



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

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA miR-221-3p VE PAK1  
GEN İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TAYEB SADIQ TAYEB**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Serdar Öztuzcu**

**GAZIANTEP**

**2014**

**T.C.**  
**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA miR-221-3p VE PAK1 GEN İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TAYEB SADIQ TAYEB**

Tez Savunma Tarihi: 25 / 06 / 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Ahmet ARSLAN**  
**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr. Serdar Öztuzcu**  
**Tez Danışmanı**

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi İmzası**

Prof. Dr. Ahmet Arslan

Yrd. Doç. Dr. Serdar Öztuzcu

Doç. Dr. Şeniz Demiryürek

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25/06/2014

Tayeb Sadiq Tayeb

## TEŞEKKÜRLER

Öncelikle, bilimsel projemi tamamlamak ve başarıyla gerçekleştirmek için bana güç veren Allah'a en iyi şükranlarımı sunmak istiyorum. Bana yardımcı olan danışmanım Yrd.Doç. Dr.Serdar OZTUZCU ye, bu tezi araştırmamda ve yazmamda bana her zaman verdiği rehberlik, danışmanlık, motivasyon, eleştiri ve cesaretlendirmesi için en derin şükranlarımı sunmak istiyorum. Bu tezi yazmamda yardımları ve desteği olan anabilim dalı bölüm başkanı Prof.Dr. Ahmet ARSLAN'a minnettarlığımı ve teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Laboratuar Bölümünden sorumlu Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya İĞCİ'ye , Yrd.Doç Dr. Mehri İĞCİ' ve Yrd.Doc.Dr.Mustafa ULAŞLI ya yardımlarından dolayı özel teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm arkadaşlara, özellikle bay Sercan ERGUN, diğer bölüm laboratuar personeline ve Gaziantep Üniversite Hastanesinin genetik laboratuvarı personeline yardımlarından dolayı teşekkürler.

Özel bir teşekkür de ailem için, onların sürekli desteği, önemli tavsiyeleri ve teşvikleri olmadan doğru yolu bulamazdım.

Tezimi tamamlamamdaki yardım ve teşvikleri için erkek ve kız kardeşlerime özel olarak teşekkür ederim var. özellikle Jamal TAYEB.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SIMGE ve KISALTMALAR .....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Meme Anatomisi .....	7
2.1.1. Adipoz doku .....	8
2.1.2. Loblar .....	8
2.1.3. Lobüller .....	8
2.1.4. Süt kanalları.....	8
2.1.5. Lenf nodları.....	8
2.2. Meme Fizyolojisi .....	8
2.3. Meme kanseri.....	9
2.3.1. Epidemioloji .....	9
2.3.2. Etioloji.....	9
2.3.3. Kanser Biyolojisi.....	9
2.3.4. Kanser genetik yapısı .....	10
2.3.5. Hücre döngüsü ve kanser .....	11
2.3.6. Programlı hücre ölümü (Apoptoz, otofaji ve programlı nekrozu).....	12
2.3.7. Tümörde yeni damar oluşumu ve metastaz .....	12
2.3.8. Meme kanserinde tümör gelişimi .....	12
2.3.9. Meme kanserinde kromozom kararsızlığı (KK).....	13

2.3.10.	Meme kanserinde mikrosatellit karasızlığı (MK).....	13
2.3.11.	Meme kanseri tipleri .....	14
2.3.12.	Meme kanserinde sinyal iletim yolakları.....	15
2.3.12.1.	HER2 aşırı ifadesinin onkojenitesi .....	15
2.3.12.2.	Meme kanserinde moleküler seviyede estrogen etkisi.....	15
2.4.	Meme Kanseri Hücresi Alıcıları.....	16
2.4.1.	Endokrin alıcısı (östrojen veya progesteron alıcısı) pozitif .....	16
2.4.2.	HER2 pozitif.....	17
2.4.3.	Üçlü negatif; östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olmayan.....	17
2.4.4.	Üçlü negatif; östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olan.....	17
2.5.	Meme Kanseri Evreleri .....	17
2.6.	Meme Kanserinde Tamoksifen.....	19
2.7.	Tamoksifen Dirençliliği.....	22
2.7.1.	p21-Aktive edilmiş Kinaz-1 (PAK1) aracılıktamoksifen dirençliliği .....	23
2.8.	miRNA in Breast Cancer .....	24
2.9.	miR-221-3p veTamoksifen Dirençliliği Üzerine Etkileri .....	25
3.	GEREÇ veYÖNTEM.....	27
3.1.	Hücre Kültürü için Sterilizasyon .....	27
3.2.	Hücre Soyları ve Kültür Aşaması .....	27
3.3.	Hücre Soylarından Total RNA (miRNA dahil) Eldesi .....	28
3.4.	RNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA Eldesi .....	29
3.4.1.	mRNA'dan cDNA eldesi .....	29
3.4.2.	.miRNA'dan cDNA eldesi .....	30
3.5.	Elde Edilen cDNA'lardan Kalite ve Miktar Tayini.....	31
3.6.	PAK1 ve miR-221-3p İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi .....	31

