalar hem de patolojik sınıflandırmalar meme kanseri hastalarının tedavi sürecine karar verme açısından büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda moleküler biyoloji temel alınarak yapılan meme kanseri sınıflandırılmasına paralel olarak araştırmacılar tarafından tümör oluşumu, korunması ve yayılmasında yer alan süreçleri kontrol eden sinyal yolları incelenmeye başlanmıştır. Tümör gelişiminde gerekli olan ve sonradan çeşitli düzenlemelerle edinilen özelliklerden olan hücre çoğalmasının sürekliliği, büyüme kontrol mekanizmalarından kaçış, hücre ölümüne direnç, sınırsız çoğalma kapasitesi, genomik dengesizlik, invazyon ve yayılma gibi mekanizmalar değerlendirilmiştir.

Küçük, protein kodlamayan endojen RNA molekülleri olarak tanımlanan mikroRNA'ların (miRNA) düzenleyici rolleri üzerine yapılan deneyler bu molekülerin hücre gelişimi, bölünmesi, farklılaşması ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda rol aldığını göstermiştir. Bu fonksiyonların kanserde genellikle düzensiz olduğunun bilinmesi miRNA'ların kanserle olabilecek ilişkilerine dikkat çekmektedir.

Meme kanserinde kullanılan kemoterapi, cerrahi müdahale, radyoterapi gibi geleneksel yöntemler günümüzde etkin olmasına rağmen bu yöntemlerin kaçınılmaz yan etkileri bulunmaktadır. Kanserde miRNA'nın etkin rolünün anlaşılması sonucunda mikroRNA temelli terapiler potansiyel araştırma konusu haline gelmiş ve klinik öncesi modellemede miRNA'ların kullanımı araştırılmaya başlanmıştır.

Bu tez kapsamında meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek, meme kanseri alt tiplerinden bağımsız ve halen kullanılmakta olan terapi ajanlarına yardımcı olabilecek

mikroRNA'nın (miRNA) potansiyel etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Fonksiyonel miRNA bağlantı ağının ve hedeflerinin tanımlanması miRNA'ların potansiyel terapötik hedef olmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI

Meme kanserinin farklı alt tiplerini temsil eden hücre hatları ATCC 'den alınmıştır. Hücrelerin tipleri, kullanılan besiyeri ve içerikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Her hücre için RRID numaraları “*Cellosaurus – ExPASy*” portalından edinilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, kullanılan besiyeri ve içerikleri.

Hücre hattı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Ortam içeriği
MCF-7 (RRID:CVCL_0031)	Lonza (BE12-741F)	DMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
BT-474 (RRID:CVCL_0179)	Lonza (BE12-741F)	DMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
SK-BR-3 (RRID:CVCL_0033)	Lonza (BE12-688F)	Mc Coy's + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
MDA-MB-231 (RRID:CVCL_0062)	Lonza (BE12-741F)	DMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
MDA-MB-468 (RRID:CVCL_0419)	Lonza (BE12-611F)	EMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
BT-20 (RRID:CVCL_0178)	Lonza (BE12-611F)	EMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin
MDA-MB-157 (RRID:CVCL_0618)	HyClone (SH30021.01)	Dulbecco's Low Glucose Modified Eagles Medium + L- Glutamin + Soydam pürivat +%10FBS + %1Penisilin/Streptomisin

#### 4.1.2. TAMPON ÇÖZELTİLER

% 10 APS

0.1 gr APS (son hacim 1 ml ddH<sub>2</sub>O)

1.5 M Tris (pH:8.8)

18.165 gr Tris-base (son hacim 100 ml ddH<sub>2</sub>O)

10X TBS (pH:8.0)	2.19 gr Tris-Base, 87.76 gr NaCl (son hacim 1L ddH <sub>2</sub> O)
20X TBE (pH:8.3)	121 gr Tris, 61.7 gr Boric acid, 7.4 gr Na-EDTA (1L ddH <sub>2</sub> O)
5X Running Buffer	15 gr Tris, 72 gr Glycine, 5 gr SDS (son hacim 1L ddH <sub>2</sub> O)
Wet Transfer Buffer	6gr Tris, 28.8 gr Glycine, 1ml % 10 SDS, % 20 Methanol

#### 4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR

1X PBS	Hyclone, SH30256.01
2X protein loading dye	Advansta, R-03019-B50
6X gel loading dye	New England Biolabs, B7021S
Acrylamide/bisacrylamide	Sigma, A3574
Agaroz	Lonza, 50004
Allstar scrambled mimic negatif kontrol	Qiagen, SI03650318
Ammonium per sulfate (APS)	Sigma, A3678
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, 4038377012001
Chloroform	Sigma, C2432
Coomasie Plus Bradford Assay	Thermo Scientific, 23209
DharmaFect -1 Transfection Reagent	Dharmacon, T-2001-03
dNTP-Mix	Thermo Scientific, R0192
Ethanol	Merck, 1.00983.2511
Ethidium bromide	SNPBiotech, SNPEB-5
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone, SH30071.03
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific, SM0321
Glycine	Sigma, G7126
Hi-perfect Transfection Reagent	Qiagen, 301705
Isopropanol	Sigma, I9516
Matrigel Basement Membrane Matrix	Corning, 354234
Methanol	Merck, 1.06007.2500
miR-770-5p inhibitor	Dharmacon, IH-301013-03-0005
miR-770-5p mimic	Qiagen, MSY0003948
Molecular Biology Grade water	Hyclone, 01-869-1A
PDVF membran 1 roll, 0.22 um	Advansta, L-08008-001

Penicillin/Streptomycin	Lonza, DE17-602E
Protein ladder	New England Biolabs, P7712S
scrambled inhibitor kontrol miRNA	Dharmacon, IN-001005-01-05
SDS	Sigma, L4390
Sodium chloride	Ambresco, 7647-14-5
Tamoxifen	Tocris, 54965-24-1
TEMED	Sigma, T7024
Trastuzumab	Roche, Genetech
Trypsin	Hyclone SH30042.01
Tris	Serva, 37190.02
Trizol	Ambion, 15596018
Tween-20	Sigma, P1379

#### **4.1.4. ENZIMLER**

DNA Polymerase	Thermo Scientific, EP0402
Dnase I	Thermo Scientific, EN0521

#### **4.1.5. KİTLER**

Complete Lysis-M	Roche, 4719956001
EPIK™ Amplification Kit	Bioline, BIO-66025
EZ DNA Methylation-Direct Kit	Zymo Research, D5020
LightCycler 480 Syber Green Master	Roche, 4707516001
miScript II RT Kit	Qiagen, 218161
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, 218073
QiAamp DNA Mini Kit	Qiagen, 51304
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, 4379012001
WesternBright Sirius HRP Detection Kit	Advansta, K-12043-D10

#### 4.1.6. TEZ KAPSAMINDA MATERYALIN KULLANILDIĞI BASAMAKLAR

- Çalışmamızda Tamoxifen (Tocris), Trastuzumab (Herceptin) uygulamaları yapılmış hücrelerin geçici transfeksiyonu için miR-770-5p mimic (Qiagen), miR-770-5p inhibitor (Dharmacon), miR-99b-5p mimic (Qiagen), miR-99b-5p inhibitor (Dharmacon), miR-373-3p (Qiagen), miR-373-3p inhibitor (Dharmacon), Allstar scrambled mimic negatif kontrol (Qiagen), scrambled inhibitor kontrol miRNA (Dharmacon), Hi-perfect Transfection Reagent (Qiagen) ve DharmaFect -1 Transfection Reagent (Dharmacon) kullanılmıştır.
- RNA izolasyonu için Trizol (Qiagen), Kloroform (Sigma), İzopropanol (Sigma) kimyasalları kullanılmış, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) ile mRNA profillemesi; miScript II RT Kit (Qiagen) ve miScript SYBR Green PCR (Qiagen) kitleri ile miRNA ifade profili incelenmiştir.
- Proliferasyon deneyleri Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) kimyasalı yardımıyla Wallac Victor Counter (Perkin Ekmer) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.
- İnvazyon deneyleri için xCELLigence invasion assay (ACEA); DNA izolasyonu, bisülfid uygulaması ve metilasyon spesifik PZR işlemi için sırasıyla QIAamp DNA Mini kit (Qiagen), EZ DNA Methylation kit (Zymo Research) ve EPIK™ Amplification Kit (Bioline) kitleri kullanılmıştır.
- İlgili miRNA'nın sinyal iletim sistemindeki etki mekanizması sc53274 for EGFR (1:1000) (SantaCruz), sc81490 for phospho-EGFR (1:1000) (SantaCruz), sc8312 for AKT (1:1000) (SantaCruz), sc7985 for phospho-AKT (Ser 473) (1:1000) (SantaCruz), sc154 for ERK2 (1:1000) (SantaCruz), sc-81492 for phosho-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) (1:1000) (SantaCruz), sc47724 for GAPDH (1:1000) (SantaCruz), 1B2E for HER3 (1:1000) (Cell Signaling), D23H3 for IGF1R (1:1000) (Cell Signaling), 7C10 for mTOR (1:1000) (Cell Signaling) D21H3 for Vimentin (1:1000) (Cell Signaling), 24E10 for E-Cadherin (1:1000) (Cell Signaling) C15D3 for SNAIL (1:1000) (Cell Signaling), 643802 for beta-actin

(1:1000) (Biolegend), and HRP-conjugated Anti-Rabbit, 7074S (1:10000) (Cell Signaling) ya da HRP-conjugated Anti-Mouse 405306 (1:2500), (Biolegend) primer ve sekonder antikorları yardımıyla araştırılmıştır.

## 4.2. YÖNTEM

miR-770-5p 'nin antikanser etkinliğinin belirlenmesinde *in vitro* koşullarda meme kanseri hücre hatlarında proliferasyon, motilite ve invazyon kapasiteleri üzerindeki etkileri ve bu miRNA'nın etki mekanizmalarını araştırmak için aşağıda bahsedilen yöntemler kullanılarak deneyler tamamlanmıştır.

### 4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ KURULMASI VE İDAMESİ

Hücreler Çizelge 4.1.'de belirtilen uygun besiyerinde, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamı sağlayan inkübatörde kültür edilmiştir. Hücrelerin devamlılığı T-25 (25 cm<sup>2</sup>'lik) ve T-75 (75 cm<sup>2</sup>'lik) flasklarda sağlanmıştır. Flaskların % 80 oranında kaplanması durumunda hücreler tripsin enzimi ile muamele edilip kaldırılarak pasajlanmış ve çoğaltılmıştır. Uzun süreli stok olarak saklanacak olan hücreler, %10 DMSO ve %90 FBS içeren saklama ortamında dondurularak, sıvı nitrojende kriyoviallerde saklanmış ve her hücre hattının depolanması sağlanmıştır.

### 4.2.2. ETKİN MİRNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Transfeksiyon işleminde kullanılacak etkin miRNA mimic konsantrasyonunu belirlemek için dört farklı derişimde (5 nM, 10 nM, 25nM ve 50 nM) mimic veya scrambled kontrol (scr) karışımları hazırlanmıştır. miRNA inhibitör konsantrasyonunu belirlemek için 50 nM, 100 nM, 150nM ve 200 nM olacak şekilde inhibitör veya scrambled kontrol (scr) karışımları hazırlanmıştır. Bu aşamada 24-well plate kullanılması tercih edilmiştir. Hücreler tripsinlenip hücre sayımı yapılmıştır. Her kuyuda 1x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve yaklaşık 1 saat 37°C 'de ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mimic, inhibitör ya da scrambled kontrol (scr) karışımları damlalar halinde kuyulara eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında laboratuvarımızda optimize edilen ve Kısım 4.2.6 “RNA izolasyonu ve qRT-PZR” bölümünde detaylı olarak anlatılan şekilde RNA izolasyonu yapılmış ve miRNA-spesifik uygun primerler kullanılarak qRT-PZR ile transfeksiyon etkinliği kontrol edilmiştir.

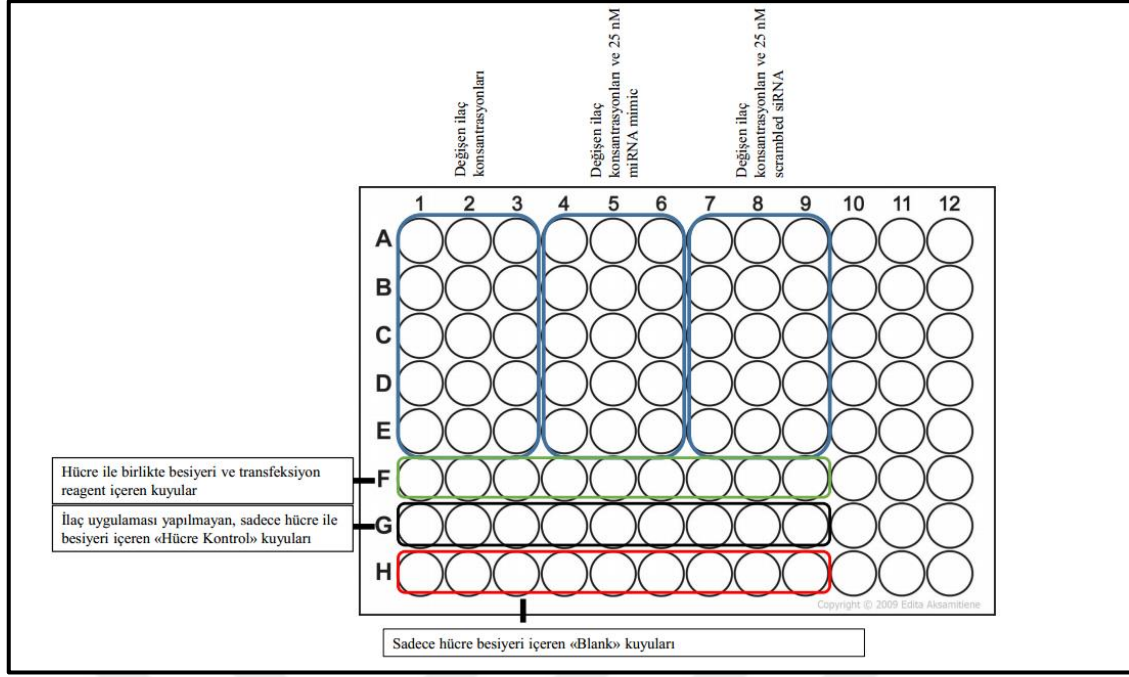
#### **4.2.3. MİRNA’LARIN PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kullanılacak hücreler tripsinlenip hücre sayımı yapılmıştır. Transfeksiyon işlemi 96-well plate kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her kuyuda  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde hesaplanmıştır. 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM olacak şekilde mimic ve scrambled kontrol (scr) sulandırılmaları hazırlanmıştır. 96-well plate içerisinde  $2 \mu\text{L}$  mimic ya da scrambled siRNA karışımları bırakılmış ve üzerine  $25 \mu\text{L}$  transfeksiyon ajanı ve serum içermeyen medium karışımı eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından her kuyuya  $175 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$ ) olacak şekilde hücre eklenip hücreler normal büyüme koşullarında  $37^\circ\text{C}$  ‘de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında WST1 protokolü uygulanarak miRNA’nın hücre çoğalmasına etkisi belirlenmiştir.

#### **4.2.4. HÜCRELERİN MİR-770-5P İLE BİRLİKTE İLAÇLARA OLAN DUYARLILIĞININ WST-1 PROTOKOLÜ İLE BELİRLENMESİ**

MCF-7, SK-BR-3, BT-474 hücre hatlarında ilaç ile birlikte belirtilen miRNA’nın ilaç konsantrasyonu üzerine etkisi WST-1 protokolü ile belirlenmiştir. Daha önceki çalışmamızda belirlenen farklı konsantrasyonlarda tamoxifen ya da trastuzumab ile birlikte 25 nM miRNA mimic veya scrambled kontrol (scr) transfeksiyon işlemi 96 kuyucuklu hücre plaklarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.). Trastuzumab uygulaması için 0.1, 0.5, 1, 2, 6  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlar belirlenmiştir. Tamoxifen için belirlenen konsantrasyonlar ise 1, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$  şeklindedir.





Şekil 4.1. İlaç etkinliğinin belirlenmesi için yapılan WST-1 uygulamasının 96 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği.

#### 4.2.5. MOTİLİTE VE İNVAZYON DENEYLERİ

miRNA'nın *in vitro* koşullarda hücre motilitesi üzerindeki etkisini araştırmak için öncelikle "Wound Healing Assay (WHA)" yapılmıştır. Bu yöntem, *in vitro* hücre göçünün ölçülmesi için kolay, düşük maliyetli ve iyi geliştirilmiş bir yöntemdir. Temel olarak, hücre tek katmanında bir "çizik" oluşturmayı, hücrelerin göçü sırasında çiziklerin kapanıp – kapanmadığını izlemek için başlangıçta ve düzenli aralıklarla görüntü yakalama ve hücrelerin göç hızını nicelleştirmek için görüntüleri karşılaştırmayı içerir.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakalara uygun koşullarda ekilmiş ve ardından miR-770-5p mimic, miR-770-5p inhibitor ve scrambled kontrol (scr) transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon işleminin ardından hücre katmanı üzerinde 20 ul pipet ucu yardımıyla çizik oluşturulmuş ve başlangıçtan (0 saat) itibaren her 24 saat sonunda görüntü alınmıştır. Ardından elde edilen görüntüler "T-scratch" programı ile analiz edilmiştir.

Real-time (eş zamanlı) invazyon deneyleri için 16 kuyulu CIM plaka (ACEA) kullanılmıştır. Hücreler öncelikle 6 kuyulu plakalara ekilmiş ve miRNA ya da scrambled kontrol ile transfekte edilmiştir. İnvazyon deneyi için CIM plakanın üst katmanı 400 ug/ml

matrigel ile kaplanmış ve 37°C 'de 4 saat inkübe edilmiştir. Plakanın alt katmanındaki kuyulara 160 ul FBS içeren besiyeri eklenmiş ve alt ile üst katman dikkatlice birleştirilmiştir. Ardından 50 ul FBS içermeyen besiyeri üst katmandaki her kuyuya eklenmiş ve 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda transfekte edilen hücreler tripsinlenip kaldırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. Her kuyuya 40.000 hücre olacak şekilde hesaplanıp ekilmiş ve 30 dk oda sıcaklığında hücrelerin plakaya tutunması için bekletilmiştir. Ardından RTCA cihazına (ACEA) yerleştirilmiş ve 24 saat sonunda elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir.

#### **4.2.6. RNA İZOLASYONU VE QRT-PZR**

##### **4.2.6.1. RNA İzolasyonu**

Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, kazıyıcı yardımı ile kaldırılıp 1.5 ml'lik tüplere alınarak +4°C , 2000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından hücre peletleri üzerine 500 ul QIAzol eklenip örnekler enjektörden geçirilmiş ve üzerine 100 µl kloroform eklenerek sertçe çalkalandıktan sonra 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4°C'de 13.000 rpm 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Üst tarafta kalan berrak faz pipet yardımıyla dikkatlice toplanıp temiz 1.5 ml'lik tüplere alınmış ve üzerine 250 ul izopropanol eklenip pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sonrasında örnekler 4°C'de 13.000 rpm 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant pelete dikkat edilerek dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 500 ul taze hazırlanmış %70'lik Ethanol eklenerek 4°C'de 10.000 rpm 5 dk santrifüj yapılmıştır. Ethanol uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem tekrarlanmıştır. Pelet 20 µl su ile çözülmüş ve buz üzerine alınmıştır. Ardından Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak RNA kantifikasyonu yapılmıştır. Ek olarak RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde 100V 30 dk yürütülmüş ve UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri EK 1'de listelenmiştir.

##### **4.2.6.2. cDNA Sentezi ve qRT-PZR Protokolü**

miR-770-5p ve scrambled kontrol (scr) transfeksiyonu ardından elde edilen total RNA'lar ile birlikte kontrol hücrelerden elde edilen total RNA'ların cDNA sentezi yapılmıştır. Bu işlemi gerçekleştirmek için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)" kiti kullanılmıştır. Her örneğin konsantrasyonu 1000 ng olacak şekilde Rnzsız su ile

sulandırılmış ve aşağıda belirtilen karışım hazırlanarak örneklerin üzerine eklenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyonu

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (<math>\mu</math>l)</b>
5X Buffer	4
RNase Inhibitor	0,5
dNTP	2
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1
Reverse Transcriptase	0,5
RNASız su	değişken
Total RNA (1000 ng)	değişken
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

Bu işlem için öncelikle RNA ve Oligo(dT) primer karışımı 65 °C’de 10 dakika denatüre edilmiştir. Sonrasında tüplere 5X buffer, Rnaz inhibitörü, dNTP karışımı ve enzim eklenip kısa santrifüj işleminden sonra 50°C’de 60 dakika ardından 85°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp üzerine 1:5 dilüsyon olacak şekilde 80  $\mu$ l su eklenip iyice pipetlenmiş ve böylece 10ng/ $\mu$ l olarak bir sonraki işleme geçilmiştir.

Belirlenen mimic ve inhibitörler ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen cDNA’lar qRT-PZR deneylerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Belirlenen spesifik primerler yardımıyla kullanılarak real-time reaksiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen Ct değerleri  $\Delta\Delta$ Ct metodu kullanılarak analiz edilmiştir. mRNA ifade analizi için referans gen olarak *GAPDH* seçilmiştir. Bu işlem “LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)” kiti kullanılarak belirlenen koşullarda Light Cyclus 480 (Roche) cihazı ile tamamlanmıştır (Çizelge 4.3.). Eş zamanlı qRT-PZR reaksiyonu sonrasında örnekler %2 ‘lik agaroz jelde yürütülmüştür. Temsili jel görüntüsü EK 2’de yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Eş-zamanlı PZR reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Mix	5
Forward Primer (FP)	0,4
Reverse Primer (RP)	0,4
cDNA (10 ng/µL)	1
RNAsız su	3,2
<b>Toplam</b>	<b>10</b>

miRNA hedef genleri için uygun primerler “Primer3” programı kullanılarak tasarlanmış ve Çizelge 4.4.’ de listelenmiştir.

Çizelge 4.4. qRT-PZR için kullanılan primer dizileri.

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ (5'---3')
ARHGAP35_F	GACTTTTCAACCTCATCGAAGCA
ARHGAP35_R	GCTTTCCGTCTGGCATTGT
CDC42_F	GGTGGAGAAGCTGAGGTCAT
CDC42_R	TTTACCAACAGCACCATCGC
CDH1_F	TTCCCAACTCCTCTCCTG
CDH1_R	AAACCTTGCCTTCTTTGTC
DNMT3A_F	AAGGAGACCAACATCGAATCCA
DNMT3A_R	CGCTTGCTGATGTAGTAGGGG
EGFR_F	TCTACAACCCACCACGTAC
EGFR_R	TCGCACTTCTTACACTTGCG
GAPDH_F	GTTCGACAGTCAGCCGCAT
GAPDH_R	TGAAGGGGTCATTGATGGCA
HER3_F	CTCTACCATTGCCAACCTCC
HER3_R	TATCTCAGCATCTCGGTCCCT

<b>ITGA6_F</b>	AACCAGCAAGGCAGATGGAA
<b>ITGA6_R</b>	CCCTTGAGAACCTGTGTTGGT
<b>NOTCH3_F</b>	GCATGTGACCAGGATGTGGA
<b>NOTCH3_R</b>	CCGACAGACACTCGTTGACA
<b>PARVB_F</b>	AATGTGGCTGAGGTGACACA
<b>PARVB_R</b>	TCTTCCCGTGAATTGAGTCC
<b>PIP5K1C_F</b>	AGGCCATCGAATCGGATGAC
<b>PIP5K1C_R</b>	CCGAAAGACCGTGTGCTCA
<b>PTK2_F</b>	GCGTCTAATCCGACAGCAAC
<b>PTK2_R</b>	GCAGGATTTCTTTCCGCCCAA
<b>RAC1_F</b>	ATAACCTCCCGGGGCAAAGA
<b>RAC1_R</b>	CTGCGGATAGGTGATGGGAG
<b>RAC2_F</b>	CGGTGAAATACCTGGAGTGC
<b>RAC2_R</b>	ATCAGGCTTTGGGTGGGGAT
<b>ROCK1_F</b>	AGTGAAGGTGATTGGTAGAGGT
<b>ROCK1_R</b>	ATGATGTCCCTTTCTTCCCAG
<b>SNAI1_F</b>	ACCACTATGCCGCGCTCTT
<b>SNAI1_R</b>	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
<b>STAT3_F</b>	GAGGGAACAAGCCCCAAC
<b>STAT3_R</b>	CTCCAGGTACCGTGTGTCAA
<b>VIM_F</b>	GGACCAGCTAACCAACGACA
<b>VIM_R</b>	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG

#### 4.2.6.3. miRNA İfadesi İçin cDNA Sentezi ve qRT-PZR

miRNA cDNA sentezi için miScript II RT kit (Qiagen) kullanılmıştır. miRNA reverse transcription (RT) reaksiyonu Çizelge 4.5.'deki gibi hazırlanmış ve 37<sup>0</sup>C'de 60 dakika ardından 95<sup>0</sup>C'de 5 dakika ve 4<sup>0</sup>C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler 1:10 dilüsyon olacak şekilde sulandırılmış (5 ng/ul) ve -20<sup>0</sup>C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 4.5. miRNA RT reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
5X miScript HiSpec Buffer	4
10X Nucleics Mix	2
miScript RT Mix	2
RNA (1000 ng)	değişken
RNAsız su	değişken
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

miRNA qRT-PZR işlemi için miScript *SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) ve *miScript primer assay* (Qiagen) kullanılmıştır. Primer dizileri EK 3'de yer almakta olup spesifik miRNA primerleri 500 ul TE ile dilue edilmiştir. Çizelge 4.6.'daki karışım hazırlanmış ve Light Cycler 480 (Roche) cihazında qRT-PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Referans olarak *RNU6* seçilmiştir.

Çizelge 4.6. miRNA qRT-PZR reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Mix	5
10X UP	1
10X Primer Assay	1
cDNA (5ng/ul)	1
RNAsız su	2
<b>Toplam</b>	<b>10</b>

#### 4.2.7. PROTEİN İZOLASYONU VE WESTERN BLOT

Hücreler 6 kuyulu plakalara ekilmiş, transfeksiyon ya da ilaç uygulamaları yapılmıştır. Ardından hücreler 2000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatan uzaklaştırılmış ve üzerine yaklaşık 50-100 ul *Lysis Buffer* eklenip karıştırılmıştır. 5 dk orbital shaker'da karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatan temiz 1.5 ml tüplere alınmış ve *Coomasie Plus Bradford Assay (Thermo)* solüsyonu kullanılarak Wallac Victor Counter (Perkin Ekmer) cihazı yardımıyla protein ölçümü yapılmıştır. Protein miktarını hesaplamak için değişen konsantrasyonlarda BSA ile standard eğri çizilmiştir. Elde edilen protein konsantrasyonları EK 4'de listelenmiştir.

Protein örnekleri 2X protein loading dye ile karıştırılıp 99°C 10 dk inkübe edilmiştir. SDS-page için % 8, % 10 ve % 12 'lik resolving jel (Çizelge 4.7.) ve % 5'lik stacking jel Çizelge 4.8.'de yer alan miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.7. Resolving jel yüzdeleri ve içerikleri

<b>İçerik (Resolving Jel)</b>	<b>%8</b>	<b>% 10</b>	<b>% 12</b>
	5 ml	5 ml	5 ml
<i>ddH<sub>2</sub>O (ml)</i>	2.3	1.9	1.6
<i>%30 Ac/BisAc (ml)</i>	1.3	1.7	2.0
<i>1.5 M Tris (ph=8.8) (ml)</i>	1.3	1.3	1.3
<i>%10 SDS (µl)</i>	50	50	50
<i>%10 APS (µl)</i>	50	50	50
<i>TEMED (µl)</i>	3	2	2

Çizelge 4.8. Stacking jel içeriği

<b>% 5 (Stacking Jel)</b>	<b>3 ml</b>
<i>ddH<sub>2</sub>O (ml)</i>	2.10
<i>%30 Ac/BisAc (ml)</i>	0.50
<i>1.5 M Tris (ph=6.8) (ml)</i>	0.38
<i>%10 SDS (µl)</i>	30
<i>%10 APS (µl)</i>	30
<i>TEMED (µl)</i>	3

Öncelikle çalışılacak proteinin ağırlığına (kDa) göre jelin çözünürlüğü belirlenir ve jel hazırlanır, en son TEMED eklenir. Jel döküldükten sonra havayla jelin temas etmemesi için %100 ethanol ile üzeri kaplanır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra ethanol ddH<sub>2</sub>O ile yıkanarak uzaklaştırılır. Kalan su Wattman kağıdı ile jele dokunmadan kenardan toplanır. Üzerine stacking jel dökülür ve tarak yerleştirilir. Polimerleşme tamamlandığında tarak dikkatlice çekilerek kuyular enjektör yardımıyla yırtmadan temizlenir. 10-15 ug protein kuyulara dikkatlice yüklenir. 80V'da 20 dk ardından 100V'da yaklaşık 2 saat yürütülür. Bu süre içerisinde protein ladder takip edilmelidir.

PVDF membran uygun boyutlarda kesilir. Öncelikle metanol, ardından ddH<sub>2</sub>O ve en son Wet Transfer tampon çözeltisi içerisine alınır. Transfer sandviçi sünger ve wattman kağıtları arasında kalacak şekilde ve geçiş yönüne dikkat edilerek hazırlanır. Transfer işlemi 70V'da 90 dk gerçekleştirilir. Transfer işlemi bittikten sonra %5'lik blocking solüsyonu hazırlanır ve membran blocking solüsyonu içinde 1 saat boyunca çalkalayıcıda bırakılır. Ardından blocking solüsyonu dökülür, 1X TBS-T ile yıkanır ve üzerine primer



antikor eklenerek gece boyu çalkalayıcıda bırakılır. Bu işlemin ardından 3 kez 1X TBS-T ile yıkanan membran üzerine sekonder antikor eklenir ve 1 saat inkübe edilir. Sekonder antikor ile muamele edilen membran ardından 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanır. Bu işlemin ardından HRP substratı olan görüntüleme kiti kullanılarak LI-COR cihazı yardımıyla görüntü alınır.

Çalışmamızda kullanılan primer ve sekonder antikorlar Çizelge 4.9.'da listelenmiştir.

Çizelge 4.9. Western Blotlama için kullanılan antikor listesi

<b>Antikor Adı</b>	<b>Markası</b>	<b>Katalog No</b>	<b>Dilüsyon Oranı</b>
AKT	SantaCruz	sc8312	1:1000
Beta-actin	Biologend	643802	1:1000
E-Cadherin	Cell Signaling	24E10	1:1000
EGFR	SantaCruz	sc53274	1:1000
ERK2	SantaCruz	sc154	1:1000
GAPDH	SantaCruz	sc47724	1:1000
HER3	Cell Signaling	1B2E	1:1000
HRP-conjugated Anti-Mouse	Biologend	405306	1:5000
HRP-conjugated Anti-Rabbit	Cell Signaling	7074S	1:10000
IGF1R	Cell Signaling	D23H3	1:1000
mTOR	Cell Signaling	7C10	1:1000
phosho-ERK 1/2	SantaCruz	sc-81492	1:1000
phosho-AKT	SantaCruz	sc7985	1:1000
phosho-EGFR	SantaCruz	sc81490	1:1000
SNAIL	Cell Signaling	C15D3	1:500
Vimentin	Cell Signaling	D21H3	1:1000

#### 4.2.8. DNA İZOLASYONU VE METİLASYON SPESİFİK PZR

MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinden QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) yardımıyla üretici firmanın protokolü uygulanarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Protokol detayları aşağıdadır:

- ❖ Ön hazırlık olarak kuru ısıtıcı bloklar açılıp 56°C ve 70°C'ye getirilmiştir.
- ❖ *Buffer AE* ve *Buffer ATL* oda ısısına getirilmiştir.
- ❖ Kullanılacak diğer malzemelerin miktarı kontrol edilip örnek sayısı kadar 1.5 ml tüp ve filtreli tüp hazırlanmış ve numaralandırılmıştır.
- ❖ Hücre kültüründen elde edilen peletin üzerine 180µl *Buffer ATL* pipetlenip pipetaj yapıldıktan sonra üzerine 20µl Proteinaz K eklenmiştir. 15-20 sn karıştırılan tüpler 56°C de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyon sonrası tüplere 200'er µl *Buffer AL* pipetlenmiş 15-20 sn karıştırıldıktan sonra 70°C de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyon sonrası tüplere 200'er µl etanol eklenip 15-20 sn karıştırılmış 3-5sn santrüfuj edilmiştir.
- ❖ Tüp içeriğinin hepsi filtreli kolona aktarılmış ve 8000 rpm'de 1 dk santrüfuj edilmiştir.
- ❖ Filtreler temiz tüpe aktarılmış, her bir tüpe 500 µl *Buffer AW1* pipetlenmiştir. Ardından örnekler 8000 rpm'de 1 dk santrüfuj edilmiştir.
- ❖ Filtreler temiz tüpe aktarılmış her bir tüpe 500 µl *Buffer AW2* pipetlenmiş ve 13000 rpm'de 3 dk santrüfuj edilmiştir.
- ❖ Filtreler temiz tüpe aktarılır. 13000 rpm'de 1 dk santrüfuj edilmiştir. Bu basamak filtrenin tamamen kurutulması içindir.
- ❖ Filtreler 1.5 ml tüplere aktarılıp 50 µl *Buffer AE* pipetlenmiş, 5dk oda ısısında bekletilmiştir.
- ❖ Ardından örnekler 8000 rpm 'de 1 dk santrüfuj edilmiştir.
- ❖ Santrüfuj sonunda filtre atılmış ve DNA örnekleri NanoDrop cihazında ölçülüp -20°C 'ye kaldırılmıştır. Ölçüm sonuçları ve temsili jel görüntüsü EK 5'de yer almaktadır.

Metilasyon spesifik PZR (MS-PZR) öncesi 500 ng genomik DNA'ya EZ DNA Methylation kit (Zymo Research) ile bisülfid uygulaması yapılmıştır. Ardından CDH1 metile ya da metile olmayan primerler (Çizelge 4.11.) ile EPIK™ Amplification Kit (Bioline) kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları Çizelge 4.10.'da yer almaktadır.

Çizelge 4.10. Metilasyon spesifik PZR koşulları

Sıcaklık	Zaman	
95 °C	5 dakika	
95 °C	30 saniye	40 döngü
57 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	5 dakika	
4 °C	∞	

Çizelge 4.11. Metilasyon spesifik CDH1 primer dizileri (178).

Primer Adı	Primer Dizisi (5'---3')
CDH1_M_F	TGTAGTTACGTATTTATTTTTAGTGGCGTC
CDH1_M_R	CGAATACGATCGAATCGAACCG
CDH1_U_F	TGGTTGTAGTTATGTATTTATTTTTAGTGGTGT
CDH1_U_R	ACACCAAATACAATCAAATCAAACCAA

## 4.2.9. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

### 4.2.9.1. Biyoinformatik Analizler

Çalışmamızda miRNA'ların tahmini hedeflerini belirlemek amacıyla *miRWalk 2.0* (179) programından faydalanılmıştır. Zenginleştirme analizleri *Webgestalt* aracılığıyla yapılmıştır (180,181). miRNA'nın tümör dokularındaki ifade seviyeleri *TCGA XenaBrowser* (182) ile gerçekleştirilmiştir. miRNA-Hedef gen ilişkisini araştırmak için *TargetScan* (131,183) programından faydalanılmıştır. Tez kapsamında kullanılan tüm primerler (metilasyon spesifik CDH1 hariç) NCBI, Primer-Blast (184) yardımıyla tasarlanmış ve UCSC In-Silico PCR (185) ile kontrol edilmiştir. Wound Healing Assay çalışmalarında *Tscracth* (186) programı yardımıyla açık alan hesaplamaları yapılmış ve grafiklendirilmiştir. Protein ve PZR jel görüntüleri *Image J* (187) programı aracılığıyla değerlendirilmiştir. İnvazyon deneylerinin gerçekleştirildiği CIM plate sonuçları *RTCA Data Analysis Software (ACEA)* programıyla analiz edilmiştir. İlaç etkinliği deneylerinde *Graphpad Prism version 6.04 software* programından yararlanılmıştır.

### 4.2.9.2. İstatistiksel Analizler

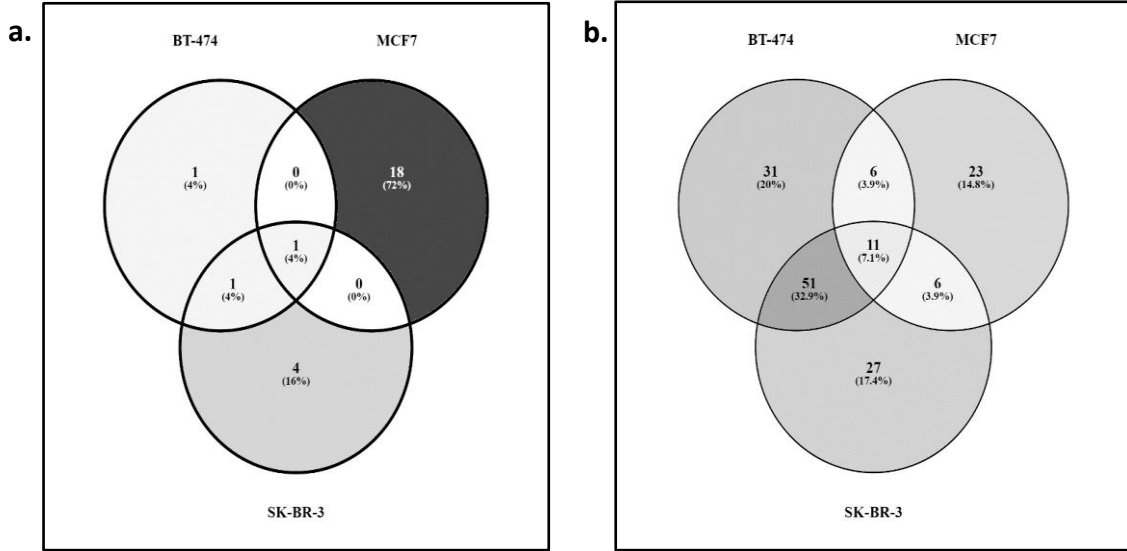
Tüm deneyler her biri en az iki biyolojik ve iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. İki örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu düşünülen farklılıkları test etmek için Student's t-test uygulanmış ve anlamlılık derecesi  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir. Sadece ilaç veya ilaç ile birlikte miR-770-5p mimic transfeksiyon deneylerinde doz-yanıt verilerini analiz etmek için doğrusal olmayan regresyon (curve fit) yöntemi kullanılmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez kapsamında östrojen reseptör pozitif (ER+) ve HER2 (+) meme kanseri hücre hatlarında belirli konsantrasyonda ilaç uygulamaları sonucunda elde edilen ve ortak yanıt olarak ortaya çıkan miRNA'lerden biri olan miR-770-5p'nin 6 farklı meme kanseri hücre hattında antikanser etkinliği ve miR-770-5p'nin etki mekanizmasını tanımlayan araştırma bulguları yer almaktadır. Ayrıca miR-770-5p ER/HER2 ve ER/IGF1R/EGFR arasındaki karşılıklı etkileşimdeki rollerine ait bulguları içermektedir.

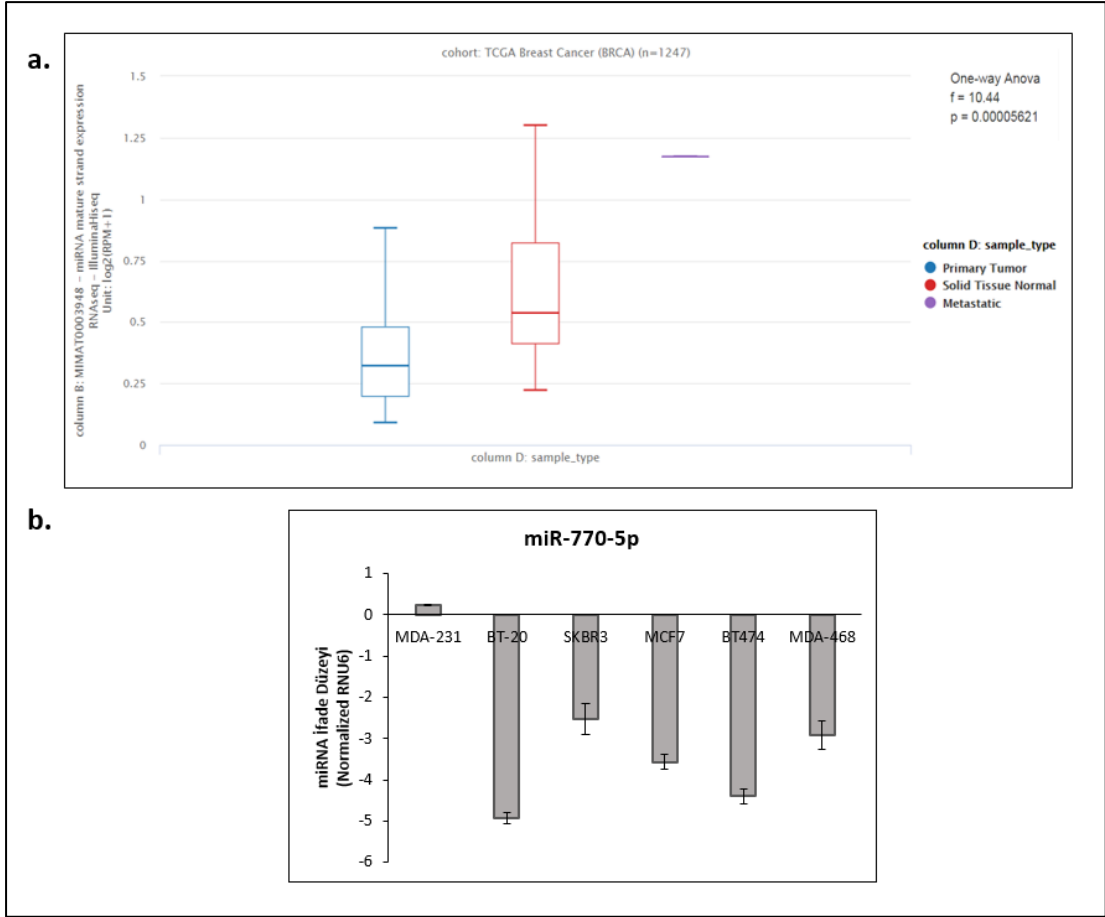
### 5.1. RESEPTÖR POZİTİF HÜCRELERDE İLAÇ İLE BİRLİKTE MİR-770-5P'NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Önceki çalışmamızda yer alan SK-BR-3 ve BT-474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrasında yapılan miRNA qRT-PZR array verileri ile MCF-7 ve BT-474 hücrelerinde tamoxifen uygulamasının ardından yapılan qRT-PZR array veriseti *VENNY* programı aracılığıyla kesiştirilmiş ER/PR/HER2 reseptörlerinden ve iki farklı ilaçtan bağımsız olarak ifadesi ortak artan tek miRNA miR-770-5p olarak belirlenmiştir (Şekil 5.1.). Üç hücre hattında da ortak olarak ifadesi azalan 11 mikroRNA EK 6'da listelenmiştir (Şekil 5.1.).



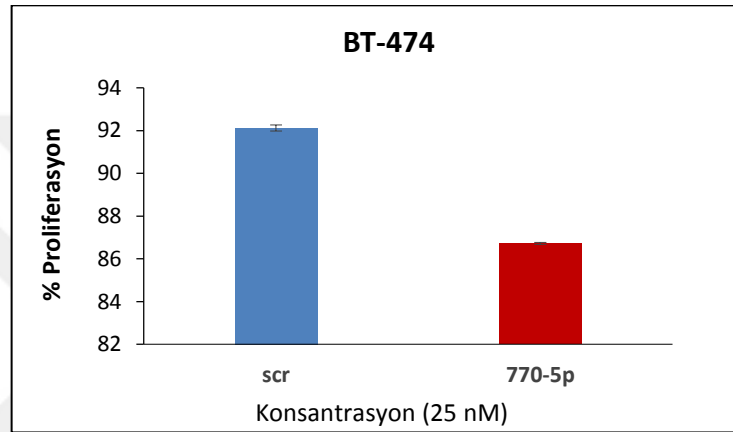
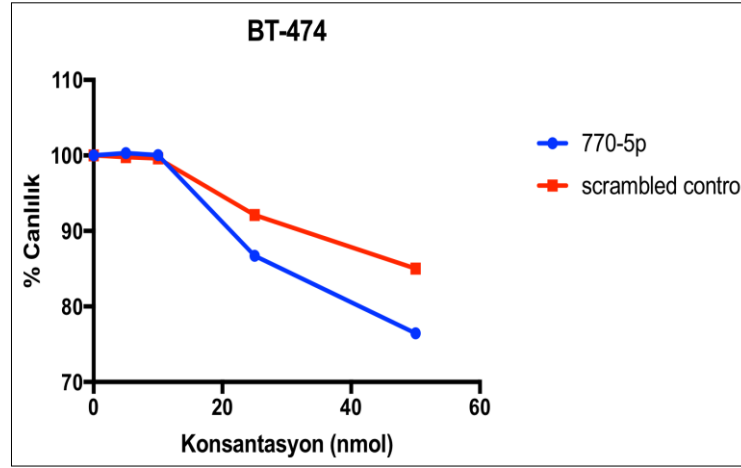
Şekil 5.1. Tamoxifen ve trastuzumab cevabında değişen mikroRNA'lar. **a.** BT-474, MCF-7 ve SK-BR-3 hücrelerinde ifadesi artan miRNA'lar. **b.** BT-474, MCF-7 ve SK-BR-3 hücrelerinde ifadesi azalan miRNA'ları göstermektedir.

miR-770-5p'nin klinik öneminin araştırılması için TCGA veritabanından faydalanılmıştır. miR-770-5p'nin tümör dokularındaki ifade seviyesi *TCGA Breast Cancer BRCA (n=1247)* veri seti kullanılarak *XenaBrowser* (182) programı ile analiz edilmiş ve tümör dokularında miR-770-5p'nin ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 5.2.). Ayrıca labarovutarımızda bulunan 6 farklı meme kanseri hücre hattında miR-770-5p ifade profili incelenmiştir ve tümör hücrelerinde miR-770-5p'nin ifadesinin azaldığı dikkat çekmiştir (Şekil 5.2.). TCGA veriseti analizi ve meme kanseri hücre hatlarından elde edilen sonuçlar tutarlı olarak bu miRNA'nın ifadesinin tümörlerde azaldığını göstermiştir. Tümörde bu mikroRNA'nın ifadesini artırmanın tedaviye yardımcı olabileceği fikrinden yola çıkarak BT-474 hücrelerinde bu mikroRNA ifadesinin mimic transfesksiyonu ile geçiçi olarak artırılması sağlanmıştır.