3.6.1.	Primer Seçimi.....	32
3.6.2.	PCR bileşenleri .....	33
3.6.2.1.	<i>PAKI</i> ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri.....	33
3.6.2.2.	miR-221-3p ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri .....	34
3.7.	İstatistiksel Analiz.....	34
4.	BULGULAR.....	36
4.1.	miR-221-3p Gen İfadesi Sonuçları.....	36
4.1.1.	miR-221-3p'nin SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	37
4.1.2.	miR-221-3p'nin MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	38
4.1.3.	miR-221-3p'nin HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	39
4.1.4.	miR-221-3p'nin ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	40
4.1.5.	miR-221-3p'nin MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	41
4.1.6.	miR-221-3p'nin SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişim ifade sonuçları.....	42
4.2.	<i>PAKI</i> Geninin Gen İfadesi Sonuçları.....	43
4.2.1.	<i>PAKI</i> 'nin SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	44
4.2.2.	<i>PAKI</i> 'nin MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	45
4.2.3.	<i>PAKI</i> 'nin HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	46
4.2.4.	<i>PAKI</i> 'nin ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları.....	47

<b>4.2.5. <i>PAK1</i>'nin MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları</b> .....	48
<b>4.2.6. <i>PAK1</i>'in SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları</b> .....	49
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	51
<b>KAYNAKLAR</b> .....	56
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	62



## **SIMGE ve KISALTMALAR**

MiRNA	Microribonucleic acid
ER	Estrogen receptor
PR	Progesterone receptor
IHC	Immunohistochemistry
ISH	In situ hybridization
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
GPR30	G protein – coupled receptor
ESR 1	Estrogen Specific Receptor of 1
SERMs	Selective estrogen receptor modulators
SERDs	Selective estrogen receptor degrades
PAK	Protein activation kinase
HME	Human mammary epithelium
RNA	Ribonucleic acid
QRT- PCR	Quantity Real Time Polymerase Change
MCF 7	Michigan cancer foundation 7
NAC	Nipple areola complex
PC	Epithelial cell

EC	Endothelial cell
ERBB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homology
CIN	Chromosomal in stability
MSI	Microsatellite in stability
DCIS	Ductal carcinoma in situ
IDC	Invasive ductal carcinoma
LCIS	lobular carcinoma in situ
ILS	Invasive lobular carcinoma
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
HER2	Human epidermal growth factor
MAPK	Mitogen activated protein kinase
TNBC	Triple negative breast cancer
TPBC	Triple positive breast cancer
NCoR	Nuclear receptor
SMRT	Single molecule real time
ERE	Estrogen response elements
PKA	Protein kinase A
UTR	untranslation region

RISC	RNA Induced silencing complex
RISC	Ribonucleic acid induced silencing complex
SND 1	Staphylococcal nuclease domain contain; of 1
ATCC	American Type Culture Collection
LGC	Laboratory of the Government Chemist
FCS	Fetal Calf Serum
mRNA	Messenger RNA
dsRNA	Double strand RNA formation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
TEMED	Tetramethylethylenediamine
cDNA	Complementary De oxyribo Nucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
AEG 1	Astrocyte elevated gene 1
SND 1	Staphylococcal nuclease domain containing-1
RISC	RNA induced silencing complex
DTT	Dithiothreitol
EMT	Epithelial to mesenchimal transition
CP	Crossing points

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Normal meme dokusu anatomisi .....	7
Şekil 2. 2. Kanser pek çok mutasyon barındırmaya meyillidir . .....	11
Şekil 2. 3. Memeli hücre döngüsünün şematik görünüşü .....	12
Şekil 2. 4. Çeşitli meme kanseri alt tiplerinin şematik gösterimi .....	13
Şekil 2. 5. HER2 aşırı ifadesinin onkojenitesi .....	15
Şekil 2. 6. Meme kanserinde moleküler seviyede estrogen etkisi .....	16
Şekil 2. 7. ER'nin işlevi .....	20
Şekil 2. 8. Tamoksifenin aksiyon mekanizması .....	21
Şekil 2. 9. Tamoksifenin ER'ye bağlanma şekli .....	21
Şekil 2. 10. <i>PAK-1</i> aracılıklı tamoksifen direncinin moleküler mekanizması .....	23
Şekil 2. 11. MikroRNA'nın işlenme yolağı .....	24
Şekil 2. 12. miR-221-3p'nin çekirdek bölgesi ile <i>PAK1</i> 3'UTR bölgesinde bulunan miR-221-3p bağlanma bölgesinin dizi eşlenmesi .....	26
Şekil 4. 1. miR-221-3p ve RNU6B_13'e ait qRT-PCR analizi sonucu. Örnekler 15 ile 27 döngüleri arasında en yüksek eğim vermiştir. ....	37
Şekil 4. 2. miR-221-3p'nin RNU6B_13 ile normalizasyonu sonucu, SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). ....	38
Şekil 4. 3. miR-221-3p'nin RNU6B_13 ile normalizasyonu sonucu, MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). ....	39
Şekil 4. 4. miR-221-3p'nin RNU6B_13 ile normalizasyonu sonucu, HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ). ...	40
Şekil 4. 5. miR-221-3p'nin RNU6B_13 ile normalizasyonu sonucu, ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). ...	41
Şekil 4. 6. miR-221-3p'nin RNU6B_13 ile normalizasyonu sonucu, MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). ...	42
Şekil 4. 7. miR-221-3p'nin SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişim ifade sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. ....	43
Şekil 4. 8. <i>PAK1</i> ve BETA-ACTIN'e ait qRT-PCR analizi sonucu. Örnekler 18 ile 25 döngüleri arasında en yüksek eğim vermiştir. ....	44
Şekil 4. 9. <i>PAK1</i> 'nin BETA-ACTIN ile normalizasyonu sonucu, SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ). ....	45

<b>Şekil 4. 10.</b> <i>PAK1</i> 'nin <i>BETA-ACTIN</i> ile normalizasyonu sonucu, MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ). .....	46
<b>Şekil 4. 11.</b> <i>PAK1</i> 'nin <i>BETA-ACTIN</i> ile normalizasyonu sonucu, HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ). .....	47
<b>Şekil 4. 12.</b> <i>PAK1</i> 'nin <i>BETA-ACTIN</i> ile normalizasyonu sonucu, ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ). .....	48
<b>Şekil 4. 13.</b> <i>PAK1</i> 'nin <i>BETA-ACTIN</i> ile normalizasyonu sonucu, MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). ...	49
<b>Şekil 4. 14.</b> <i>PAK1</i> 'in SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. ....	50

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2. 1.</b> Meme kanseri TNM evrelemesi .....	18
<b>Tablo 2. 2.</b> Total TNM evrelemesi.....	19
<b>Tablo 3. 1.</b> Kullanılan hücre soylarının özellikleri .....	27
<b>Tablo 3. 2.</b> mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri .....	29
<b>Tablo 3. 3.</b> mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları .....	29
<b>Tablo 3. 4.</b> miRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri .....	30
<b>Tablo 3. 5</b> miRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları .....	31
<b>Tablo 3. 6.</b> <i>PAK1</i> geninin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.....	32
<b>Tablo 3. 7.</b> Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri. ....	32
<b>Tablo 3. 8.</b> <i>PAK1</i> ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri .....	33
<b>Tablo 3. 9.</b> <i>PAK1</i> ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları .....	33
<b>Tablo 3. 10.</b> miR-221-3p ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	34
<b>Tablo 3. 11</b> miR-221-3p ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları .....	34
<b>Tablo 4. 1.</b> Hücre soylarından elde edilen miRNA cDNA'larının derişimleri .....	36
<b>Tablo 4. 2.</b> Hücre soylarından elde edilen mRNA cDNA'larının derişimleri .....	43