Şekil 5.2. miR-770-5p 'nin ifadesinin belirlenmesi. **a.** TCGA veriseti yardımıyla bu mikroRNA'nın tümörlerde ifadesinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (n=1247, p=0.00005621). **b.** Benzer şekilde 6 farklı ATCC meme kanseri hücre hattında da miR-770-5p ifadesi incelenmiş ve reseptör pozitif hücreler içerisinde BT-474 hücrelerinde diğer tümör hücrelerine göre ifadesinin düşük olduğu saptanmıştır.

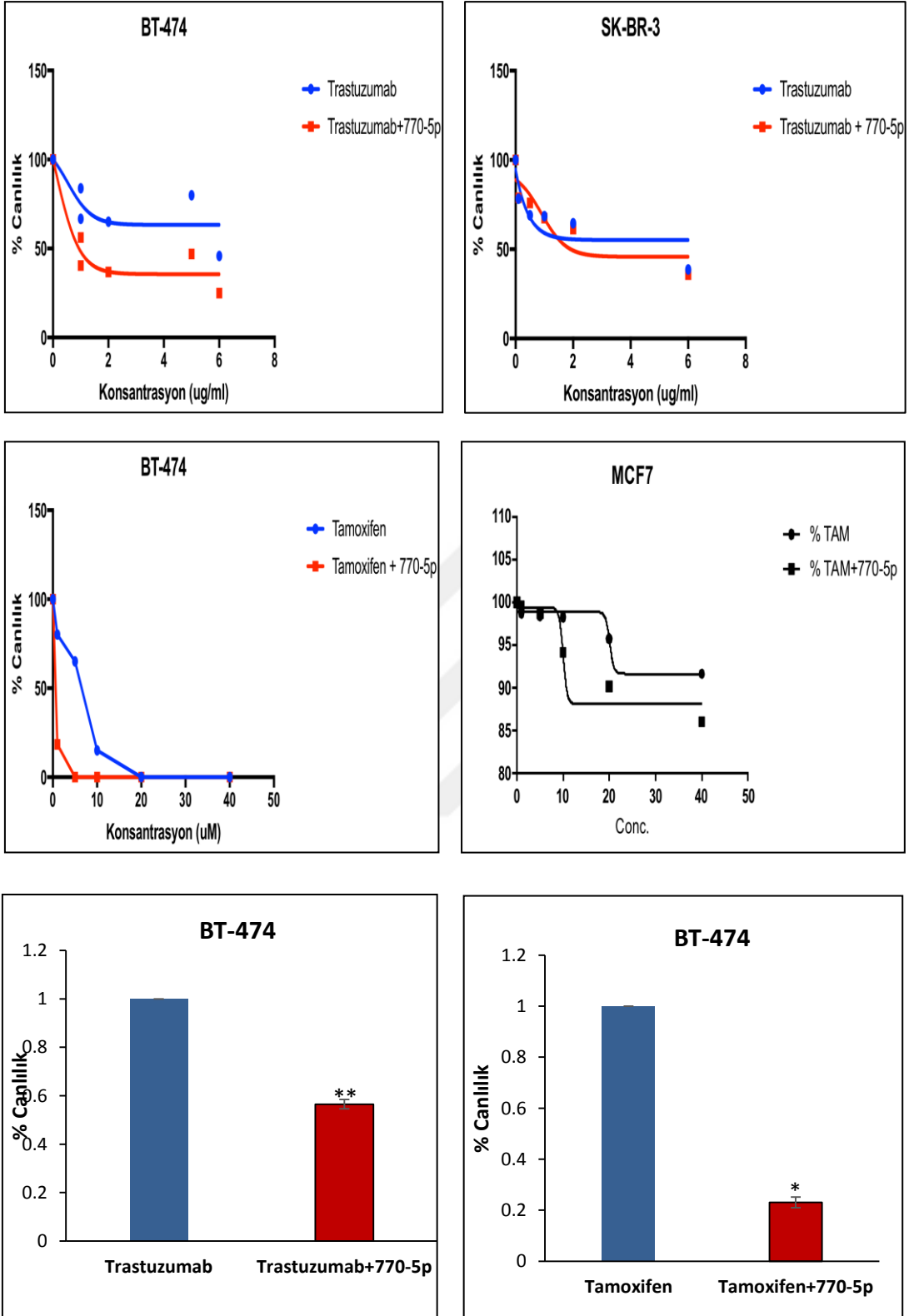
Östrojen reseptör pozitif (ER+) ve HER2 pozitif (HER2+) meme kanseri hücre hattı olan BT-474 hücrelerinde değişen konsantrasyonlarda miR-770-5p transfeksiyonu yapılmış ve etkin konsantrasyon 25 nM olarak belirlenmiştir. Ardından BT-474 hücrelerine miR-770-5p ve scrambled kontrol (scr) kullanılarak belirlenen etkin konsantrasyon (25 nM) ile transfeksiyon yapılmış ve mikroRNA'nın proliferasyon üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında tek başına miR-770-5p'nin scrambled kontrole kıyasla hücre canlılığını yaklaşık % 10 oranında azalttığı bulunmuştur (Şekil 5.3.) (n=2, \*p<0.005).



Şekil 5.3. BT-474 hücrelerinde miR-770-5p'nin proliferasyon üzerine etkisi. Farklı konsantrasyonlarda yapılan transfeksiyon sonuçları değerlendirilmiş ve etkin konsantrasyon olarak 25 nM belirlenmiştir. BT-474 hücrelerinde miR-770-5p (25 nM)'nin hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (n=2, \*p<0.005).

miR-770-5p'nin trastuzumab ve tamoxifen etkinliğine olan etkisinin araştırılması için ek olarak trastuzumab veya tamoxifen ile birlikte miR-770-5p transfeksiyonu yapılmış ve her iki ilacın da etkinliğini anlamlı olarak artırdığı gözlenmiştir (Şekil 5.4.).





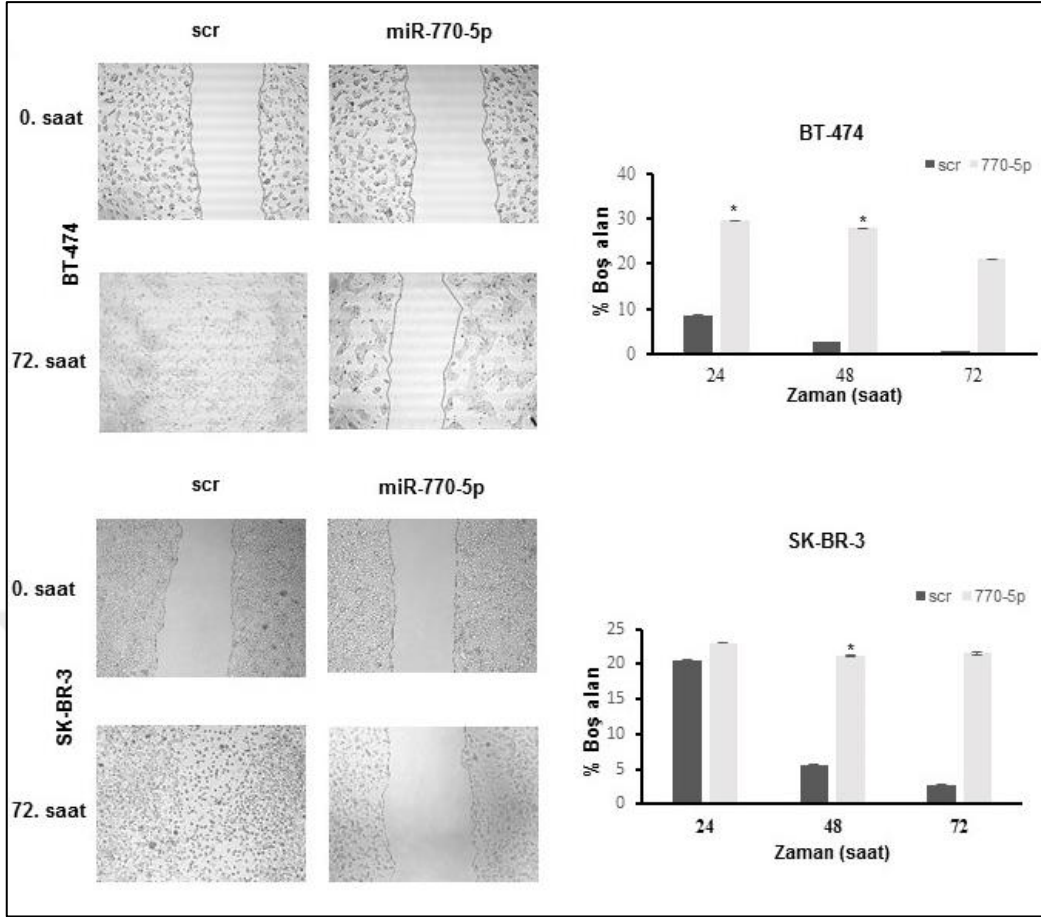
Şekil 5.4. miR-770-5p'nin ilaç ile birlikte proliferasyon üzerine etkisi. BT-474, SK-BR-3 ve MCF-7 hücrelerinde trastuzumab veya tamoxifen ile birlikte miR-770-5p'nin proliferasyon üzerine etkisi incelenmiş ve ilaçlar ile birlikte hücre canlılığını sadece ilaca kıyasla daha da azalttığı saptanmıştır (\*\*p<0.0001; \*p<0.002).

Trastuzumab ve tamoxifen varlığında ortak hedef olarak belirlemiş olduğumuz miR-770-5p'nin potansiyel moleküler fonksiyonunun araştırılması için öncelikle *in silico* yöntemler ile hedef genleri belirlenmiş ve yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. *mirWalk2.0* (179) kullanılarak potansiyel hedef genleri belirlenmiş ve bu hedefler ile yapılan zenginleştirme analizi sonucunda ErbB, İnsulin ve MAPK sinyal yolağı gibi kanser oluşum ve gelişiminde önemli rol oynayan sinyal iletim sistemlerinin varlığı bulunmuştur (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. miR-770-5p hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi verileri.

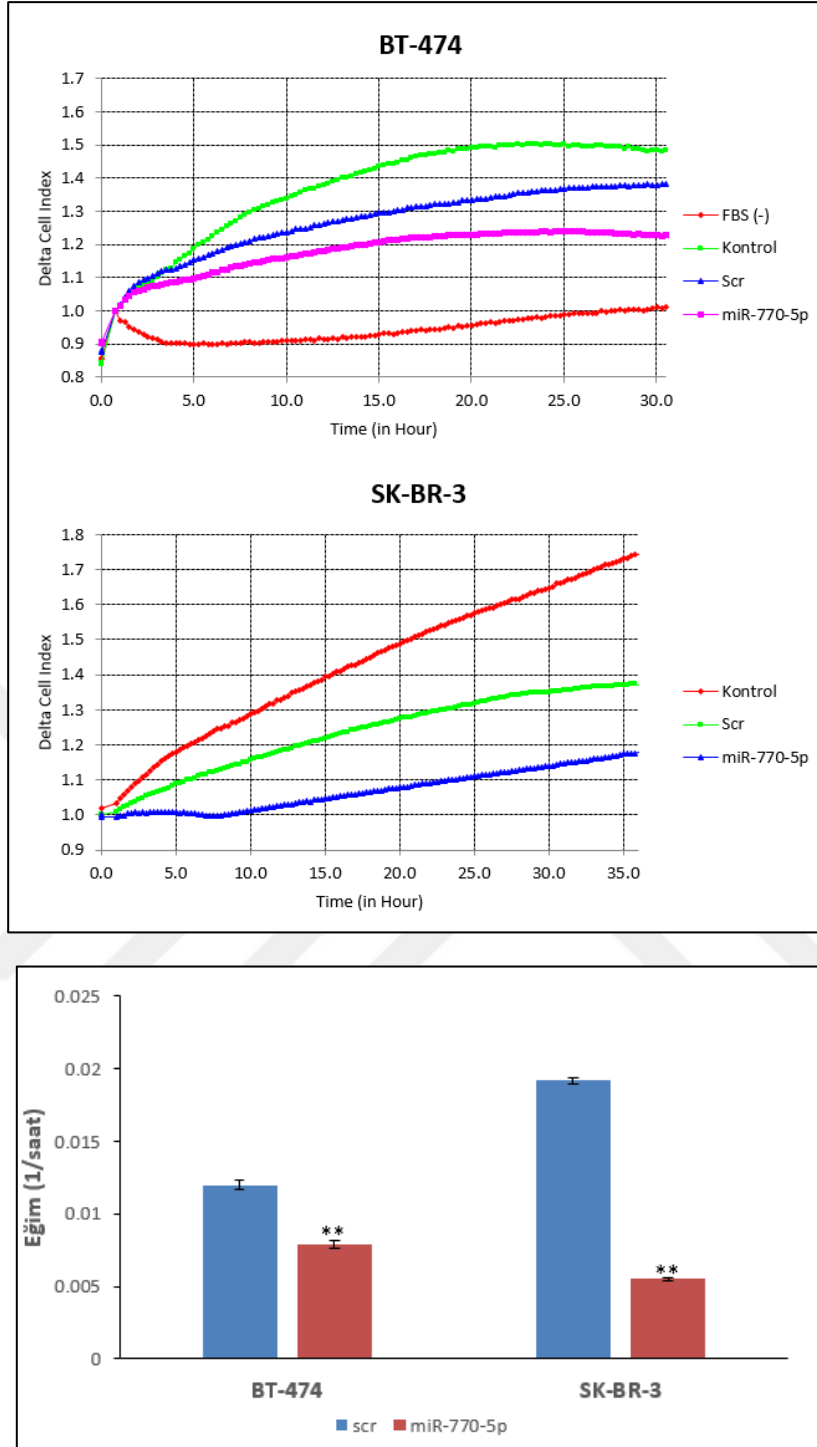
Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
ErbB sinyal yolağı	47	P=3.67e-18
Kalsiyum sinyal yolağı	71	P=8.01e-18
İnsülin sinyal yolağı	64	P=6.69e-20
Fokal adezyon	91	P=2.84e-27
MAPK sinyal yolağı	109	P=2.27e-27

Zenginleştirme analizlerinden elde edilen yolaklar incelendiğinde hedef genlerin fokal adezyon, ErbB sinyal yolağı gibi hücrenin hareket ve invazyon kapasitesini etkileyebilecek yolaklarda rol aldığı dikkat çekmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak miR-770-5p'nin motilite üzerine etkisini incelemek amacıyla reseptör pozitif üç hücre hattında da (BT-474, SK-BR-3 ve MCF-7) miR-770-5p mimic transfeksiyonunun ardından yara iyileşme (Wound Healing Assay, WHA) deneyleri yapılmıştır. 72 saat sonunda miR-770-5p mimic ile transfekte edilen hücrelerde scr kıyasla boş alan varlığı gözlenmiş (Şekil 5.5.) ve *Tscracth* (186) programı yardımıyla açık alanlar hesaplanmış ve grafik haline getirilmiştir. Yara iyileşme deneyleri her üç hücre hattında da miR-770-5p'nin hücre hareketliliğini engellediğini göstermektedir (Şekil 5.5.). MCF-7 hücrelerinden elde edilen görüntüler EK 7'de sunulmuştur.



Şekil 5.5. BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde miR-770-5p motilite üzerine etkisi. Motilite hızı WHA ile değerlendirilmiş ve miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde kontrole kıyasla motilite hızı azalmıştır (n=2, \*p<0.005).

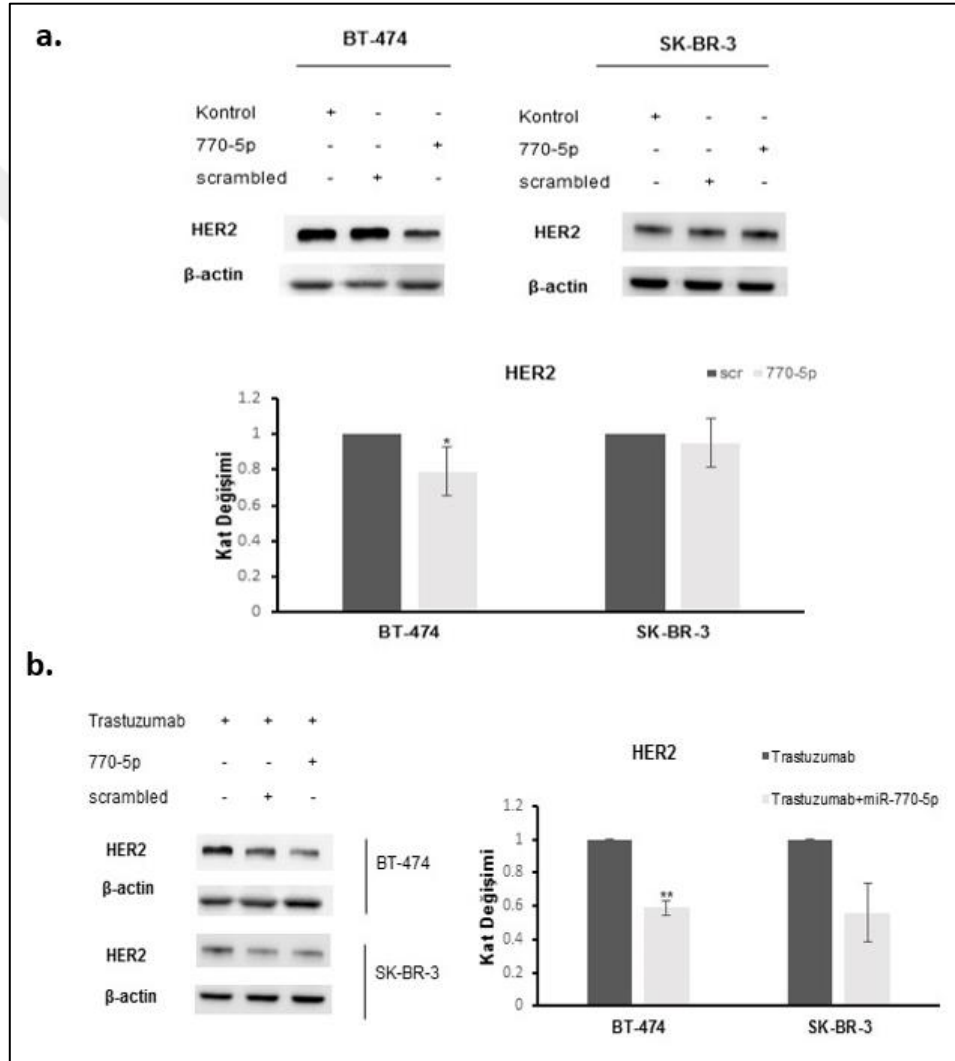
Ek olarak miR-770-5p'nin invazyon yeteneği üzerine etkisi araştırılmış ve *xCELLigence real-time cell analyzer* ile yapılan invazyon deneyleri sonucunda miR-770-5p mimic transfekte BT-474 ve SKBR-3 hücrelerinde invazyon kinetiğinin anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde miR-770-5p invazyon üzerine etkisi. İnvazyon yeteneği xCELLigence real-time cell analyzer ile değerlendirilmiş ve miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde kontrole kıyasla invazyon kinetiği azalmıştır (n=2, \*\*p<0.0001).

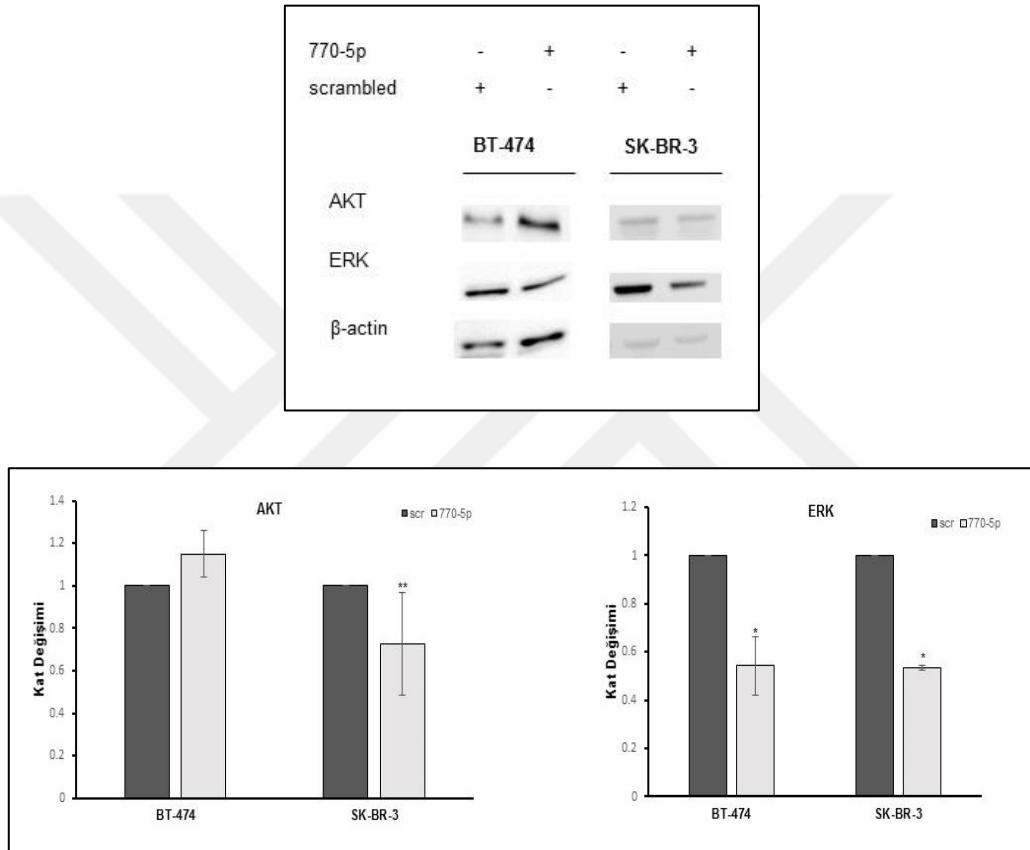
### 5.1.1. MIR-770-5P'NİN HER2 SİNYAL İLETİMİNDEKİ ETKİ MEKANİZMASI

Yapılan zenginleştirme analizi sonuçları miR-770-5p'nin ErbB2 (HER2) sinyal iletim sistemi üzerinde fonksiyonu olabileceğini düşündürmüştür. *mirWalk* programında potansiyel hedefler içerisinde ErbB2 varlığı belirlenmiş ve tek başına miR-770-5p mimic transfekte BT-474 hücrelerinde ErbB2 protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 5.7.). BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde trastuzumab ile birlikte miR-770-5p'nin ErbB2 protein seviyesini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Şekil 5.7.).



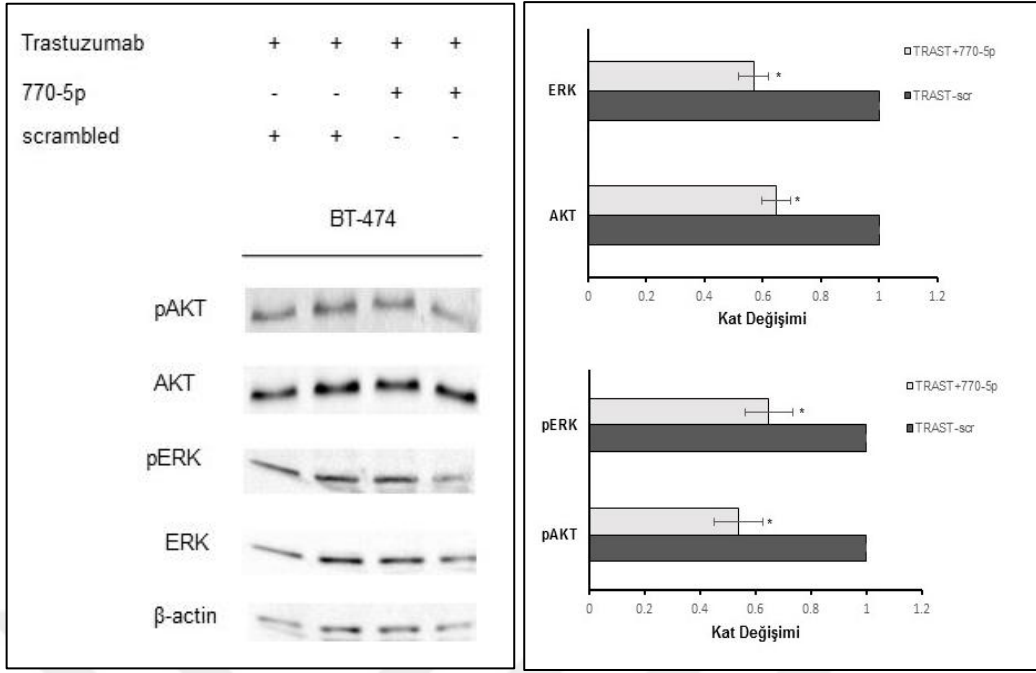
Şekil 5.7. miR-770-5p'nin tek başına ve trastuzumab ile birlikte ErbB2 protein ifadesi üzerine etkisi. **a.** Her iki hücre hattında miR-770-5p mimic transfeksiyonu ile HER2 protein seviyesi azalmaktadır (n=3, p<0.05). **b.** Trastuzumab ile birlikte miR-770-5p özellikle BT-474 hücrelerinde HER2 protein seviyesi azalmıştır (\*\*p<0.05).

miR-770-5p'nin HER2 sinyal iletim sistemindeki rolünü incelemek amacıyla miR-770-5p mimic ile transfekte edilmiş BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde HER2 iletim sisteminin aşağı akış elemanları üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla PI3K ve MAPK sinyal ağının temel düzenleyicileri olarak bilinen AKT ve ERK proteinlerinin total ve fosforile formları incelenmiştir. Protein analiz sonuçları her iki hücre hattında da miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde total ERK protein seviyesinin anlamlı olarak azaldığı ancak total AKT seviyesinin sadece SK-BR-3 hücrelerinde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.8.).



Şekil 5.8. miR-770-5p transfekte BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde total ERK ifadesi. BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde scrambled ya da miR-770-5p ile transfekte protein lizatlarında total AKT ve ERK protein seviyeleri incelenmiştir. ERK ifadesi her iki hücre hattında da azalırken (n=4, \*p<0.01); AKT ifadesi sadece SK-BR-3 hücrelerinde anlamlı olarak azalmıştır (n=2, \*\*p<0.05).

miR-770-5p'nin trastuzumab etkinliğini artırma mekanizmasının aydınlatılması amacıyla trastuzumab varlığında miR-770-5p ya da scrambled kontrol ile transfekte BT-474 hücrelerinde total ve fosforile ERK ve AKT seviyeleri incelenmiş ve her iki proteinin hem total hem de fosforile formunun anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. Trastuzumab varlığında miR-770-5p'nin AKT ve ERK üzerine etkisi. Trastuzumab ile birlikte miR-770-5p ile transfekte BT-474 hücrelerinde 72. saat sonunda AKT ve ERK proteinleri için Western blot yapılmıştır. miR-770-5p'nin trastuzumab ile kombinasyonu p-ERK ve p-AKT ifadesini anlamlı olarak azaltmıştır (n=3, \*p<0.05).

## 5.2. MİR-770-5P'NİN ER/HER2 HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

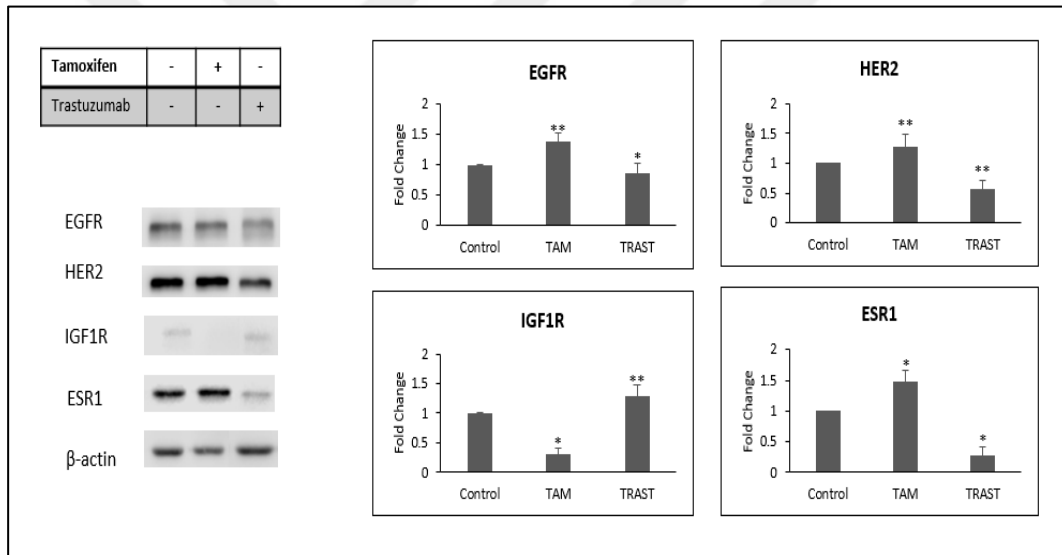
Yapılan biyoinformatik analizler ile miR-770-5p'nin tahmini hedef genleri belirlenmiştir. Bu mikroRNA'nın hedefleri içerisinde *HER2*, *ESR1*, *EGFR* ve *IGF1R* varlığı dikkatimizi çekmiş ve her iki ilaç varlığında da hücre canlılığını azaltma mekanizmasının bu reseptörlerin ifadesini değiştirerek olabileceğini düşündürmüştür.

ER/HER2 ve ER-EGFR/IGF1R arasındaki karşılıklı etkileşim daha önceki birçok çalışmada tanımlanmıştır. Endokrin terapi ya da monoklonal antikor tedavilerinden bir süre sonra hücrelerin kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişimini bu reseptörlerdeki ifade değişimi ile sağladığı bilinmektedir. Bu bilgi ışığında; öncelikle BT-474 hücrelerinde belirlediğimiz etkin ilaç konsantrasyonu (IC70 değeri) ile yukarıda belirttiğimiz karşılıklı etkileşim varlığı araştırılmıştır. Tamoxifen (10  $\mu$ M) varlığında kontrol hücreye kıyasla total HER2 protein seviyesi artmakta; trastuzumab (6  $\mu$ g/ml) varlığında ise HER2 protein seviyesi azalmaktadır (Şekil 5.10.).

Tamoxifenin ER kısmi antagonisti olduğu ve ER ile yarışmalı inhibisyon göstererek proliferasyonu azalttığı bilinmektedir. Tamoxifen varlığında ER-alfa (ER $\alpha$ , *ESR1*) protein düzeyinde azalma beklenmektedir. Literatürde ER ve HER2 arasındaki karşılıklı etkileşim negatif olarak tanımlanmakta ER varlığında HER2 seviyesinin azaldığı belirtilmektedir. Bu durum tamoxifen varlığında HER2 seviyesindeki artış ile uyumludur (Şekil 5.10.).

BT-474 hücrelerinde tamoxifen ve trastuzumab varlığında karakterize edilen diğer bir membran reseptör protein ise *IGF1R* 'dir. Tamoxifen varlığında *IGF1R* protein seviyesi azalırken; trastuzumab varlığında kontrole kıyasla artmaktadır (Şekil 5.10.).

HER ailesinin diğer bir üyesi olan *EGFR* (HER1) protein düzeyi BT-474 hücrelerinde tamoxifen varlığında artmakta; trastuzumab varlığında azalmaktadır (Şekil 5.10.). Bu durum aynı ailenin bir diğer üyesi olan HER2 protein düzeyine benzemektedir.



Şekil 5.10. Tamoxifen ya da Trastuzumab varlığında BT-474 hücrelerinde ER, IGF1R, HER2 ve EGFR total protein düzeyleri (n=2, \*p<0.01; \*\*p<0.05).

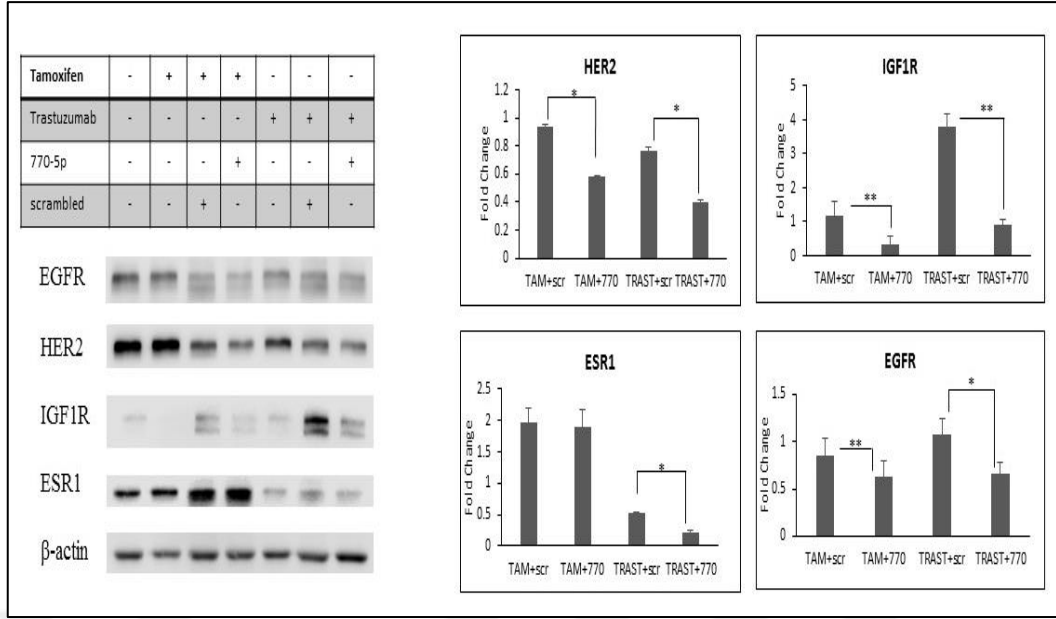
Yaptığımız miRNA-hedef gen analizlerinde miR-770-5p'nin tahmini hedefleri içerisinde HER2, *IGF1R* ve *EGFR* yer almaktadır. Tamoxifen ve trastuzumab varlığında miR-770-5p transfekte hücrelerde proliferasyonda gözlediğimiz sırasıyla yaklaşık % 60 ve % 40'lık azalmanın (Şekil 5.3.) bu reseptörler arasındaki karşılıklı etkileşimi azaltarak olabileceği fikri üzerine ilaç varlığında 770-5p transfekte hücrelerde reseptör düzeyleri protein seviyesinde incelenmiştir.



Tamoxifen varlığında BT-474 hücrelerinde ER/HER2 karşılıklı etkileşimi kaynaklı HER2 seviyesi arttığını göstermiş idik (Şekil 5.10.). Tamoxifen ile birlikte miR-770-5p transfekte hücrelerde sadece ilaç varlığında artan HER2 seviyesi scrambled kontrole kıyasla (scr) azalmaktadır. *ESR1* seviyesinde miR-770-5p transfekte hücrelerde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 5.11.). Dolayısı ile tamoxifen uygulaması sırasında hücrenin crosstalk mekanizması aracılığı ile HER2 reseptörünün ifadesini arttırdığı ve böylece hayatta kaldığı söylenebilir. Bu noktada miR-770-5p artan HER2 reseptörünü hedefleyerek bu reseptörün downregülasyonu ile tamoxifen etkinliğini arttırdığı düşünülmüştür.

Ayrıca miR-770-5p'nin ER/EGFR/IGF1R arasındaki karşılıklı etkileşim üzerine etkisi araştırılmış ve miR-770-5p transfekte hücrelerde sadece tamoxifen varlığında artan EGFR düzeyini ilaç ve miRNA varlığında azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca tamoxifen varlığında azalan IGF1R protein düzeyi miR-770-5p varlığında daha da azalmaktadır (Şekil 5.11.). **Bu bulgular tamoxifen varlığında miR-770-5p'nin büyüme reseptörlerini hedefleyerek hücrenin hayatta kalım mekanizmalarını regüle edebileceğini göstermektedir.**

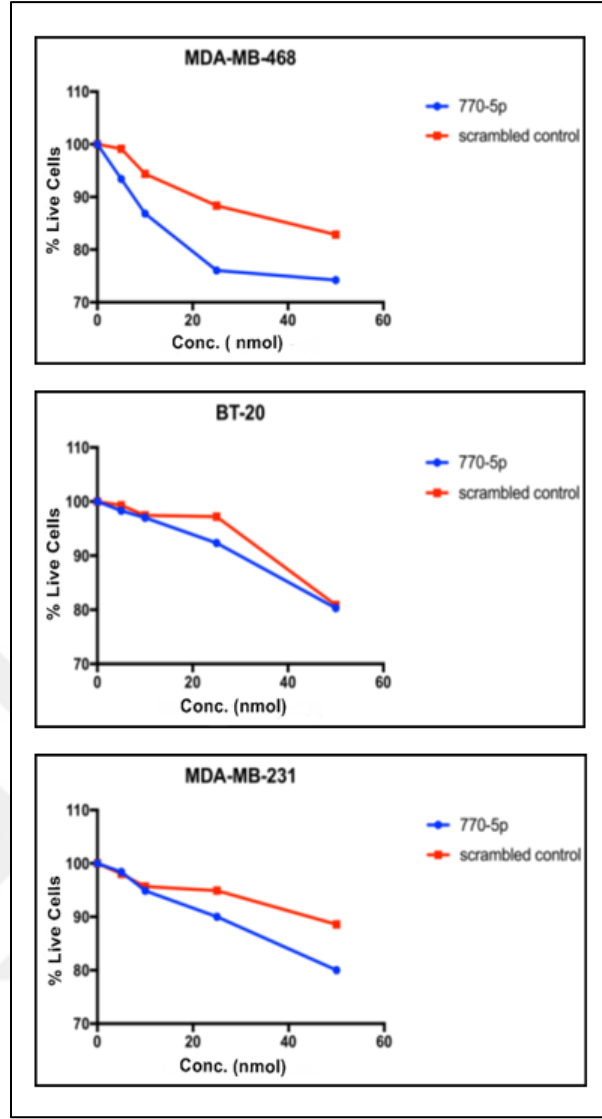
Şekil 5.10.'da gösterdiğimiz trastuzumab varlığında azalan HER2 seviyesi miR-770-5p transfekte hücrelerde daha da azalmaktadır. Bu bulgu miR-770-5p'nin ER/HER2 arasındaki karşılıklı etkileşimde rolü olabileceğini işaret etmektedir. Bu duruma paralel olarak trastuzumab varlığında *ESR1* seviyesi de miRNA transfekte hücrelerde azalmıştır (Şekil 5.11.). ER/EGFR/IGF1R karşılıklı etkileşiminde trastuzumab varlığında anlamlı şekilde artan IGF1R protein düzeyi trastuzumab ile birlikte miR-770-5p transfekte BT-474 hücrelerinde etkin şekilde azalmaktadır. Benzer şekilde ilaç ile birlikte miR-770-5p EGFR seviyesi scrambled kontrole kıyasla azaltılmaktadır (Şekil 5.11.). **Bu bulgular trastuzumab varlığında miR-770-5p'nin hücrenin sağ kalım mekanizması olabilecek IGF1R artışını kontrol ederek trastuzumabı potansiye edebildiğini göstermektedir.**



Şekil 5.11. Tamoxifen ya da trastuzumab ile birlikte miR-770-5p'nin BT-474 hücrelerinde ER, IGF1R, HER2 ve EGFR total protein düzeylerine etkisi (n=2, \*p<0.01; \*\*p<0.05).

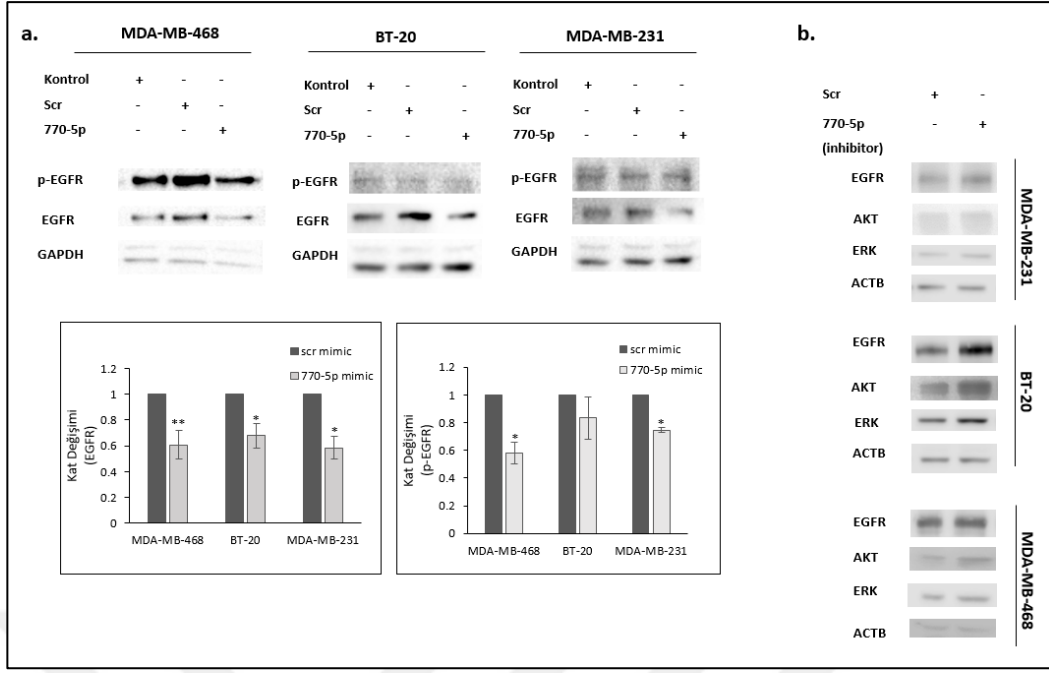
### 5.3. ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ (TNBC) HÜCRELERİNDE MİR-770-5P'NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON ÜZERİNDEKİ ROLÜ VE POTANSİYEL ETKİ MEKANİZMASI

miR-770-5p'nin ER+ ve HER2+ hücrelerde ilaç cevabına ortak yanıt olarak belirlendiği ve EGFR/HER2/IGFR karşılıklı etkileşiminde aktif rolü olduğu düşünüldüğünde bu miRNA'nın üçlü-negatif (TNBC) hücrelerinde antikanser etkinlik gösterebileceği düşünülmüştür. Bu etkiyi araştırmak üzere yapılan WST1 deneyleri sonucunda mir-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde proliferasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 5.12.). Bu hücrelerde miR-770-5p tek başına hücre proliferasyonunu yaklaşık % 20 oranında azaltmaktadır.



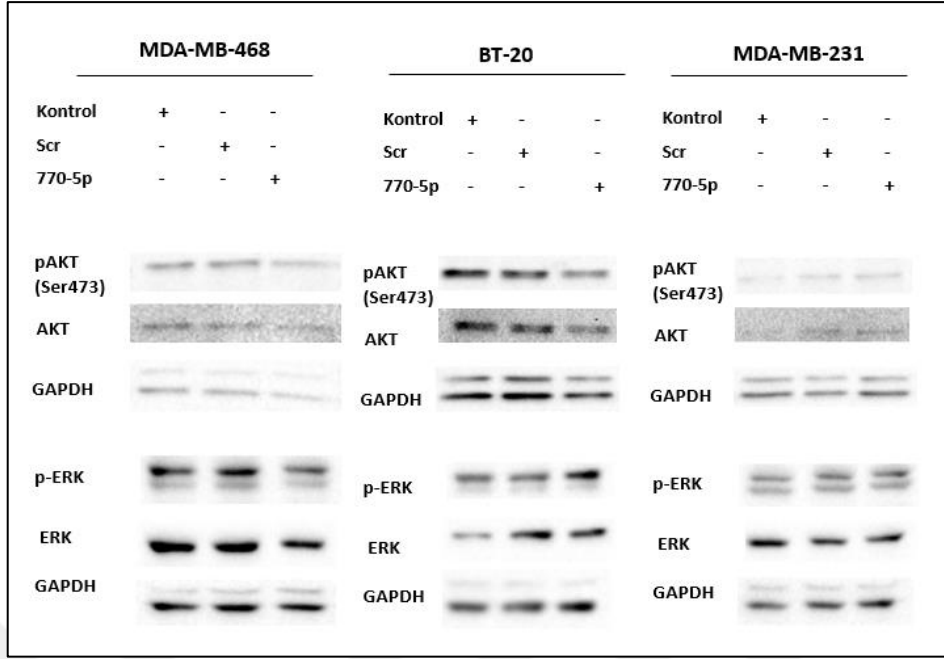
Şekil 5.12. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde proliferasyon eğrileri.