**ÖZET**  
**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA miR-221-3p VE PAK1 GEN İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tayeb TAYEB

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU  
Haziran 2014, 62 sayfa

Kadınlarda en yaygın malignite meme kanseridir. Kanser ilaçlarının, hücresel davranışı ve kanser patogenezinin altında yatan mekanizmalar aracılığıyla etki ettiği yolları anlamadaki yetersizlikten dolayı, kanser tedavisinde oluşan ilaç direnci hala önemli bir klinik sorun olarak kalmıştır. Bu sebeple, meme kanserindeki risk faktörü oluşumlarının tümörün morfolojik ve moleküler özelliklerine göre değişip değişmediğini belirlemek önemli bir sorgulamadır. Tamoksifen direnci, anti-östrojen tamoksifenin ER $\alpha$ 'yı transaktive eden agonistik özellikler kazandığı meme kanseri vakalarının yarısında görülmektedir. ER $\alpha$ 'nın *PAK1* aracılıklı serin 305 (S305) fosforilasyonu tamoksifen direncine yol açar. Bizim çalışmamızda, *PAK1* kaynaklı tamoksifen direnci konu alınmıştır. Bizim hipotezimize göre, *PAK1* tarafından sağlanan ER $\alpha$ -S305 fosforilasyonu *PAK1*'in miR-221-3p ile transkripsiyonel engellenmesi ile tersine çevrilebilir çünkü miR-221-3p *PAK1*'in 3'UTR bölgesini hedeflemektedir. Bu amaçla, bölümümüzdeki laboratuvarında ER-pozitif meme kanseri hücre hatlarında (MCF7, HCC1500, ZR-75-1), ER-negatif meme kanseri hücre hatlarında (SKBR3, MDA-MB-231) ve kontrol olarak meme epitel hücre hattı hTERT-HME1'de miR-221-3p'nin ifade düzeyini ölçmek için Real-Time PCR (qRT-PCR) kullandık. *PAK1*'daki miR-221-3p bağımlı artış, ZR-75-1 hücre soyunun invaziv özelliğe sahip olup diğer ER+ hücre hatları MCF7 ve HCC1500'ün daha hafif bir kanser şiddetine sahip olmasına bağlanabilir. SKBR3 hücre hattındaki miR-221-3p'nin ifade düzeyinin azalması *PAK1*'in ifade düzeyinin artması, *PAK1* ifade düzenlenmesinde miR-221-3p'nin rolünün de olabileceğine yorumlanabilir. miR-221-3p ve *PAK1* ifadesi kontrol hücre soyuna göre yüksek olan MDA-MB-231 hücre hattında *PAK1* ifadesi için farklı düzenleyici mekanizmalar olabilir. Bu sonuçlara göre, meme kanserinin histopatolojisi ve şiddetine göre, miR-221-3p hastalığın moleküler mekanizması ile ilgili *PAK1* aktivitesi olsun veya farklı mekanizmalar üzerinden olsun önemli bilgiler verebilir.

**Anahtar Kelimeler:** miR-221-3p, *PAK1*, meme kanseri, qRT-PCR, RT-PCR.

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF miR-221-3p AND PAK1 GENE EXPRESSIONS IN BREAST CANCER CELL LINES