Reseptör pozitif hücrelerde miR-770-5p'nin ErbB sinyal iletimi üzerinde fonksiyonu olduğu bilgisi ile TNBC hücrelerinde ErbB ailesi üyesi olan EGFR total ve fosforile formu ile aşağı akış sinyalindeki ERK, p-ERK, AKT ve p-AKT protein düzeyleri incelenmiştir. miR-770-5p mimic transfekte MDA-MB-468, BT-20 ve MDA-MB-231 hücrelerinde EGFR ve p-EGFR protein düzeyi azalırken; miR-770-5p inhibitor ile transfekte TNBC hücrelerinde EGFR düzeyi artmıştır (Şekil 5.13.).



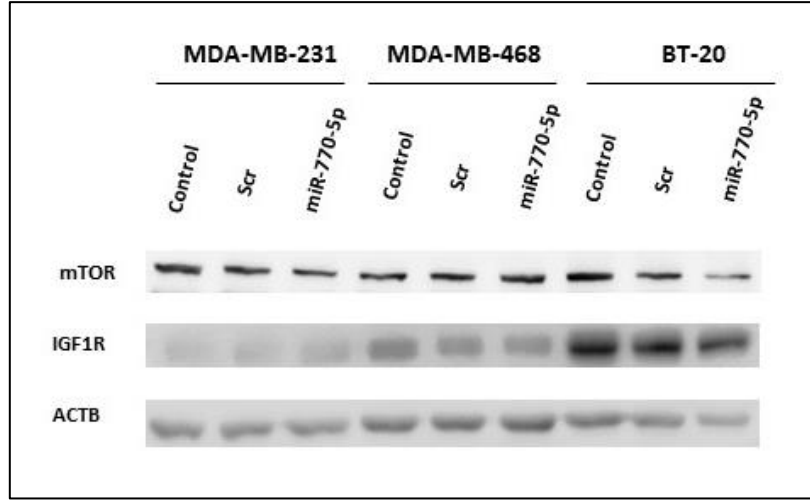
Şekil 5.13. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde EGFR sinyal sistemi. a. miR-770-5p mimic transfekte üç TNBC hücresinde EGFR ve p-EGFR protein düzeyleri incelenmiş ve miR-770-5p varlığında hem total EGFR hem de p-EGFR ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. b. miR-770-5p inhibitör ile transfekte hücrelerdeki EGFR, AKT ve ERK protein seviyelerini göstermektedir (n=3, \*p<0.05, \*\* p<0.01).

miR-770-5p transfekte üç TNBC hücre hattında EGFR sinyal iletim sisteminin iki temel düzenleyicisi olan AKT ve ERK protein düzeyleri incelenmiştir. EGFR aşağı akış sinyalinde yer alan ERK ve AKT ile p-ERK ve p-AKT protein düzeyleri de miR-770-5p transfekte hücrelerde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.14.). Ek olarak miR-770-5p inhibitor ile transfekte hücrelerde EGFR, AKT ve ERK protein seviyeleri ya değişmemiş ya da artmıştır (Şekil 5.13.).



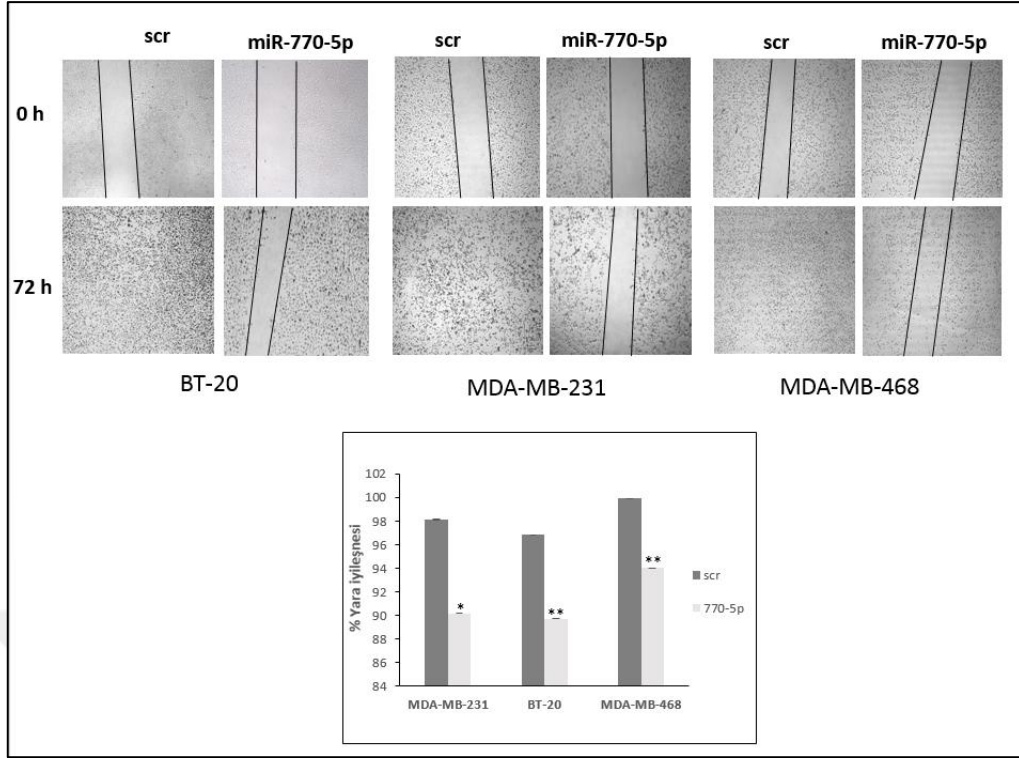
Şekil 5.14. miR-770-5p transfekte üç TNBC hücre hattında EGFR sinyal iletim sisteminin iki temel düzenleyicisi olan AKT ve ERK protein düzeyleri.

Çizelge 5.1.'de miR-770-5p'nin potansiyel hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizinde listelenen iletim sistemleri arasında İnsülin yolağı dikkat çekmektedir. miR-770-5p'nin antiproliferatif etkisini gösterebileceği yollardan bir diğerinin de insülin yolağı ve aşağı akış sinyalinde yer alan mTOR olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla TNBC hücrelerinde ifade edilen ve miR-770-5p potansiyel hedefleri arasında bulunan IGF1R ve mTOR düzeyleri üç TNBC hücre hattında da incelenmiştir. MDA-MB-468 ve BT-20 hücrelerinde miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde scrambled kontrol (scr)'e kıyasla total IGF1R ve total mTOR protein düzeyinde azalma görülmüştür (Şekil 5.15.).



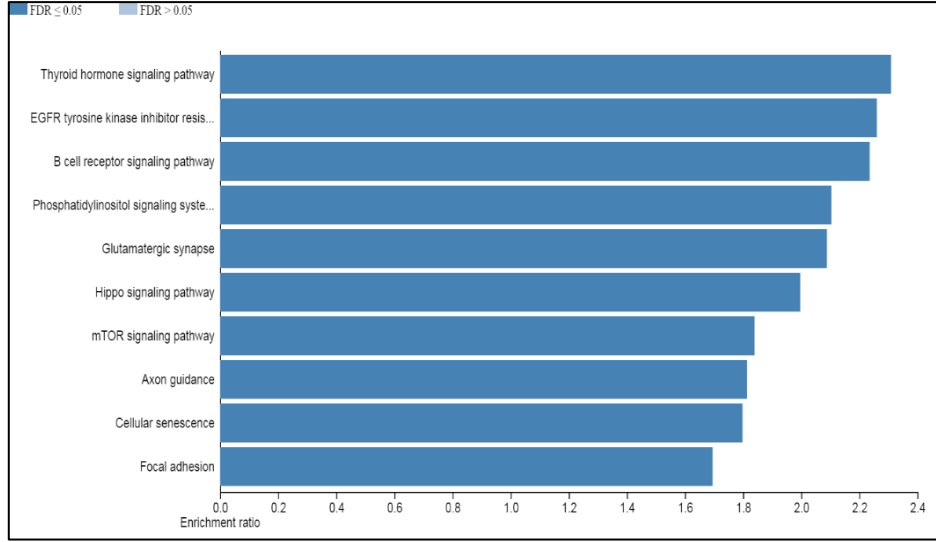
Şekil 5.15. miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde total mTOR ve total IGF1R düzeyleri.

Bu mikroRNA'nın diğer bir kanser özelliği olan motilite üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla WHA deneyleri gerçekleştirilmiştir. miR-770-5p transfeksiyonu sonucunda her üç TNBC hücresinde de oluşturulan yara iyileşmez iken kontrol ve scrambled kontrol örneklerinde oluşturulan yara kapanmıştır. Bu durum reseptör pozitif ve üçlü negatif olarak seçilen hücrelerin tamamında gözlenmiştir (Şekil 5.16.) (Şekil 5.5.). Elde ettiğimiz bu veriler miR-770-5p'nin TNBC hücrelerinde invazyon üzerinde etkili olabileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır.



Şekil 5.16. TNBC hücrelerinde miR-770-5p'nin motilite üzerine etkisi. miR-770-5p mimic transfeksiyonu ardından her 24 saat sonunda hücrelerin görüntüleri alınmış ve boş alan hesaplamaları *Tscracth* programı ile yapılmış ve grafikleştirilmiştir (n=2, \*p<0.005).

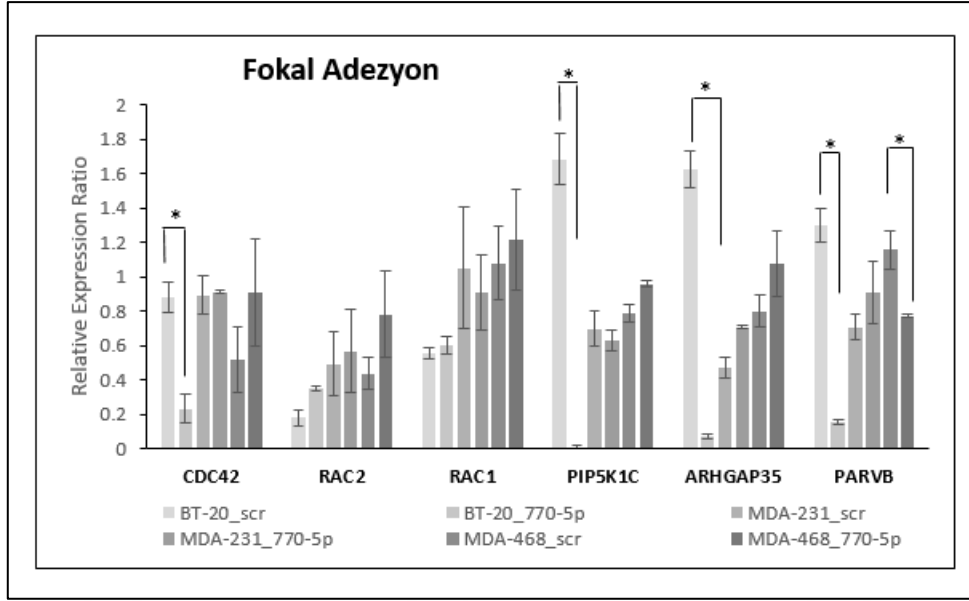
miR-770-5p tahmini hedef genleri ile zenginleştirme analizleri yapılmış ve motilite / invazyonda önemli rolleri olduğu bilinen sinyal iletim sistemleri listelenmiştir (Çizelge 5.1.). Webgestalt programı yardımıyla miR-770-5p tahmini hedef genleri ile yapılan KEGG yolları FDR değerine göre grafikleştirilmiştir (Şekil 5.17.).



Şekil 5.17. miR-770-5p'nin potansiyel hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi grafiği.

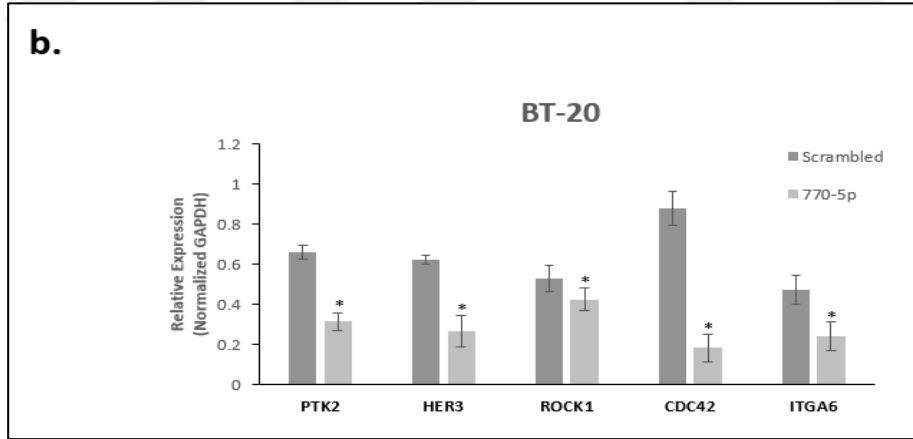
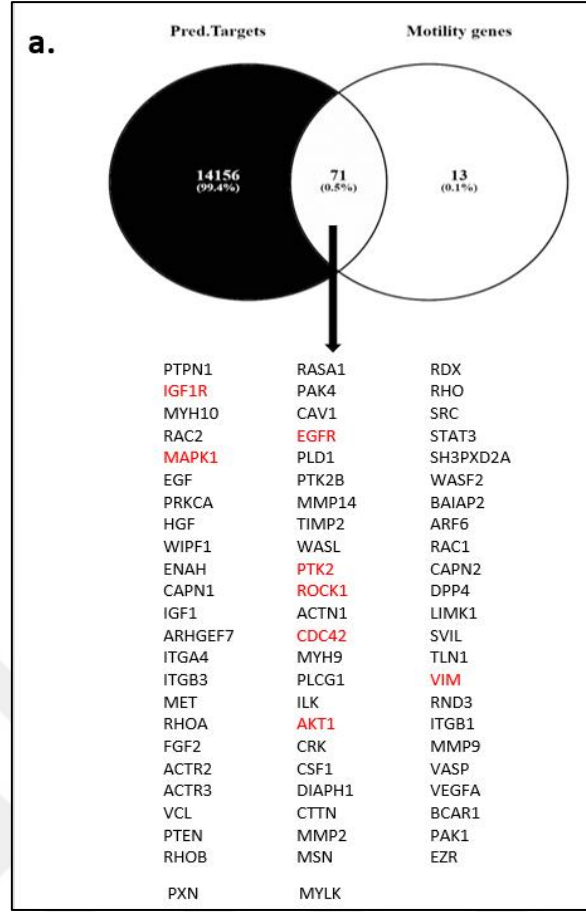
Yapılan zenginleştirme analizleri içerisinde Fokal Adezyon sinyali dikkatimizi çekmiş ve miR-770-5p mimic transfekte TNBC hücrelerinden elde edilen RNA örnekleri ile bu yolak içerisinde yer alan ve miR-770-5p'nin potansiyel hedefi olan *CDC42*, *RAC1*, *RAC2*, *PIP5K1C*, *ARHGAP35* ve *PARVB* genleri ile eş zamanlı RT-PZR yapılmıştır. *CDC42*, *PIP5K1C* ve *ARHGAP35* genlerinin BT-20 hücrelerinde miR-770-5p varlığında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. *PARVB* için miR-770-5p mimic transfekte BT-20 ve MDA-MB-468 hücrelerinde azalma gözlenmiştir. *RAC1* ve *RAC2* genleri için anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir (Şekil 5.18.).





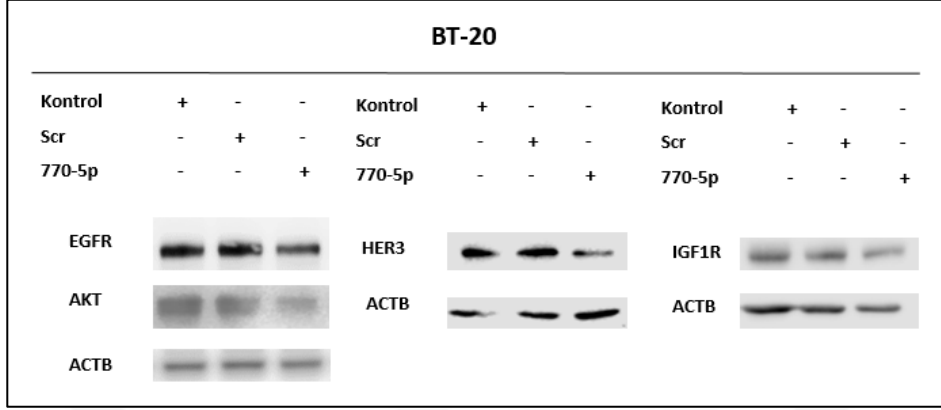
Şekil 5.18. Fokal Adezyon yolağında yer alan genler ile yapılan eş zamanlı qRT-PZR analiz sonuçları. TNBC hücrelerinde scr ve 770-5p transfeksiyonu ardından elde edilen RNA örnekleri ile CDC42, PIP5K1C, ARHGAP35 ve PARVB genleri için eş zamanlı qRT-PZR sonucunda 770-5p transfekte BT-20 hücrelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür (n=2, \*p<0.001).

Ek olarak motilite ile ilişkili genler *NCBI* (188,189) veritabanı kullanılarak listelenmiş ardından miR-770-5p potansiyel hedef genleri ile kesiştirilmiş ve 71 gen ortak olarak saptanmıştır (Şekil 5.19.). Belirlenen 71 ortak gen içerisinde fokal adezyon ile ilişkili olduğu bilinen *PTK2*, *HER3*, *ROCK1*, *CDC42* ve *ITGA6* genleri için BT-20 hücrelerinde eş zamanlı RT-PZR analizi yapılmıştır. Fokal adezyon genleri ile gerçekleştirilen PZR analizlerinde en fazla etki BT-20 hücrelerinde gözlenmiştir. Bu sebeple motilite alakalı gen ve protein analizlerine BT-20 hücreleri ile devam edilmiştir. Motilite alakalı genlerin miR-770-5p transfekte BT-20 hücrelerinde anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.19.).



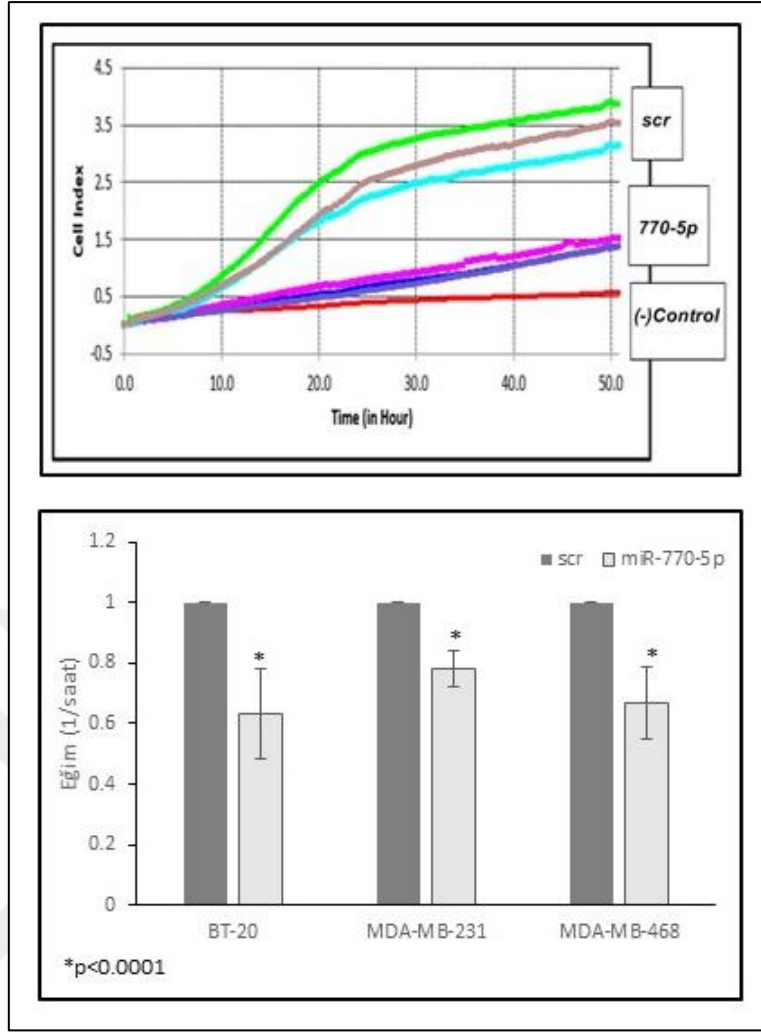
Şekil 5.19. miR-770-5p tahmini hedef genleri ve motilite ilişkisi. **a.**Tahmini hedef genler ile motilitede yer aldığı bilinen genler kesiştirilmiş ve 71 gen ortak olarak bulunmuştur. **b.** BT-20 hücrelerinde 71 gen içerisinde focal adezyon ile ilişkili genlerin real time qRT-PZR analiz sonuçları yer almaktadır (n=2, p<0.002).

BT-20 hücrelerinde mRNA düzeyinde görülen bu azalma EGFR, HER3, IGF1R reseptör proteinleri ve bu reseptörlerin altında yer alan AKT ve ERK protein düzeylerinde de görülmüştür (Şekil 5.20.).



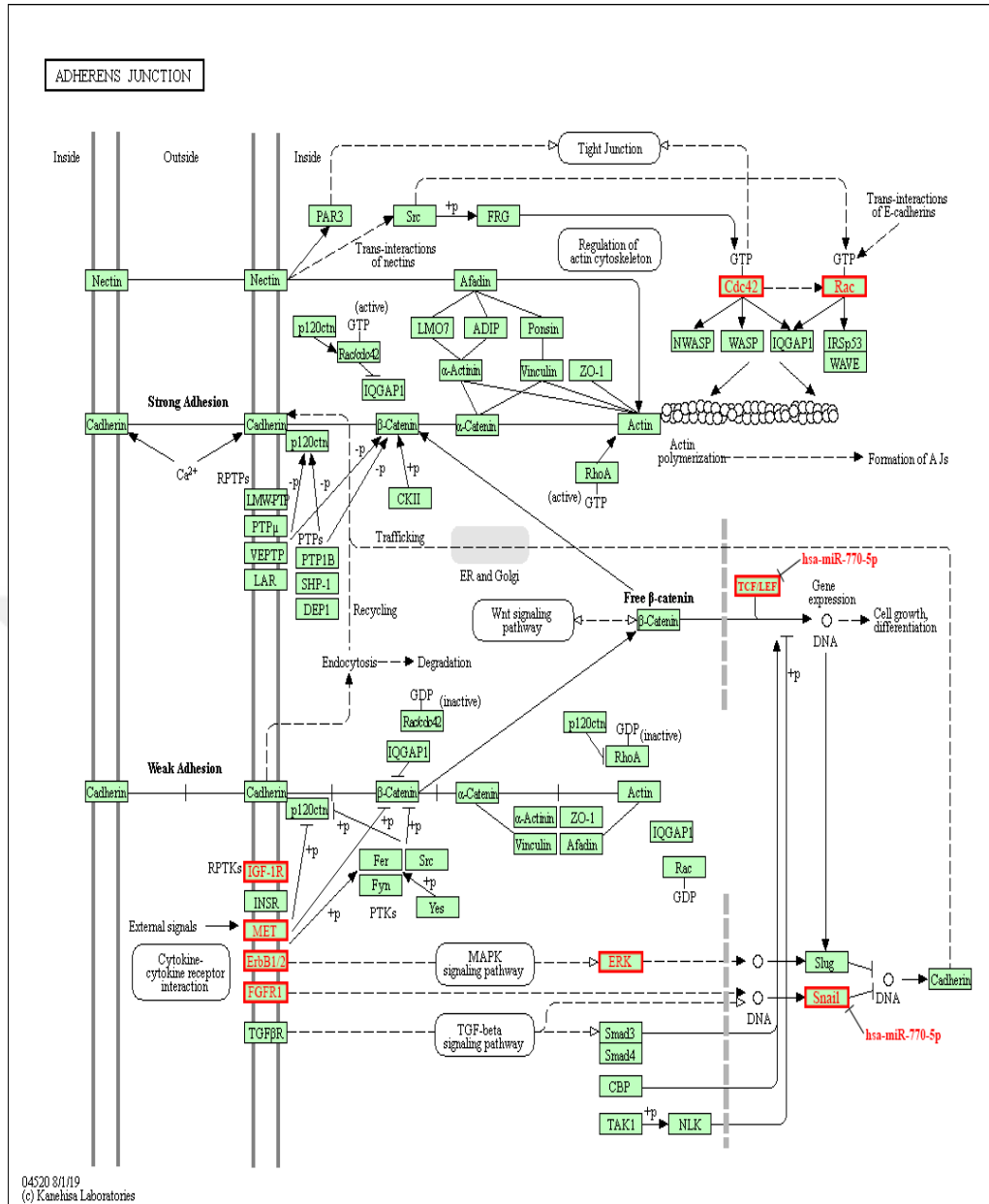
Şekil 5.20. miR-770-5p transfekte BT-20 hücrelerinde EGFR, HER3, IGF1R, AKT ve ERK protein düzeyindeki azalma gösterilmiştir (n=2, p<0.05).

Reseptör pozitif hücelere kıyasla motilite ve invazyon kapasitesi daha güçlü olan MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve BT-20 hücrelerinde miR-770-5p mimic transfeksiyonu yapılmış ve miR-770-5p ile transfekte hücrelerin scrambled kontrole kıyasla invazyon kapasitelerinin anlamlı şekilde azaldığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (Şekil 5.21.).



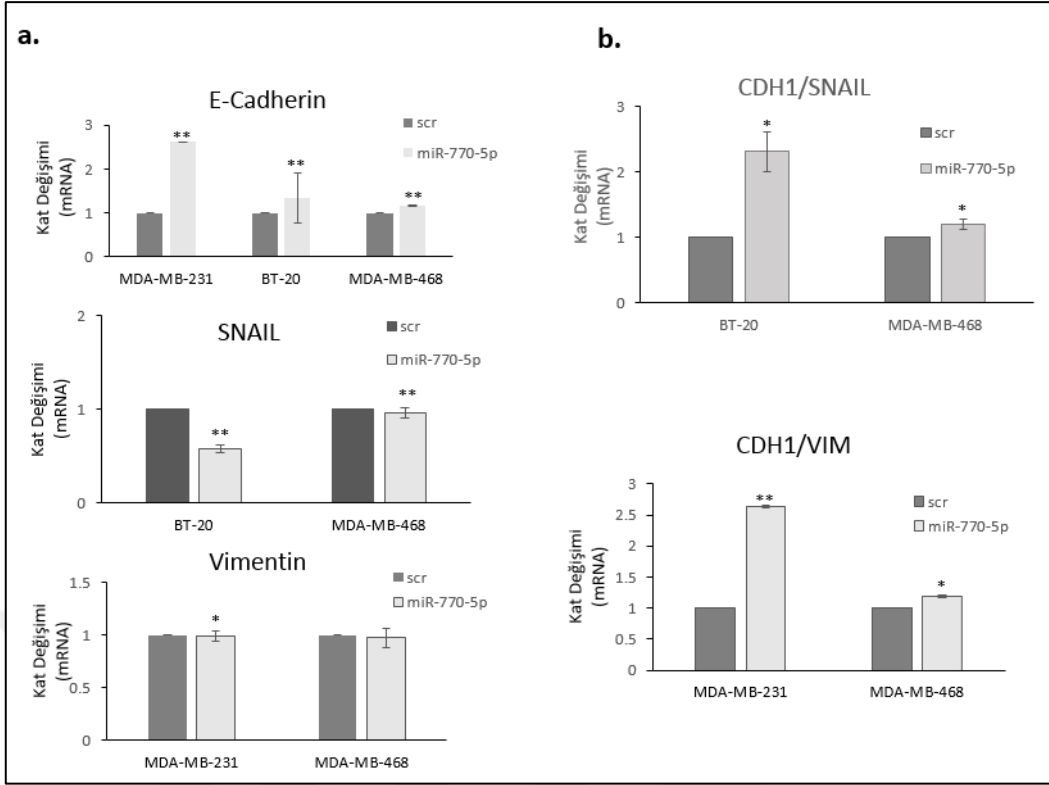
Şekil 5.21. miR-770-5p'nin TNBC hücre hatlarında invazyon üzerine etkisi. Üç hücre hattında da 72 saat sonunda miR-770-5p transfekte hücrelerde scrambled kontrole kıyasla hücrenin invazyon yeteneğinin azaldığı görülmüştür (n=2, \*p<0.001).

Zenginleştirme analizi sonucunda elde edilen listeler içerisinde *Adherens Junction* varlığı dikkatimizi çekmiş bu yolaktaki SNAIL, E-Cadherin, TCF3 genleri miR-770-5p'nin hedeflediği adaylar olarak belirlenmiştir (Şekil 5.22.).



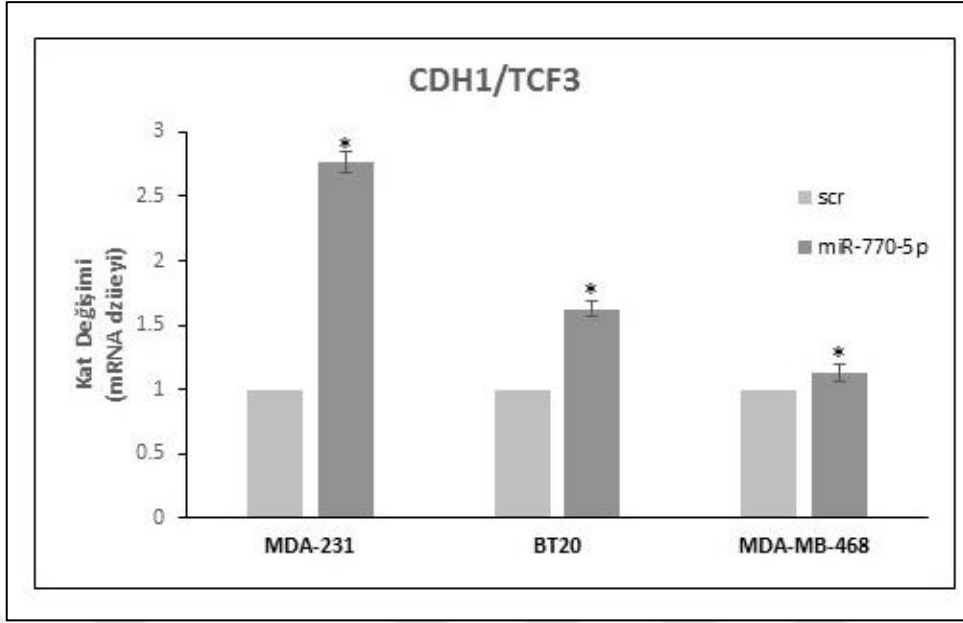
Şekil 5.22. Adherens Junction yolağı. Zenginleştirme analizi sonucu ortaya çıkan ve 770-5p tahmini hedef genleri içerisinde yer alan *SNAIL*, *TCF*, *cdc42*, *Rac*, *ErbB1/2*, *IGF1R*, *ERK* genlerinin varlığını gösteren KEGG figürü.

TNBC hücrelerinde miR-770-5p ifadesi geçici olarak artırılmış ve öncelikle EMT belirteçlerinden olan E-Cadherin, Vimentin ve SNAIL düzeyleri mRNA seviyesinde eş zamanlı RT-PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. miR-770-5p'nin tahmini hedefleri içerisinde vimentin ve SNAIL olması artan miRNA'nın bu mezenkimal genleri baskılayarak E-Cadherin ifadesinin artmasına neden olabileceği düşündürmüştü ve mRNA düzeyinde *CDH1/VIM* ya da *CDH1/SNAIL* oranlarının miR-770-5p transfekte hücrelerde scrambled kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.23.).



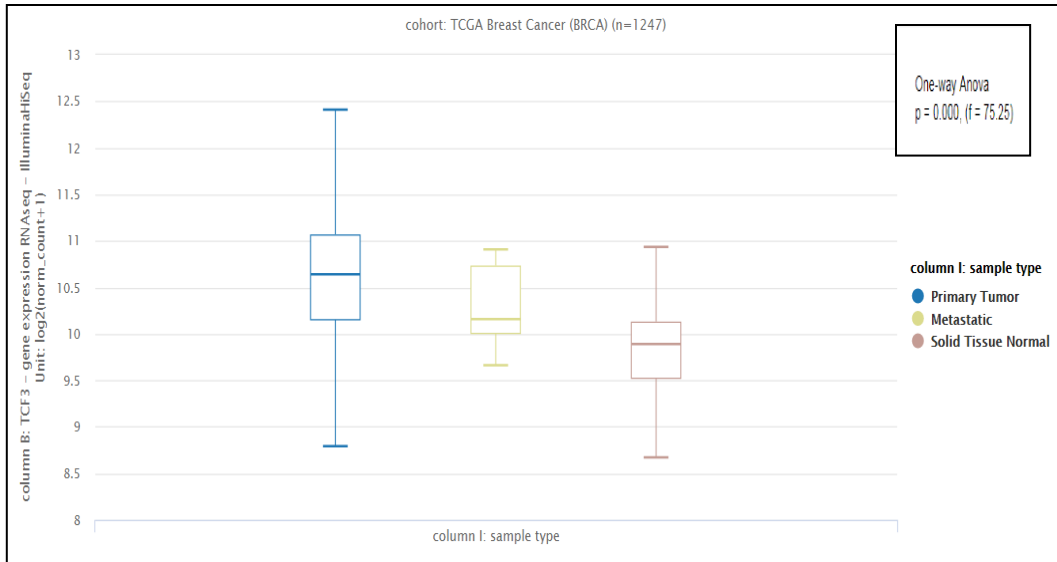
Şekil 5.23. TNBC hücrelerinde EMT belirteçlerinin mRNA düzeyinde ifadeleri. **a.** E-Cadherin, SNAIL ve Vimentin üç farklı TNBC hücre hattında incelenmiştir. **b.** E-Cadherin/SNAIL ve E-Cadherin/VIM oranları gösterilmiştir (n=2, \*p<0.01, \*\*p<0.05).

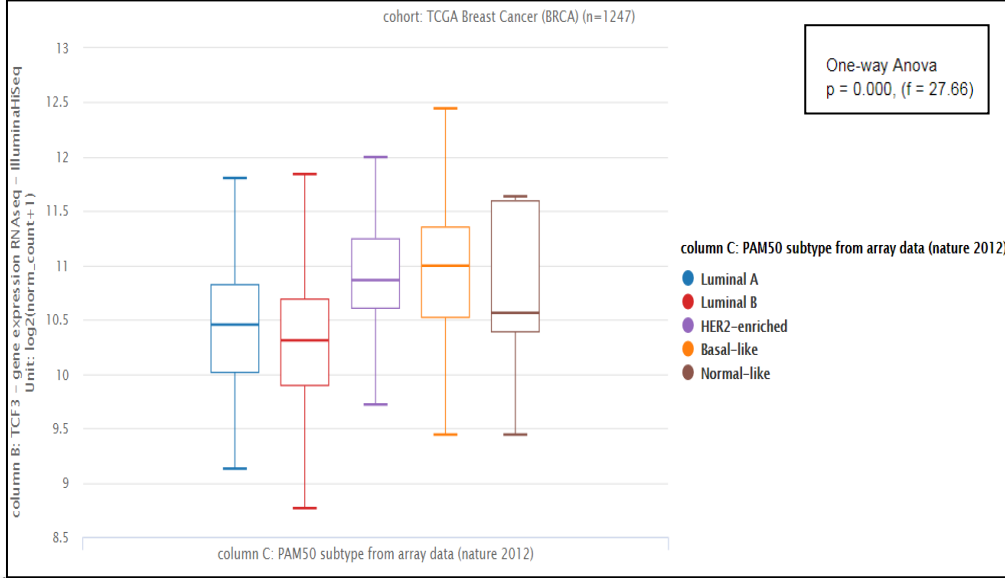
Ayrıca miR-770-5p tahmini hedef genleri arasında *CDH1* baskılayıcısı olarak bilinen *TCF3* geni varlığı dikkatimizi çekmiştir. *CDH1* seviyesindeki artışın diğer bir sebebinin *TCF3* olabileceği düşünülmüş ve üç hücre hattında da eş zamanlı RT-PZR ile *TCF3* seviyeleri incelenmiştir. miR-770-5p mimic transfekte TNBC hücrelerinde *TCF3* ifadesinin azaldığı ve *CDH1/TCF3* oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.24.).



Şekil 5.24. miR-770-5p varlığında CDH1/TCF3 ilişkisi. TNBC hücre hatlarında miR-770-5p transfekte hücrelerde scrambled kontrole (scr) kıyasla CDH1/TCF3 oranı mRNA düzeyinde anlamlı olarak artmıştır (n=2,\*p<0.05).

Ek olarak TCGA BRCA veriseti kullanılarak *TCF3* geninin tümör dokusunda ve özellikle meme kanseri tümör alt tiplerinde ifadesi incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda *TCF3* geninin tümörde normale kıyasla arttığı ve özellikle bu artışın Basal-like alt tipinde en yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.25.).

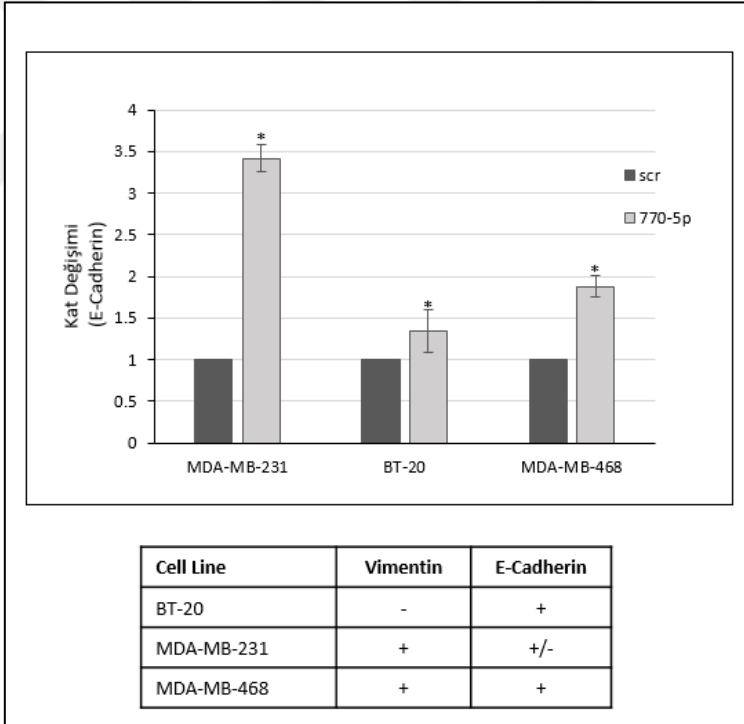
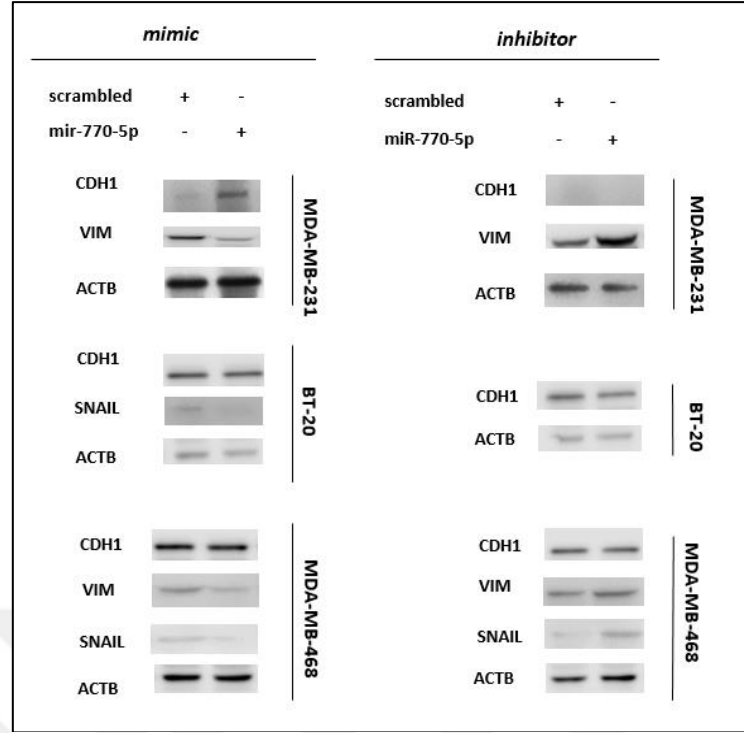




Şekil 5.25. TCF3 ifade düzeyinin meme kanserinde tümör normal arasındaki ve meme kanseri alt tipleri arasındaki durumu. TCGA meme kanseri verisi kullanılarak TCF3'nin tümör dokusundaki ifadesi araştırılmıştır. Normale kıyasla tümörde arttığı özellikle basal-like tümör dokusunda arttığı belirlenmiştir.

EMT belirteçleri olarak seçilen E-Cadherin, Vimentin ve SNAIL için mRNA düzeyinde görülen bu değişimlerin protein düzeyinde de araştırılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla üç hücre hattında da miR-770-5p ifadesi mimic yardımıyla geçici olarak artırılmış ya da inhibitör kullanılarak azaltılmıştır. Hücre profillerindeki farklılıktan dolayı üç protein de incelenmiş ve mezenkimal belirteç olarak hücredeki ifadesine göre vimentin ya da SNAIL seçilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde E-Cadherin protein seviyesinin çok düşük olduğu literatürde bildirilmiştir. Bu hücrelerde miR-770-5p mimic transfeksiyonu sonucunda Vimentin azalırken E-Cadherin ifadesinin arttığı western blot sonucunda gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde miR-770-5p inhibitör transfeksiyonu sonucu vimentin artarken E-Cadherin protein ifadesi gözlenmemiştir (Şekil 5.26.). BT-20 ve MDA-MB-468 hücrelerinde ise SNAIL ve E-cadherin protein düzeyleri incelenmiştir. Benzer bir şekilde mimic transfeksiyonu ile mezenkimal belirteç olduğu bilinen SNAIL protein ifadesi azalırken E-Cadherin ifadesi artmaktadır (Şekil 5.26.). Ayrıca MDA-MB-468 hücrelerinde miR-770-5p inhibitör transfeksiyonu sonrasında kontrole kıyasla SNAIL ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 5.26.). Tüm bu protein verileri ile üç hücre hattında da E-Cadherin protein düzeyleri belirlenmiştir. mRNA verileri ile korele olarak protein verisinde de E-Cadherin / Vimentin oranının miR-770-5p mimic transfeksiyonu yapılan hücrelerde arttığı gösterilmiştir (Şekil 5.26.).

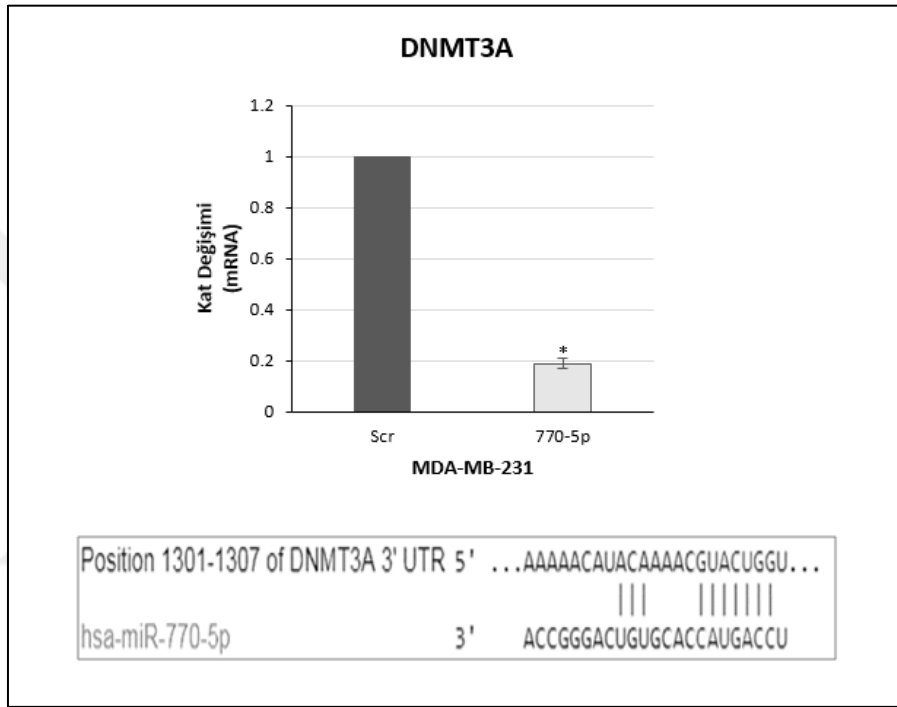




Şekil 5.26. Üç farklı TNBC hücre hattında E-Cadherin ve Vimentin ifadeleri. TNBC hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Vimentin ve E-Cadherin ifadeleri incelenmiş ve miR-770-5p ifadesinin artırıldığı hücrelerde vimentin ifadesinin azaldığı E-Cadherin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (n=3, p<0.05).

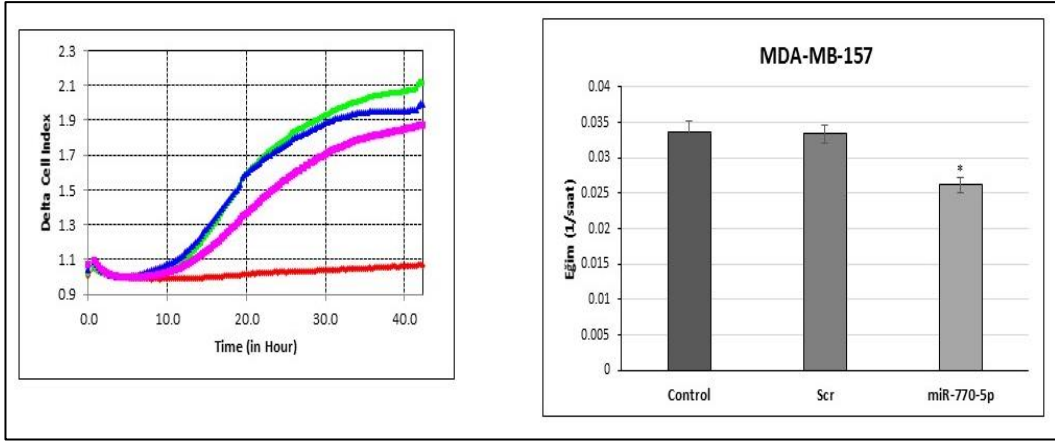
MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinde CDH1 promoter hipermetilasyonu varlığı literatürde bildirilmiştir (190). miR-770-5p'nin potansiyel hedefleri içerisinde *DNMT1*,

*DNMT3A* ve *DNMT3B* genleri yer almaktadır. miR-770-5p bu üç DNA metiltransferaz içerisinde sadece *DNMT3A*'nın 3'-UTR dizisine bağlanmaktadır; *DNMT1* ve *DNMT3B* genlerinin kodlanan bölgeleri içerisinde bağlanma bölgesi saptanmıştır. Ek olarak; MDA-MB-231 hücrelerinde *DNMT3A* ifadesi mRNA düzeyinde araştırılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde miR-770-5p varlığında *DNMT3A* ifadesi scrambled kontrole kıyasla azalmıştır (Şekil 5.27.). miR-770-5p'nin *DNMT3A*'nın 3'-UTR bölgesine bağlanma bölgesi *TargetScan* (131,183) yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 5.27.).



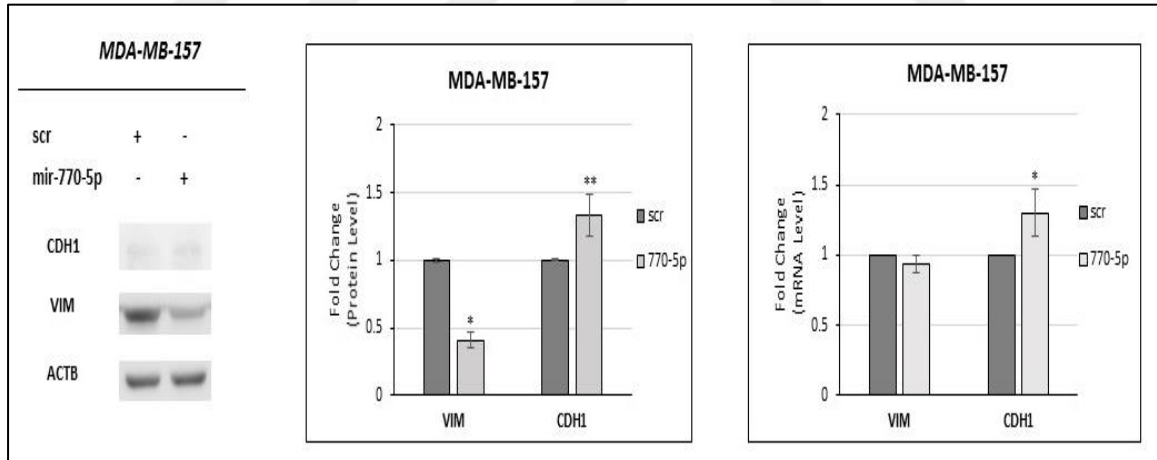
Şekil 5.27. miR-770-5p ve *DNMT3A* ilişkisi. MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan qRT-PZR deneyi sonucunda *DNMT3A* ifadesinin scr'ye kıyasla miR-770-5p transfekte hücrelerde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (n=2, \*p<0.001).

MDA-MB-231 hücrelerinde miR-770-5p varlığında mRNA ve protein düzeyinde *CDH1* seviyesinde artış gözlenmiş ve bu durum MDA-MB-231 hücreleri ile benzer özellikler taşıyan MDA-MB-157 hücrelerinde incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle MDA-MB-157 hücrelerine miR-770-5p transfekte edilmiş ve *xCELLigence real-time cell analyzer* ile invazyon deneyleri yapılmış ve miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde scrambled kontrole (scr) kıyasla invazyon kapasitesinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 5.28.).



Şekil 5.28. MDA-MB-157 hücrelerinde miR-770-5p'nin invazyon üzerine etkisi. miR-770-5p mimic transfeksiyonu ardından MDA-MB-157 hücreleri CIM plate (ACEA) ekilmiş ve xCELLigence real-time cell analyzer cihazı yardımıyla hücrelerin invazyon kapasiteleri incelenmiş ve grafiklendirilmiştir. miR-770-5p'nin hücrenin invazyon kapasitesini azalttığı belirlenmiştir (n=2, \*p<0.0001).

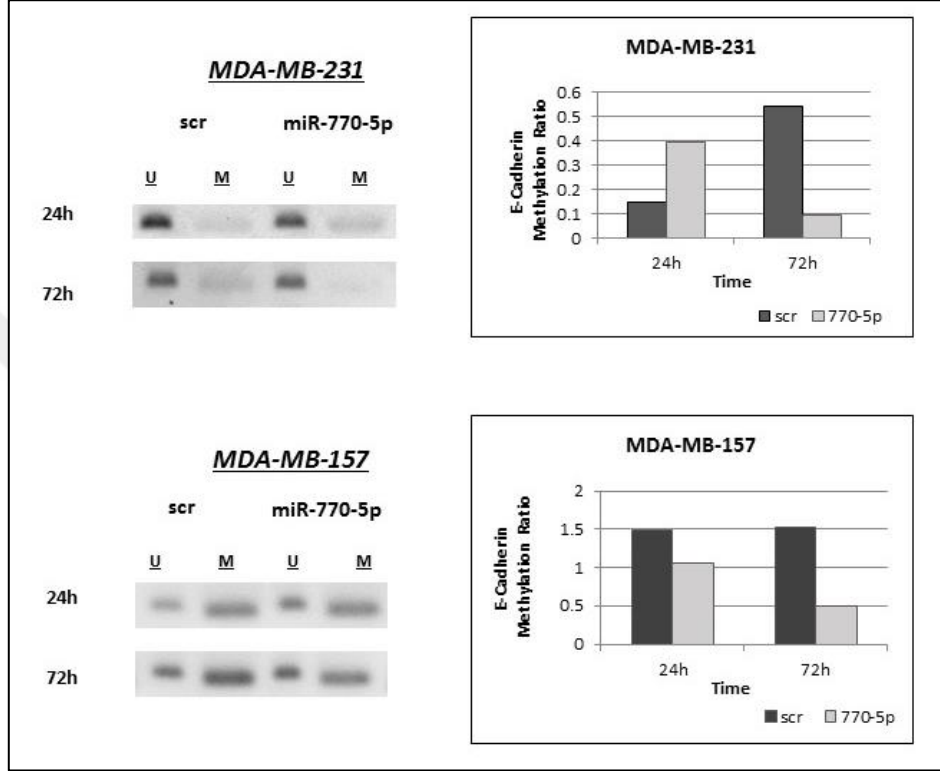
Ayrıca CDH1 ve VIM genleri protein düzeyinde incelenmiş ve MDA-MB-231 hücrelerinde görülen CDH1 seviyesinde artış ve VIM seviyesinde azalma MDA-MB-157 hücrelerinde de gözlenmiştir. Benzer durum mRNA düzeyinde de gösterilmiştir (Şekil 5.29.).



Şekil 5.29. CDH1 ve VIM seviyelerinin miR-770-5p mimic transfekte MDA-MB-157 hücrelerinde incelenmesi. Bu hücrelerde miR-770-5p varlığında Vimentin (VIM) seviyesi azalırken CDH1 seviyesi artmaktadır ve bu durum hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterilmiştir (n=2, \*p<0.05, \*\*p<0.01).

MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinde görülen CDH1 seviyesindeki bu artışın CDH1 promotor metilasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. *CDH1* metilasyon profilini incelemek için miR-770-5p ya da scrambled kontrol (scr) transfekte MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinden 24 saat ve 72 saat sonunda elde edilen pelletlerden

DNA izolasyonu yapılmış ve bisülfid uygulaması yapılmıştır. Metilasyon spesifik primerler ile yapılan PZR sonucunda *CDH1* metilasyon profili araştırılmıştır. Scr transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde 24 ve 72 saatler kıyaslandığında *CDH1* metilasyonu artarken miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde azalmaktadır. miR-770-5p varlığında *CDH1* metilasyonundaki azalma MDA-MB-157 hücrelerinde de gözlenmiştir (Şekil 5.30.).



Şekil 5.30. miR-770-5p varlığında *CDH1* metilasyonu. miR-770-5p mimic transfekte MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinde *CDH1* metilasyonu scrambled kontrole kıyasla azalmaktadır. (U: metile olmayan primerler ile yapılan PZR sonucunu; M: metile primerler ile yapılan PZR sonucunu temsil etmektedir).

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

#### 6.1.1. RESEPTÖR POZİTİF HÜCRELERDE MİR-770-5P'NİN İLAÇ İLE BİRLİKTE PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

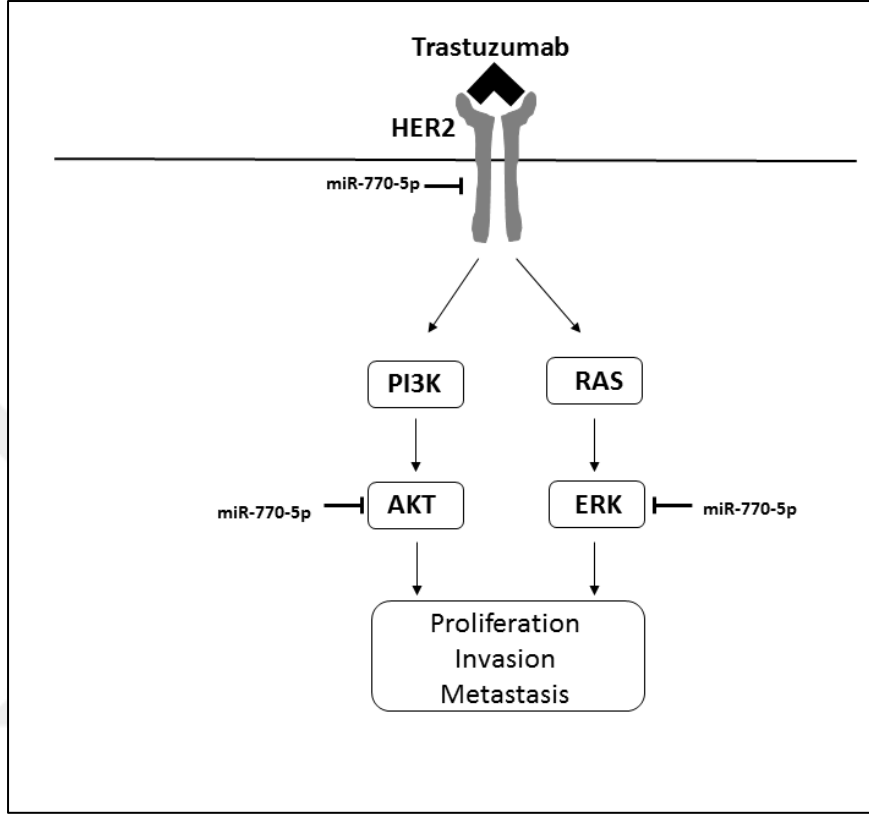
Bu çalışmada ER, PR ve HER2 pozitif hücrelerde reseptör bağımsız ve ilaç bağımsız ortak olarak ifade artışı gözlenen mikroRNA miR-770-5p olarak belirlenmiştir. miR-770-5p gastric cardia adenocarcinoma (191), over kanseri (192), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (193) ve hepatocellular carcinoma (194) gibi pek çok kanser ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak miR-770-5p 'nin meme kanseri regülasyonunda yer aldığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada kemoterapi dirençli üçlü negative meme kanseri (TNBC) doku örneklerinde miR-770-5p'nin down-regüle olduğu ve artan miRNA ifadesinin *STMN1* genini hedefleyerek metastazı ve gelişen direnci tersine çevirdiği gösterilmiştir (195). Kemoterapiye karşı gelişen dirençte rol alan bir miRNA olarak tanımlansa da miR-770-5p'nin ER pozitif ve HER2 pozitif hücrelerde tamoxifen ya da trastuzumab ile ilişkisi daha önce tanımlanmamıştır. Çalışmamızda yapılan TGCA veri analizi ile bu mikroRNA'nın tümör dokularında kontrole kıyasla ifadesinin azalış göstermesi bu miRNA'nın fonksiyonel ağının araştırılması için önemli olabileceğini düşündürmüştür. miR-770-5p'nin potansiyel hedef genleri ile yapılan zenginleştirme analizleri sonucunda ErbB, MAPK ve Fokal Adezyon sinyal sistemleri gibi motilite ve invazyonda rol olan iletim sistemlerinin varlığı dikkatimizi çekmiştir. Ayrıca bu çalışmada biyoinformatik analizlere paralel olarak miR-770-5p ifadesini artırdığımız HER2+ hücrelerde motilite ve invazyon kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir. Motilite ve invazyonda gözlenen bu azalmanın miR-770-5p'nin hedefleri içerisinde yer alan ve MAPK sinyal iletim sisteminde rol oynayan ERK down regülasyonu ile olabileceği düşünülmüştür.

miR-770-5p'nin potansiyel aday genleri içerisinde *ErbB2* (HER2)'nin varlığı ve yapılan zenginleştirme analizi sonucunda ErbB sinyal iletim sisteminin yer alması üzerine bu sinyal iletim sistemine odaklanılmış ve öncelikle miR-770-5p mimic transfekte BT-474 hücrelerinde HER2 proteininin azaldığı gösterilmiştir. Ardından bu yolakta yer alan ve

HER2 reseptörü altında rol oynayan PI3K ve MAPK iletim sistemlerinde iki temel protein olan AKT ve ERK protein ifade düzeyleri incelenmiştir. Total ERK seviyesi her iki hücre hattında da azalırken AKT seviyesinin sadece SK-BR-3 hücrelerinde azaldığı gözlenmiştir. Bu durum hücrelerdeki değişen mutasyon profili ve iki hücre hattının farklı reseptör durumları ile açıklanabilir. *PIK3CA* geni c.333G>C (p.K111N) mutasyonu BT-474 hücrelerinde tanımlanmıştır (196) ve bu durum miR-770-5p mimic transfekte BT-474 hücrelerindeki AKT protein düzeyinde değişim gözlenmemesini açıklayabilir. Ek olarak HER2 ve diğer büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşim (*crossstalk*) varlığı bu durumun bir sebebi olabilir. Yapılan bir araştırmada BT-474 hücreleri gibi yüksek ER ifade gösteren HER2 pozitif meme kanseri hücreleri SK-BR-3 gibi ER negatif ve HER2 pozitif hücrelere kıyasla trastuzumab tedavisine daha düşük yanıt gösterdiği bildirilmiştir (197). Çalışmamızda trastuzumab varlığında miR-770-5p transfekte hücrelerde total ve fosforile AKT ve ERK protein seviyelerinde scrambled kontrole göre azalma gözlenmiştir. Bu durum PI3K-AKT ve MAPK sinyalleri arasındaki karşılıklı etkileşim varlığı ile açıklanabilir. Bulgularımız trastuzumab varlığında miR-770-5p'nin bu karşılıklı etkileşimi bloklayarak ilacın antiproliferatif etkisini güçlendirebileceğini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda yer alan eş zamanlı RT-PZR array verisi miR-770-5p'nin terapötik cevap olabileceğini ve ileri çalışmalarımız bu miRNA'nın kombine terapide etkin olabileceğini göstermiştir. Literatürde yer alan pek çok klinik öncesi çalışmada kemoterapi ile birlikte miRNA tabanlı tedavi seçenekleri araştırılmıştır. Baldassarri ve arkadaşları *in vitro* koşullarda miR-9, miR-126, miR-181a ve miR-326'nın spesifik meme kanseri ilaçlarının etkisini güçlendirdiğini raporlamışlardır (198). Diğer bir çalışmada hücrede miR-375 ifade artışının tamoksifen duyarlılığına neden olduğu gösterilmiş ve bu miRNA'nın meme kanserinde gelişen tamoksifen direncine karşı potansiyel hedef olabileceği bildirilmiştir (199). Ayrıca miR-218'nin *BRCA1* genini hedefleyerek hücreleri cisplatin'e karşı duyarlı hale getirdiği (200) ve miR-542-3p ifadesinin azaltılmasının PI3K-AKT regülasyonu aracılığıyla meme kanseri hücrelerinde trastuzumab direnci geliştirdiği gösterilmiştir (164). Tüm bu pre-klinik çalışmalar miRNA tabanlı tedavi yaklaşımına bir boyut kazandırmakta ve proliferasyon, motilite ve invazyonu düzenleyerek tedavide kullanılan ilaçların etkinliğini artırabileceğini düşündürmektedir. HER2+ tedavi yaklaşımında gelişen dirence karşı kullanılan bir strateji kombine PI3K ve MEK inhibitörlerinin tedavide kullanımınıdır. **Elde ettiğimiz bulgular ışığında HER2 sinyalinde yer alan AKT ve ERK ifadesinin**

miR-770-5p varlığında azaldığı ve BT-474 hücrelerinde miR-770-5p'nin trastuzumab etkinliğini potansiye ettiği gösterilmiştir. Trastuzumab ile birlikte miR-770-5p'nin AKT ve ERK sinyalini azaltarak HER2+ meme kanseri hücrelerinde proliferasyon, motilite ve invazyonu bloklayabileceği düşünülmektedir (201) (Şekil 6.1.).



Şekil 6.1. HER2 sinyalinde mir-770-5p'nin önerilen etki mekanizması. miR-770-5p HER2, AKT ve ERK'i hedefleyerek HER2 sinyalini düzenlediği gösterilmiştir. Trastuzumab varlığında HER2 seviyesinin azalması miR-770-5p'nin AKT ve ERK ifadelerini azaltarak ilacın etkisini potansiye edebilir.

### 6.1.2. ER/HER2 HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Meme kanserli vakaların yaklaşık % 20 - % 30 'unda HER2 (*ErbB2*) proto-onkojenin aşırı ifadesi mevcut olup bu durum daha agresif fenotip ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (202). HER2, dört transmembran tirozin kinaz reseptöründen (TKR) HER1-HER4'ten oluşan insan epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin bir üyesidir (203). Bu reseptörlerin her biri, hücre dışı bir bağlanma alanı, bir transmembran segmenti, tirozin-kinaz bölgesi ve C-terminal kuyruğu ile benzer bir yapıya sahiptir. HER2 ligand bağlanma bölgesi içermez, ancak HER ailesinin geri kalan üyelerinin tercih edilen dimerizasyon

ortağıdır, çünkü yüksek bir katalitik aktivite sergiler (204). Eğer HER2 ifadesi artırılırsa, ligand yokluğunda diğer HER ailesi üyelerini aktive edebilir. Bu aktivasyon, Ras- MAPK yolunda hücre proliferasyonunu indükleyen ve PI3K/Akt/mTOR yoluyla hücre ölümünü önleyen sinyal kaskadlarını aktive eder (205).

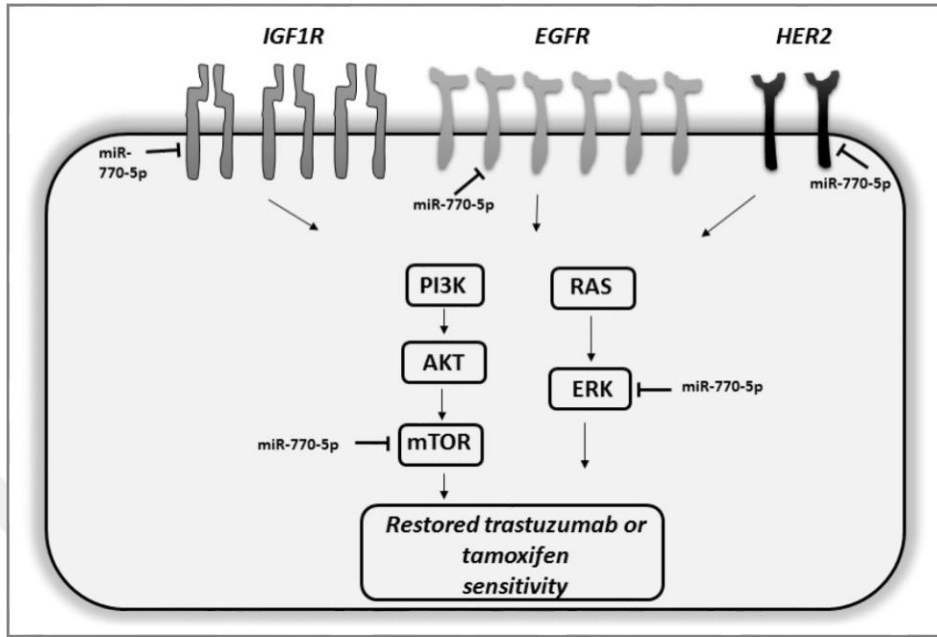
Trastuzumab'ın ve yakın bir zamanda meme kanseri tedavisinde HER2'ye karşı yeni ilaçların dahil edilmesi, HER2-pozitif meme kanserinin doğal seyrini değiştirmiştir (206,207). Trastuzumab, hücre büyümesini inhibe etmek için HER2 dimerizasyonunun önlenmesi, HER2 reseptörünün internalizasyonu, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitör p27 biriktirilmesi ve hücre siklüsünün durdurulması, antikör induksiyonu bağımlı hücrel sitotoksosite gibi farklı mekanizmaları kullanabilir.

Trastuzumab, alternatif dimerizasyon modellerini sağlayan diğer ligandlar ve reseptörler nedeniyle sinyal yolunu tamamen inhibe edemeyebilir. Bu kategoride, epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR* / *HER1*) ve *HER3*, trastuzumab direncinde daha önemli rol oynayan reseptörlerdir (208). Meme Kanserinde *HER2*'nin ve *EGFR*'nin birlikte ifadesi, birkaç retrospektif serideki hayatta kalım ile negatif olarak ilişkilendirilmiştir ve her iki *TKR*'nin inhibisyonu *in vitro* olarak sinerjik etki göstermiştir (209–211).

*HER2*(+) meme kanserinde aşırı ifade edilen *IGF1R* membran bağılı reseptör olup *PI3K*'yı aktive eden diğer bir sinyal iletim sistemidir ve *HER2*(+) metastatik meme kanserinde trastuzumab direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (210). Çalışmamızda etkin konsantrasyonda trastuzumab varlığı (6 ug/ml) ile BT-474 hücelerde *IGF1R* total protein seviyesinin arttığı *HER2* ve *EGFR* total protein düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Trastuzumab'ın *HER2* reseptörüne bağlanan monoklonal bir antikör olduğu düşünüldüğünde ilaç varlığında hücre kaçış mekanizması olarak *HER2* reseptörünü azaltarak hücre proliferasyonu devam edebilir. *IGF1R* total protein seviyesi artışı, trastuzumab varlığında *HER2* protein düzeyinin azaldığı düşünüldüğünde hücrenin kaçış mekanizması olarak *IGF1R* ifadesini artırdığını düşündürmektedir. *HER2/EGFR/IGF1R* arasındaki karşılıklı etkileşim varlığı da bu fikri desteklemektedir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *HER2/EGFR/IGF1R* karşılıklı etkileşim varlığı ışığında; ***HER2*'nin aşırı ifade edildiği hücrelerde *miR-770-5p*'nin trastuzumab ile birlikte kullanımı *HER2*, *EGFR*, *IGF1R* reseptör proteinlerinin aşırı ifadesini azaltarak *HER***



reseptör blokajını sağlayabileceği ve reseptör dimerizasyonu ile oluşan sinyal iletimini azaltabileceği öngörülmektedir (Şekil 6.2.).



Şekil 6.2. miR-770-5p'nin HER2/EGFR/IGF1R karşılıklı etkileşim (crosstalk) üzerine etkisi.

HER2 aşırı ekspresyonu, *in vitro* ve *in vivo* olarak tamoxifen direnci ile de ilişkilendirilmiştir (212). Tamoxifen direnci ile ilgili farmakolojik çalışmalar, hedef yapıdaki değişiklik, mikroRNA'ların anormal ekspresyonu ve ER'nin tümör mikroçevresindeki fonksiyonu ve bununla ilişkili genetik değişiklikler ile araştırılmaktadır (213,214). Tamoxifen bağlandıktan sonra östrojen reseptörünün ifadesi tamoxifen direncinin tümör mikroçevresinde nasıl gelişeceğini gösterir. ER $\alpha$  veya ER $\beta$ 'nin ifadesindeki değişim, eş-düzenleyici proteinlerdeki değişiklik, mikroRNA'ların anormal ekspresyonu ve genetik polimorfizmler, tamoxifen metabolik aktivitesinde rol oynarlar. Tamoxifen direnç mekanizmasının şifresini çözmek için yoğun araştırmalar yapılmıştır ve ER sinyallerinin modülasyonu, büyüme faktörü reseptörlerinin düzenlenmesi (HER2, EGFR, FGFR, IGFIR), PI3K-AKT/mTOR yolu ve NF $\kappa$ B sinyalinin değişikliklerinin düzenlenmesi dahil karmaşık yolların tanımlanması ile sonuçlanmıştır (215). Tamoxifen direnç mekanizmasının anlaşılması, birbirine bağlı yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesinde temel oluşturur. Reseptör Tirozin Kinaz moleküler yollarının ve hücre içi sinyal ağlarının birlikte hedeflenmesi, en umut verici anti-kanser yaklaşımlarından biri olacağı düşünülmektedir.

Meme kanserinde mevcut endokrin tedavileri genellikle tamoxifen gibi anti-östrojenler veya E2 sentezini önleyen aromataz inhibitörleri kullanarak ER $\alpha$  sinyal yollağını hedeflemeye dayanır (216,217). Bununla birlikte, ER $\alpha$  pozitif tümörlü hastaların yaklaşık % 50'si tedavi başlangıcından bir süre sonra bu ilaçlara cevap vermez ya da ilaçlara karşı direnç geliştirir (218,219). Endokrin direnç, önemli bir klinik problemdir ve tedavi başarısızlığı ve mortalitenin önde gelen nedenidir (220,221). Literatürdeki veriler ışığında membranla ilişkili ER $\alpha$  ve büyüme faktörü reseptör yolları arasındaki karşılıklı etkileşim, endokrin direncinin gelişmesinde rol oynayan bir mekanizma olduğunu göstermektedir (222). Çalışmamızda belirlenen konsantrasyonda tamoxifen (10 mM) varlığında BT-474 hücrelerinde HER2, EGFR gibi tirozin kinaz reseptörlerinin total seviyelerinde artış gözlenmiştir ve bu durum ER/HER2/EGFR karşılıklı etkileşim varlığını desteklemektedir.

Tümördeki endokrin direnci, ER $\alpha$  ve HER2/ IGF-1R / EGFR sinyal ağında yer alan proteinlerin aşırı ifadesi veya hiperaktivasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, endokrin dirençli meme kanserinde terapötik yaklaşımdan biri hem ER $\alpha$  'yı hem de büyüme faktörü sinyalini bloke etmek için hedef tedavilerin kombinasyonu olabilir. **Çalışmamızda tamoxifen varlığında artan HER2 ve EGFR reseptör proteinlerinin tamoxifen ile birlikte miR-770-5p varlığında azaldığı gözlenmiştir. miR-770-5p'nin tahmini hedefleri arasında HER2, EGFR gibi HER ailesi üyelerinin yer aldığı düşünüldüğünde bu mikroRNA'nın endokrin direncinde etkili olan ER/HER2/EGFR karşılıklı etkileşim mekanizmasını düzenleyebileceğini düşündürmektedir (Şekil 6.2.).**

### **6.1.3. ÜÇLÜ-NEGATİF (TNBC) HÜCRELERDE MİR-770-5P'NİN PROLİFERASYON, MOTİLİTE VE İNVAZYON ÜZERİNDEKİ ROLÜ VE POTANSİYEL ETKİ MEKANİZMASI**

EGFR (*ErbB1*) ErbB ailesinin ilk keşfedilen üyesi olup homodimer ya da heterodimer oluşturup sinyal ağındaki aşağı akış elemanlarını tirozin fosforilasyonu ile aktive ederek hücre proliferasyonu, migrasyonu ve hayatta kalımı kontrol eder. Mutasyon aktivitesi ve EGFR'nin gen amplifikasyonu meme kanserinde nadir olmasına rağmen, EGFR ekspresyonu, polizomiye bağlı olarak artan gen kopya sayısı ile arttırılabilir ve primer tümörde EGFR'nin artan ekspresyonu, artan metastaz ve TNBC hastalarının sağkalımının

azalması ile ilişkilendirilmiştir (223,224). Literatürde BT-20 ve MDA-MB-468 hücrelerinde EGFR kopya sayısının fazla olduğu ve bu nedenle bu hücrelerde aşırı EGFR ifadesi olduğu bildirilmiştir (225,226). miR-770-5p ile yapılan zenginleştirme analizi sonucunda ortaya çıkan ErbB sinyal iletim sistemi ve reseptör pozitif hücrelerde göstermiş olduğumuz büyüme faktörü reseptörleri arasındaki etkileşim düşünülerek bu miRNA'nın TNBC hücrelerinde etkili olabileceği fikrini akıllara getirmiştir. Bu amaçla EGFR sinyal iletim sistemi incelenmiş ve miR-770-5p mimic transfekte hücrelerde özellikle EGFR kopya sayısı artışı olduğu bilinen BT-20 ve MDA-MB-468 hücrelerinde total ve fosforile EGFR düzeyinde scrambled kontrole kıyasla azalma gözlenmiştir. Bu duruma paralel olarak aşağı akış elemanlarından AKT ve ERK proteinlerinin total ve fosforile seviyeleri miR-770-5p varlığında azalmaktadır. TNBC hücrelerinde miR-770-5p inhibitörü ile transfekte hücrelerde EGFR, ERK ve AKT seviyelerinde gözlenen artma ya da herhangi bir değişim gözlenmeme durumu bu moleküllerin miR-770-5p hedefleri içerisinde olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca MDA-MB-468 hücrelerinde bilinen PTEN mutasyonu ve MDA-MB-231 hücrelerinde bilinen KRAS ve BRAF mutasyonları (227) varlığında miR-770-5p'nin hedeflediği ERK ve mTOR seviyesinde gözlenen azalma sinyal ağını aşağıdan etkileyerek proliferatif sinyalin azalmasını açıklayabilir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I reseptörü (IGF-IR), IGF-I ligandlarının bağlanmasıyla büyümeyi, gelişmeyi ve metabolizmayı düzenleyen bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Son yıllarda elde edilen veriler IGF-1/ IGF1R sinyalinin mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili tümör metastazı ve ilaç direncinde etkili olabileceği gösterilmiştir (228). IGF-IR / FAK arasındaki karşılıklı etkileşim ZEB-1 ve Snail ekspresyonunu artırarak EMT sürecinin hızlanmasına ve TNBC'de migrasyon ve invazyona neden olur (228). miR-770-5p'nin potansiyel hedefleri ile motilitede yer alan genler kesiştirilmiş ve *IGF1R*, *EGFR*, *HER3*, *ROCK1* ve *PTK2* (FAK) genleri dikkatimizi çekmiş ve miR-770-5p transfekte TNBC hücrelerinde bu genlerde gözlenen azalma miR-770-5p varlığında motilite ve invazyondaki azalmayı açıklayabilir. IGF1R, EGFR gibi metastazda etkin reseptör tirozin kinazların azalmasına ek olarak invazyon deneylerinde belirlenen anlamlı azalış ve EMT belirteçlerinde mRNA ve protein düzeyinde gözlenen mezenkimal belirteçlerin de azalması (Vimentin ya da Snail) ve E-cadherin ifade düzeyinin artışı miR-770-5p'nin EMT sürecini MET'e çevirerek invazyon sürecini kontrol edebileceğini düşündürmektedir. miR-770-5p bu sürecin kontrolünü E-Cadherin baskılayıcısı olarak bilinen TCF3 düzeyini azaltarak ya

da E-cadherin promotor metilasyonunu düzenleyerek yapabilir. MDA-MB-231 ve MDA-MB-157 hücrelerinde CDH1 promoter hipermetilasyonu varlığı literatürde bildirilmiştir (227). Bu iki hücre hattında miR-770-5p varlığında artan E-Cadherin düzeyi azalan metilasyon profili kaynaklı olabileceğini düşündürmüş ve yapılan bisülfid uygulaması ve metilasyon spesifik PZR deneyleri sonucunda CDH1 promoter metilasyonunun azaldığı gözlenmiştir. miR-770-5p tahmini hedefleri arasında *DNMT3A* geni varlığı ve miR-770-5p mimic transfekste hücrelerde bu genin mRNA düzeyinde azalması EMT sürecindeki E-cadherin düzeyindeki artışının nedeni olabilir.

Tez kapsamında **miR-770-5p TNBC hücrelerinde EGFR, IGF1R gibi tirozin-kinaz reseptörlerini ve bu sinyal iletim sisteminde aşağı akış elemanlarından olan mTOR ve ERK moleküllerini hedefleyerek proliferasyonu; *ROCK1, FAK, IGF1R, EGFR, NOTCH3, Vimentin, Snail* gibi genleri hedefleyerek hücrenin motilite ve invazyon yeteneğini azaltabileceği yapılan deneylerle gösterilmiştir. Ayrıca invazyonda temel basamak olan EMT sürecini TCF3 ya da DNMT3A genlerini hedefleyip E-Cadherin ifadesini düzenleyerek kontrol edebileceği düşünülmektedir.**

## 6.2. SONUÇ

### 6.2.1. RESEPTÖR POZİTİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİR-770-5P'İN İLAÇ ETKİNLİĞİ VE ER/HER2, HER2/EGFR/IGF1R KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİ ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Meme kanseri biyolojisi ve hormonal ajanlar ile terapötik cevapta HER reseptör ailesinin de içinde yer aldığı diğer reseptör aileleri ve ER arasındaki karşılıklı etkileşim önemlidir (229). Meme kanseri hücrelerindeki östrojenin biyolojik etkisi ER $\alpha$  ve ER $\beta$  olarak bilinen iki reseptör aracılığıyla sağlanır. Östrojenin ER'a bağlanması reseptörün fosforilasyonunu başlatır. Proteinler ile reseptör dimerizasyonu tetiklenir ve reseptörün DNA promotor bölgelere bağlanması kolaylaşır (230). Aktif olan ER östrojen cevap elementlerini (ERE) ve promotor bölgelerini içeren genlerin transkripsiyonunu ayarlar (Klasik genomik sinyal iletim sistemi) (230). ER kompleksi aynı zamanda c-fos/c-Jun gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin koaktivasyonu aracılığıyla gen transkripsiyonunu sağlar (klasik olmayan sinyal iletim sistemi) (231). Genomik östrojen sinyal sistemi IGF-IR, siklin D1, IGF-II ve

VEGF gibi tümör gelişiminde önemli proteinleri kodlayan genlerin ifadesini uyarır (230,231). EGFR ve HER2 gibi pek çok gen östrojen sinyali ile azalır. ER aynı zamanda membran östrojen sinyali olarak da bilinen genomik olmayan mekanizma ile hücrel fonksiyonları düzenler (229). Burada ER ve büyüme faktörü reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim meydana geldiği görülür. ER sitoplazma, mitokondri ve plazma membranı gibi çekirdek dışındaki yapılarda yer alır. Bu durum ER'ın işlevsel olarak büyüme faktörü ligandı gibi davrandığına işaret eder. Plazma membranı ile ilişkili ER siklik AMP gibi ikincil mesajcıların seviyesini artırır (232) ve IGF-IR, EGFR ve HER2 gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleri aktifleşir (233,234). ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşim çift yönlüdür. MAPK ve AKT gibi birçok kinaz ER'nin spesifik bölgelerini fosforlar ve bu durum ligand bağımsız ER aktivasyonuna sebep olur. Örneğin; MAPK ile fosforlanan AIB1 ER-bağımlı transkripsiyonu artırır (235) ve AIB1'in aşırı ifadesi HER2 ile transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde (MCF-7-HER2+) tamoxifen bağlı ER'yi zıt etki yerine östrojen ile aynı etkiye çevirir (236). Bu bulgu ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimin tamoxifen direncinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. MCF-7-HER2+ hücrelerinde gefitinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ve anti-HER2 antikoru ER ve HER2 arasındaki karşılıklı etkileşimi elimine eder ve hücre yeniden tamoxifene karşı duyarlı hale gelir.

Yapılan araştırmalar meme kanserinde büyümenin östrojen reseptörü (ER) ve bir çok büyüme faktörü reseptör sinyal sisteminin koordinasyonu ile düzenlendiğini göstermiştir. ER ve büyüme faktörü reseptör sinyal iletim sisteminin özellikle meme kanserinde endokrin terapiye direnç oluşum mekanizmalarından biri olan EGFR ile arasındaki karşılıklı etkileşimin varlığı bilinmektedir (124,237). EGFR/HER2 sinyal iletim sisteminin aktivasyonu tümör hücrelerinde apoptoz inhibisyonu, hücre büyümesinin uyarımı, invazyon ve anjiogenezin artırılması gibi çeşitli etkilerin oluşmasına neden olan kinaz sinyal basamaklarını başlatır. Hücre büyümesi ve hayatta kalması PI3K/Akt ve Erk1/2 MAPK iletim sistemlerinin aracılığıyla olur. Bu kinazlar fosforile olup ER'yi ya da AIB1 gibi koregülatör elementleri aktive etmesi nedeniyle tümörlerde ER aktivasyonu açısından önemlidir (235,238).

Hormon reseptör pozitif (HR+) meme kanseri vakalarında hormonal uygulamalara rağmen, endokrin terapiye karşı gelişen direnç mekanizmaları hala klinik bir problemdir (239). Faz

III klinik denemeler HR+ tümörlerin % 30'unun aromataz inhibitörlerine (AI) cevap verebildiğini göstermiştir. Buna ek olarak, başlangıçta AI'ya cevap veren tümörlerin bir süre sonra bu ilaca direnç kazandığı ve hastalığın ilerlemesinin durdurulamadığı belirlenmiştir (240).

Hormonal terapiye karşı ER ifadesinin azaltılması, ER mutasyonları, ER koregülatörlerinin alternatif ifade edilmesi gibi pek çok direnç mekanizması önerilmiştir. HER reseptör ailesi üyeleri (EGFR, HER2, HER3, HER4) hormon direncinde etkili rol alır. Özellikle HER2 aşırı ifadesi prelinik modellerde endokrin terapiye direnç gelişimini sağlar (230). HER2 ligand bağlanma bölgesi içermeyen bir reseptör olup diğer HER üyeleri ile dimerizasyonu sonucunda aktifleşir ve proliferasyon, hayatta kalım gibi hücrel süreçler tetiklenir.

HR+ ve HER2+ tümörler ER'nin genomik ve genomik olmayan mekanizması ile büyüme hormon iletim sistemi arasında tehlikeli bir döngü kurarlar ve bu durum hücre proliferasyonunu ve hayatta kalımı artırır. Bu iki reseptörden biri kapatıldığında diğerinin aktif hale gelmesi nedeniyle her iki reseptörü de hedef alabilen akılcı terapiler geliştirilmelidir.

ER ve meme kanseri biyolojisinde önemli yeri olan HER ailesi dışındaki diğer reseptör aileleri arasındaki karşılıklı etkileşim önemlidir. Steroid hormonlar ve büyüme faktörlerinin kanser hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisinin ortaya çıkması ile tirozin kinaz reseptörleri ve nükleer reseptörler arasındaki karşılıklı etkileşim önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Meme, endometrial ve uterus gibi dokular hem estradiol hem de IGF (insulin benzeri büyüme faktörü) cevabı verirler. Örneğin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında ER ve IGF-IR reseptörleri yer almaktadır. İlginç bir şekilde, her iki reseptör de aynı anda uyarıldığında IGF-IR ve ER editif ya da sinerjistik etki gösterir. Bu durum farklı yapısal ailelerde yer alan bu reseptörlerin arasında karşılıklı bir etkileşim olabileceğini göstermiştir (241).

Kanser terapisinde ER'ı hedeflemenin başarılı uygulamalardan biri olduğu açıktır. Yakın zamana kadar tek başına tamoxifen gibi anti-östrojenik ilaç kullanımının faydalı olmadığı kombine terapilerin gerekli olduğuna kanaat getirilmiştir. Büyüme faktör reseptör sisteminin ER fonksiyonu üzerindeki etkisi bu yolları hedeflenmesinin de fayda sağlayabileceği fikrini doğurmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda, tirozin kinaz büyüme

faktör reseptörü ve ER'ı birlikte hedefleyen ilaçların etkin olabileceği düşünülmektedir. Tez kapsamında miR-770-5p'nin tamoxifen ve trastuzumab ile birlikte proliferasyonu azalttığı belirlenmiş, miR-770-5p varlığında ER pozitif ve HER2 pozitif BT-474 hücrelerinde trastuzumab'ı potansiye edebileceği gösterilmiştir. Ek olarak ER/HER2 ya da HER2/EGFR/IGF1R arasındaki karşılıklı etkileşimlerde rol oynayarak endokrin terapi ya da monoklonal antikorlara karşı gelişen dirençte etkili olabileceği düşünülmektedir.

### 6.2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİR-770-5P'NİN EMT SÜRECİ VE İNVAZYONDAKİ ROLÜ

Meme kanserinde 1960-2010 yılları arasındaki veriler kullanılarak yapılan çalışmalarda kanserli vakaların sağ kalım oranının %63'den %90'a çıktığı bildirilmiştir. Bu ilerlemelere rağmen, uzak metastatik hastalık tanısı alan kadınlar için 5 yıllık sağkalım oranı sadece %23'tür (242). Bu veriler doğrultusunda, araştırmacılar ve klinisyenler metastazın altında yatan moleküler mekanizmaları çözerek, tedavi seçimini ve nihayetinde prognostik sonuçları iyileştirmek için meme kanseri mortalitesi ile mücadele etmek için çalışmaktadır.

Meme kanseri metastaz araştırmalarında son zamanlarda odaklanılan nokta epitelial mezenkimal geçiş (EMT) 'tir. Klasik EMT, epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere diferensiyasyonunu gerektiren, genellikle farklı hücre tiplerine yol açan kritik bir gelişimsel programdır. Tümör ilerledikçe, epitel hücreler mezenkimal hücrelerin özelliklerine erişebilir, bu süreç onkojenik EMT olarak anılır. Ayrıca onkojenik EMT, artan göç ve istilacı kabiliyetlere neden olabilir ve bu da metastatik yayılıma katkıda bulunur. Transkripsiyon faktörleri, sinyal molekülleri ve mikroRNA'lar da dahil olmak üzere EMT sürecinde görev alan pek çok molekül keşfedilmiştir. EMT'ye yanıt olarak down-regüle edilen çeşitli proteinler arasında E-Cadherin (*CDH1*), plakoglobin (*JUP*), okluzin (*OCLN*), zonula okluzanlar1 (*TJPI*),  $\alpha$ -katenin (*CTNNA3*) ve claudinler 3/4/7 (*CLDN-3/4/7*) sayılabilir. Diğer taraftan, mezenkimal benzeri bir fenotipin teşvik edilmesi, fibronektin (*FNI*), N-Cadherin (*CDH2*), Vimentin (*VIM*), ACTA2 ve nükleer CTNNB1 gibi proteinlerin upregülasyonu ile gerçekleşir. EMT fenotipinin yaygın kullanılan belirleyicisi CDH1'in kaybedilmesi / azaltılmasıdır ve bu durum EMT'nin kritik bir adımıdır. Çinko parmak proteinleri Snail (*SNAI1*), Slug (*SNAI2*), Zeb1 (*ZEB1*) ve Zeb2

(*ZEB2*) her biri, meme hücrelerindeki *CDH1* transkripsiyonunu, hücre içi bölgelerindeki E-kutuları (CANNTG) bağlayarak doğrudan baskılar. Gelişimde rol oynadığı bilinen miRNA'ların EMT sürecinin indüksiyonunda görev alabileceği şaşırtıcı değildir. En sık belirtilen EMT ile ilgili miRNA'lar, miR-200a/b/c, miR-141 ve miR-429'dan oluşan miR-200 ailesine üyeleridir.