Tayeb TAYEB

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Asst. Prof. Serdar ÖZTUZCU

June 2014, 62 pages

The most common malignancy in women is breast cancer. Drug resistance in the treatment of cancer still remains a major clinical concern because of an insufficiency of understanding of the pathways by which cancer drugs interact with the mechanisms underlying cellular behaviour and cancerpathogenesis. Therefore, defining whether risk factor associations for breast cancer diverge by morphological and molecular features of the tumors shows an important query. Resistance to tamoxifen is seen in half of the recurrences in breast cancer. The anti-estrogen tamoxifen gains agonistic property by transactivating ER $\alpha$ . *PAK1*- mediated phosphorylation of serine 305 (S305) of ER $\alpha$  leads to resistance to tamoxifen. In our study, *PAK1*- induced suggestive tamoxifen resistance was designed. According to our hypothesis, phosphorylation of ER $\alpha$ -S305 by *PAK1* may be reversed by *PAK1* transcriptional inhibition by miR-221-3p due to miR-221-3p targeting the 3'UTR of *PAK1*. For this purpose, we used Real-Time PCR (qRT-PCR) to measure the expression level of miR-221-3p in ER-positive breast cancer cell lines (CRL-1500, MCF7) and breast epithelial cell line, hTERT-HME1, as control in the laboratory in our department. Increase in the expression of *PAK1* depending on miR-221-3p may be related to ZR-75-1 cell line which has invasive characteristic but other two ER+ cancer cell lines, MCF7 and HCC1500, have milder cancer severity. miR-221-3p may have a role on regulation of *PAK1* expression because the miR-221-3p expression level decreases while *PAK1* expression level increases in SKBR3 cell line. miR-221-3p and *PAK1* expression in MDA-MB-231 cell line are higher than that of hTERT-HME1 cell line may be interpreted like that miR-221-3p has no regulatory effect on of *PAK1* expression in this cell line. According to these results, miR-221-3p may give crucial information about the molecular mechanism of the disease upon *PAK1* activity or different mechanisms with respect to histopathology and severity of breast cancer.

**Key Words:** miR-221-3p, PAK1, breast cancer, qRT-PCR, RT-PCR



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kısa bir tarihsel bilgi olarak, meme kanseri eski bir hastalıktır ve Mısırlılar milattan 3000 yıl önce onu tanımladı (1). Yunan ve Romalı hekimler meme kanseri ve tedavisi hakkında çeşitli makaleler yazmıştır (1). Cerrahi, meme kanseri tedavisinde, farklı işlemlerle ve bazen de onun sebepleri ve doğal oluşumu hakkında inanılan düşüncelerle, en eski yöntemi olarak kabul edilmektedir (1). Ancak, özellikle Ortaçağ'da olmak üzere, birçok 'tıbbi' tedavi tanımlanmıştır (1). Meme kanseri tedavisinde değişen yaklaşımlar, hem hastalığın patogenezi hakkındaki düşüncelerdeki değişiklikleri hem de hastalık hakkındaki bilginin büyüklüğü, ayrıca da bilim ve teknolojiadaki gelişmeleri yansıtmaktadır (1). Felsefik olarak, medikal tedavinin oluşumu, lokal tedavi değil de sistemik bir terapi olan cerrahinin oluşumundan kavramsal olarak farklıdır (1). Son 50 yılda, cerrahi olmayan tedavi tiplerinin varlığı meme kanseri tedavisinde cerrahinin yerini alacak şekilde ilerlemiştir (1).

Kanser ilaçlarının, hücre sel davranışı ve kanser patogenezinin altında yatan mekanizmalar aracılığıyla etki ettiği yolları anlamadaki yetersizlikten dolayı, kanser tedavisinde oluşan ilaç direnci hala önemli bir klinik sorun olarak kalmıştır (2).

Kadınlarda en yaygın malignite meme kanseridir (2). Tüm kadın kanserlerinin % 31'ni meme kanseri oluşturmaktadır (2). Meme kanseri vakası ABD'de tüm kanser vakalarının % 14,5'ini oluşturmaktadır (2). Aynı zamanda, meme kanseri için ölüm oranı % 7,1 olarak bildirilmiştir. ABD'de 2009 yılında yaklaşık 192.370 kadın için meme kanseri tanısı konulmuştur ve 40.170'si bu hastalıktan ölmüştür (3,4).

2012 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülen Türkiye kanser istatistiklerine göre hazırlanan raporda, ülkemizde en sık saptanan ilk 10 kanser türü arasında bulunan meme kanseri akciğer, prostat ve cilt kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Kadınlarda daha sık görülen meme kanseri (40,70/100.000), erkeklerde de %0,8 oranında görülmektedir (5-12). Tedavi, tarama programları ve toplum bilincinin gelişimiyle sağlanan erken teşhisin sayesinde ölüm oranı azalmaktadır (5-12).