Tez kapsamının ikinci kısmı olan miR-770-5p'nin üçlü negatif meme kanseri hücrelerine transfeksiyonu ve sonrasında yapılan yara iyileşme ve invazyon deneyleri bu miRNA'nın motilite ve invazyon üzerine etkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. İnvazyon sürecindeki ilk adım olarak düşünülen EMT biyobelirteçleri ile yapılan eş-zamanlı PZR çalışmasında miR-770-5p ile transfekte olan hücrelerin kontrole kıyasla *CDH1* seviyelerinin arttığı, *SNAIL*, *TCF3*, *VIM* gibi EMT indükleyicilerinin ise anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. EMT belirteçleri ile yapılan protein analizleri bu miRNA'nın EMT sürecinde etkili olabileceği fikrini desteklemektedir.

TNBC hücrelerinde potansiyel etki mekanizmasını açıklamak adına yapılan çalışmalar sonucunda miR-770-5p'nin EGFR ve IGF1R sinyal iletim sistemlerinde her iki reseptör tirozin kinaz ya da bu sinyal ağında distalde yer alan moleküller olan ERK ve mTOR'u hedefleyerek proliferasyonu azaltabileceği gösterilmiştir. Motilite ve invazyon sürecine etki mekanizmasında ise yine bu iki sinyal ağı ve FAK, ROCK1 gibi hücre iskeletinde önemli olan molekülleri hedefleyebileceği belirlenmiştir. Motilite sürecini takip eden invazyonda ise EMT sürecinde Vimentin, Snail gibi kritik mezenkimal belirteçleri hedeflemesiyle birlikte TCF3 ya da DNMT3A aracılı E-Cadherin artışı ile birlikte EMT sürecini MET'e çevirerek tümör hücresinin invazyon kapasitesi üzerindeki potansiyel etki mekanizması tanımlanmaya çalışılmıştır.

Tez kapsamında elde edilen bulgular miR-770-5p'in da trastuzumab ve tamoxifen direncinde de etkin olabileceğini destekler niteliktedir. Direnç durumunda miRNA mekanizmalarının aydınlatılması için benzer yolların dirençli hücrelerde araştırılması önem taşımaktadır. Ayrıca *in vitro* olarak gösterdiğimiz miRNA-ilaç potansiyasyon (miR-770-5p'nin trastuzumab ve tamoxifen etkinliğini artırması) mekanizması ve miR-770-5p'nin invazyon kapasitesi üzerine etki mekanizmasının *in vivo* hayvan modellerinde gösterilmesi bu miRNA'nın prelinik olarak doğrulanması açısından değerli olacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Jhan J-R, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*. England; 2017 Nov;18(17):1595–609.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. United States; 2017 Jan;67(1):7–30.
3. Savci-Heijink CD, Halfwerk H, Hooijer GKJ, Horlings HM, Wesseling J, van de Vijver MJ. Retrospective analysis of metastatic behaviour of breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. Netherlands; 2015 Apr;150(3):547–57.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2001 Sep;98(19):10869–74.
5. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. England; 2000 Aug;406(6797):747–52.
6. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. United States; 2007 Aug;13(15 Pt 1):4429–34.
7. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. England; 2005 Jan;205(2):248–54.
8. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. England; 2009 Dec;6(12):718–30.
9. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2000 Aug 17 [cited 2014 Dec 12];406(6797):747–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602>
10. Iorio M V, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al.

- MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2014 Jul 11];65(16):7065–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103053>
11. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, Dunning MJ, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* England; 2007;8(10):R214.
  12. Bockmeyer CL, Christgen M, Muller M, Fischer S, Ahrens P, Langer F, et al. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* Netherlands; 2011 Dec;130(3):735–45.
  13. Sullivan CS, Grundhoff A, Tevethia S, Treisman R, Pipas JM, Ganem D. Expression and function of microRNAs in viruses great and small. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* United States; 2006;71:351–6.
  14. Mallory AC, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet.* United States; 2006 Jun;38 Suppl:S31-6.
  15. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* England; 2008 Mar;9(3):219–30.
  16. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* England; 2005 Feb;433(7027):769–73.
  17. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* [Internet]. 2008 Sep 4 [cited 2014 Jul 10];455(7209):58–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668040>
  18. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
  19. Wang Y, Lee CGL. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med.*

- England; 2009 Jan;13(1):12–23.
20. Janga SC, Vallabhaneni S. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks. *Adv Exp Med Biol*. United States; 2011;722:59–74.
  21. Wen K-C, Sung P-L, Yen M-S, Chuang C-M, Liou W-S, Wang P-H. MicroRNAs regulate several functions of normal tissues and malignancies. *Taiwan J Obstet Gynecol*. China (Republic : 1949- ); 2013 Dec;52(4):465–9.
  22. Goh JN, Loo SY, Datta A, Siveen KS, Yap WN, Cai W, et al. microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. England; 2016 May;91(2):409–28.
  23. Manuscript A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2014 Dec 14];490(7418):61–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3465532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  24. Bastien RRL, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MTW, Prat A, Munárriz B, Rowe L, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2012;5:44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3487945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  25. Jung J, Wagner V, Körner C. microRNAs IN THERAPY RESISTANCE OF BREAST CANCER. 2016;(November):103–12.
  26. Singh R, Mo Y-Y. Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2013;14(March):201–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3595302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  27. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003 Jul 8 [cited 2014 Nov 18];100(14):8418–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=166244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: A critical review. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2568–81.
  29. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer* [Internet]. 2014;13(1):228. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-228>
  30. Tryfonidis K, Zardavas D, Katzenellenbogen BS, Piccart M. Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2016;50:68–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.08.008>
  31. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. United States; 2013;18(2):123–33.
  32. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Jan 7];8(5):R76. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1929138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  33. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. England; 2010;12(5):R68.
  34. Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2010 Apr;107(15):6994–9.

35. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. United States; 2011 Jul;121(7):2750–67.
36. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. United States; 2015 Apr;21(7):1688–98.
37. Jezequel P, Loussouarn D, Guerin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res*. England; 2015 Mar;17:43.
38. Curtis C, Shah SP, Chin S, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* [Internet]. 2012 Jun 21 [cited 2015 Sep 21];486(7403):346–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3440846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000 Jan 7 [cited 2014 Jul 10];100(1):57–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
40. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4 [cited 2014 Jul 9];144(5):646–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
41. Feldner JC, Brandt BH. Cancer cell motility--on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. *Exp Cell Res*. United States; 2002 Jan;272(2):93–108.
42. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev*

- Cancer [Internet]. 2002;2(6):442–54. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc822>
43. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Sep 19];7(6):415–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508028>
44. Peinado H, Cano a. New potential therapeutic targets to combat epithelial tumor invasion. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2006;8(12):851–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169758>
45. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* [Internet]. 2005;132(14):3151–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091007>
46. Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K, et al. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* [Internet]. 1999;18(18):5073–84. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033568198&partnerID=tZOtx3y1>
47. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2016 Sep 19];116(Pt 3):499–511. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00224>
48. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Mar [cited 2016 Sep 19];3(3):155–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994736>
49. Mann JR, Backlund MG, Buchanan FG, Daikoku T, Holla VR, Rosenberg DW, et

- al. Repression of prostaglandin dehydrogenase by epidermal growth factor and snail increases prostaglandin E2 and promotes cancer progression. *Cancer Res.* 2006;66(13):6649–56.
50. Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: Prostaglandin E 2 induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66(10):5338–45.
51. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* United States; 2006 Nov;127(4):679–95.
52. Morris PG, Lynch C, Feeney JN, Patil S, Howard J, Larson SM, et al. Integrated positron emission tomography/computed tomography may render bone scintigraphy unnecessary to investigate suspected metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* United States; 2010 Jul;28(19):3154–9.
53. McGuire A, Brown JAL, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(1):145–55.
54. Berman AT, Thukral AD, Hwang W-T, Solin LJ, Vapiwala N. Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer.* United States; 2013 Apr;13(2):88–94.
55. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* United States; 2010 Jul;28(20):3271–7.
56. Aversa C, Rossi V, Geuna E, Martinello R, Milani A, Redana S, et al. Metastatic breast cancer subtypes and central nervous system metastases. *Breast.* Netherlands; 2014 Oct;23(5):623–8.
57. Lowery AJ, Kell MR, Glynn RW, Kerin MJ, Sweeney KJ. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* Netherlands; 2012 Jun;133(3):831–41.

58. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev. Netherlands*; 2010 May;36(3):206–15.
59. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Res [Internet]*. 2015;17(1):542. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4362832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Mao L, Sun A-J, Wu J-Z, Tang J-H. Involvement of microRNAs in HER2 signaling and trastuzumab treatment. *Tumour Biol [Internet]*. *Tumor Biology*; 2016 Oct 12;1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5405-3>
61. Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer [Internet]*. Nature Publishing Group; 2012;106(1):6–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3251862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol. United States*; 2008 Mar;26(8):1275–81.
63. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol. United States*; 2010 Mar;28(7):1145–53.
64. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2013 Jul;110(27):11091–6.
65. Balko JM, Giltane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.*



- United States; 2014 Feb;4(2):232–45.
66. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*. England; 2010 Apr;29(14):2013–23.
  67. Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. United States; 2013 Jul;31(20):2586–92.
  68. Layman RM, Ruppert AS, Lynn M, Mrozek E, Ramaswamy B, Lustberg MB, et al. Severe and prolonged lymphopenia observed in patients treated with bendamustine and erlotinib for metastatic triple negative breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. Germany; 2013 May;71(5):1183–90.
  69. Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, Johnson D, Mackay A, Welti JC, et al. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. United States; 2011 Aug;17(16):5275–86.
  70. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E, Swamy R, Valero V, O'Neill V, et al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast c. *J Clin Oncol*. United States; 2011 Nov;29(32):4286–93.
  71. Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. England; 2013 Sep;14(10):933–42.
  72. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer

- confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res.* England; 2014 Aug;16(4):406.
73. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* United States; 2012 Feb;366(6):520–9.
  74. Montero JC, Esparis-Ogando A, Re-Louhau MF, Seoane S, Abad M, Calero R, et al. Active kinase profiling, genetic and pharmacological data define mTOR as an important common target in triple-negative breast cancer. *Oncogene.* England; 2014 Jan;33(2):148–56.
  75. Singh J, Novik Y, Stein S, Volm M, Meyers M, Smith J, et al. Phase 2 trial of everolimus and carboplatin combination in patients with triple negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* England; 2014 Mar;16(2):R32.
  76. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther.* United States; 2014 Nov;13(11):2477–88.
  77. Muellner MK, Uras IZ, Gapp B V, Kerzendorfer C, Smida M, Lechtermann H, et al. A chemical-genetic screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer. *Nat Chem Biol.* United States; 2011 Sep;7(11):787–93.
  78. Castel P, Ellis H, Bago R, Toska E, Razavi P, Carmona FJ, et al. PDK1-SGK1 Signaling Sustains AKT-Independent mTORC1 Activation and Confers Resistance to PI3K $\alpha$  Inhibition. *Cancer Cell.* United States; 2016 Aug;30(2):229–42.
  79. Duncan JS, Whittle MC, Nakamura K, Abell AN, Midland AA, Zawistowski JS, et al. Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. *Cell.* United States; 2012 Apr;149(2):307–21.
  80. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States; 2005

Oct;102(43):15545–50.

81. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature*. England; 2006 Jan;439(7074):353–7.
82. Hollern DP, Honeysett J, Cardiff RD, Andrechek ER. The E2F transcription factors regulate tumor development and metastasis in a mouse model of metastatic breast cancer. *Mol Cell Biol*. United States; 2014 Sep;34(17):3229–43.
83. Andrechek ER. HER2/Neu tumorigenesis and metastasis is regulated by E2F activator transcription factors. *Oncogene*. England; 2015 Jan;34(2):217–25.
84. Britschgi A, Andraos R, Brinkhaus H, Klebba I, Romanet V, Muller U, et al. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell*. United States; 2012 Dec;22(6):796–811.
85. Jhan J-R, Andrechek ER. Effective personalized therapy for breast cancer based on predictions of cell signaling pathway activation from gene expression analysis. *Oncogene*. England; 2017 Jun;36(25):3553–61.
86. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. United States; 2010 Jun;141(7):1117–34.
87. Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem*. United States; 2015;84:739–64.
88. Ward CW, Hoyne PA, Flegg RH. Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins*. United States; 1995 Jun;22(2):141–53.
89. Kopp R, Rothbauer E, Ruge M, Arnholdt H, Spranger J, Muders M, et al. Clinical implications of the EGF receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options. *Recent results*

- cancer Res Fortschritte der Krebsforsch Prog dans les Rech sur le cancer. Germany; 2003;162:115–32.
90. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* England; 2006 Jul;7(7):505–16.
  91. Hynes NE, Lane H a. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2005 May [cited 2014 Jul 21];5(5):341–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864276>
  92. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Jan [cited 2014 Oct 25];79:34–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269963>
  93. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* United States; 2014 Mar;25(3):282–303.
  94. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets.* United Arab Emirates; 2005 May;6(3):243–57.
  95. Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms Underlying the Action and Synergism of Trastuzumab and Pertuzumab in Targeting HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2018 Sep 20;10(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30241301>
  96. Bennisroune A. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. 2015;6(November):1–10.
  97. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2018; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrclinonc.2018.28>
  98. Polivka J, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014 May;142(2):164–75.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.004>

99. Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13(2):215–23.
100. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007;26(22):3113–21.
101. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* [Internet]. 2007 Dec;213(3):589–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786953>
102. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279–90.
103. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2011 Jun;36(6):320–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000411000508>
104. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007;26(22):3227–39.
105. Saal L, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2005;65(7):2554–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805248>
106. Brugge J, Hung MC, Mills GB. A New Mutational activation in the PI3K Pathway. *Cancer Cell*. 2007;12(2):104–7.
107. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2002 Jun;8(6):1747–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060612>

108. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- $\alpha$  activity. *J Mol Endocrinol*. 2008;40(3–4):173–84.
109. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 May 1;26(13):2139–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390968>
110. Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM, Bhattacharya S, Siwak D, Gendelman R, et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Jan 15;69(2):565–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147570>
111. Won JK, Yang HW, Shin SY, Lee JH, Heo W Do, Cho KH. The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(3):153–63.
112. Nielsen TO, Andrews HN, Cheang M, Kucab JE, Hsu FD, Ragaz J, et al. Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2015 Sep 23];64(1):286–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729636>
113. Karamouzis M V, Papavassiliou AG. Targeting insulin-like growth factor in breast cancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Oct [cited 2015 Oct 4];84(1):8–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424863>
114. Haluska P, Carboni JM, TenEyck C, Attar RM, Hou X, Yu C, et al. HER receptor signaling confers resistance to the insulin-like growth factor-I receptor inhibitor, BMS-536924. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008 Sep [cited 2015 Sep 21];7(9):2589–98. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2614316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

115. Huang X, Gao L, Wang S, McManaman JL, Thor AD, Yang X, et al. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2015 Sep 23];70(3):1204–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103628>
116. Worthington J, Bertani M, Chan H, Gerrits B, Timms JF. Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells--interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3 regulation. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Sep 23];10:490. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2946312&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
117. Lee A V, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, et al. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1999 May [cited 2015 Sep 26];13(5):787–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319328>
118. Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Jan 12 [cited 2015 Sep 26];271(2):1016–21. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.2.1016>
119. Nickerson T, Huynh H, Pollak M. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 Aug 28 [cited 2015 Oct 4];237(3):690–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X97970893>
120. Stewart AJ, Westley BR, May FE. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br J Cancer* [Internet]. 1992 Oct [cited

- 2015 Sep 26];66(4):640–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1977408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. Salerno M, Sisci D, Mauro L, Guvakova MA, Ando S, Surmacz E. Insulin receptor substrate 1 is a target for the pure antiestrogen ICI 182,780 in breast cancer cells. *Int J Cancer* [Internet]. 1999 Apr 12 [cited 2015 Sep 26];81(2):299–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188734>
  122. Morishita S, Niwa K, Ichigo S, Hori M, Murase T, Fujimoto J, et al. Overexpressions of c-fos/jun mRNA and their oncoproteins (Fos/Jun) in the mouse uterus treated with three natural estrogens. *Cancer Lett* [Internet]. 1995 Nov 6 [cited 2015 Oct 4];97(2):225–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7497467>
  123. Fagan DH, Yee D. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 Dec 26];13(4):423–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003523>
  124. Osborne CK, Bardou V, Hopp T a., Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua S a. W, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2003 Mar 5 [cited 2015 Feb 12];95(5):353–61. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/95.5.353>
  125. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res. United States*; 2007 Aug;13(16):4909–19.
  126. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res. United States*; 2009 Dec;15(24):7479–91.
  127. Bender LM, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer.



- Front Biosci. United States; 2008 May;13:3906–12.
128. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Jul 11];6(4):259–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279>
  129. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2002 Nov;99(24):15524–9.
  130. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature. England*; 2012 Feb;482(7385):347–55.
  131. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92–105.
  132. Lu J, Getz G, Miska E a, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* [Internet]. 2005 Jun 9 [cited 2014 Jul 9];435(7043):834–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944708>
  133. Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, Bak M, Heath C V, Schwartz G, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res. United States*; 2007 Dec;67(24):11612–20.
  134. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren P a, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Apr 20];11(3):R27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  135. McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, et al. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. *PLoS One. United States*; 2014;9(1):e87032.

136. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. United States; 2010 Jun;141(7):1195–207.
137. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2014 Jul 17];116(2):281–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>
138. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. England; 2006 Oct;25(46):6188–96.
139. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*. Ireland; 2009 Nov;285(2):116–26.
140. Martin EC, Elliott S, Rhodes L V, Antoon JW, Fewell C, Zhu Y, et al. Preferential star strand biogenesis of pre-miR-24-2 targets PKC-alpha and suppresses cell survival in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Carcinog*. United States; 2014 Jan;53(1):38–48.
141. Gebeshuber CA, Martinez J. miR-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling. *Oncogene*. England; 2013 Jul;32(27):3306–10.
142. Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Apr 15 [cited 2014 Sep 15];71(8):2926–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393507>
143. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*. United States; 1998 Jun;50(2):151–96.
144. Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Dec 28];26(21):8191–201. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1636750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

145. Bueno MJ, Perez de Castro I, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*. United States; 2008 Oct;7(20):3143–8.
146. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem*. United States; 2009 Feb;284(9):5731–41.
147. Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, Horvat E-A, Schmidt C, Kublbeck M, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol Syst Biol*. England; 2012 Feb;8:570.
148. Ma L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*. England; 2010;12(5):210.
149. Ma F, Zhang J, Zhong L, Wang L, Liu Y, Wang Y, et al. Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/beta-catenin signaling. *Gene*. Netherlands; 2014 Feb;535(2):191–7.
150. Li L-Z, Zhang CZ, Liu L-L, Yi C, Lu S-X, Zhou X, et al. miR-720 inhibits tumor invasion and migration in breast cancer by targeting TWIST1. *Carcinogenesis*. England; 2014 Feb;35(2):469–78.
151. Xiao F, Bai Y, Chen Z, Li Y, Luo L, Huang J, et al. Downregulation of HOXA1 gene affects small cell lung cancer cell survival and chemoresistance under the regulation of miR-100. *Eur J Cancer*. England; 2014 May;50(8):1541–54.
152. Liu MX, Siu MKY, Liu SS, Yam JWP, Ngan HYS, Chan DW. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. United States; 2014 Feb;5(4):944–58.
153. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. United States; 2013 May;368(18):1685–94.
154. Gebert LFR, Rebhan MAE, Crivelli SEM, Denzler R, Stoffel M, Hall J. Miravirsen

- (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res.* England; 2014 Jan;42(1):609–21.
155. Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nature biotechnology.* United States; 2013. p. 577.
156. Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* Switzerland; 2012;3:120.
157. Kelnar K, Peltier HJ, Leatherbury N, Stoudemire J, Bader AG. Quantification of therapeutic miRNA mimics in whole blood from nonhuman primates. *Anal Chem.* United States; 2014 Feb;86(3):1534–42.
158. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, et al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res.* United States; 2010 Jul;70(14):5923–30.
159. Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C, et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet.* United States; 2011 Mar;43(4):371–8.
160. Fyles AW, McCready DR, Manchul LA, Trudeau ME, Merante P, Pintilie M, et al. Tamoxifen with or without breast irradiation in women 50 years of age or older with early breast cancer. *N Engl J Med.* United States; 2004 Sep;351(10):963–70.
161. Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing MicroRNA therapeutics. *Circ Res.* 2012;110(3):496–507.
162. Ye X-M, Zhu H-Y, Bai W-D, Wang T, Wang L, Chen Y, et al. Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer by targeting IGF1R. *BMC Cancer* [Internet]. *BMC Cancer*; 2014;14(1):134. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3974046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
163. Corcoran C, Rani S, Breslin S, Gogarty M, Ghobrial IM, Crown J, et al. miR-630

- targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. *Mol Cancer* [Internet]. *Molecular Cancer*; 2014;13(1):71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655723>
164. Ma T, Yang L, Zhang J. MiRNA-542-3p downregulation promotes trastuzumab resistance in breast cancer cells via AKT activation. *Oncol Rep.* 2015;33(3):1215–20.
  165. Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, et al. MiR-200c suppresses TGF- $\beta$  signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J Cancer.* 2014;135(6):1356–68.
  166. Ye X, Bai W, Zhu H, Zhang X, Chen Y, Wang L, et al. Mir-221 promotes trastuzumab-resistance and metastasis in her2-positive breast cancers by targeting PTEN. *BMB Rep.* 2014;47(5):268–73.
  167. Lü M, Ding K, Zhang G, Yin M, Yao G, Tian H, et al. MicroRNA-320a sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells to tamoxifen by targeting ARPP-19 and ERR $\gamma$ . *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:8735. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736597> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4348640>
  168. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* [Internet]. 2008 Jan 10 [cited 2016 Jul 6];451(7175):147–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  169. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* England; 2007 Jan;17(1):3–14.
  170. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* United States; 2013 Jan;63(1):11–30.

171. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin. United States*; 2011;61(2):69–90.
172. Hollern DP, Andrechek ER. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. *Breast Cancer Res. England*; 2014 Jun;16(3):R59.
173. Andrechek ER, Cardiff RD, Chang JT, Gatza ML, Acharya CR, Potti A, et al. Genetic heterogeneity of Myc-induced mammary tumors reflecting diverse phenotypes including metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2009 Sep;106(38):16387–92.
174. Ponzio MG, Lesurf R, Petkiewicz S, O'Malley FP, Pinnaduwaage D, Andrulis IL, et al. Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2009 Aug;106(31):12903–8.
175. Drost R, Dhillon KK, van der Gulden H, van der Heijden I, Brandsma I, Cruz C, et al. BRCA1185delAG tumors may acquire therapy resistance through expression of RING-less BRCA1. *J Clin Invest. United States*; 2016 Aug;126(8):2903–18.
176. DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MTW, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med. United States*; 2011 Oct;17(11):1514–20.
177. Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, Dust S, Stover DG, Chi D, et al. CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep. United States*; 2016 Nov;17(9):2367–81.
178. Chen C-A, Chiang Y-C, Chang M-C, Hu Y-H, You S-L, Cheng Y-YK, et al. Gene methylation profiles as prognostic markers in ovarian clear cell and endometrioid adenocarcinomas. *Am J Transl Res. United States*; 2015;7(1):139–52.
179. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible

- miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inf.* 2011;44(5):839–47.
180. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2014 Oct 23];33(Web Server issue):W741-8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1160236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  181. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):77–83.
  182. Goldman M, Craft B, Brooks AN, Zhu J, Haussler D. The UCSC Xena Platform for cancer genomics data visualization and interpretation. *bioRxiv* [Internet]. 2018 Jan 1; Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2018/05/18/326470.abstract>
  183. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4(AUGUST2015):1–38.
  184. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* England; 2012 Jun;13:134.
  185. Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ. The UCSC genome browser and associated tools. *Brief Bioinform.* England; 2013 Mar;14(2):144–61.
  186. Detmar M. Short Technical Reports layer wound healing assays. 2009;
  187. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;9(7):671–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>
  188. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* England; 2016 Jan;44(D1):D7-19.
  189. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic*

- Acids Res. England; 2018 Jan;46(D1):D8–13.
190. Hollestelle A, Nagel JHA, Smid EM, Lam ES, Elstrodt EF, Wasielewski M, et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. 2010;53–64.
  191. Guo W, Dong Z, Liu S, Qiao Y, Kuang G, Guo Y, et al. Promoter hypermethylation-mediated downregulation of miR-770 and its host gene MEG3, a long non-coding RNA, in the development of gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Carcinog*. 2017;56(8):1924–34.
  192. Zhao H, Yu X, Ding Y, Zhao J, Wang G, Wu X, et al. MiR-770-5p inhibits cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer by targeting ERCC2. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(33). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27449101>
  193. Zhang Z, Yang Y, Zhang X. MiR-770 inhibits tumorigenesis and EMT by targeting JMJD6 and regulating WNT/ $\beta$ -catenin pathway in non-small cell lung cancer. *Life Sci* [Internet]. Elsevier; 2017;188(August):163–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.002>
  194. Wu WJ, Shi J, Hu G, Yu X, Lu H, Yang ML, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits FBXW7 expression by upregulation of microRNA-770 in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol* [Internet]. *Tumor Biology*; 2016;37(5):6045–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4452-5>
  195. Li Y, Liang Y, Sang Y, Song X, Zhang H, Liu Y, et al. MIR-770 suppresses the chemo-resistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1 article. *Cell Death Dis* [Internet]. Springer US; 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-017-0030-7>
  196. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA, Kallemeijn WW. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Cancer Res*. 2007;5(February):195–202.
  197. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic



- Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2012 Feb 1;40(1):139–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260680>
198. Baldassari F, Zerbinati C, Galasso M, Minotti FCL, Agnoletto C, Previati M, et al. Screen for microRNA and drug interactions in breast cancer cell lines points to miR-126 as a modulator of CDK4/6 and PIK3CA inhibitors. *Front Genet*. 2018;9(MAY):1–11.
  199. Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Küblbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, et al. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene*. 2013;32(9):1173–82.
  200. He X, Xiao X, Dong L, Wan N, Zhou Z, Deng H, et al. MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1. *Tumor Biol*. 2015;36(3):2065–75.
  201. Noyan S, Gurdal H, Gur Dedeoglu B. Involvement of miR-770-5p in trastuzumab response in HER2 positive breast cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(4):e0215894. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31009516>
  202. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. United States; 1987 Jan;235(4785):177–82.
  203. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. England; 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.
  204. Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene*. England; 2000 Dec;19(53):6093–101.
  205. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. United States; 2007 Jul;357(1):39–51.

206. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. United States; 2001 Mar;344(11):783–92.
207. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. United States; 2002 Feb;20(3):719–26.
208. Luque-Cabal M, Garcia-Tejido P, Fernandez-Perez Y, Sanchez-Lorenzo L, Palacio-Vazquez I. Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clin Med Insights Oncol*. United States; 2016;10(Suppl 1):21–30.
209. DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D 2nd, Thor AD. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol*. United States; 2005 Feb;23(6):1152–60.
210. Gallardo A, Lerma E, Escuin D, Tibau A, Munoz J, Ojeda B, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer*. England; 2012 Apr;106(8):1367–73.
211. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. United States; 2001 Dec;61(24):8887–95.
212. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat*. Netherlands; 1992;24(2):85–95.

213. Garcia-Becerra R, Santos N, Diaz L, Camacho J. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *Int J Mol Sci.* Switzerland; 2012 Dec;14(1):108–45.
214. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol.* United States; 2005 Dec;23(36):9312–8.
215. Hosford SR, Miller TW. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharmgenomics Pers Med.* New Zealand; 2014;7:203–15.
216. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* United States; 2005 Nov;97(22):1652–62.
217. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov.* England; 2003 Mar;2(3):205–13.
218. Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JMW, Harper ME, et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology.* United States; 2003 Mar;144(3):1032–44.
219. Macedo LF, Sabnis G, Brodie A. Preclinical modeling of endocrine response and resistance: focus on aromatase inhibitors. *Cancer.* United States; 2008 Feb;112(3 Suppl):679–88.
220. Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* United States; 2001 May;93(9):684–90.
221. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology

- of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev.* United States; 2001 Mar;53(1):25–71.
222. Nicholson RI, Johnston SR. Endocrine therapy--current benefits and limitations. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2005 Jan [cited 2015 Jan 13];93 Suppl 1:S3-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247594>
223. Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* United States; 2014 Sep;27(9):1212–22.
224. Tischkowitz M, Brunet J-S, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MCU, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* England; 2007 Jul;7:134.
225. El Guerrab A, Bamdad M, Kwiatkowski F, Bignon Y-J, Penault-Llorca F, Aubeil C. Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* United States; 2016 Nov;7(45):73618–37.
226. Tian F, Randle DH. GENETIC ALTERATION CELL PANELS : EFFECTIVE TOOLS FOR HIGH About ATCC. 2014;
227. Hollestelle A, Nagel JHA, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* Netherlands; 2010 May;121(1):53–64.
228. Li H, Bath IS, Qu X, Xu L, Song N, Wang R, et al. IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Mol Cancer.* England; 2017 Jan;16(1):6.
229. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Mar 10 [cited 2015 Feb 15];23(8):1616–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755967>

230. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2015 Jan 13];5(9):531–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607391>
231. Kushner PJ, Agard D a, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2000 Nov 30 [cited 2015 Feb 15];74(5):311–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076000001084>
232. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Aug 30 [cited 2015 Feb 15];91(18):8517–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
233. Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E. Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2003 Jun 26 [cited 2015 Feb 15];22(26):4007–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821935>
234. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jun 16 [cited 2015 Jan 12];275(24):18447–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749889>
235. Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2015 Feb 12];20(14):5041–7. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.20.14.5041-5047.2000>
236. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling a. E, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu Cross-Talk in ER/HER2-Positive Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet].

- 2004 Jun 15 [cited 2015 Feb 15];96(12):926–35. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djh166>
237. Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF, Gee JM. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 1999 Sep [cited 2015 Feb 12];6(3):373–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516852>
238. Hong S-H, Privalsky ML. The SMRT Corepressor Is Regulated by a MEK-1 Kinase Pathway: Inhibition of Corepressor Function Is Associated with SMRT Phosphorylation and Nuclear Export. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Sep 1;20(17):6612–25. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.20.17.6612-6625.2000>
239. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2015 Sep 26];11(4):643–58. Available from: <http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/erc.1.00776>
240. Bonnetterre J, Thürlimann B, Robertson JF, Krzakowski M, Mauriac L, Koralewski P, et al. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2000 Nov 15 [cited 2015 Sep 26];18(22):3748–57. Available from: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2011.41.3302>
241. Yu Z, Gao W, Jiang E, Lu F, Zhang L, Shi Z, et al. Interaction between IGF-IR and ER induced by E2 and IGF-I. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Jan 13];8(5):e62642. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3660452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
242. Drasin DJ, Robin TP, Ford HL. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):226.

## EKLER

EK 1. RNA spektrofotometrik ve Bioanalyzer ölçüm sonuçları.

Aşağıdaki çizelgede yapılan RNA izolasyonlarının spektrofotometrik değerleri yer almaktadır.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/ul)	A260/280
BT-474_Control	252.6	2.04
BT-474_770-5p	302.18	2.01
BT-474_Scr	264.09	2.03
MCF-7_Control	214.57	1.98
MCF-7_770-5p	162.69	1.93
MCF-7_Scr	330.17	1.97
SK-BR-3_Control	875.44	2.03
SK-BR-3_770-5p	627.21	2.05
SK-BR-3_Scr	901.53	2.07
BT-20_Control	262.38	2.03
BT-20_770-5p	117.01	1.95
BT-20_Scr	211.32	1.97
MDA-MB-231_Control	189.41	2.00
MDA-MB-231_770-5p	173.26	1.98
MDA-MB-231_Scr	208.44	1.98

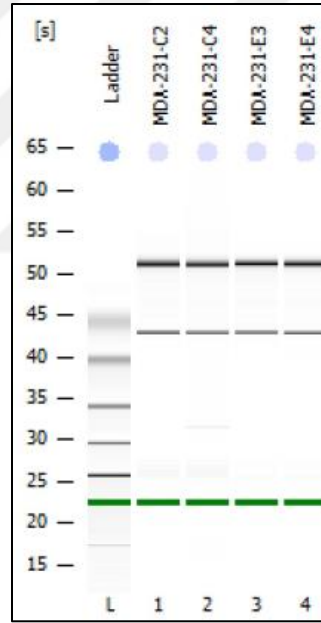
MDA-MB-468_Control	241.22	1.98
MDA-MB-468_770-5p	151.95	1.99
MDA-MB-468_Scr	141.73	1.89
MDA-MB-157_Control	728.1	2.04
MDA-MB-157_770-5p	684.14	2.03
MDA-MB-157_Scr	762.76	2.04
BT-474_TAM+scr-1	370.91	2.00
BT-474_TAM+scr-2	393.84	2.02
BT-474_TAM+770-5p-1	330.59	2.01
BT-474_TAM+770-5p-2	418.9	2.00
BT-474_TRAST+scr-1	470.94	2.05
BT-474_TRAST+scr-2	266.58	1.99
BT-474_TRAST+770-5p-1	392.39	2
BT-474_TRAST+770-5p-2	382.72	1.83



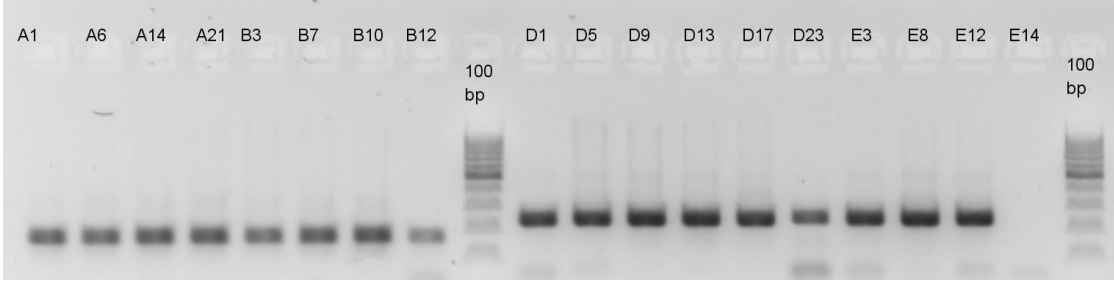


RNA örneklerinin temsili agaroz jel görüntüsü.

Ayrıca Agilent Bioanalyzer cihazı yardımıyla RNA kalite kontrolleri yapılmıştır. Temsili görüntü aşağıdadır:



EK 2. qRT-PZR sonrasında örneklerin %2 'lik jel görüntüsü (temsili).



A1-A6-A14-A21-B3-B7-B10-B12 nolu örnekler GAPDH geni; D1-D5-D9-D13-D17-D23-E3-E8-E12 nolu örnekler HER3 geni PZR ürününü temsil ederken E14 nolu örnek ise negatif kontrolü temsil etmektedir.



EK 3. miScript Primer Assay Dizileri.

<i>Ürün Adı</i>	<i>Katalog No</i>	<i>5' – 3' Dizisi</i>
Hs_miR-770-5p_2 miScript Primer Assay	MS00010584	UCCAGUACCACGUGUCAGGGCCA
Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay	MS00033740	–



EK 4. Transfekte hücrelerden elde edilen protein ölçüm sonuçları

<b>Örnek Adı</b>	<b>Konsantrasyon (ug/ul)</b>
BT-474_Control-1	2747.30728
BT-474_Control-2	2337.64564
BT-474_Mock-1	2422.23722
BT-474_Mock-2	1878.44517
BT-474_Scr-1	2181.1396
BT-474_Scr-2	2578.08057
BT-474_770-5p-1	1832.60337
BT-474_770-5p-2	2276.3498
BT-474_TAM-1	1795.685
BT-474_TAM-2	2352.53691
BT-474_TAM+scr-1	1866.56402
BT-474_TAM+scr-2	1792.32041
BT-474_TAM+770-5p-1	1974.86339
BT-474_TAM+770-5p-2	1773.23244
BT-474_TRAST	2114.84116
BT-474_TRAST	2153.0229
BT-474_TRAST+scr-1	1484.34669
BT-474_TRAST+scr-2	1641.99728

BT-474_TRAST+770-5p-1	1371.99556
BT-474_TRAST+770-5p-2	1400.86007
SK-BR-3_Control-1	1826.64007
SK-BR-3_Control-2	1635.82015
SK-BR-3_Scr-1	1269.28909
SK-BR-3_Scr-2	1414.65653
SK-BR-3_770-5p-1	1316.13862
SK-BR-3_770-5p-2	1365.26468
SK-BR-3_TRAST-1	1417.20030
SK-BR-3_TRAST-2	1490.69004
SK-BR-3_TRAST+scr-1	1522.39606
SK-BR-3_TRAST+scr-2	1633.65491
SK-BR-3_TRAST+770-5p-1	1452.69150
SK-BR-3_TRAST+770-5p-2	1411.70531
MDA-MB-231_Control-1	1992.69525
MDA-MB-231_Control-2	1995.2818
MDA-MB-231_Scr-1	2012.17311
MDA-MB-231_Scr-2	2313.17221
MDA-MB-231_770-5p-1	1972.56509
MDA-MB-231_770-5p-2	1919.40952

MDA-MB-468_Control-1	2575.29039
MDA-MB-468_Control-2	2882.32270
MDA-MB-468_Scr-1	2397.03302
MDA-MB-468_Scr-2	3110.56316
MDA-MB-468_770-5p-1	2985.33305
MDA-MB-468_770-5p-2	3906.19574
BT-20_Control-1	1110.05279
BT-20_Control-2	1135.83397
BT-20_Scr-1	1944.11614
BT-20_Scr-2	1812.68452
BT-20_770-5p-1	1684.11602
BT-20_770-5p-2	2117.90649
MDA-MB-157_Control-1	2616.82512
MDA-MB-157_Control-2	2397.12316
MDA-MB-157_Scr-1	2260.14355
MDA-MB-157_Scr-2	2318.50145
MDA-MB-157_770-5p-1	2334.61172
MDA-MB-157_770-5p-2	2810.09710
MDA-MB-231_Control-1 (inhibitor)	2298.67642
MDA-MB-231_Control-2 (inhibitor)	1878.37522

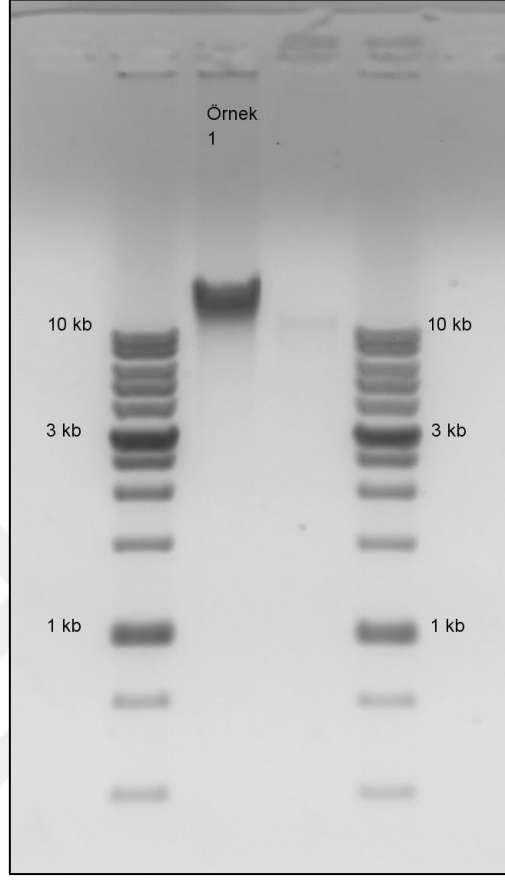
MDA-MB-231_Scr-1 (inhibitor)	1361.50146
MDA-MB-231_Scr-2 (inhibitor)	1421.14666
MDA-MB-231_770-5p-1 (inhibitor)	1232.37981
MDA-MB-231_770-5p-2 (inhibitor)	1603.36558
MDA-MB-468_Control-1 (inhibitor)	1872.16553
MDA-MB-468_Control-2 (inhibitor)	2024.43564
MDA-MB-468_Scr-1 (inhibitor)	2096.05928
MDA-MB-468_Scr-2 (inhibitor)	2525.28147
MDA-MB-468_770-5p-1 (inhibitor)	2124.60216
MDA-MB-468_770-5p-2 (inhibitor)	2244.05276
BT-20_Control-1 (inhibitor)	1810.16948
BT-20_Control-2 (inhibitor)	1495.75141
BT-20_Scr-1 (inhibitor)	1854.02269
BT-20_Scr-2 (inhibitor)	1514.99990
BT-20_770-5p-1 (inhibitor)	1223.87926
BT-20_770-5p-2 (inhibitor)	1470.08029
BT-474_Scr-1 (inhibitor)	2252.27039
BT-474_Scr-2 (inhibitor)	2241.82497
BT-474_770-5p-1 (inhibitor)	1870.27867
BT-474_770-5p-2 (inhibitor)	2061.40900

EK 5. DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve temsili jel görüntüsü.

<b>Örnek Adı</b>	<b>Konsantrasyon (ng/ul)</b>	<b>A260/280</b>
MDA-MB-231_Control_24h	112.9	1.98
MDA-MB-231_Scr_24h	184.6	2.00
MDA-MB-231_770-5p_24h	92.1	1.99
MDA-MB-231_Control_72h	186.0	1.99
MDA-MB-231_Scr_72h	95.6	2.02
MDA-MB-231_770-5p_72h	107.3	2.01
MDA-MB-157_Control_24h	218.9	1.98
MDA-MB-157_Scr_24h	208.2	2.04
MDA-MB-157_770-5p_24h	159.7	2.02
MDA-MB-157_Control_72h	137.8	2.00
MDA-MB-157_Scr_72h	189.6	1.96
MDA-MB-157_770-5p_72h	253.9	1.96



EK 5 devamı. temsili jel görüntüsü.

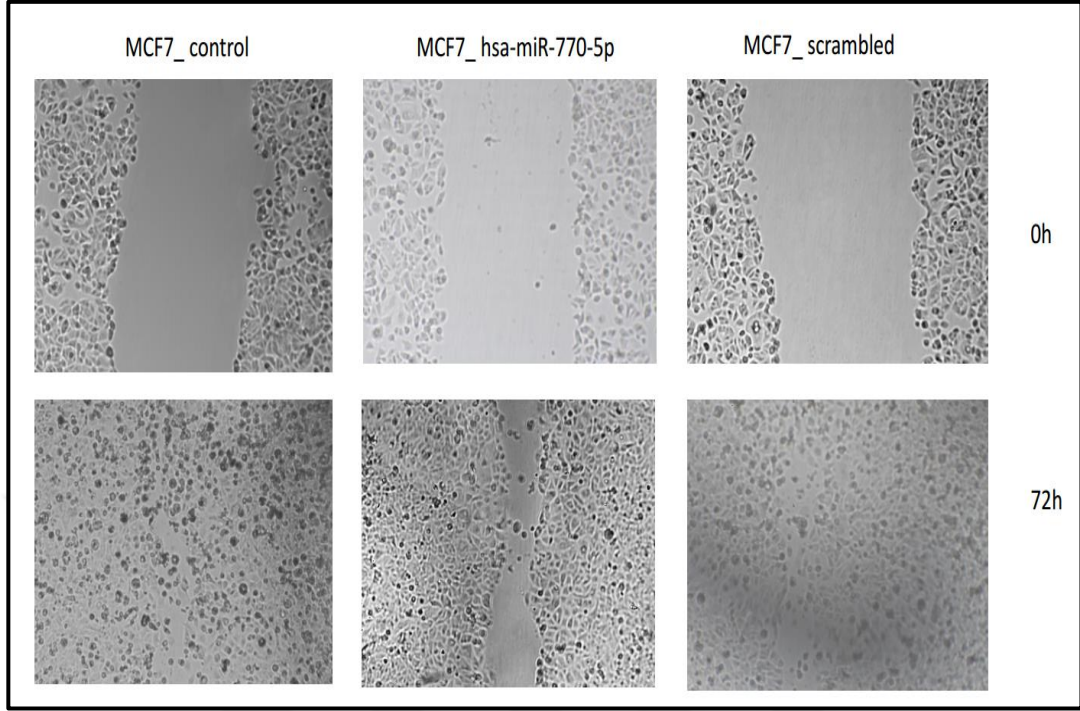


Temsili DNA örneğinin %1 'lik agaroz jeldeki görüntüsüdür.

EK 6. Reseptör pozitif hücrelerde trastuzumab ve tamoxifen uygulaması sonucunda ifadesi değişen miRNA'ların üç farklı hücre hattındaki ifade değişimi.

Ortak miRNA'lar	Kat Değişimi			
	BT-474		MCF-7	SK-BR-3
	Tamoxifen	Trastuzumab	Tamoxifen	Trastuzumab
miR-770-5p	1.60	1.66	1.80	2.13
miR-373*	-1.59	-4.02	-1.49	-3.42
miR-1260	-2.51	-	-2.22	-1.67
miR-1280	-2.24	-	-1.98	-1.61
miR-188-5p	-2.01	-	-2.79	-1.72
miR-490-3p	-2.42	-1.64	-1.53	-2.16
miR-99b	-1.72	-1.61	-1.72	-1.58
miR-7-2*	-2.99	-	-1.84	-2.65
miR-335*	-2.41	-	-1.63	-1.97
miR-328	-2.14	-	-1.61	-2.88
miR-637	-2.05	-	-2.58	-1.75
miR-30a*	-1.67	-	-1.53	-1.92

EK 7. MCF-7 hücrelerinde miR-770-5p mimic transfeksiyonu ardından yara iyileşme deneyi sonucunda elde edilen görüntüler.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : SENEM NOYAN

**Doğum Yeri** : ANKARA

**Doğum Tarihi** : 25/09/1984

### **Eğitim Bilgileri**

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (Yüksek Lisans, 2012 -2015)

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Lisans, 2002-2007)

Çankaya Anadolu Lisesi (2002)

### **İş Denevimi**

- Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BAP, 18L0415001, “Üçlü Negatif meme kanseri hücrelerinde miRNA tabanlı antikanser etki mekanizmalarının belirlenmesi”, 2017-2019, Araştırmacı.
- Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BAP, 13B4143001 “Tamoxifen ve Trastuzumab’a duyarlı meme kanseri hücrelerinde Tamoxifen ve Trastuzumab miRNA profillerinin araştırılması ” 2012-2015, Araştırmacı.
- DAMAGEN Genetik Araştırma ve Tanı Merkezi (2010 - )
- Ay-Ka Ltd.Şti.( Haziran 2007 –Ocak 2010)

### **Üyelikler**

The European Association for Cancer Research (EACR), U.K. (Üye)

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği (tbgder) Türkiye (Üye)

### **Burslar**

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Bursu (2013)

## **Katılan Kongreler**

- TBGK 2019 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi , Ekim 2019 (Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma Ödülü Poster Sunumu)
- IABCR 2019 (International Association for Breast Cancer Research), Nisan 2019, (Poster)
- 7. Multidisipliner Kanser Araştırma&1. Temel Onkoloji Kongresi, Ekim 2018 (Poster)
- EACR-25 (25TH BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH), Haziran 2018 (Poster)
- 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi , Ekim 2017 (Poster)
- 29. Avrupa Pataloji Kongresi , Eylül 2017 (Poster)
- VI. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi , Mayıs 2017 (Poster)
- EORTC – NCI – AACR Sempozyum, Kasım 2016 (Poster)
- FEBS, Eylül 2016 (Poster ve Sözlü Sunum)
- Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği, IV. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Kasım 2015 (Poster)
- 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2015 (Poster)
- ENDO 2015: The Endocrine Society Annual Meeting, Mart 2015 (Poster)
- EMBO Meeting, Kasım 2014 (Poster)
- Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği, III. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Eylül 2014 (Poster)
- EACR (European Association Cancer Research) , Temmuz 2014
- Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü , Kasım 2013
- Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi , Mayıs 2009
- Uluslararası Tıbbi Genetik kongresi , Mayıs 2008
- Biyoteknoloji , Nanobiyoteknoloji ve Genom Teknolojileri Kongresi (NANOMAT) , 29 Ekim – 3 Kasım 2007 (Affymetrix Uygulamaları sunum)

## **Kurslar ve Sertifikalar**

“Hücre Ölümünde Biyoinformatik Yaklaşımlar” Gebze, Türkiye, 11 Şubat 2017

“Hücre Ölümünde Yeni Teknolojiler” Gebze, Türkiye, 10 Şubat 2017

“Ulusal ve Uluslararası Proje Yazma İlkeleri” Gebze, Türkiye, 09 Şubat 2017

“Moleküler Biyolojide Biyoinformatik Uygulamalar” Ankara, Türkiye, 25-26 Haziran 2015

“MLPA Workshop”, MRC-Holland, Ankara, Türkiye, 2014

“Cytoscape 2.8 ile Network Analizi Uygulamalı Eğitimi”, Ankara, Türkiye, 15 Kasım 2014.

“1.Biyogüvenlik Eğitimi”, Ankara, Türkiye, 28 Mart 2014.

## **Yayınlar**

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “Involvement of miR-770-5p in trastuzumab response in HER2 positive breast cancer cells” PLoS ONE 14(4): e0215894, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894>.

Yasemin Öztemur Islakoğlu, **Senem Noyan**, Alp Aydos, Bala Gür Dedeoğlu, “Meta-miRNA biomarker signatures to classify breast cancer subtypes” OMICS A Journal of Integrative Biology Volume 22, Number 11, 2018, DOI: 10.1089/omi.2018.0157.

Yasemin Öztemur Islakoğlu, **Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “hsa-miR-301a and SOX10-dependent miRNA-TF-mRNA regulatory circuits in breast cancer”, Turk J Biol (2018) 42: 103-112. doi:10.3906/biy-1708-17.

Akin S, **Noyan S**, Dagdelen S, Pasaoglu I, Kaynaroglu V, Askun MM, Bilen CY, Kiratli H, Baydar DE, Onder S, Sokmensuer C, Aytemir K, Erkin G, Kiratli PO, Alikasifoglu M, Erbas T, “Unusual presentations of Carney Complex in patient with a novel PRKAR1A mutation”, Neuro Endocrinol Lett. 2017.

Aydos A, Gurel A, Oztemur Islakoglu Y, **Noyan S**, Gokce B, Ecemis T, Kaya C, Aksu AT, Gur Dedeoglu B, “Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells”, PLoS One. 2016; 11(12): e0168875. doi:10.1371/journal.pone.0168875

### **Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

**Senem Noyan**, Fatma Funda Demirsoy, Ayşegül Yücel Polat, Bala Gür Dedeoğlu, “*Overexpression of miR-770-5p regulates acquired trastuzumab resistance*”, IABCR 2019 (International Association for Breast Cancer Research), Nisan 2019, Poster Sunumu.

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “*hsa-miR-X regulates cell proliferation on BT-20 cells by the induction of autophagy signaling pathway*”, MOKAD-2018, Ekim 2018, Poster Sunumu.

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu “*Antitumor activity of hsa-miR-X in HER2 positive cells is mediated by the regulation of AKT and ERK*”, EACR-25 (25TH BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH), Haziran 2018, Poster Sunumu, *ESMO Open 2018;3:doi: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.867*

**Senem Noyan**, Ali Emre Akpınar, Bala Gür Dedeoğlu, Aynur Karadağ, “*Metilsülfonilmetanın ER(+)* Meme Kanseri Hücre Hatlarında Tamoxifen’in Antikanser Etkinliği Üzerine Etkisi”, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2017, Poster Sunumu

Yasemin Oztemur Islakoglu, **Senem Noyan**, Bala Gur Dedeoglu, “*hsa-miR-501-3p is a Stable Endogenous Control for Breast Tumors*”, VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul – Türkiye, 22 – 25 Mayıs 2017, Poster Sunumu, *Turkish Journal of Molecular Biology and Biotechnology May 2017 Volume 2, Number 01, Supplement 01.*

Ayşegül Yücel Polat, Yasemin Öztemur Islakoğlu, Alp Aydos, **Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “*Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples*”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam – Hollanda, 2 – 6

Eylül 2017, Poster Sunumu, *Springer European Journal of Pathology September 2017, Volume 471, Supplement 1.*

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “*The role of hsa-miR-X in cell motility and invasion in triple-negative breast cancer cell lines*” 28<sup>th</sup> EORTC- NCI- AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Münih-Almanya, 29 Kasım – 2 Aralık 2016, Poster Sunumu, *Elsevier European Journal of Cancer September 2016, Volume 68, Supplement 1.*

**Senem Noyan**, Nil Kılıç, Yasemin Öztemur, Bala Gür Dedeoğlu, Demet Cansaran-Duman, “*Determination of miRNAs of usnic acid lichen seconder metabolite using high-throughput technology*” 41<sup>st</sup> FEBS Congress Molecular and Systems Biology for a Better Life, Kuşadası – Türkiye, 3 - 8 Eylül 2016, Sözlü Sunum, *The FEBS Journal Volume 283 Supplement 1 September 2016*

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “*Hsa-miR-X modulates motility and invasion in triple breast cancer cell line*”, 41<sup>st</sup> FEBS Congress Molecular and Systems Biology for a Better Life, Kuşadası – Türkiye, 3 - 8 Eylül 2016, Poster Sunumu, *The FEBS Journal Volume 283 Supplement 1 September 2016*

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “*Hsa-miR-X regulates cell motility in breast cancer cell lines*” 4. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 27-29 Kasım 2015, Poster Sunumu

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “*Meme Kanseri Hücrelerinde hsa-miR-770-5p'nin Antiproliferatif Etkisi*” 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Ölüdeniz, Fethiye, Türkiye, 27-30 Ekim 2015, Poster sunumu

Safak Akin, **Senem Noyan**, Selcuk Dagdelen, Ilhan Pasaoglu, Volkan Kaynaroglu, Melike Mut Askun, Hayyam Kiratli, Dilek Ertoy Baydar, Sevgen Onder, Cenk Sokmensuer, Kudret Aytemir, Gul Erkin, Mehmet Alikasifoglu and Tomris Erbas. “*A Novel PRKARIA Mutation in a Patient with Carney Complex*”, ENDO 2015, 5-8 Mart 2015 San Diego , California - Amerika, 2015, Poster sunumu



Ezel Cilek, **Senem Noyan**, Bala Gur Dedeoglu. “*Identification of trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer by integration of two high-throughput Technologies*” EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology 08 - 11 November 2014 Heidelberg - Almanya, Poster sunumu

**Senem Noyan**, Ezel Cilek, Bala Gur Dedeoglu. “*Revealing the trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer cell lines by qPCR-based array*”, 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 2014, İzmir - Türkiye, Poster sunumu



## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “Involvement of miR-770-5p in trastuzumab response in HER2 positive breast cancer cells” PLoS ONE 14(4): e0215894, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894>.

## TEZDEN ÇIKAN BİLDİRİLER

**Senem Noyan**, Fatma Funda Demirsoy, Ayşegül Yücel Polat, Bala Gür Dedeoğlu, “*Overexpression of miR-770-5p regulates acquired trastuzumab resistance*”, IABCR 2019 (International Association for Breast Cancer Research), Nisan 2019, Poster Sunumu.

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, “*hsa-miR-X regulates cell proliferation on BT-20 cells by the induction of autophagy signaling pathway*”, MOKAD-2018, Ekim 2018, Poster Sunumu.

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu “*Antitumor activity of hsa-miR-X in HER2 positive cells is mediated by the regulation of AKT and ERK*”, EACR-25 (25TH BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH), Haziran 2018, Poster Sunumu, *ESMO Open* 2018;3:doi: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.867

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “*The role of hsa-miR-X in cell motility and invasion in triple-negative breast cancer cell lines*” 28<sup>th</sup> EORTC- NCI- AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Münih-Almanya, 29 Kasım – 2 Aralık 2016, Poster Sunumu, *Elsevier European Journal of Cancer* September 2016, Volume 68, Supplement 1.

**Senem Noyan**, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu, “*Hsa-miR-X modulates motility and invasion in triple breast cancer cell line*”, 41<sup>st</sup> FEBS Congress Molecular and Systems Biology for a Better Life, Kuşadası – Türkiye, 3 - 8 Eylül 2016, Poster Sunumu, *The FEBS Journal* Volume 283 Supplement 1 September 2016

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, "Hsa-miR-X regulates cell motility in breast cancer cell lines" 4. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 27-29 Kasım 2015, Poster Sunumu

**Senem Noyan**, Bala Gür Dedeoğlu, "Meme Kanseri Hücrelerinde hsa-miR-770-5p'nin Antiproliferatif Etkisi" 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Ölüdeniz, Fethiye, Türkiye, 27-30 Ekim 2015, Poster sunumu



## RESEARCH ARTICLE

## Involvement of miR-770-5p in trastuzumab response in HER2 positive breast cancer cells

Senem Noyan<sup>1</sup>, Hakan Gurdal<sup>2</sup>, Bala Gur Dedeoglu<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey, <sup>2</sup> Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey\* [gurbala@yahoo.com](mailto:gurbala@yahoo.com)

## Abstract

miRNAs may play effective roles in breast cancer so modulating their expression levels could have therapeutic benefits. Recent studies have found the combination of miRNA-based therapeutics with conventional drugs as promising. This study aimed to find drug-responsive miRNAs, and explore their anticancer activities in HER2+ breast cancer cells and regulatory role in the trastuzumab response. qRT-PCR-array analysis was performed with effective concentrations of tamoxifen and trastuzumab treated BT-474, SK-BR-3 and MCF-7 cells. Motility and invasion analyses were performed with wound healing and xCELLigence impedance-based assays respectively. Viability of cells following mimic transfection and drug treatment was assessed by WST-1 assay. Western blot analysis was used to assess miR-770-5p regulation of proteins and their phosphorylated forms. The clinical relevance of miR-770-5p was examined by TCGA data analysis. The qRT-PCR-array results indicated that miR-770-5p was responsive in a drug and cell line independent manner. Over-expression of miR-770-5p inhibited the motility and cell invasion through regulation of AKT and ERK proteins. Additionally, miR-770-5p potentiated the effectiveness of trastuzumab. Thus, regulating the expression level of miR-770-5p in combination with trastuzumab treatment may simultaneously inhibit the downstream elements of PI3K and MAPK signalling, thereby blocking the proliferation, motility and invasion capacities of HER2+ breast cancer cells.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Noyan S, Gurdal H, Gur Dedeoglu B (2019) Involvement of miR-770-5p in trastuzumab response in HER2 positive breast cancer cells. PLoS ONE 14(4): e0215894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894>

**Editor:** Amir Ahmad, University of South Alabama Mitchell Cancer Institute, UNITED STATES

**Received:** January 14, 2019

**Accepted:** April 10, 2019

**Published:** April 22, 2019

**Copyright:** © 2019 Noyan et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was funded by Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit, Project number 1384143001 to BGD.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** BC, Breast Cancer; DE, Differentially Expressed; ER, Estrogen Receptor; ER $\alpha$ , Estrogen

## Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women, constituting approximately 30% of all cancer types [1]. Breast cancer is a heterogeneous disease with complex clinical behavior and responses to therapeutic intervention [2,3]. It is classified based on gene expression profiling, including HER2 positive (HER2+), luminal A or B, basal-like and presence of hormone receptors [4]. Approximately 70% of human breast cancers are estrogen receptor alpha positive (ER+), so anti-estrogen therapy is an effective treatment [5]. Tamoxifen citrate (TAM), which competes with the estrogen that binds to the estrogen receptor (ER), was the first selective estrogen receptor modulator (SERM) to be developed [6]. Tamoxifen has been used clinically for over 30 years as a partial agonist of ER to reduce the risk of recurrence and contralateral

receptor alpha positive; HER2+, HER2 positive; HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; MBC, Metastatic breast cancer; miRNAs, MicroRNAs; PR, Progesterone Receptor; TAM, Tamoxifen citrate; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TNBC, Triple Negative Breast Cancer.

neoplasia in breast cancer treatment. However, the development of resistance to this drug is inevitable because of molecular crosstalk mechanisms in the tumor cells [7,8]. Additionally, HER2+ tumors, which constitute 25% of breast cancers, are also known to show resistance to tamoxifen and standard chemotherapeutic approaches [8–10]. Trastuzumab (Herceptin) is a FDA-approved recombinant humanized monoclonal antibody developed against the extracellular domain of the HER2 protein, which is currently used as a therapy for HER2-overexpressing breast cancer patients [11–14]. Elucidation of the molecular mechanism of trastuzumab treatment is therefore important as it may contribute to determining the resistance mechanisms of tumor cells to this drug.

MicroRNAs (miRNA), which are 20–25 nucleotides long, non-coding RNAs, are endogenous RNA molecules that are evolutionarily conserved and repress gene expression post-transcriptionally. These regulatory molecules play important roles in various cellular processes, such as differentiation, cell growth and apoptosis. Since these processes are generally dysregulated in cancer, the relationship between miRNAs and cancer is quite important and solid [15]. miRNAs are deregulated in breast cancer and various types of other human cancers [11,15]. Since miRNAs may play effective roles in disease progression, they represent potential therapeutic targets for cancer as well. Modulating miRNA expression levels could provide effective disease therapies [16,17].

miRNAs play regulatory roles in breast cancer progression and have the potential to reverse resistance to drugs like tamoxifen [18–20]. A few studies have investigated the relationship between drugs and miRNAs. One recently showed that miR-210 levels in plasma might be associated with trastuzumab resistance in patients [13]. Others found an effect of trastuzumab on the expression of miRNAs. However, these studies only focused on the oncogenic and tumor suppressor functions of individual miRNAs in trastuzumab sensitive or resistant cell lines [14–19] failing to explain the complexity of miRNA-mediated drug mechanisms.

In this study, we determined the expression profiles of miRNAs in tamoxifen and trastuzumab-sensitive breast cancer cell lines by qRT-PCR-array analysis to explain the common molecular mechanisms of these two drugs. Among the differentially expressed miRNAs, only one common miRNA, miR-770-5p, was responsive in a drug and cell line independent manner. Bioinformatics analysis, together with the experimental results, indicated that HER2 signaling was one of the targets of miR-770-5p. We showed that overexpression of miR-770-5p potentiated the effect of trastuzumab, especially in BT-474 cells. When miR-770-5p was overexpressed in the presence of trastuzumab, there was downregulation in the total or phosphorylated levels of AKT and ERK. This downregulation of the major regulator proteins of PI3K and MAPK signaling may explain the potentiation mechanism of miR-770-5p in HER2+ cells.

## Compliance with ethical standards

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## Materials and methods

### Cell lines and culture

Three human breast cancer cell lines (BT-474, SK-BR-3, MCF-7) were obtained from the American Type Culture Collection and maintained in DMEM or McCoy medium supplemented with 10% FCS. All cell lines were cultured in humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The molecular characteristics of these cell lines are summarized in [Table 1](#).

Table 1. Molecular classification of human breast cancer cell lines.

Cell lines Source	Subtype	Immunoprofile
BT-474	Luminal B	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+</sup> , HER2 <sup>+</sup>
SK-BR-3	HER2	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+</sup> , HER2 <sup>+</sup>
MCF-7	Luminal A	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+</sup> , HER2 <sup>-</sup>

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.t001>

### Tamoxifen or trastuzumab treatment and cell proliferation analysis

Tamoxifen (Cat. No: 54965-24-1), purchased from Tocris (Minneapolis, MN, USA), was dissolved in ethanol as a 100  $\mu\text{mol/ml}$  stock solution. Trastuzumab (Herceptin) was obtained from Roche (Basel, Switzerland).

For the drug sensitivity test, two experimental designs were applied. First, MCF-7 and BT-474 cells were seeded at densities of  $3 \times 10^3$  and  $6 \times 10^3$  cells/ml respectively and cultured in 8 different concentrations of tamoxifen (100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1  $\mu\text{mol/ml}$ ) for 3 days. Control cells were treated with the same concentrations of ethanol in the culture medium. For trastuzumab treatment, SK-BR-3 and BT-474 cells were plated in 96-well microtiter plates at a concentration of  $6 \times 10^3$ /well, and cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> overnight before treatments. The cells were incubated with decreasing trastuzumab concentrations (300, 60, 30, 6, 2, 0.5 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 3 days. Control groups received PBS at a concentration equal to that in the drug-treated cells.

Cell proliferation was measured using WST1 assay. Briefly, the cells were plated in 96-well plates at  $8 \times 10^3$  per well in a final volume of 100  $\mu\text{l}$ , before exposure to trastuzumab or tamoxifen at the aforementioned concentrations for 3 days. 10  $\mu\text{l}$  of WST-1 reagent was added to each well on day 3. Incubation of the cells at 37°C for 3 h was followed by measuring absorbance at 480 nm on a Wallac Victor Counter (Perkin Ekmer, USA). The IC<sub>50</sub> value, which represents the drug concentration required for 50% growth inhibition, was calculated with Graphpad Prism version 6.04 software (California, CA, USA).

### miRNA expression analysis by quantitative real-time PCR array

For miRNA profiling, a SYBR green-based miScript miRNA PCR Array (MIHS-3216ZG) was used (Qiagen). Endogenous controls, normalization controls, miRNA reverse transcription and positive controls were also tested for each array. After treatment of the cells with the effective concentrations of the drugs, total RNA was isolated using QIAzol reagent (Qiagen) according to manufacturer's instructions, reverse transcribed to cDNA and used to measure miRNA expression. The plates were run on a Roche Light Cycler 480 instrument to analyze the expression of miRNAs using the obtained Ct values. The specificity of the miRNA assays was confirmed from the melting curves of the PCR products.

### Validation of real-time PCR array

Mature miR-770-5p levels were quantified with Qiagen miRNA assays. Quantitative PCR was performed using SYBR mix (Qiagen) on a Roche Light Cycler 480. U6 snRNA (MS00033740) was used as the internal control (Qiagen). Relative expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method while fold changes were calculated using the equation  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

### Transfection with miRNA modulator

$4 \times 10^5$  cells were seeded in six-well plates and transfected with the effective concentration, 25 nM, of either the miRNA mimic (MSY0003948) or the negative scrambled control (scr, SI03650318) using HiPerFect Transfection Reagent (301705) (Qiagen, Germany). After an

incubation period of 48 h or 72 h, cells were harvested using a cell scraper in ice-cold PBS. The RNA and protein were isolated for further qPCR and western blot analysis respectively.

Viability of breast cancer cells after transfection of miR-770-5p miRNA mimic was measured by the same WST1 protocol.

The synergistic effect of trastuzumab with miR-770-5p was also analyzed. For this purpose, cells were treated with miR-770-5p mimic or scrambled control RNA with varying doses of the drug for 48 h. After incubation, the same WST1 protocol was applied to the cells.

### Wound healing assay

For the wound healing assay, cells ( $5 \times 10^5$ /well) were seeded into six-well plates and cultured under standard conditions. When the cells reached confluency, they were transfected with miR-770-5p mimic or the scrambled control. A wound was performed with a 20  $\mu$ L tip on confluent BT-474, SK-BR-3 and MCF-7 cells ( $t_0$ ). We observed and photographed the cells with a microscope at 0, 24, 48 and 72 hours after transfection. Gap widths at  $t_0$  and  $t_{final}$  were measured and the average gap width ratio of miR-770-5p transfected cells was normalized to that of control cells using Tscracth [21].

### Invasion assay

Cell invasion analysis was performed with xCELLigence real-time cell analyser. At 24h post-transfection with miRNA mimic,  $4 \times 10^4$  BT-474 and SK-BR-3 cells in 200  $\mu$ L of serum-free medium were seeded into the upper chamber of the ACEA Biosciences Inc. CIM-plate wells (Cat. No: 2801038), fitted with a microporous membrane of matrigel separating the upper and lower chamber. The lower chamber was filled with culture medium supplemented with 10% FBS as a chemoattractant. Cell invasion was monitored for 24 hours with xCELLigence real-time cell analyser, using CIM-plate and measuring impedance-based signals.

### Western blot analysis

Cells in culture were lysed using Complete Lysis-M kit (Roche). The protein concentrations of the lysates were quantified using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific). 10  $\mu$ g of protein for each sample were loaded on to 8% SDS-PAGE gel. Separated proteins were transferred to a PVDF membrane (L-08008-001, Advanta) in wet transfer buffer. Membranes were blocked with 5% milk in TBST (0.5%) for 1 hour at room temperature before incubation at +4°C overnight with the following antibodies: HER2 (1:1000, ab8054, Abcam), total AKT (1:1000, sc8312, SantaCruz), phospho-AKT (Ser 473, 1:1000, sc-7985-R, SantaCruz), total ERK2 (1:1000, sc-154, SantaCruz), phospho-ERK 1/2 (Thr 202 / Tyr 204, 1:1000, sc-81492, SantaCruz) and beta-actin (1:1000, 634801, Biologend) in 3% milk powder-TBST. After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, the protein bands were detected using WesternBright Sirius Kit (K-12043-D20, Advanta).

### Target prediction and pathway analysis

Predicted miRNA targets were retrieved from the mirWalk2.0 target prediction tool, which collects data from 12 different programs (mirWalk, miRDB, PITA, MicroT4, miRMap, RNA22, miRanda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2, TargetScan) [22]. To assess the functional enrichment of the gene list, we used Webgestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit) [23].

### Statistical analysis

All the experiments were performed with a minimum of two biological and two technical replicates each. Student's t-test was performed to test the differences, which were considered to be statistically significant at a p-value of less than 0.05 between two samples. The nonlinear regression (curve fit) method was used to analyze dose-response data for mimic transfection with drug only or drug plus miR-770-5p.

## Results

### Identification of tamoxifen or trastuzumab-responsive microRNAs

The putative roles of miRNAs in tamoxifen or trastuzumab responses were investigated by miRNA qRT arrays to search for differentially-expressed miRNAs between three different breast cancer cell lines.

The miRNA qRT array results showed that, for trastuzumab treatment, 53 miRNAs were differentially expressed in BT-474 cells (3 upregulated, 50 downregulated) while there were 101 DE miRNAs for SK-BR-3 cells (6 upregulated, 95 downregulated) (S1 Table). Those miRNAs that showed more than 1.5-fold difference in expression level at  $p < 0.05$  were selected as DE miRNAs. When the DE miRNA lists for the two cell lines were intersected, 64 miRNAs were found to be commonly responsive to trastuzumab, of which 62 downregulated and 2 upregulated (Fig 1A). The array analysis results indicated that 65 and 68 miRNAs were found to be tamoxifen-responsive in MCF-7 and BT-474 cells respectively (S1 Table). Among the responsive miRNAs, 19 were upregulated in MCF-7 cells while 47 were downregulated. For BT-474 cells, out of 68 DE miRNAs, 2 were upregulated and 66 were downregulated. DE miRNAs in tamoxifen-treated MCF-7 and BT-474 cells were compared with VENNY and 17 common downregulated miRNAs and 1 common upregulated miRNAs were detected (Fig 1A). When all the DE expressed lists were intersected, miR-770-5p was significantly responsive in a cell and drug-independent manner with consistent upregulation (Fig 1B).

### Targets of miR-770-5p participate in cancer-related pathways

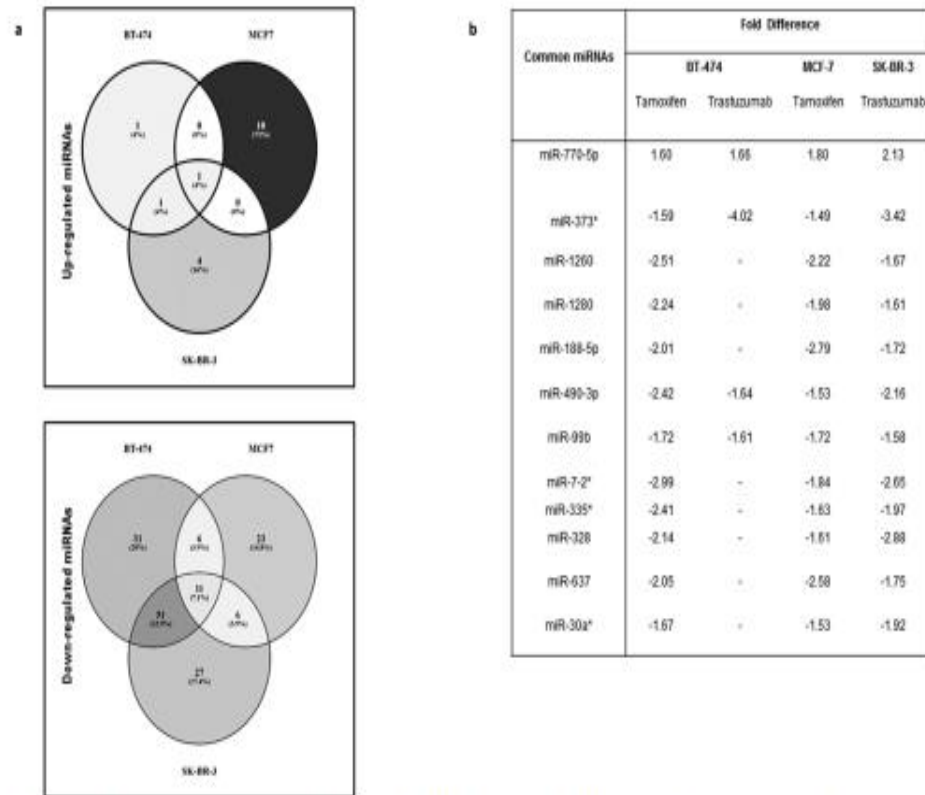
Having determined that miR-770-5p was a common drug target in each cell line, we wanted to further characterize its potential molecular function. Through the use of the target prediction software mirWalk2.0 [20], we identified the predicted targets of miR-770-5p. Pathway enrichment analysis results showed that the target genes enriched significantly in pathways related to cancer progression, such as ErbB, Insulin and MAPK signaling pathways (Table 2).

Additionally, we assessed miR-770-5p expression level in breast tumor tissues in TCGA breast cancer BRCA (n = 1247) cohort using XenaBrowser [24]. miR-770-5p expression was significantly downregulated in tumor samples compared to normal samples ( $f = 10.44$ ,  $p < 0.00005621$ ) (Fig 2), which led us to upregulate the expression of miR-770-5p in tumor cells as a strategy to explore its molecular function in cancer cells.

### Motility and invasion are regulated by miR-770-5p

To determine the effect of miR-770-5p overexpression on cell motility, wound-healing assays were performed after mimic transfection. The wound closure in the scratched was quantitated over 72 hours. miR-770-5p overexpression decreased the cells' motility capacity compared to scrambled control-transfected cells. Wound closure was 100% in both BT-474 and SK-BR-3 cells when transfected with negative control. However, it reduced to 20% in both cell lines in a miR-770-5p overexpression-dependent manner (Fig 3A). Additionally, monitoring with xCELLigence-based invasion assay revealed that miR-770-5p overexpression decreased the





**Fig 1. Trastuzumab and Tamoxifen responsive miRNAs were identified by qRT-PCR Array.** (a) HER2+ and ER+ BT-474 cells were treated with both tamoxifen and trastuzumab while ER+ MCF-7 cells and HER2+ SK-BR-3 cells were only treated with tamoxifen and trastuzumab respectively. There was only one common responsive miRNA among upregulated miRNAs; 11 miRNAs were commonly downregulated in all cell lines. The common responsive miRNAs are listed in b.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g001>

cells' invasion kinetics (Fig 3B). Assessment of the proliferative activity of the mimic-transfected cells showed that miR-770-5p did not affect cell proliferation by itself (S1 Fig).

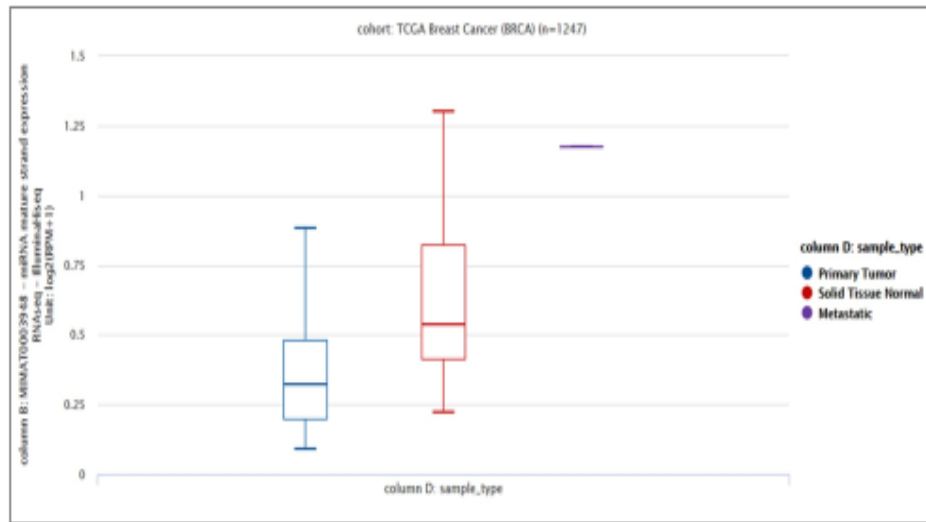
### Upregulation of miR-770-5p changes cellular response to trastuzumab in HER2 (+) breast cancer cells

The pathway enrichment analysis results suggested that miR-770-5p might function as a mediator of the HER2 signaling pathway (Table 2). Furthermore, according to the mirWalk results, HER2 was predicted to be regulated by miR-770-5p. Supporting this prediction, we

**Table 2. Pathway enrichment analysis results conducted with the targets of miR-770-5p.**

KEGG Pathway Name	Number of Genes	Statistics
ErbB Signaling Pathway	47	P = 3.67e-18
Calcium signaling pathway	71	P = 8.01e-18
Insulin signaling pathway	64	P = 6.69e-20
Focal adhesion	91	P = 2.84e-27
MAPK signaling pathway	109	P = 2.27e-27

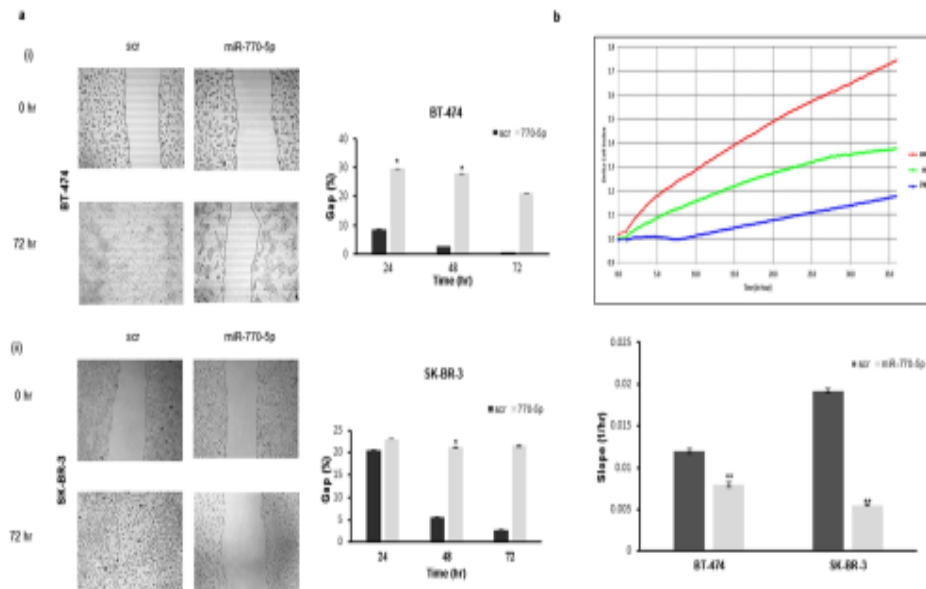
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.t002>



**Fig 2. Lower expression of miR-770-5p is associated with tumor samples.** Expression level of miR-770-5p was downregulated in tumor samples compared to normal samples (One-way ANOVA;  $p < 0.00005621$ ,  $f = 10.44$ ).

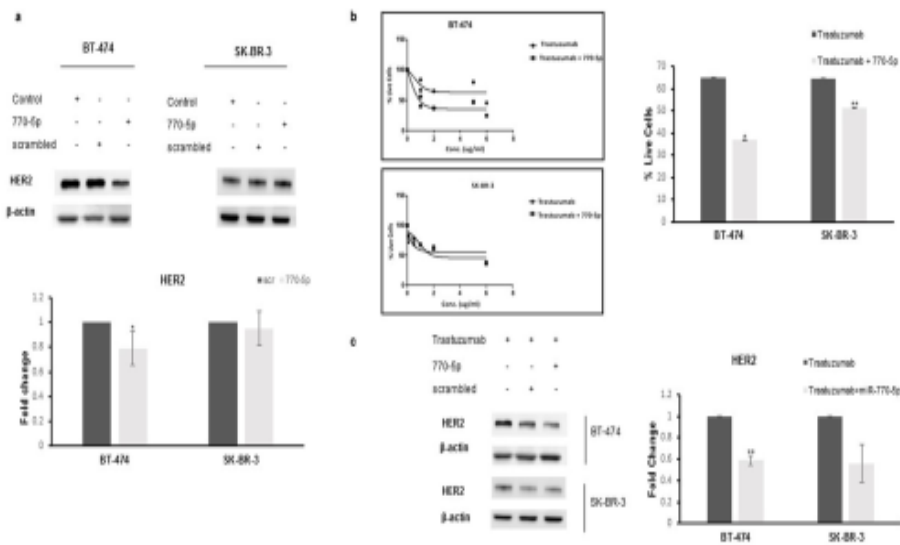
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g002>

demonstrated that upregulation of miR-770-5p slightly decreased the expression level of HER2 protein in BT-474 cells (Fig 4A). To clarify whether miRNA upregulation in cells by mimic transfection increases the growth-inhibitory effect of trastuzumab, the sensitivity of HER2



**Fig 3. miR-770-5p regulates motility and invasion in BT-474 and SK-BR-3 cells.** (a) The rate of motility was assessed by wound-healing assay. Wound closure was observed in scrambled control-transfected cells in a time-dependent manner while miR-770-5p mimic transfected cells lost their motility ( $n = 2$ ,  $*p < 0.005$ ). (b) Cell invasion analysis was performed by xCELLigence real-time cell analyzer measuring impedance-based signals. Cell invasion capacity decreased in both of the cells transfected with miR-770-5p mimic compared to scrambled control-transfected cells ( $n = 2$ ,  $**p < 0.0001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g003>



**Fig 4. miR-770-5p overexpression downregulated HER2 and increased the effect of trastuzumab.** (a) The protein expression level of HER2 was slightly diminished in both cell lines following miR-770-5p transfection  $n = 3$ ,  $p < 0.05$ . (b) Combinational treatment of cells with trastuzumab and miR-770-5p decreased cell viability in BT-474 and SK-BR-3 cells ( $n = 3$ ,  $*p < 0.001$ ,  $**p < 0.05$ ); HER2 expression also reduced significantly, especially in BT-474 cells ( $**p < 0.05$ ).

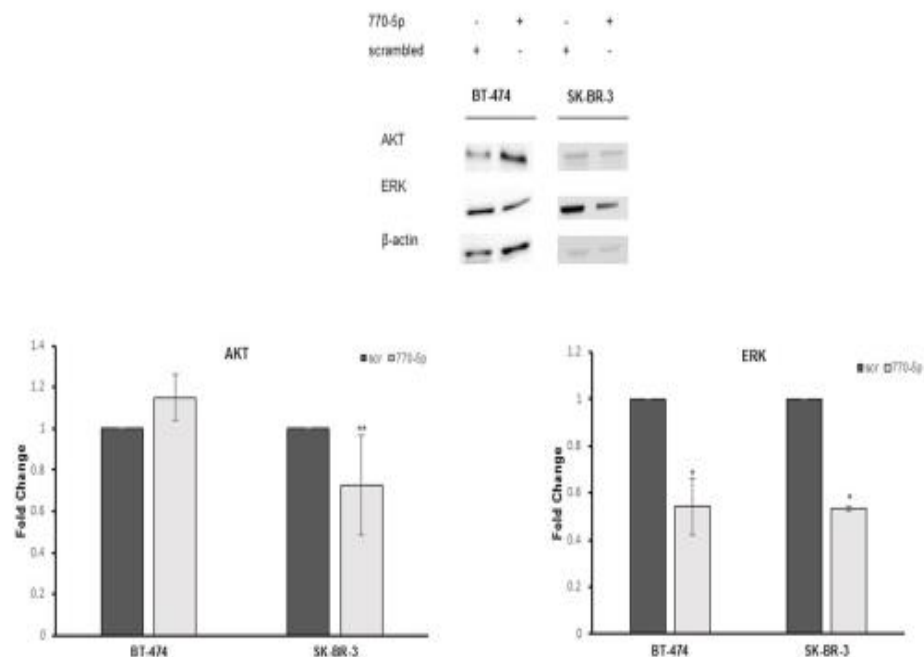
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g004>

overexpressing cells (BT474 and SKBR3) to trastuzumab treatment was analyzed by WST1 assay after miR-770-5p mimic transfection. This showed that the effect of trastuzumab increased with upregulation of miRNA in the cells by decreasing the percentage of living cells from 60% to 40% in BT-474 cells and from 60% to 50% in SK-BR-3 cells (Fig 4B). In addition, HER2 protein levels decreased significantly in both cell lines when the cells were treated with a combination of trastuzumab and miR-770-5p. That is, miR-770-5p potentiated the effect of trastuzumab in HER2+ cells (Fig 4C).

### miR-770-5p regulates cancer cell behavior by targeting several genes involved in the HER2 signaling pathway

From the bioinformatics analysis, HER2 was predicted to be the target of miR-770-5p and our protein results supported the regulative effect of miR-770-5p on HER2. To explore the role of miR-770-5p on the HER2 signaling pathway, downstream elements were assessed in miR-770-5p-overexpressing BT-474 and SK-BR-3 cells. The total or phosphorylation states of AKT and ERK, which are major regulator proteins of PI3K and MAPK signaling respectively, were examined.

The protein analysis results showed that total ERK expression level was downregulated in both cell lines through miR-770-5p overexpression alone compared to control cells, while total AKT level was only diminished significantly in SK-BR-3 cells (Fig 5; t-test,  $p < 0.05$ ). Hence, the expression levels of total and phosphorylated forms of AKT and ERK proteins were analysed in BT-474 cells to determine the response to trastuzumab combined with miR-770-5p. In the presence of trastuzumab, total protein levels of both AKT and ERK were downregulated while p-AKT and p-ERK levels also decreased significantly (Fig 6; t-test,  $p < 0.05$ ).



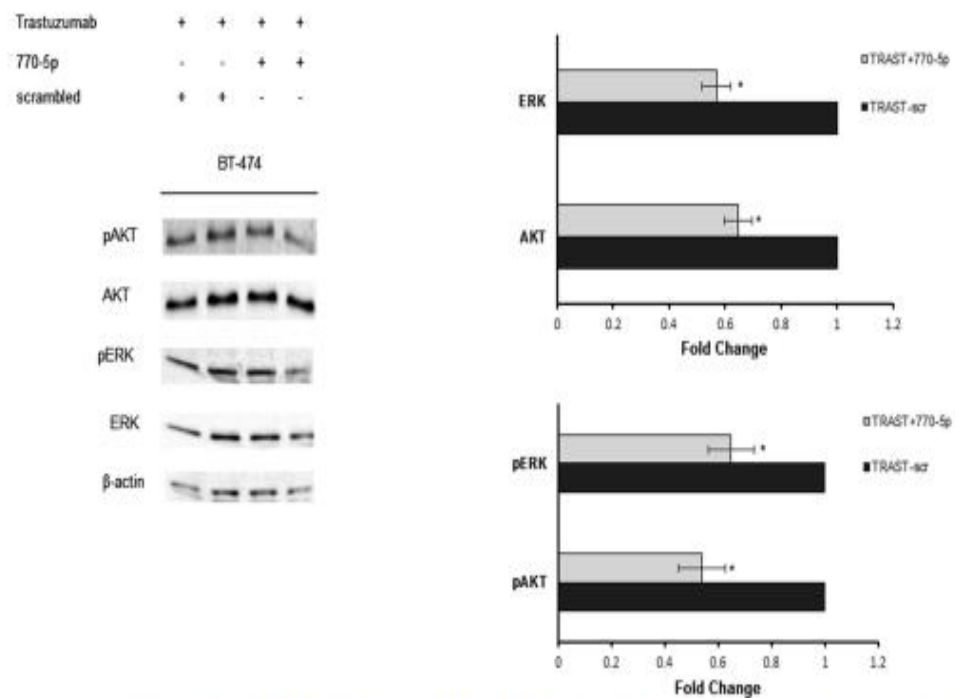
**Fig 5.** miR-770-5p targeted total ERK in BT-474 and SK-BR-3 cells. Protein expression of total AKT and ERK were detected in BT-474 and SK-BR-3 cells transfected with miR-770-5p mimics and scrambled control (scr). ERK expression decreased in BT-474 cells after mimic transfection ( $n = 4$ ,  $*p < 0.01$ ). Both the ERK expression and the AKT expression, decreased significantly only in SK-BR-3 cells ( $n = 2$ ,  $**p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g005>

## Discussion

In this study, we identified a common miRNA response in cells expressing ER and HER2 to two different drugs, tamoxifen and trastuzumab. According to the qRT-PCR-array results, miR-770-5p was significantly responsive, independent of cell and drug type, with consistent overexpression. miR-770-5p has been linked to various cancers, such as gastric cardia adenocarcinoma [25], ovarian cancer [26], non-small cell lung cancer [27] and hepatocellular carcinoma [28]. It has also been shown to be downregulated in breast cancer. A recent study reported that miR-770-5p is downregulated in chemo-resistant triple negative breast cancer (TNBC) tissues while its ectopic expression antagonized resistance and metastases by targeting *STMN1* [29]. One of the deregulated miRNAs may be a potential biomarker to predict clinical outcomes in TNBCs receiving neoadjuvant chemotherapy [30]. However, the role of miR-770-5p in ER+ and HER2+ breast cancer cells, and its response to tamoxifen and trastuzumab treatment has not previously been determined. Furthermore, our TCGA data analysis, which indicates its significant downregulation in breast tumors compared to normal breast tissues, supports its possible clinical importance and led us to conduct further functional analysis.

In the pathway enrichment analysis, targets of miR-770-5p were significantly enriched in focal adhesion, MAPK and ErbB signaling pathways, which are closely related with motility and invasion [31]. In parallel with this bioinformatics analysis, the motility and invasion capacity of both HER2+ cells decreased with the overexpression of miR-770-5p. This decrease in motility and invasion may be down to ERK downregulation, which is one of the putative targets of miR-770-5p [32,33].