İfade profillemeye çalışmaları gösterdi ki; hormon almaçlarının ifadesi, tümör dokusunda tümörleşmede erken tespit edilen ve tümör biyolojisi hakkında önemli bilgiler veren kalıcı "moleküler portreler" ile ilişkilidir (13-15). Bu nedenle, risk faktörleri hem tümörlerin gelişimiyle hem de onların biyolojisi ve ilerlemesiyle bağlantılı olabilir (13-

15). Böylece, meme kanserindeki risk faktörü oluşumlarının tümörün morfolojik ve moleküler özelliklerine göre değişip değişmediğini belirlemek önemli bir etyolojik sorgulamadır (13-15).

Tümör boyutu, histolojik sınıf ve metastatik aksiller lenf nodu sayısı gibi fiziksel özellikleri kullanarak meme kanseri nüks olasılığı klinik-patolojik paradigma tarafından tahmin edilmektedir (16). Klinik-patolojik paradigmaya göre, immünohistokimya (IHK) östrojen ve progesteron reseptörü (ER/PR) ifade seviyesinin belirlenmesi için kullanılır (16). IHK ya da in situ hibridizasyon (ISH) insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'yi (HER2) tanımlamak için kullanılır (16). Her bir reseptörün seviyesi, anti-östrojen yada anti-HER2 tabanlı tedavilerden muhtemel fayda görecektir hastaların alt gruplarını belirlemek için akıllı marker olarak kullanılmaktadır (16). Ayrıca, daha doğru bir şekilde nüks riskini ölçmek için kullanılır (16).

ER, nükleer alıcı ailesinin bir üyesidir ve meme kanserlerinin çoğunun değişime uğramış fenotipinin düzenlenmesinde rol alır (17). ER östrojen hormonu (17 $\beta$ -estradiol) tarafından aktive edilen bir alıcıdır (17). ER'nin iki tipi bulunmaktadır: hücre içi alıcıların nükleer hormon ailesinin bir üyesi olan ER ve G proteinine bağlı alıcıların rodopsin benzeri ailesinin bir üyesi olan GPR30 (17). ER östrojen tarafından aktive edildiğinde, çekirdek içine geçebilir ve farklı genlerin aktivitesini düzenlemek için DNA'ya bağlanabilmektedir (DNA'ya bağlanan bir transkripsiyon faktörü gibi) (17). Östrojenin ER'a bağlanması meme hücrelerinin proliferasyonunu tetikler ve bu da hücre bölünmesi ve DNA replikasyonunda artışa sebep olarak mutasyona yol açmaktadır (18). Her iki durumun sonuçları şöyledir; hücre döngüsünde bozulma, apoptoz ve DNA tamiri, dolayısıyla tümör oluşumu (18). ER $\alpha$  kesinlikle daha çok farklılaşmış tümörler ile ilgili iken ER $\beta$ 'nin bu tümörlerde müdahil olduğu gerçeği tartışmalıdır. ESR1 geninin farklı tipleri (tek nükleotid polimorfizmi ile) tanımlanmıştır ve gelişen meme kanserinin çeşitli riskleri ile ilişkilidir (18).

"ER-pozitif" olarak adlandırılan aşırı ER ifadesi, meme kanseri vakalarının yaklaşık % 70'inde görülür ve bu dokularda immünohistokimya kullanılarak gösterilebilir (19). Farmakolojik inhibitörler ve /veya ooforektomi (yumurtalıklarının birinin veya her ikisinin cerrahi olarak çıkarılması) ile steroid hormon yolağının engellenmesinin, bu hasta popülasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir ve yirmi yılı aşkın bir süredir yaygın olarak kullanılan bir anti-kanser ajanı olmuştur (19). Östrojen kaynaklı yolağın

farmakolojik inhibitörleri bu vakaların çoğunda etkilidir (19) .Bu sınıftaki terapötikler, östrojen üretimini baskılayan ilaçlarını (aromataz inhibitörleri ve gonadotropin salan hormon agonistleri) ve doğrudan ER inhibitörlerini (seçici ER modülatörleri (SERM) ya da seçici ER yıkıcıları (SERY)) içerirler (20).