**Fig 6.** Trastuzumab treatment together with miR-770-5p modulates AKT and ERK expression level. miR-770-5p mimic was transfected to BT-474 cells and; total and phosphorylated AKT and ERK protein levels were analyzed by Western blot 72 h after transfection. Combination of trastuzumab with miR-770-5p mostly affected pERK and pAKT levels in BT-474 cells ( $n = 3$ ,  $*p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215894.g006>

Since HER2 has been identified as one of the targets of miR-770-5p, and pathway enrichment analysis conducted with putative targets of miR-770-5p indicated that ErbB signaling is one of the regulated pathways, we focused on this and a downregulation of HER2 protein was observed, especially in miR-770-5p-restored BT-474 cells. To follow the downstream signal through PI3K and MAPK signaling [34], we examined the expression levels of two major regulator proteins, AKT and ERK. Although total ERK expression was downregulated in both cell lines, total AKT downregulation was only observed in SK-BR-3 cells. This can be explained by variable mutation profiles as well as the different receptor status of two cell lines. c.333G>C (p.K111N) mutation in *PIK3CA* gene in BT-474 cells is well defined, which could explain the stable expression level of AKT in miR-770-5p transfected cells [35]. Finally, this stability could be due to the crosstalk mechanism between HER2 and growth factor receptors [10,36]. It was previously shown that complete response rates to trastuzumab-based treatment are lower in patients with the highest ER expression levels in HER2-positive breast cancers, like ER and HER-positive BT-474 cells, compared to ER-negative and HER2-positive SK-BR-3 cells [37]. In support of this, when cells were transfected with miR-770-5p mimic in the presence of trastuzumab, we observed downregulation in total AKT and ERK expression as well as their phosphorylated forms compared to scrambled control-transfected cells in both cell lines. Multiple levels of crosstalk are present between the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, which can compensate for each other [38,39]. Hence, miR-770-5p may block this crosstalk in the presence of trastuzumab, thereby strengthening the antiproliferative effect of trastuzumab.

Our qRT-PCR-array data show that miRNA expression levels in tumor cells can be potent in therapeutic response, and several preclinical studies have assessed the combination of miRNA-based therapeutics with chemotherapy [40]. Baldassarri et al. demonstrated that a combination treatment with miRNAs *in vitro*, especially miR-126, miR-9, miR-181a and miR-326, magnify the activity of specific breast cancer drugs [41]. In another study, restoring miR-375 sensitized cells to tamoxifen. This indicates it to be a potential target for treatment-resistant breast cancer [19]. miR-218 targeted *BRCA1* to sensitize breast cancer cells against cisplatin [42] and miR-542-3p silencing restored trastuzumab resistance via PI3K-AKT pathway regulation in breast cancer cells [43]. These data obtained from preclinical studies provide insights for using miRNA-based therapies to improve the effectiveness and potentiate the anticancer activity of drugs by regulating proliferation, motility or invasion [44]. One strategy to improve treatment effectiveness in HER2-overexpressing cancers, particularly those that develop resistance to HER2-targeted therapies, could be combined inhibition of PI3K and MEK. In conclusion, we showed that miR-770-5p downregulated AKT and ERK through HER2 signaling and potentiated the activity of trastuzumab in BT-474 cells. Here, we could suggest that mediating miR-770-5p in combination with trastuzumab treatment could inhibit two important pathways simultaneously, thereby blocking the proliferation, motility and invasion capacities of HER2+ breast cancer cells (S2 Fig).

A combination of miR-770-5p with tyrosine kinase inhibitors could also make breast cancer treatments more effective. However, preclinical animal models are needed to confirm the effectiveness of these combined therapies *in vivo*.

## Supporting information

**S1 Table. Differentially expressed miRNA lists.**  
(XLSX)

**S1 Fig. Viability of the cells after miR-770-5p transfection.** Although the viability of the cells decreased significantly in miR-770-5p mimic-transfected BT-474 and SK-BR-3 cells compared to scrambled control-transfected cells, the total viability of the cells diminished only 20% and 10% for BT-474 and SK-BR-3 cells respectively (n = 2, \*p<0.02).  
(TIF)

**S2 Fig. Proposed action mechanism of miR-770-5p in HER2 signaling.** miR-770-5p is shown to regulate HER2 signaling by targeting HER2, AKT and ERK. Introducing miR-770-5p may reduce the expression of HER2 and in the presence of trastuzumab it may downregulate AKT and ERK that potentiate the activity of trastuzumab.  
(TIF)

**S3 Fig. Western blot images.** Original uncropped blots of Figs 4, 5 and 6.  
(PDF)

## Acknowledgments

This study was funded by Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit, Project number 13B4143001.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Senem Noyan, Bala Gur Dedeoglu.

**Data curation:** Senem Noyan, Bala Gur Dedeoglu.

**Formal analysis:** Senem Noyan, Hakan Gurdal.

**Funding acquisition:** Bala Gur Dedeoglu.

**Investigation:** Senem Noyan, Hakan Gurdal, Bala Gur Dedeoglu.

**Methodology:** Bala Gur Dedeoglu.

**Project administration:** Bala Gur Dedeoglu.

**Resources:** Bala Gur Dedeoglu.

**Supervision:** Bala Gur Dedeoglu.

**Validation:** Senem Noyan.

**Writing – original draft:** Senem Noyan.

**Writing – review & editing:** Senem Noyan, Hakan Gurdal, Bala Gur Dedeoglu.

## References

1. Youlden DR, Cramb SM, Dunn N a M, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol. Elsevier Ltd*; 2012; 36: 237–48. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.007> PMID: 22459198
2. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 10393–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100> PMID: 12917485
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406: 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093> PMID: 10963692
4. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev. Elsevier Ltd*; 2012; 38: 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005> PMID: 22178455
5. Chen C, Baumann WT, Clarke R, Tyson JJ. Modeling the estrogen receptor to growth factor receptor signaling switch in human breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2013; 587: 3327–34. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.022> PMID: 23994522
6. Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62: 1265–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.001> PMID: 20708050
7. Ali S, Rasool M, Chaudhry H, Pushparaj PN, Jha P, Hafiz A, et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*. 2016; 12: 135–139. <https://doi.org/10.6026/97320630012135> PMID: 28149048
8. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther*. 2012; 20: 256–267. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.256> PMID: 24130921
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344: 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103163441101> PMID: 11248153
10. Singla H, Luthiadach A, Kaur RP, Chander H, Kumar V, Munshi A. Recent advances in HER2 positive breast cancer epigenetics: Susceptibility and therapeutic strategies. *Eur J Med Chem. Elsevier Masson SAS*; 2017; 142: 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.075> PMID: 28800870
11. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2007; 18: 977–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl475> PMID: 17229773
12. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 1992; 89: 4285–4289. PMID: 1350088
13. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res. Elsevier Ltd*; 2014; 79: 34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002> PMID: 24269963
14. Herceptin FDA Approval. Available: <https://web.archive.org/web/20170128163102/https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm080591.htm>

15. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016; 1: 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4> PMID: 29263891
16. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int.* ???; 2015; 15: 38. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1> PMID: 25960691
17. Tan W, Liu B, Ou S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncol Lett.* 2018; 15: 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638> PMID: 29434998
18. Li J, Lu M, Jin J, Lu X, Xu T, Jin S. miR-449a Suppresses Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells by Targeting ADAM22. *Cell Physiol Biochem.* 2018;210029: 136–149. <https://doi.org/10.1159/000493964> PMID: 30278449
19. Ward A, Balwierc A, Zhang JD, Köblbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, et al. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32: 1173–1182. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.128> PMID: 22508479
20. Young J, Kawaguchi T, Yan L, Qi Q, Liu S, Takabe K. Tamoxifen sensitivity-related microRNA-342 is a useful biomarker for breast cancer survival. *Oncotarget.* 2017; 8: 99978–99989. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21577> PMID: 29245954
21. Detmar M. Short Technical Reports layer wound healing assays. 2009; <https://doi.org/10.2144/000113083>
22. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inf.* 2011; 44: 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002> PMID: 21605702
23. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 77–83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt439> PMID: 23703215
24. Goldman M, Craft B, Brooks AN, Zhu J, Hausler D. The UCSC Xena Platform for cancer genomics data visualization and interpretation. *bioRxiv.* 2018; Available: <http://biorxiv.org/content/early/2018/05/18/326470.abstract>
25. Guo W, Dong Z, Liu S, Qiao Y, Kuang G, Guo Y, et al. Promoter hypermethylation-mediated downregulation of miR-770 and its host gene MEG3, a long non-coding RNA, in the development of gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Carcinog.* 2017; 56: 1924–1934. <https://doi.org/10.1002/mc.22650> PMID: 28345805
26. Zhao H, Yu X, Ding Y, Zhao J, Wang G, Wu X, et al. MIR-770-5p inhibits cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer by targeting ERCC2. *Oncotarget.* 2016; 7: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10736> PMID: 27449101
27. Zhang Z, Yang Y, Zhang X. MiR-770 inhibits tumorigenesis and EMT by targeting JMJD6 and regulating Wnt/β-catenin pathway in non-small cell lung cancer. *Life Sci.* Elsevier; 2017; 188: 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.002> PMID: 28882645
28. Wu WJ, Shi J, Hu G, Yu X, Lu H, Yang ML, et al. Wnt/β-catenin signaling inhibits FBXW7 expression by upregulation of microRNA-770 in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol. Tumor Biology;* 2016; 37: 6045–6051. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4452-5> PMID: 26602384
29. Li Y, Liang Y, Sang Y, Song X, Zhang H, Liu Y, et al. MIR-770 suppresses the chemo-resistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1 article. *Cell Death Dis.* Springer US; 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0030-7> PMID: 29323124
30. Garcia-Vazquez R, Ruiz-García E, García AM, Astudillo-De La Vega H, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, et al. A microRNA signature associated with pathological complete response to novel neoadjuvant therapy regimen in triple-negative breast cancer. *Tumor Biol.* 2017;39. <https://doi.org/10.1177/1010428317702899> PMID: 28621239
31. Brix D, Clemmensen K, Kallunki T. When Good Turns Bad: Regulation of Invasion and Metastasis by ErbB2 Receptor Tyrosine Kinase. *Cells.* 2014; 3: 53–78. <https://doi.org/10.3390/cells3010053> PMID: 24709902
32. Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, Reddy KB. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene.* 2001; 20: 4209–4218. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204541> PMID: 11464287
33. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22: 395–403. <https://doi.org/10.1023/A:1023781114568> PMID: 12884914
34. Fink MY, Chipuk JE. Survival of HER2-Positive Breast Cancer Cells: Receptor Signaling to Apoptotic Control Centers. *Genes and Cancer.* 2013; 4: 187–195. <https://doi.org/10.1177/1947601913488598> PMID: 24069506
35. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA, Kallemeijn WW. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Cancer Res.* 2007; 5: 195–202. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0263> PMID: 17314276

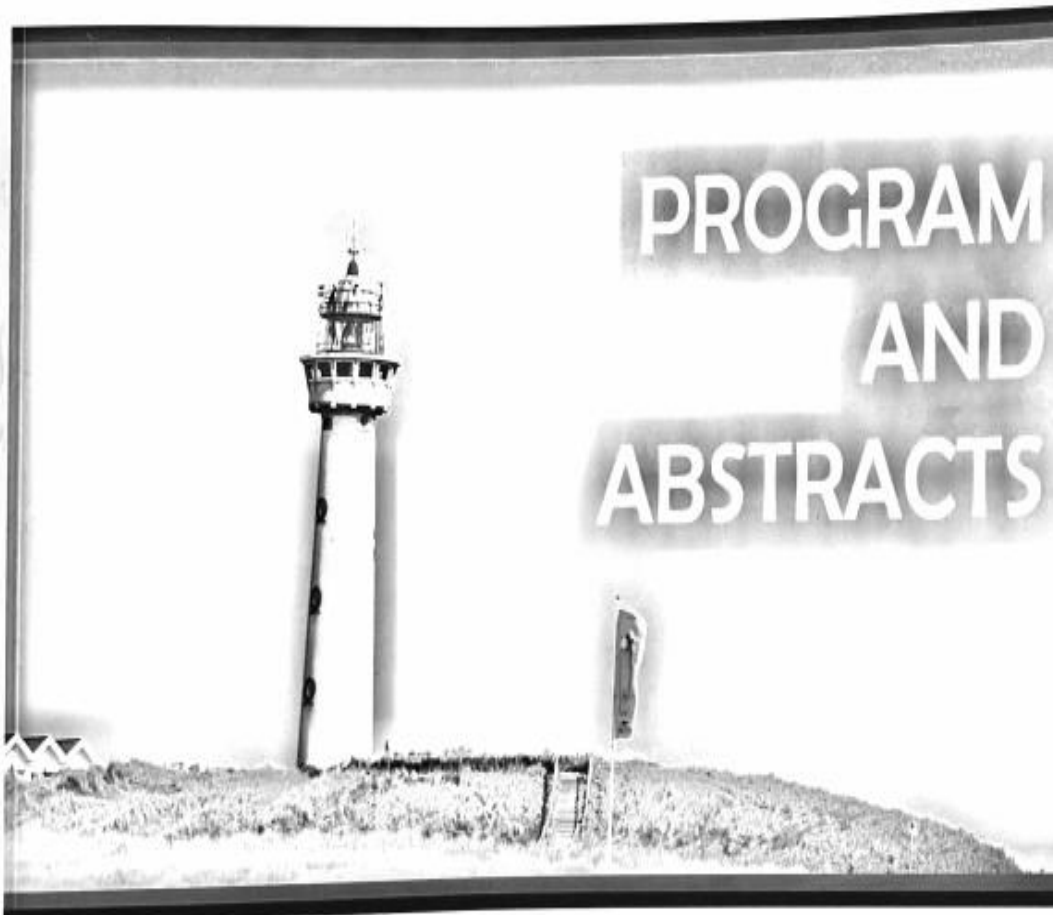


36. Dubská L, Andera L, Sheard MA. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: An unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2006; 579: 4149–4158. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.047> PMID: 16023111
37. Nahta R, O'Regan RM. Therapeutic implications of estrogen receptor signaling in HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 135: 39–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2067-8> PMID: 22527112
38. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40: 139–46. <https://doi.org/10.1042/BST20110609> PMID: 22260680
39. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36: 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006> PMID: 21531565
40. Blower PE, Chung J-H, Verducci JS, Lin S, Park J-K, Dai Z, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 1–9. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0573> PMID: 18187804
41. Baldassarri F, Zerbinati C, Galasso M, Minotti FCL, Agnoletto C, Previali M, et al. Screen for microRNA and drug interactions in breast cancer cell lines points to miR-126 as a modulator of CDK4/6 and PIK3CA inhibitors. *Front Genet.* 2018; 9: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00001>
42. He X, Xiao X, Dong L, Wan N, Zhou Z, Deng H, et al. MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1. *Tumor Biol.* 2015; 36: 2065–2075. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2814-z> PMID: 25394901
43. Ma T, Yang L, Zhang J. MiRNA-542-3p downregulation promotes trastuzumab resistance in breast cancer cells via AKT activation. *Oncol Rep.* 2015; 33: 1215–1220. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3713> PMID: 25586125
44. van Beijnum JR, Giovannetti E, Poel D, Nowak-Sliwiska P, Griffioen AW. miRNAs: micro-managers of anticancer combination therapies. *Angiogenesis.* Springer Netherlands; 2017; 20: 269–285. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9544-x> PMID: 28474282

**IABCR 2019** 31st International Association for  
Breast Cancer Research Conference

**Exploring the molecular  
mechanisms of breast cancer**

April 15-18, 2019  
Egmond aan Zee  
Hotel Zuiderduin  
The Netherlands



**IABCR**  
International Association  
for Breast Cancer Research

## ABSTRACTS POSTERS

Abstract nr: 62

### Overexpression of miR-770-5p regulates acquired trastuzumab resistance

Senem Noyan<sup>1</sup>, Fatma Funda Demirsoy<sup>1</sup>, Ayşegül Yücel Polat<sup>1</sup>, Bala Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University Biotechnology Institute

A few of preclinical and clinical studies highlighted the bidirectional crosstalk between the human epidermal growth factor family members (HER) in breast cancer as a mechanism of resistance to anti-HER agents. Cross signaling between HER2 and EGFR could play role in the development of resistance to therapeutics. The involvement of miRNAs in the resistance of targeted therapies like trastuzumab was demonstrated in recent studies. Hence the regulation of miRNAs in resistance state could reverse the cell behaviour to drugs. In our previous studies we found that overexpression of miR-770-5p downregulated AKT and ERK expression through HER2 signaling and potentiated the effect of trastuzumab. In this study we investigated the role of miR-770-5p in trastuzumab resistance by using trastuzumab resistant BT-474 and SK-BR-3 cells. The expression analysis results showed that miR-770-5p level was decreased in both of the resistant cell lines. When miRNA level was overexpressed in resistant cells the trastuzumab sensitivity was restored in both SK-BR-3 and BT-474 cells. Concordant with our previous data pAKT and pERK expression levels were decreased. After long term treatment with trastuzumab the cells gained resistance to the drug and HER2 expression decreased while upregulation of EGFR expression was observed in SK-BR-3-R cells. Since EGFR was found to be one of the putative targets of miR-770-5p we investigated the role of this miRNA in HER2-EGFR crosstalk mechanism. Upon overexpressing miR-770-5p in SK-BR-3-R cells EGFR expression was decreased together with pAKT and pERK. It could be concluded that miR-770-5p may sensitize the trastuzumab-resistant cells to death by blocking the crosstalk signal in the absence of HER2 by targeting EGFR and downstream signals.



# Overexpression of miR-770-5p regulates acquired trastuzumab resistance

Senem Noyan<sup>1</sup>, Fatma Funda Demirsoy<sup>1</sup>, Aşegül Yücel Polat<sup>1</sup>, Bala Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ankara University Biotechnology Institute



### Abstract

A line of preclinical and clinical studies highlighted the bidirectional crosstalk between the human epidermal growth factor family members (HER) in breast cancer as a mechanism of resistance to anti-HER agents. Cross signaling between HER2 and EGFR could play role in the development of resistance to therapeutics. The involvement of miRNAs in the resistance of targeted therapies like trastuzumab was demonstrated in recent studies. Hence the regulation of miRNA in resistance state could reverse the cell behaviour to drug. In our previous studies we found that overexpression of miR-770-5p downregulated AKT and ERK expression through HER2 signaling and potentiated the effect of trastuzumab. In this study we investigated the role of miR-770-5p in trastuzumab resistance by using trastuzumab resistant BT-474 and SK-BR-3 cells. The expression analysis results showed that miR-770-5p level was decreased in both of the resistant cell lines. When miRNA level was overexpressed in resistant cells the trastuzumab sensitivity was restored in both SK-BR-3 and BT-474 cells. Concordant with our previous data pAKT and pERK expression levels were decreased. After long term treatment with trastuzumab the cells gained resistance to the drug and HER2 expression decreased while upregulation of EGFR expression was observed in SK-BR-3 cells. Since EGFR was found to be one of the putative targets of miR-770-5p we investigated the role of this miRNA in HER2-EGFR crosstalk mechanism. Upon overexpressing miR-770-5p in SK-BR-3 cells EGFR expression was decreased together with pAKT and pERK. It could be concluded that miR-770-5p may sensitize the trastuzumab-resistant cells to death by blocking the crosstalk signal in the absence of HER2 by targeting EGFR and downstream signals.

### Material & Method

Trastuzumab resistant breast cancer cell lines (SK-BR-3 and BT-474) were generated by continuous exposure to increasing concentrations of trastuzumab up to 10 µg/mL over 6 months. Both cell lines were cultured in a humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

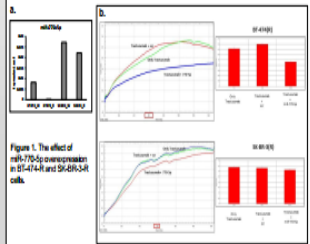
Cells (4 × 10<sup>5</sup>) were seeded into six-well plates and cultured under standard conditions. When the cells reached confluence, transfected with miRNA mimic or scrambled control. After 24h post-transfection, cell proliferation was monitored over a period of 144 hours by ICCELLigence real-time cell analyzer using an E-plate and measuring impedance-based signals.

miRNA overexpression was achieved by transfection with human miRNA precursor (Qiagen) and verified by qRT-PCR. Total RNA was extracted from cell lines with QIAzol reagent according to manufacturer's instructions. Reactions were performed using Roche Real-Time qPCR System. miRNA expression was normalized using RNU6 as the housekeeping gene.

Antibodies were against EGFR, AKT, phospho-AKT, ERK, phospho-ERK, IGF-1R (all from SantaCruz), HER2 (Abcam), mTOR (GST) and Gefitinib (Bioland).

### Results

To uncover potential resistance mechanisms to trastuzumab, we selected trastuzumab-resistant BT-474 (R) / SK-BR-3 (R) and trastuzumab-sensitive BT-474 (S) and SK-BR-3 (S) breast cancer cells. Cells were regularly exposed to increasing concentrations of trastuzumab, over a 6-month period, to a final concentration of 10 µg/mL. qRT-PCR results showed that miR-770-5p expression level decreased in both trastuzumab resistant cells especially in BT-474 (R) (Figure 1a). The proliferation rate for BT-474R cells was 50 % slower than that for scrambled control cells. The proliferation rate for SK-BR-3 resistant cells was decreased 30 % (Figure 1b).



A potential mechanism of drug resistance is loss of the target, HER2, when resistant cells were generated by prolonged exposure to trastuzumab. It was also known that activation of alternative signaling pathways such as EGFR and mTOR, confer drug resistance [1]. Therefore, we examined expression levels of these proteins. Our data demonstrate that downregulation of HER2 and upregulation of EGFR and mTOR could contribute to trastuzumab resistance in SK-BR-3 and BT-474 resistant cells (Figure 2).

### References

- Naito R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Dec; 65(26):1118-26.
- Nayyar H, Wilson JH, Harris LN, Basu AT, Kimble RB, Mallick N. Trastuzumab-induced HER upregulation in "trastuzumab-resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001 Mar; 61(6):2101-4.
- Naito R, Yu CL, Hwang MC, Hontela J, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 May; 3(5):289-95.

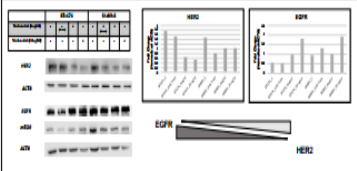


Figure 2. The expression levels of HER2 and EGFR through development of trastuzumab resistance in BT-474 and SK-BR-3 cells.

Several studies have reported potential mechanisms of resistance to trastuzumab, including signaling from RTKs instead of HER2, increased PI3K signaling and amplification of signaling by other HER receptors. It is also known that EGFR tyrosine kinase and EGFR-HER2 heterodimers, could potentially bypass trastuzumab blockade [2]. Part of our investigation into RTKs include western blot analysis for HER2 and EGFR signal transduction pathways and we found decreased HER2, EGFR and p-ERK in miR-770-5p overexpressed SK-BR-3 (R) and BT-474 (R) cells (Figure 3).

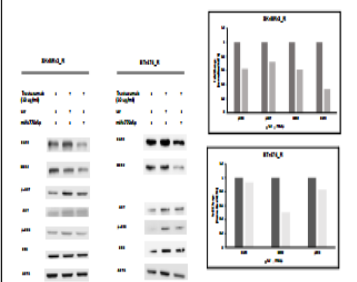


Figure 3. The effect of miR-770-5p in HER2 and EGFR signal transduction pathway.

Another TK receptor that stimulates cell proliferation, IGF1R, was found to interact with HER2 in trastuzumab-resistant cell lines, including its phosphorylation. In some preclinical models, when anti-IGF1R drugs were used, trastuzumab-resistant cells restored sensitivity [1]. It was shown that the trastuzumab-induced growth inhibition in HER2-overexpressing cells can be compensated by increased IGF1R signaling, resulting in resistance to trastuzumab [3]. Therefore, we also examined total IGF1R and mTOR expression in BT-474R cells. When miR-770-5p mimic was transfected to these cells, decreased level of total mTOR and IGF1R protein expression was observed (Figure 4)

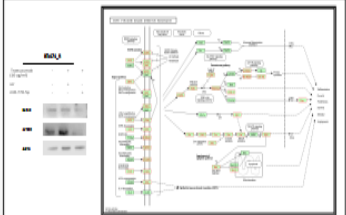


Figure 4. The expression status of EGFR and mTOR in the presence of miR-770-5p in BT-474R cells.

As illustrated in Figure 5, our findings pointed out miR-770-5p as a critical molecule that modulates bidirectional crosstalk between HER2-IGFR-EGFR and mTOR by blocking the active signaling in the trastuzumab resistant cells.

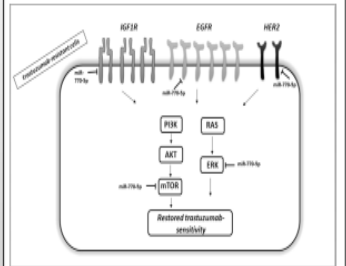


Figure 5. Proposed mechanism of miR-770-5p action in trastuzumab resistance.

### Conclusions

Understanding mechanisms of drug resistance in preclinical studies is challenging due to the complex nature of resistance and compensatory pathways, as well as the use of tumor cells with diverse genetic backgrounds. We observed increased expression of a number of RTKs—IGF1R, EGFR and mTOR that are implicated in trastuzumab resistance. Additionally, we indicated that these RTKs diminished in miR-770-5p transfected trastuzumab resistant cells. These findings could highlight that miR-770-5p may restore trastuzumab sensitivity by declining bidirectional crosstalk signaling between EGFR, HER2 and IGF1R.

**Acknowledgement:** We thank Prof. Hakan Gürdal-Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology and Prof. Ekin Yılmaz-Ankara University Biotechnology Institute for their antibodies support.

**EACR 25**

30 June - 3 July 2018 • Amsterdam

**ESMO** *Open*  
Cancer Horizons

## Abstracts of the 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research

Amsterdam, The Netherlands, 30 June – 3 July 2018



Abstracts of the 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research

**ESMO** GOOD SCIENCE  
BETTER MEDICINE  
BEST PRACTICE

into medulloblastoma cells via endocytosis and siRNA was trafficked to the cytoplasm. Star-siRNA inhibited PLK1 protein expression by 70% ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ) when compared to control cells (star-non-functional siRNA). Knockdown of PLK1 resulted in G2 cell cycle arrest ( $p < 0.001$ ) and DNA damage. This led to the induction of apoptosis and cell death ( $p < 0.001$ ). Star-PLK1 siRNA also sensitised cells to cisplatin. Conclusion This is the first study to demonstrate that star nanoparticles can deliver siRNA to medulloblastoma cells. This nanomedicine may be a new therapeutic tool which has potential to revolutionise medulloblastoma treatment and could enhance precision-medicine where it can be used to inhibit the expression of any tumour-promoting gene or cocktail of genes personalised to the genetic profile of a patient's tumour.

**PO-355 ANITUMOR ACTIVITY OF HSA-MIR-X IN HER2 POSITIVE CELLS IS MEDIATED BY THE REGULATION OF AKT AND ERK**

<sup>1</sup>S. Noyan, <sup>2</sup>H. Gurdal, <sup>3</sup>B. Gur Deveci. <sup>1</sup>Ankara University Biotechnology Institute, System Biotechnology, Ankara, Turkey; <sup>2</sup>Ankara University Medical School, Department of Pharmacology, Ankara, Turkey

10.1136/esmoopen-2018-EA025.867

**Introduction** HER2 overexpression has been reported in approximately 30% of human breast tumours, and is associated with poor clinical outcome and recurrent disease. Herceptin is a humanised monoclonal antibody targeting HER2. PI3K-AKT is a downstream effector of the HER2 signalling pathway. microRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs of 19-22 nucleotides that can negatively regulate gene expression at post-transcriptional levels. Herceptin plays an important role in treating metastatic breast cancer by targeting ErbB2 (HER2), therefore, combining Herceptin with miRNAs might enhance its antitumor activity. In this study the antitumor activity of hsa-miR-X, which was found to be Herceptin-responsive by our group, with Herceptin in HER2 positive breast cancer cell lines was identified in SK-BR-3 and BT-474 cells.

**Material and methods** We investigated the synergistic effect of Herceptin and miRNA mimic combination on tumorigenic activities of the cells. To check its role in migration and invasion, wound healing and invasion assays were performed respectively. Cell invasion was monitored over a period of 24 hours by xCELLigence real-time cell analyzer measuring impedance-based signals. Furthermore, viability of breast cancer cells was measured by the WST1 assay after transfection with hsa-miR-X miRNA mimic. We measured the expression of AKT and ERK in HER2 positive cells treated with miR-X mimic plus Herceptin by Western blot analysis.

**Results and discussions** We showed that increased expression of hsa-miR-X significantly inhibits migration and invasion of HER2 (+) breast cancer cells. Additionally, western blot experiments demonstrated that transfection of hsa-miR-X with Herceptin treatment decreased the protein level of AKT and ERK in these cells.

**Conclusion** It may be concluded that hsa-miR-X may increase the activity of the drug by pulling down its effective concentration and regulating PI3K-AKT pathway in HER2 positive cells. hsa-miR-X could decrease proliferation, motility and invasion via inhibiting Akt phosphorylation and may represent a new strategy for treating HER2 positive breast cancer.

**PO-356 MICRORNA MEDIATED REGULATION OF MORGANA, A NEW ONCOSUPPRESSOR IN CHRONIC MYELOID LEUKAEMIA**

<sup>1</sup>S. Rocca\*, <sup>2</sup>L'Anna, <sup>3</sup>F. Fusella, <sup>4</sup>F. Orsi, <sup>5</sup>U. Ala, <sup>6</sup>P. Provero, <sup>7</sup>D. Taverna, <sup>8</sup>E. Turco, <sup>9</sup>U. Brancaccio. <sup>1</sup>Molecular Biotechnology Center - University of Turin, Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Turin, Italy; <sup>2</sup>VD-1U Leuven Center for Cancer Biology, Department of Oncology, Leuven, Belgium

10.1136/esmoopen-2018-EA025.868

**Introduction** Morgana is a chaperone protein encoded by the *CHORDC1* gene. Its deletion is embryonic lethal due to apoptosis of the cells of the inner cell mass. We recently characterised the role of Morgana in myeloid malignancies, as the haploinsufficiency of the protein in mice is able to induce a fatal and transplantable myeloproliferative disease resembling human Atypical Chronic Myeloid Leukaemia (aCML). 5 out of 5 aCML patients and 16% of Philadelphia-positive CML patients express low/undetectable levels of Morgana in their bone marrow. As we never found mutations or deletions of *CHORDC1* gene, we decided to investigate if Morgana can be targeted by miRNAs. Five miRNAs are predicted to target Morgana: miR-15a/b and miR-16 sharing the same seed sequence and miR-26a/b.

**Material and methods** HEK-293T cells were used to overexpress miRNAs predicted to target Morgana mRNA. The level of miRNAs overexpression and Morgana mRNA was assessed with qRT-PCR and Morgana protein level with Western Blot at different time points. The seed sequences for the selected miRNAs in the 3'UTR of *CHORDC1* gene were than mutated to validate the specificity of the binding. Bioinformatic analysis were used to correlate miRNAs and Morgana expression levels in leukaemia and lymphoma.

**Results and discussions** We demonstrated that miRNA-15a/b and miRNA-26a/b are able to bind to Morgana 3'-UTR and, in this way, mediate its mRNA deregulation leading to a reduction of Morgana, both at mRNA and protein level. We were able to highlight an anti-correlation between Morgana and miRNAs expression in haematological tumours: in particular miR-15b in Chronic Lymphocytic Leukaemia and Lymphomas, miR-15a in aCML and CML and miR-26a and miR-16 in Lymphomas.

**Conclusion** Morgana is able to act both as proto-oncogene and as oncosuppressor depending on tissue type and levels of expression as it is frequently found both overexpressed and downregulated. Different approaches to elucidate its mechanisms of regulation failed and we believe that miRNAs are just one of them. Further investigations are needed to clarify how Morgana expression is regulated in different type of tumours.

**PO-357 MIR-145-5 P, MIR-196A-5P, MIR-222-3 P AND LINC RNA MALAT1 AS NON-INVASIVE MARKERS IN ADVANCED LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

<sup>1</sup>S. Grigorisov\*, <sup>2</sup>V. Petlova, <sup>3</sup>T. Popov, <sup>4</sup>V. Mitev, <sup>5</sup>K. Kaneva. <sup>1</sup>Molecular Medicine Center, Department of Medical Chemistry and Biochemistry- Medical University - Sofia- Bulgaria, Sofia, Bulgaria; <sup>2</sup>Clinic of ENT, Department of ENT- UMHAT Tsarica Yvanka-61A - Medical University - Sofia- Bulgaria, Sofia, Bulgaria

10.1136/esmoopen-2018-EA025.869

**Introduction** Non-coding RNAs are become one of the most investigated biomarkers in non-invasive diagnostics of cancer

Senem Noyan<sup>1</sup>, Hakan Gürdal<sup>2</sup>, Bala Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ankara University Biotechnology Institute  
<sup>2</sup>Ankara University Department of Pharmacology

### Introduction

The aim of this study is to identify the role of hsa-miR-X on AKT and ERK axis in proliferation, motility and invasion on HER2 positive breast cancer cells.

HER2 overexpression has been reported in approximately 30% of human breast tumors, and is associated with poor clinical outcome and recurrent disease. Herceptin is a humanized monoclonal antibody targeting HER2.

The MAPK and the PI3K pathways play an important role in controlling cell proliferation, survival and invasion. These pathways are frequently mutated in cancer. Additionally, it is known that multiple levels of crosstalk interactions are present between the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. Because of this, blockade of one pathway may lead to the activation of the other signaling cascade and this situation might attenuate drug response and contribute to the development of acquired resistance.

In this study, the antitumor activity of hsa-miR-X, which was found to be Herceptin-responsive by our group, with Herceptin in HER2 positive breast cancer cell lines was identified in SK-BR-3 and BT-20 cells. These cells were transfected with hsa-miR-X and to check its anticancer effect, WST1, wound healing and invasion assays were performed respectively. Furthermore, AKT and ERK protein levels were analyzed in transfected cells by western blot to explain the effect of hsa-miR-X in growth and survival signaling pathways.

### Methods

The human HER2 (+) breast cancer cell lines (SK-BR-3 and BT-20) were obtained from the ATCC supplemented with 10% FBS. All cell lines were cultured in a humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

miRNA overexpression was achieved by transfection with human miRNA precursor (Qiagen) and verified by qRT-PCR. Cell proliferation was measured using the WST1 assay. To examine the synergistic effect of the combination therapy, cells were also treated with miRNA mimic or scrambled RNA with varying doses of trastuzumab for 48h. After incubation, the same WST1 protocol was applied to mimic transfection.

For the wound healing assay, cells (5 × 10<sup>4</sup>/well) were seeded into six-well plates and cultured under standard conditions. When the cells reached confluence, transfected with miRNA mimic or control. We observed cells at 0, 48, and 72 hours after scratching and photographed the cells with a microscope. Gap widths at 4<sub>h</sub> and 72<sub>h</sub> were measured, and the average gap width ratio of hsa-miR-X transfected cells was normalized to that of control cells by using DeSchict.

Cell invasion was monitored over a period of 24 hours by iCELLigence real-time cell analyzer using a double-plate and measuring impedance-based signals.

Western blot was performed for human HER2, AKT and ERK proteins which are known essential molecules on HER2 signaling pathway.

### Results

Pathway enrichment analysis results suggested that hsa-miR-X might function as a mediator of HER2 signaling pathway. To clarify whether miRNA mimic transfection increases the growth-inhibitory effect of trastuzumab, the sensitivity of HER2-overexpressing cells was analyzed by WST1 assay with 6 µg/ml trastuzumab after hsa-miR-X mimic transfection. Accordingly, hsa-miR-X may increase the efficacy of the drug by reducing the effective concentration of trastuzumab in HER2+ cells, although there is no sensible effect on proliferation alone (Figure 1).

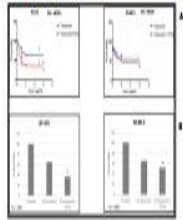


Figure 1. hsa-miR-X with trastuzumab could decrease proliferation of breast cancer cells. hsa-miR-X mimic transfected HER2 positive breast cancer cell lines were observed to have diminished cell proliferation ability compared to only drug-treated cells (+). Same results were obtained from each cell line and it is indicated in 6.

In addition, they were submitted to a scratch and invasion assays. Figure 2 shows that gap closure was delayed in hsa-miR-X transfected cells compared with controls.

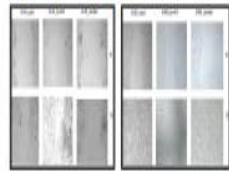


Figure 2. hsa-miR-X could inhibit the motility of breast cancer cells. hsa-miR-X mimic transfected HER2 positive breast cancer cell lines were observed to have diminished motility ability compared with scrambled transfected and control cells (+). Same results were obtained from each cell line and it is indicated in 6.

To examine whether hsa-miR-X have inhibitory effect in cells, they were transfected with hsa-miR-X or scrambled in concentration of 25 nM and then were analyzed by iCELLigence invasion assay. As it is shown in Figure 3, the transfection with hsa-miR-X could considerably decrease the HER2 cells invasive action compared with control group.

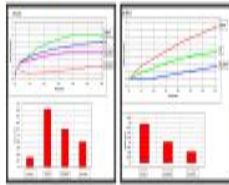


Figure 3. Effect of hsa-miR-X on the invasive capacity of the cells. hsa-miR-X transfection diminished the invasive action remarkably compared with scrambled transfected cells.

Deregulated MAPK pathway contributes oncogenic behavior of cancer cells through increased cell proliferation and increased cell invasion. To check the effect of hsa-miR-X on HER2 signaling pathway, we performed Western blot analysis. Our results show that hsa-miR-X decreased HER2 protein level and accordingly PI3K and MAPK major regulator proteins AKT and ERK respectively (Figure 4).

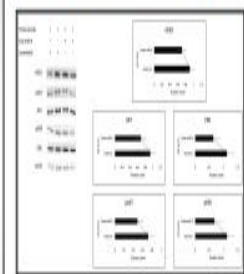


Figure 4. Effect of hsa-miR-X on AKT and ERK protein levels in HER2 positive breast cancer cell lines.

### Conclusions

MicroRNAs play biological roles in the mechanisms responsible for anti-tumor effects. Alternatively, some microRNAs would be biomarkers to predict the treatment response of drugs. We suggest that the genes that were targeted by hsa-miR-X are related to HER2 signaling pathway.

We observed that cell motility and migration diminished after transfection of HER2 positive breast cancer cell lines (BT-20 and SK-BR3) with mimic for this miRNA. Wound healing and invasion assays together with western blot analysis results could support the role of hsa-miR-X in HER2 signaling via AKT and ERK dependent manner. Overall, our results may suggest hsa-miR-X as a potential regulator of an HER2 axis through AKT and ERK regulation in HER2 positive breast cancer cell lines.

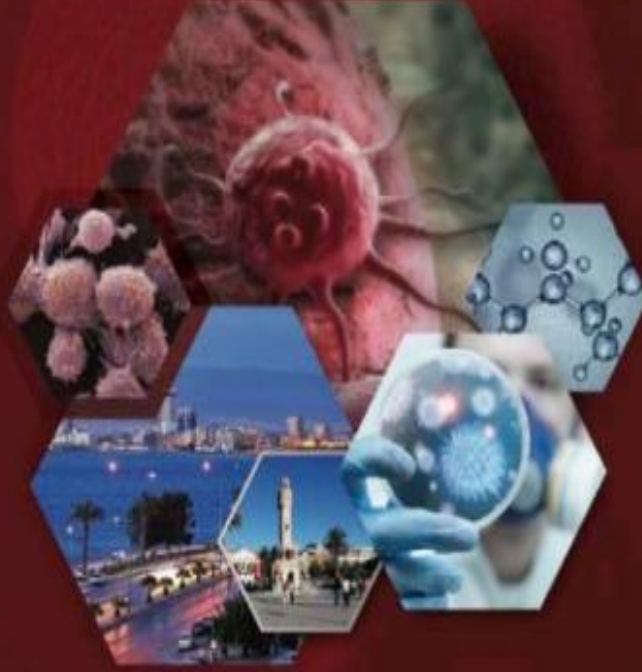
It might be concluded that the up-regulation of miR-X may play a biological role in growth and survival signaling pathways in HER2 positive breast cancer cells and it could lead to novel therapeutic targets.

# 7. MULTİDİSİPLİNER KANŞER ARAŞTIRMA & 1. TEMEL ONKOLOJİ KONGRESİ

ULUSLARARASI KATILIMLI

11-14 Ekim 2018

Euphoria Aegean Resort & SPA - Seferihisar, İzmir



## KONGRE KİTABI







## POSTER BİLDİRİ

### PS006 - hsa-miR-X regulates cell proliferation on BT-20 cells by the induction of autophagy signaling pathway

Senem Noyan<sup>1</sup>, Bala Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Antara University Biotechnology Institute

Triple negative breast cancer (TNBC), which is lacking the expression of HER2, estrogen and progesterone receptors accounts for roughly 15%-20% of all types of breast cancer. Because of resistance to monoclonal antibody treatment the only remaining systemic treatment is chemotherapy in TNBC. Therefore, targeted therapeutics are required to improve its prognosis. MicroRNAs (miRNAs) have crucial function in cancer modulating cellular pathways. Autophagy is an evolutionarily conserved cellular mechanism for cell survival. Autophagy is a complex pathway involving multiple proteins such as ATG (autophagy-related genes). The ATG5 is a key mediator of cellular autophagy. LC3I and II plays a role in autophagosome formation. miRNA mediated autophagy induction appears to be useful as a potential candidate for TNBC targeted therapy. In the current study, we investigated the effect of hsa-miR-X on autophagy regulation in BT-20 cells in vitro. BT-20 cells were transfected with hsa-miR-X inhibitor and cell proliferation was examined using WST1. The expression of autophagy-associated proteins, ATG5 and LC3, was detected by western blotting. In this study we found that downregulation of miR-X inhibited cell proliferation of BT-20 cells. Additionally, increased level of ATG5 and LC3II proteins was detected in the cells transfected with hsa-miR-X inhibitor. These results could indicate that induction of autophagy with hsa-miR-X inhibitor contributes to a decrease of cell proliferation via increasing ATG5 and LC3II proteins. As a conclusion, the potential role of hsa-miR-X on triple negative breast cancer cell survival via autophagy signaling pathway could be pointed out as a novel therapeutic target for TNBC treatment.

## POSTERS

## Table of Contents

## Sunday 4 September

- 129 DNA replication and recombination: Novel aspects
- 130 Nuclear architecture
- 131 Developmental biology
- 138 Systems biology
- 145 Host–pathogen interactions
- 152 DNA repair and cancer
- 164 New optical methods for studying neuronal structure and function
- 165 Miscellaneous

## Monday 5 September

- 205 RNA biology, biogenesis and processing
- 209 Proteins in action
- 231 Computational biology
- 240 Mechanisms of pro-inflammatory diseases
- 249 Epigenetics and cancer
- 264 Novel signaling pathways controlling the cardiac function
- 265 Mechanism of neurodegenerative diseases
- 272 Education, training, and career planning in molecular life sciences

## Tuesday 6 September

- 278 MicroRNAs and noncoding RNAs
- 284 Autophagy: Regulation mechanisms
- 285 Extracellular matrix and metalloproteinases
- 289 Structural biology: Membrane complexes and supercomplexes
- 294 Biochemical mechanisms in tolerance and autoimmunity
- 297 Stem cells and cancer
- 309 Cardiac regeneration: Programming human heart cells
- 312 Developments in biomaterials and tissue engineering
- 320 Aging

## Wednesday 7 September

- 324 Plant biochemistry and molecular biology
- 348 Cell cycle and circadian clocks
- 349 Single molecule techniques – Applications in biology
- 352 Molecular mechanisms of inflammation
- 361 Functional genomics and proteomics
- 373 Personalized medicine
- 381 Chemical and biochemical aspects of oxidative stress

Abstracts submitted to the 41st FEBS Congress, which was planned for Kuşadası, Turkey from 3rd to 8th September 2016, and accepted by the Congress Organizing Committee are published in this Special Issue of *The FEBS Journal*. Unfortunately, the Congress was cancelled by FEBS after the excellent scientific programme was compromised by an insufficient number of confirmed speakers, and so the authors of these abstracts were not able to present their work at the event\*. Late-breaking abstracts and abstracts withdrawn after Congress cancellation are not included in this issue.

## About these abstracts

Abstracts submitted to the Congress are not peer-reviewed. In addition, abstracts are published as submitted and are not copyedited prior to publication.

We are unable to make corrections of any kind to the abstracts once they are published.

## Indexing

Abstracts published in *The FEBS Journal* Special Issue for the 41st FEBS Congress will be included individually in the Conference Proceedings Citation Index published by Web of Science.

## How to cite these abstracts

AuthorOne, A., AuthorTwo, B. (2016). Abstract title. *FEBS J*, 283: Abstract number\*\*. doi:10.1111/febs.13808

\* An optional closed online presentation opportunity of short duration on the Congress website was offered after Congress cancellation and may be taken up by some abstract authors.

## P-01.03.3-011

**Competing endogenous RNA of SIP1 in hepatocellular carcinoma**

I. Yafin Camel<sup>1</sup>, M. Cetin, P. Balçık-Ercin, G. Odabas, T. Yagci  
*Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey*

Competing endogenous RNAs (ceRNAs) act as molecular sponges for the same pool of microRNAs through their miRNA response elements (MRE), titrate miRNA levels and thereby regulate gene expression post-transcriptionally. SMAD interacting protein 1 (SIP1), a member of the ZEB family is a regulator of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) program, which is active during embryogenesis and tumor invasion and metastasis. Hence, we investigated the regulation of SIP1 by ceRNAs in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. Among hundreds of SIP1 ceRNAs listed at Competitive Endogenous mRNA Database (ceRDB), 14 transcripts (*PTEEN*, *ZEB1*, *PTCHI*, *CREB5*, *ACV2B*, *ENAH*, *ROBO2*, *ERBB4*, *E2F3*, *FOXO1*, *RICTOR*, *KLK3*, *ETS1*, *CDK6*) sharing at least 9 common MRE sites with SIP1 were selected and their expression in 9 HCC cell lines were determined by qRT-PCR. *ETS1* was found to be highly correlated with *SIP1* in HCC. Furthermore, repressing *SIP1* expression by shRNA in HCC cells resulted in decreased expression of *ETS1*, *PTEEN* and *ZEB1*. Our results suggest a possible bidirectional and post-transcriptional regulation of SIP1 and its ceRNAs in HCC.

## P-01.03.3-012

**A meta-analysis for the identification of common microRNA signatures in colorectal cancer**

N. Sahar<sup>1,2</sup>, N. Beldar, H. Ozdag

<sup>1</sup>*Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey,*

<sup>2</sup>*Consulate Institute of Information Technology, Islamabad, Pakistan*

Colorectal carcinogenesis (CRC) has quite frequent incidence and mortality rates worldwide, despite being studied for decades now. New biomarkers are needed to be identified in addition to the existing ones, due to heterogeneous nature of this disease. The regulatory molecular machinery of a cell, including microRNAs (miRNAs), contributes to this heterogeneity upon aberrant expression.

Herein, for a mechanistic understanding of differential gene expression in CRC tissue we analyzed miRNA expression profiles of 78 CRC tumors against 62 normal colorectal mucosa samples, using raw data from E-MTAB-752 and E-GEOD-35834 (Affymetrix microarrays), and GSE39982 and E-MTAB-813 (Agilent microarrays) datasets obtained from Gene Expression Omnibus and ArrayExpress. Raw samples were normalized (different platforms separately) using quartile normalization in BRB-ArrayTools. Differential expression of miRNAs was identified using cut-off values of  $P \leq 0.05$ , fold change  $\geq 1.5$  and stringent false discovery rates. miRTarBase and miRWalk2.0 databases were explored to identify validated targets.

We found thirty (including miR-21 and miR-183) and thirteen (miR-1, miR-139, miR-375, etc.) miRNAs commonly upregulated and downregulated respectively, in both Affymetrix and Agilent microarray results. Predicted targets of these miRNAs frequently belong to pathways related to cancer like  $\beta$ -catenin, Phosphoinositide-3-kinase, and Transforming growth factor- $\beta$ , to name few. Moreover, the target genes were significantly enriched in clusters related to cell cycle, cell differentiation and regulation of apoptosis.

These promising results will further be compared with differentially expressed gene profiles from a cohort of Turkish CRC patients. Hence the integrated study will refine the panel of diagnostic and prognostic CRC markers.

## P-01.03.3-013

**Hsa-miR-X modulates motility and invasion in triple breast cancer cell line**

S. Noyan<sup>1</sup>, H. Gürdal<sup>2</sup>, B. Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey,*

<sup>2</sup>*Department of Pharmacology, Ankara University, Ankara, Turkey*

Breast cancer is a heterogeneous disease and expression levels of certain receptors have demonstrated subtypes which characterize clinically distinct breast tumors. A triple-negative phenotype lacks expression of ER, HER2 and PR and is known as basal-like carcinoma. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs that participate in the gene expression in many biological processes. E-cadherin is an important mediator of adhesion in epithelial tissues, and loss of E-cadherin can play a critical role in tumor invasive behavior. Another key player of cell integrity PIP (3,4,5) triphosphate is generated at the leading edge of the cell and leads to cell polarization. PIP3 is generated by hydrolysis of PIP (4,5) bisphosphate, which is synthesized by PIP5K1. Any dysregulation in these molecules may support the invasive behavior of the cells. The aim of this study is to find out the role of miRNA precursor (hsa-miR-X) in invasion and motility in triple negative breast cancer cells.

In this study a triple-negative breast cancer cell line BT-20 was transfected with hsa-miR-X or scrambled control siRNA. To check its role in motility and invasion, wound healing and invasion assays were performed respectively. Cell invasion was monitored over a period of 24 h by xCELLigence real-time cell analyzer using a double-plate and measuring impedance-based signals. Additionally EMT markers were analyzed by qRT-PCR to explain the molecular mechanisms beneath motility and invasion.

We observed that cell motility and cell invasion diminished after transfection of BT-20 cells with mimic for hsa-miR-X. Furthermore, qRT-PCR experiments indicated that transfection of hsa-miR-X decreased the expression level of PIP5K1C while increasing the E-cadherin expression level.

Wound healing and invasion assays together with qRT-PCR results support the role of hsa-miR-X in cell motility and invasion. This process might be explained via E-cadherin mediated MET or GSK-3-beta related inhibition of invasion.

## P-01.03.3-014

**Expression level of five microRNAs as diagnostic markers in glioblastoma**

R. A. Khalilay<sup>1,2</sup>, M. Saffar<sup>3</sup>, B. O. Kanabe<sup>4</sup>, Y. Junjo<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>*Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey,* <sup>2</sup>*Department of Biology, College of Science and Scientific Research Center, Salahaddin University, Erbil, Iraq,* <sup>3</sup>*Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey,* <sup>4</sup>*Department of Biology, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey,* <sup>5</sup>*Department of Respiratory Medicine, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey,* <sup>6</sup>*National Center of Excellence in Analytical Chemistry, University of Sindh, Jamshoro, Pakistan*

Glioblastoma or glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and most aggressive type of glioma. Generally, GBM is



Volume 68, Supplement 1, December 2016

ISSN 0959-8049

# EJC

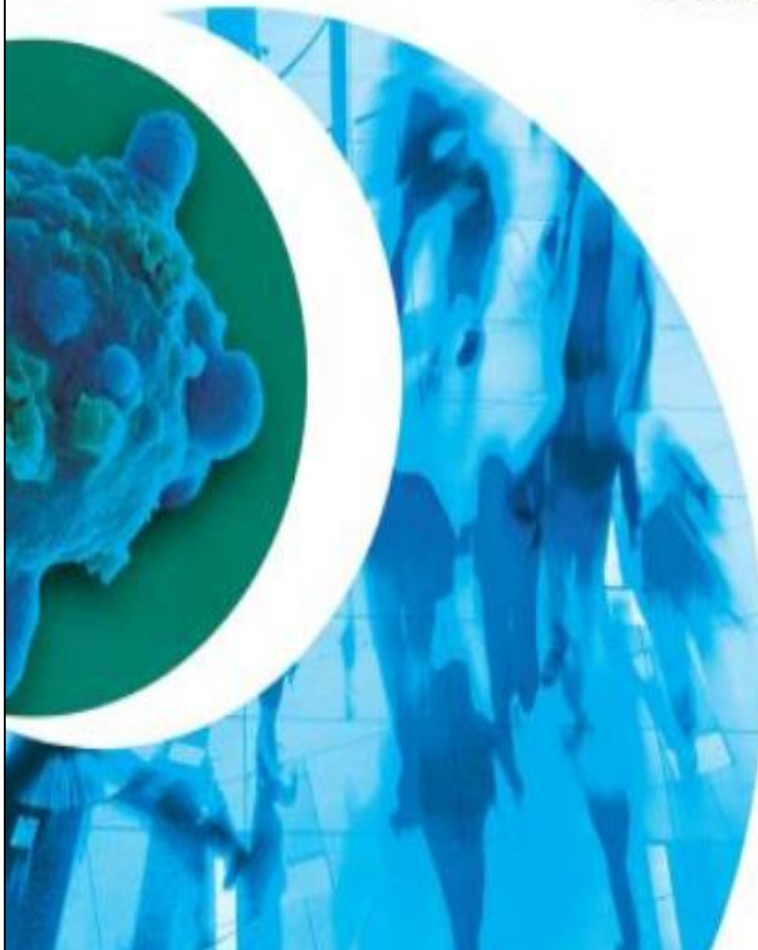
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER

IN THIS SUPPLEMENT

28<sup>th</sup> EORTC – NCI – AACR Symposium on  
Molecular Targets and Cancer Therapeutics

29 November – 2 December 2016  
Munich, Germany

Abstract Book



## 156 Poster (Board P127)

**Prostate cancer cell induced generation of myeloid derived suppressor cells from monocytes ex vivo is inhibited by targeting STAT3 with gallicolactone**

B. Hultén<sup>1</sup>, K. Leanderson<sup>2</sup>, M. Johansson<sup>3</sup>, A. Tjartel<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Translational Medicine, Lund University, Division of Urological Cancers, Malmö, Sweden; <sup>2</sup>Translational Medicine, Lund University, Cancer Immunology, Malmö, Sweden; <sup>3</sup>Glactone Pharma AB, Glactone Pharma AB, Helsingborg, Sweden

**Background:** The transcription factor Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 3 (STAT3) is implicated in acquired drug resistance, metastases and immune suppression in prostate cancer (PCa). Elevated levels of myeloid derived suppressor cells (MDSC) have been found in the peripheral blood and tumor site of PCa patients and correlate with disease progression. MDSC play a major role in the suppression of antitumor immunity. STAT3 signaling is involved in accumulation, generation and function of MDSCs. We aimed to investigate if cells with an MDSC phenotype could be generated from monocytes in the presence of PCa cells and if this induction could be blocked by the direct STAT3 inhibitor gallicolactone.

**Materials and methods:** Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors. Monocytes were co-cultured with PCa cells in transwells allowing cancer cells and monocytes to share culture medium. Monocytes in co-cultures or with conditioned medium from PCa cells were grown for 72 h with or without the STAT3 inhibitor gallicolactone with subsequent analysis by flow cytometry for CD14 and HLA-DR for MDSC generation. PBMC was collected from patients with metastatic PCa and healthy controls and analysed for the expression of CD14 and HLA-DR with FACS analysis. CD14+ HLA-DR cells were sorted using BD FACSAria cell sorter, subjected to cytochrome and analysed for expression of pSTAT3.

**Results:** PCa cell lines induced an MDSC phenotype (CD14+ HLA-DR+) in monocytes from healthy donors, with the greatest induction from the more aggressive PCa cell line DU145. Gallicolactone prevented the PCa cell induced MDSC phenotype in a dose dependent manner. The inhibitory effect of gallicolactone on PCa induction of MDSCs may be due to STAT3 inhibition in both monocytes and PCa cells. The levels of MDSCs (CD14+ HLA-DR+) were significantly higher in metastatic PCa patients compared to healthy controls and were shown to express pSTAT3.

**Conclusions:** This study demonstrates that PCa cells can induce MDSCs from monocytes ex vivo and that inhibiting STAT3 can block this process. This indicates that STAT3 inhibition may reverse the immunosuppressive mechanisms caused by MDSC activation and that STAT3 inhibitors represents a potential new treatment for advanced PCa where levels of MDSC are increased.

**Conflict of interest:** Ownership: Shareholders in Glactone Pharma AB (PH, AB, MJ). Board of Directors: Glactone Pharma AB (AB). Other Substantive Relationships: Project manager for Glactone Pharma AB (MJ).

## 157 Poster (Board P128)

**Changes in transcription of the genes from iron and copper metabolic pathways are associated with progression from T1 to T3 stage of renal cell carcinoma**

A. Borys<sup>1</sup>, T. Golabek<sup>2</sup>, M. Przydacz<sup>2</sup>, A. Klimkowska<sup>2</sup>, J. Toton-Zuranska<sup>1</sup>, J. Machlowska<sup>1</sup>, P. Chlosta<sup>1</sup>, K. Okon<sup>1</sup>, P. Wolkow<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Jagiellonian University, Medical College, Center for Medical Genomics OMICRON, Krakow, Poland; <sup>2</sup>Jagiellonian University, Medical College, Department of Urology, Krakow, Poland; <sup>3</sup>Jagiellonian University, Medical College, Department of Pathology, Krakow, Poland

**Background:** Staging of renal cell carcinoma (RCC), based on TNM classification as well as size and regional spread of primary tumors, provides useful prognostic indicator of patient outcome. However, clinical course of the disease varies even among patients within the same staging strata. This calls for search of other prognostic factors that could improve prognostication for individual patients. Molecular events, e.g. presence of mutations or changes in transcriptional and epigenetic regulation may provide a clue for personalization of disease prognosis. However, molecular events, associated with regional spread of the tumor during progression from stage T1 to T3 are known only partially. We aimed to identify new patterns of gene expression, which point at the mechanisms of local tumor spread.

**Material and Methods:** We used microarrays for genome-wide analysis of gene expression in 24 patients with RCC in stage T1 through T3. Unsupervised clustering divided patients into subgroups. Genes with fold change above 1.5 were used for clustering. Pathway analysis identified molecular mechanisms, associated with tumor stage and survival over 10 year observational period.

**Results:** Unsupervised clustering revealed three clusters of patients. While one cluster contained only T1 patients and other only T3 patients, the third

cluster contained a mixture of T1, T2 and T3 patients. We interpret this group as patients at intermediate stage, whose tumors started already to grow and spread, therefore left typical T1 phenotype but being in the transition process have not reached yet the T3 phenotype. We were intrigued by the fact that our patients were not divided into two clean T1 and T3 clusters. We found most interesting the group of genes, upregulated in the patients from an intermediate group, which distinguished them from T1 cluster and at the same time made them similar to the T3 cluster. Pathway analysis identified among them genes responsible for cell proliferation and mesenchymal transition but surprisingly also genes related to iron and copper metabolism, such as lysyl oxidase or STEAP3.

**Conclusion:** Growth of tumor and its local spread in RCC patients is associated with changed transcriptional regulation of iron and copper metabolism.

**No conflict of interest.**

## 158 Poster (Board P129)

**Chimeric anti-podoplanin mAbs produced by Castlab technology possess high antitumor activity via ADCC and CDC activities**

A. Kurita<sup>1</sup>, M.K. Kaneko<sup>2</sup>, S. Ogasawara<sup>2</sup>, M. Fukuyama<sup>1</sup>, Y. Kato<sup>2</sup>, <sup>1</sup>University of Tokyo, Department of Pathology, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Tohoku University, Department of Regional Innovation, Miyagi, Japan

**Background:** Podoplanin (PDPN), a platelet aggregation-inducing transmembrane glycoprotein, is expressed in a variety of tumors, and binds to C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2). PDPN expression is associated with invasion and metastasis. Several anti-PDPN monoclonal antibodies (mAbs) such as NZ-1 showed antitumor and antimetastatic activities by binding to platelet aggregation-stimulating (PLAG) domain of PDPN. Recently, we developed novel mouse anti-PDPN mAbs, Lp1Ab-2, Lp1Ab-7, and Lp1Ab-23 using the cancer-specific mAb (Castlab) technology.

**Methods:** We generated and characterized mouse-human chimeric anti-PDPN mAbs, chLp1Ab-2, chLp1Ab-7, and chLp1Ab-23. We investigated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) activities of chimeric anti-PDPN mAbs in vitro. Furthermore, we evaluated the in vivo efficacy of chimeric anti-PDPN mAbs using several xenograft models.

**Results:** Novel chimeric anti-PDPN mAbs showed ADCC and CDC activities against CHO/PDPN, glioblastoma, mesothelioma, or lung cancer cell lines. Treatment with chimeric anti-PDPN mAbs and human NK cells abolished tumor growth in xenograft models of PDPN-expressing cell lines. **Conclusion:** Chimeric anti-PDPN mAbs produced by Castlab technology suppressed tumor development via ADCC/CDC activities. PDPN should be useful as a novel antibody-based therapy.

**No conflict of interest.**

## 159 Poster (Board P130)

**The role of hsa-miR-X in cell motility and invasion in triple-negative breast cancer cell lines**

S. Noyan<sup>1</sup>, H. Gurdal<sup>2</sup>, B. Gur Dedeoglu<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey; <sup>2</sup>Ankara University, Department of Pharmacology, Ankara, Turkey

The aim of this study is to identify the role of hsa-miR-X in motility and invasion in TNBC. Triple-negative phenotype which is an aggressive type of breast cancer lacks expression of ER, HER2 and PR and is known as basal-like carcinoma. Since the lack of targeted therapies and resistance to chemotherapy it is inevitable to identify new molecules for diagnosis and treatment of triple negative breast cancer (TNBC). MicroRNAs could be good candidate molecules which regulate gene expression in many biological processes. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process which induces motility and invasion of the cells. E-cadherin is an important mediator of adhesion in epithelial tissues. Loss of E-cadherin can play a critical role in tumor invasive behavior and E-cadherin transcription is known to be regulated by transcriptional repressors, such as SNAI. Dysregulation of these molecules could affect the invasion and metastatic capacity of the cell.

In this study three triple negative breast cancer cell lines, BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231 were transfected with hsa-miR-X or scrambled control siRNA. To check its role in motility and invasion, wound healing and invasion assays were performed respectively. Cell invasion was monitored over a period of 24 hours by xCELLigence real-time cell analyzer using a double-plate and measuring impedance-based signals. Furthermore, EMT markers were analyzed in transfected cells by qRT-PCR to explain the effect of hsa-miR-X in motility and invasion.

We observed that cell motility and invasion decreased in three triple negative breast cancer cell lines (BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231 cells) after transfected with mimic for hsa-miR-X. Additionally, qRT-PCR experiments demonstrated that transfection of hsa-miR-X decreased the expression level of SNAI, while increasing the E-cadherin expression level.

### Introduction

The aim of this study is to identify the role of hsa-miR-X in motility and invasion in TNBC. Triple-negative phenotype which is an aggressive type of breast cancer that lacks expression of ER, HER2 and PR and is known as basal-like carcinoma. Since the lack of targeted therapies and resistance to chemotherapy it is inevitable to identify new molecules for diagnosis and treatment of triple negative breast cancer (TNBC). MicroRNAs (miRNA) could be good candidate molecules, which regulate gene expression in many biological processes.

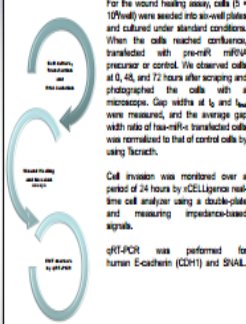
Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process, which induces motility and invasion of the cells. E-cadherin is an important mediator of adhesion in epithelial tissues. Loss of E-cadherin can play a critical role in tumor invasive behavior and E-cadherin transcription is known to be regulated by transcriptional repressors, such as SNAI1. Dysregulation of these molecules could affect the invasion and metastatic capacity of the cell.

In this study three triple negative breast cancer cell lines, BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231 were transfected with hsa-miR-X and to check its role in motility and invasion, wound healing and invasion assays were performed respectively. Furthermore, EMT markers were analyzed in transfected cells by qRT-PCR to explain the effect of hsa-miR-X in motility and invasion.

### Methods

The human triple-negative breast cancer cell lines (BT-20, MDA-MB-468, MDA-MB-231) were obtained from the ATCC supplemented with 10% FBS. All cell lines were cultured in a humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

miRNA overexpression was achieved by transfection with human miRNA precursor (Dharmacon) and verified by qRT-PCR. Total RNA was extracted from cell lines with QIAzol reagent.



For the wound healing assay, cells (5 × 10<sup>4</sup>/well) were seeded into 96-well plates and cultured under standard conditions. When the cells reached confluence, transfected with pre-miR miRNA precursor or control. We observed cells at 0, 48, and 72 hours after seeding and photographed the cells with a microscope. Gap widths at 0, 48 and 72 were measured, and the average gap width ratio of hsa-miR-X transfected cells was normalized to that of control cells by using ImageJ.

Cell invasion was monitored over a period of 24 hours by xCELLigence real-time cell analyzer using a double-plate and measuring impedance-based signals.

qRT-PCR was performed for human E-cadherin (CDH1) and SNAI1.

### Results

Pathway enrichment analysis results suggested that hsa-miR-X might function as a mediator of breast cancer cell motility and invasion. To test this, scrambled control and hsa-miR-X mimic were transfected to MDA-MB-231, MDA-MB-468 and BT-20 cells and these cells were submitted to a scratch and invasion assays. Figure 1 shows that gap closure was delayed in hsa-miR-X transfected cells compared with controls.

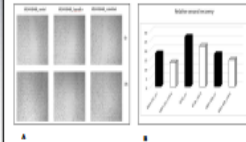


Figure 1. hsa-miR-X could inhibit the motility of breast cancer cells. hsa-miR-X mimic transfected triple negative breast cancer cell lines were observed to have decreased motility ability compared both to scrambled transfected and control cells (%). Same results were obtained from each cell line and are indicated in it.

To examine whether hsa-miR-X have inhibitory effect in TNBC, triple negative breast cancer cell lines were transfected with hsa-miR-X or scrambled in concentration of 25nmol and then were analyzed by xCELLigence invasion assay. As it is shown in Figure 2, the transfection with hsa-miR-X could consistently decrease the TNBC cells invasive action compared with control group.

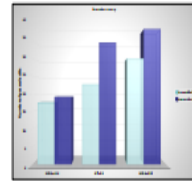


Figure 2. Effect of hsa-miR-X on the invasive capacity of the cells. hsa-miR-X transfection diminished the invasive action remarkably compared with scrambled transfected cells.

In breast cancer cells, we known that enforcing SNAI1 overexpression induces epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasive migration and metastatic properties. Furthermore, E-cadherin expression in breast cancer cells correlates negatively with SNAI1 expression. Our qRT-PCR experiments demonstrated that transfection of hsa-miR-X decreased the expression level of SNAI1, while increasing the E-cadherin expression level (Figure 3).

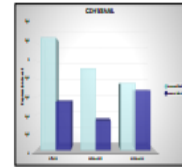


Figure 3. Effect of hsa-miR-X on E-cadherin and SNAI1 expression in triple negative breast cancer cell lines.

### Conclusions

Wound healing and invasion assays together with qRT-PCR results could support the role of hsa-miR-X in cell motility and invasion via SNAI1 and E-cadherin dependent manner. Overall, our results identify E-cadherin and SNAI1 regulation by hsa-miR-X as a pivotal regulator of an EMT axis in triple negative breast cancer cell lines.

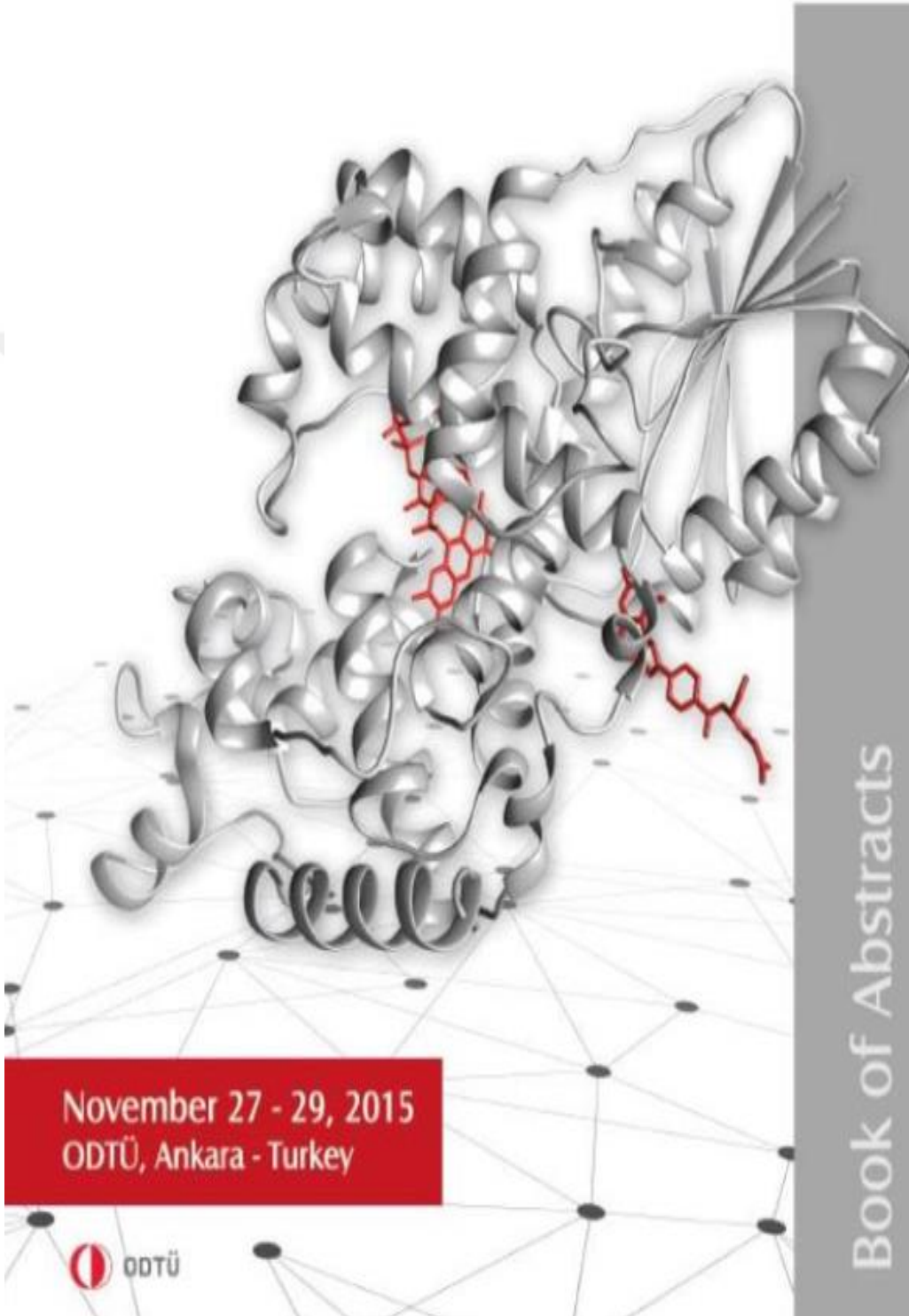
It might be concluded that insights into the miRNA research that regulates triple negative breast cancer motility and invasion could lead to reveal therapeutic targets.

Acknowledgement: This project was funded by Ankara University BAP department (Project No: 13B4143001).



# MolBiyokon 2015

4<sup>th</sup> International Congress  
of the Molecular Biology Association of Turkey



November 27 - 29, 2015  
ODTÜ, Ankara - Turkey



Book of Abstracts

### Hsa-Mir-X Regulates Cell Motility in Breast Cancer Cell Lines

Senem Noyan, Bala Gür Dedeoğlu

Ankara University Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

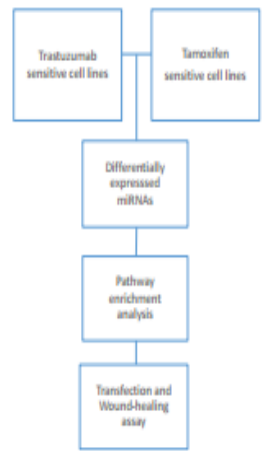
Cell migration that comprises multiple steps is essential for developmental, physiological, and pathological processes in all multicellular organisms. It is also an important process for the development of metastases in cancer. The first step of a migration is cell motility depends on localized actin polymerization at the leading edge of the cell. MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNA molecules. The potential roles of candidate microRNAs were revealed for the treatment of various cancer disease models. This study identifies the global expression profiles of miRNAs in tamoxifen and trastuzumab responsive breast cancer cell lines. In this study, the putative roles of miRNAs in relation to trastuzumab and tamoxifen response was investigated. miRNA qRT arrays were used to search for differentially expressed miRNAs between three different breast cancer cell lines. At the end of analysis a common miRNA (hsa-miR-x) was found to be significantly differentially expressed in all cell lines. The targets of the hsa-miR-x were investigated in silico using target identification database, miRWalk. Pathway enrichment analysis of the target genes was performed by KEGG. Consequently pathway analyses predicted that the miRNA would regulate well-described cell migration signaling pathways such as focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton. Accordingly, cell motility was evaluated using the conventional wound-healing assay. We observed that cell motility diminished after transfection of ER/HER2 positive and triple negative breast cancer cell lines (BT-474 / BT-20 / MDA-MB-231 / MDA-MB-468) with mimic for this miRNA. The idea that hsa-miR-x could regulate cell migration derives from the results that it could mediate the formation of actin structure to inhibit motility of cancer cells.



**ABSTRACT**

Cell migration that comprises multiple steps is essential for developmental, physiological, and pathological processes in all multicellular organisms. It is also an important process for the development of metastases in cancer. The first step of a migration is cell motility depends on localized actin polymerization at the leading edge of the cell. MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNA molecules. The potential roles of candidate microRNAs were revealed for the treatment of various cancer disease models. This study identifies the global expression profiles of miRNAs in tamoxifen and trastuzumab responsive breast cancer cell lines. In this study, the putative roles of miRNAs in relation to trastuzumab and tamoxifen response was investigated. miRNA qRT arrays were used to search for differentially expressed miRNAs between three different breast cancer cell lines. At the end of analysis a common miRNA (hsa-miR-x) was found to be significantly differentially expressed in all cell lines. The targets of the hsa-miR-x were investigated in silico using target identification database, miRWalk. Pathway enrichment analysis of the target genes was performed by KEGG. Consequently pathway analysis predicted that the miRNA would regulate well-described cell migration signaling pathways such as focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton. Accordingly, cell motility was evaluated using the conventional wound-healing assay. We observed that cell motility diminished after transfection of ER/HER2 positive and triple negative breast cancer cell lines (BT-474 / BT-20 / MDA-MB-231 / MDA-MB-468) with mimic for this miRNA. The idea that hsa-miR-x could regulate cell migration derives from the results that it could mediate the formation of actin structures to inhibit motility of cancer cells.

**OBJECTIVES**



The human breast cancer cell lines (BT-474, SKBR3, MCF7, MDA-MB-231, BT-20, MDA-MB-468) were obtained from the American Type Culture Collection supplemented with 10% FCS. All cell lines were cultured in a humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

Total RNA, including miRNA, was isolated from cell lines using QIAzol reagent (Qiagen) according to manufacturer's instructions. miRNA qRT arrays were used to search for differentially expressed miRNAs between three different breast cancer cell lines.

Mature hsa-miR-x levels were quantified with Qiagen miRNA assays.

For the wound healing assay, cells (6-8 × 10<sup>5</sup>) were seeded into six-well plates and cultured under standard conditions. When the cells reached confluence, transfected with pre-miR miRNA precursor or control. At 24 hours after transfection, a wound was made by scraping the cell monolayer with a 200 µl pipette tip and washed twice with medium. We observed cells at 0, 48, and 72 hours after scraping and photographed the cells with a microscope.

**RESULTS**

Using qRT-based microRNA profiling analysis and these screening criteria, we obtained a list of trastuzumab and tamoxifen responsive microRNAs. Among these microRNAs, we focused on hsa-miR-X as a microRNA up-regulated in both MCF7, SKBR3 and BT-474 cells. First, we utilized miRBase algorithm for predicting the microRNA targets. After pathway enrichment analysis, we selected two cell migration signaling pathways focal adhesion and regulation of actin cytoskeleton (Figure 1).



Figure 1. Predicted targets of hsa-miR-x in focal adhesion pathway.

The results suggested that hsa-miR-X might function as a mediator of breast cancer cell motility. To test this, control and hsa-miR-x mimic MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-20 and BT-474 cells were submitted to a scratch assay. Gap widths at t<sub>0</sub> and t<sub>final</sub> were measured, and the average gap width ratio of hsa-miR-x transfected cells was normalized to that of control cells by using TScratch. Figure 2 shows that gap closure was delayed in hsa-miR-x transfected cells compared with controls.

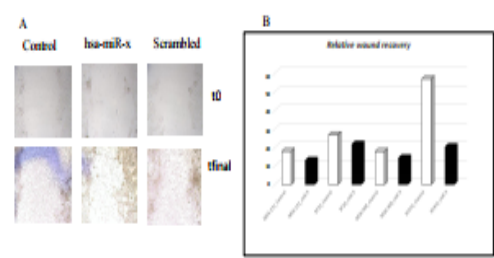


Figure 2. hsa-miR-x could inhibit the motility of breast cancer cells. Hsa-miR-x mimic transfected BT474 cells were observed to have diminished motility ability compared both to scrambled miRNA transfected and control cells (A). Same results were obtained from each cell line indicated in B.

**CONCLUSIONS**

MicroRNAs play biological roles in the mechanisms responsible for antitumor effects. Alternatively, some microRNAs would be biomarkers to predict the treatment response of drugs. We suggest that the genes that were targeted by hsa-miR-x are related to focal adhesion and motility. We observed that cell motility diminished after transfection of ER/HER2 positive and triple negative breast cancer cell lines (BT-474 / BT-20 / MDA-MB-231 / MDA-MB-468) with mimic for this miRNA. The up-regulation of miR-x may play a biological role in cell migration.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This project was funded by Ankara University BAP department (Project No: 1384143001).

TCCAGC CGTBAA AGTGT TCCAGC CGTBAA  
AACCGG AACGCC TT1A AACCGG AACGCC  
ASCTCT CAACCG ASCTCT CAACCG  
GGACAG ATTCAG GGACAG ATTCAG  
TATCA ATGCTG TATCA ATGCTG  
CGATAGTGC CGATAGTGC  
ACACCATC ACACCATC  
GGATTG GGATTG  
ATAAGGTG ATAAGGTG  
ARGAGATAGAA ARGAGATAGAA  
AGGCTT CACCTT AGGCTT CACCTT  
CTCTAC GAACCA CTCTAC GAACCA  
CTCTCA CATTAT CTCTCA CATTAT  
AAGGCG TGGGCT AAGGCG TGGGCT  
GGCTAG TAGAGC GGCTAG TAGAGC



# ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ (Uluslararası Katılımlı)

27-30 Ekim 2015 - Ölüdeniz / Fethiye



Biyoinformatik 'Omik' Veri Analiz Yöntemleri  
ve Kişisel Tıp Uygulamaları Kursu  
26 Ekim 2015

## KONGRE KİTABI CONGRESS BOOK

pozitif apoptotik hücrelerin yüzdesi böbrek 13,2 iken, karaciğerde 17,6 olarak belirlenmiştir. Grup 2'de ise bu oranlar böbrekte 23,2; karaciğerde 22,1 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin oranı ise böbrekte 18,5 ve karaciğerde ise 17,2 olarak ortaya çıkmıştır. Apoptotik indeks tüm gruplarda aynıdır. Bizim çalışmamız, prenatal dönemde levetiracetam maruz kalmamın yeni doğan rat yavrularının karaciğer ve böbrek dokularında apoptotic bir etkisinin olmadığı ve apoptozis açısından levetiracetam'ın gebelik kullanımının güvenli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma gebelik süresince levetiracetam maruziyetinin rat yavrularının karaciğer ve böbrek dokularında apoptotik bir etkisini değerlendiren ilk araştırmadır.

#### Evaluation of Apoptotic Cell Death on Liver and Kidney Tissues Following Administration of Levetiracetam during Prenatal Period

Tejcan Akın<sup>1</sup>, Tural Sengül<sup>2</sup>, Elbistan Mehmet<sup>3</sup>, Güvenç Tolga<sup>4</sup>, Kara Nurten<sup>5</sup>, Gurgor Pinar Naile<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Ahi Evran University, School of Health, Kirsehir, Turkey.

<sup>2</sup>Öndokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Section of Medical Genetic, Samsun, Turkey.

<sup>3</sup>Öndokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary, Department of Pathology, Samsun, Turkey.

<sup>4</sup>Ordu University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Ordu, Turkey

Levetiracetam is a new generation antiepileptic drug used in treatment of patients with epilepsy and has adverse effects on different tissues. We aimed to evaluate whether the apoptotic effects of levetiracetam exposure during pregnancy on liver and kidney tissues of rat pups or not. We used the newborn rat pups exposed to levetiracetam during pregnancy. Thirty Sprague-Dawley rats were divided into three groups. The groups 1 and 2 rats were treated with different doses of levetiracetam (25 mg/kg/d and 50 mg/kg/d, respectively) from gestational days 1 to 18 during pregnancy. Group 3 (control group) was treated with the same volume of saline. Apoptosis was evaluated by the terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. Liver and kidney tissues from rat pups were used for investigation. The percent of TUNEL positive apoptotic cells in group 1 were 13.2 and 17.6 for kidney and liver, respectively. The percent of TUNEL positive apoptotic cells in group 2 were 23.2 and 22.1 for kidney and liver, respectively. The percent of TUNEL positive apoptotic cells (%) in group 3 were 18.5 and 17.2 respectively for kidney and liver. The apoptotic index were the same in kidney and liver tissues of all groups. Our results demonstrate that the prenatal exposure to levetiracetam has no apoptotic effects on liver and kidney of rat pups and has biosafety in pregnancy in terms of apoptosis. The first study evaluating the apoptotic effects on liver and kidney tissues following administration of levetiracetam during prenatal period.

#### PS-05 03

#### Meme Kanseri Hücrelerinde hsa-miR-770-5p'nin Antiproliferatif Etkisi

Noyan Senem, Gür Dedeoğlu Bala

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

Meme kanseri, klinik davranış ve genetik çeşitliliğe bağlı terapötik müdahaleye verdiği cevap açısından heterojen bir hastalıktır. Östrojen ve östrojen reseptörü meme kanserinin dörtte üçünde ifade gösterir ve meme kanserinin büyüme ve ilerlemesinde rol alır. HER2 (ErbB2) gen amplifikasyonu ve aşırı ifadesi ile ilişkili olarak artan protein seviyesi meme kanseri içerisinde %30 civarında görülür ve genellikle kötü prognosis ile koreledir. Monoklonal antikor ve endokrin terapi, meme kanseri tedavisinde moleküler değişiklikleri temel alan terapötik uygulamalardan ikisidir. MikroRNA'lar (miRNA) 20-25 nt uzunluğunda protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA'lar peçok organizmada evrimsel olarak korunan diziler olup post-transkripsiyonel olarak gen ifadesini baskırlar. Yapılan peçok çalışma mikroRNA'ların meme kanserinde bilinen mekanizmaları etkileyebildiğini göstermekte ve bu düzenleyici RNA moleküllerinin tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef molekül olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, iki farklı meme kanseri alt-tipine uygulanan iki farklı ilacın ortak moleküler etki mekanizmasını miRNA boyutunda açıklamayı hedefleyen çalışmadır. Çalışmada ER(+)/HER2(-) olduğu bilinen üç farklı meme kanseri hücre hattı (BT474-SKBR3-MCF7) iki farklı ilaç olan trastuzumab ve tamoxifen ile muamele edilmiş ve ilaca duyarlı miRNA profilleri "Qiagen miScript miRNA PCR Arrays" kullanılarak elde edilmiştir. miRNA'lara ait hedef genler ve rol aldıkları yollar veritabanları aracılığıyla belirlenmiştir. İlaç ve iki farklı meme kanseri alt-tipinden bağımsız ve ortak olan ve anlamlı olarak artış gösteren bir adet miRNA varlığı tespit edilmiştir (hsa-miR-770-5p). Bu mikroRNA'nın belirtilen hücrelere transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla WST1 uygulaması yapılmış ve kullanılan hücrelerde proliferasyonun azaldığı saptanmıştır. Bu miRNA'nın meme kanseri tedavisinde hücre tipinden bağımsız aday hedef miRNA olabileceği düşünülmüştür.

#### Antiproliferative Effect of hsa-miR-770-5p in Breast Cancer Cell Lines

Noyan Senem, Gür Dedeoğlu Bala

Ankara University Biotechnology Institute, Ankara

Breast cancer is a heterogeneous disease in which clinical behavior and responses to therapeutic interventions depend on multiple genetic alterations. Oestrogens and oestrogen receptor play fundamental roles in the development and progression of more than three-quarters of breast cancers. The ErbB2 gene encodes an epidermal growth factor receptor related tyrosine kinase that is overexpressed in 30 % of invasive breast cancers.



# Meme Kanseri Hücrelerinde hsa-miR-770-5p'nin Antiproliferatif Etkisi

Senem Noyan<sup>1</sup>, Bala Gür Dedeoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü



## GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın malignansi olarak yerini almakta olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dünyada meme kanseri, tüm kanser insidansının %10-15'ini kapsamaktadır ve akciğer kanserinden sonra görülme sıklığında 2. sırada yer alır. Klasik olarak meme kanseri histopatolojik özellikleri (ER, PR ve HER2) kullanılarak farklı klinik alt tiplere sınıflandırılmıştır. Hormon reseptör pozitif (HR+), HER2 pozitif (HER2+) ve her iki reseptör negatif olarak ayrılan bu alt tipler farklı biyolojik davranışlar ve tedavi duyarlılığı göstermektedir. Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i östrojen pozitifdir (ER+) ve östrojen hormonuna yanıt olarak gelişim gösterirler. HER2'nin aşırı ifadesi (HER2+), meme kanseri hastalarının %20-30'unda görülen bir durumdur ve HER2+ tümörlerin tamoksifen ve standart kemoterapiye direnç gösterdiği bilinmektedir.

Son yıllarda moleküler biyolojisi temel alınarak yapılan meme kanseri sınıflandırılmasına paralel olarak araştırmacılar tarafından tümör oluşumu, korunması ve yayılmasında yer alan süreçleri kontrol eden sinyal yollarını incelemeye başlamışlardır. Yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların (miRNA) bulunması ve hücrede çok önemli işlevlere sahip olduklarını gösterilmesi bu molekülleri de meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol alan şüpheli listeye koymuştur ve miRNA ifadesi profilleri ile açıklanamayan farklılıklar miRNA çipleri ile araştırılmaya başlanmıştır. miRNA çipleri sayesinde meme kanserine sebep olabilecek hedef miRNA'lar bulunmaya başlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmamızda ATCC'den alınan SK-BR-3 (HTB-30), BT474 (HTB-20) ve MCF7 (HTB-22) meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler: %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glütamin içeren besiyerinde idame ettirilmiştir.

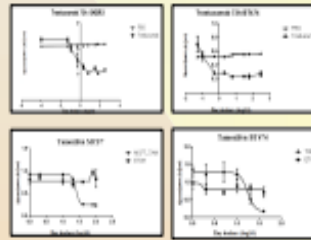
Monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin) ve ER+ hücrelerde etkili olduğu bilinen tamoksifen belirlenen dozlarda uygulanmıştır.

WST-1 protokolü aracılığıyla farklı dozlardaki ilaç uygulamasının hücre çoğalmasına etkisi gözlemlenmiş ve IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır. Trizol ile total RNA izolasyonu yapılmış ve iki farklı ilaca duyarlı miRNA profilleri "Qiagen miScript miRNA PCR Arrays" kullanılarak elde edilmiştir.

İlaç ve iki farklı meme kanseri alt-tipinden bağımsız ve ortak olan ve anlamlı olarak artış gösteren bir adet miRNA varlığı tespit edilmiştir. Bu mikroRNA'nın belirlenen hücrelere transfeksiyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla WST1 uygulaması yapılmıştır.

## BULGULAR

HER2+ olduğu bilinen SKBR3 ve BT474 hücrelerine belirlenen dozlarda trastuzumab uygulaması; MCF7 ve BT474 hücrelerine belirlenen dozlarda tamoksifen uygulaması yapılmıştır. 72 saat sonunda GraphPad programı aracılığıyla hücre canlılık eğrileri ve IC<sub>50</sub> değerleri elde edilmiştir (Şekil 1).



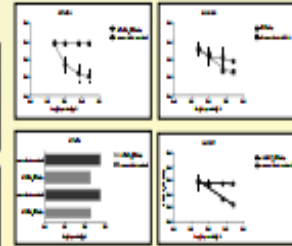
Şekil 1. Hücrelere belirli dozlarda ilaç uygulaması ile elde edilen canlılık eğrileri.

Trastuzumab ve tamoksifen varlığında hsa-miR-770-5p hücre bağımsız olarak artan tek mikroRNA'dır. Bu mikroRNA'nın hedefleri arasında ErbB ailesi üyeleri ve ESR2 geninin olması dikkat çekicidir (Şekil 2).



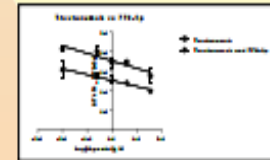
Şekil 2. Etili sinyal yolları sisteminde yer alan hsa-miR-770-5p hedefleri.

hsa-miR-770-5p mimik kullanılarak hücrelere yapılan transfeksiyon işlemi sonunda proliferasyonu azaldığı gösterilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. hsa-miR-770-5p'nin antiproliferatif etkisi.

BT474 hücrelerinde hsa-miR-770-5p mimik ve trastuzumab kullanılarak yapılan transfeksiyon sonucunda bu mikroRNA'nın proliferasyonda ilacın etkisini artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. hsa-miR-770-5p ve trastuzumab uygulaması ile elde edilen canlılık eğrileri.

## TARTIŞMA

Tamoksifen ve trastuzumab uygulamaları ile anlamlı farklılık gösteren hsa-miR-770-5p'nin hücrelere transfeksiyon sonucunda bu mikroRNA'nın proliferasyonu azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda trastuzumab ile birlikte verildiğinde ilacın etkisini artırması bu miRNA'nın hedefleri arasındaki ErbB2 ailesi üyelerinden HER2 üzerinden etkililik gösterdiğini düşündürmektedir. Bu miRNA'nın meme kanseri tedavisinde hücre tipinden bağımsız tedaviyi destekleyici aday miRNA olabileceği düşünülmüştür.