Bir SERM olan tamoksifen, aktif metaboliti olan hidroksitamoksifen yardımıyla meme dokusundaki ER'nin bir antagonistidir (21). Tamoksifen tümör hücreleri ve diğer doku hedeflerindeki ER'lere, DNA sentezini azaltan ve östrojenin etkilerini durduran bir nükleer kompleks oluşturarak, tamamıyla bağlanır (21). Tamoksifen, östrojenle meme ve diğer dokulardaki bağlanma bölgeleri için güçlü anti-östrojenik özellikleri aracılığıyla yarışan steroid olmayan bir elementtir (21). Tamoksifen hücrelerin hücre döngüsünün G1 ve G0 aşamalarında kalmalarına neden olur (21).Tamoksifen sitosidalden ziyade sitostatiktirçünkü kanserli hücrelerin bölünmesini engeller fakat hücre ölümüne neden olmamaktadır (21).

Metastatik meme kanserli hastalar başlangıçta kemoterapi veya hormonal tedaviye yanıt verse de, hastalığın nüksü bir kaç ayla birkaç yıl içinde ortaya çıkabilir (22). Ayrıca, yanıt oranları ve ikinci tedaviye yanıtın süresi genellikle başlangıç tedavisindekinden daha azdır(22).

Potansiyel olarak endokrin duyarlı meme kanseri olan kadınların tedavisinde Tamoksifen'in başarısına rağmen, bu kadınların yaklaşık% 30'unda Tamoksifen'e karşı ya içsel ya da kazanılmış bir dirençten dolayı hastalığın ilerlediği görülmektedir (23). İlerlemiş ER-pozitif hastalığı olan hastaların yaklaşık yarısı Tamoksifen'e karşı anında yanıt vermese de, ilaca cevap veren hastalarda da hastalık sonunda dirençli bir fenotip kazanmaktadır (23). İçsel ve kazanılmış direnç için olası nedenler; Tamoksifen'in farmakolojisi,ER'nin yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler, tümör çevresiyle olan etkileşimler ve tümör hücrelerindeki genetik değişiklikler olarak bildirilmiştir. Şimdiye kadar, dirence yol açan önemli bir mekanizma tanımlanmamıştır (23).

ER'ningenellikle  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak adlandırılan, her biri farklı genler(sırasıyla ESR1 ve ESR2) tarafından kodlanan, iki farklı biyolojik olarak aktif formu vardır (24). Tamoksifen ER $\alpha$  pozitif meme kanseri hastalarında son derece etkili bir anti-kanser ajanıdır (24).Moleküler direnç mekanizmalarından biri PAK-1 kaynaklı Tamoksifen direncidir (24).Bu bağlamda, SRC-1 (steroid reseptörü ortak aktifleştirici-1) Tamoksifen varlığında ER $\alpha$ 'nın AF2 bölgesine değil AF1 bölgesine bağlanmaktadır

(24). *PAK-1* tarafından gerçekleştirilen ER $\alpha$ -S305 fosforilasyonu ER $\alpha$ 'nın C-ucu ve SRC-1 arasındaki oryantasyonda bir değişime neden olur (24). Bu *PAK-1* tarafından gerçekleştirilen ER $\alpha$ -S305'e özgü fosforilasyon RNA polimeraz II'nin çağırılmasını ve Tamoksifen varlığında transkripsiyonun artışı sağlar (24). Budirencini tersine çevirecek mekanizmalardan biri olarak, microRNA'lar (miRNA) *PAK-1*'in etkisini inhibe etmek için etkili olabilir (24).

miRNA'lar küçük, 18-25 nükleotid uzunluğunda, kodlanmayan RNA moleküllerinden oluşan, hedefledikleri genlerin ifadesini düzenleyen yeni tanımlanan bir RNA sınıfıdır (25). miRNA'lar, hedef mRNA'larının 3'UTR bölgelerine bağlanarak, translasyonu engelleyerek ve bazı durumlarda transkriptin hızlı bir şekilde parçalanmasını sağlayarak etkilerini gösterirler (25). Miranda ve TargetScan miRNA veritabanları ve bir araştırmaya göre, miR-221-3p *PAK-1*'i hedefler ve aktivitesini inhibe eder(26).

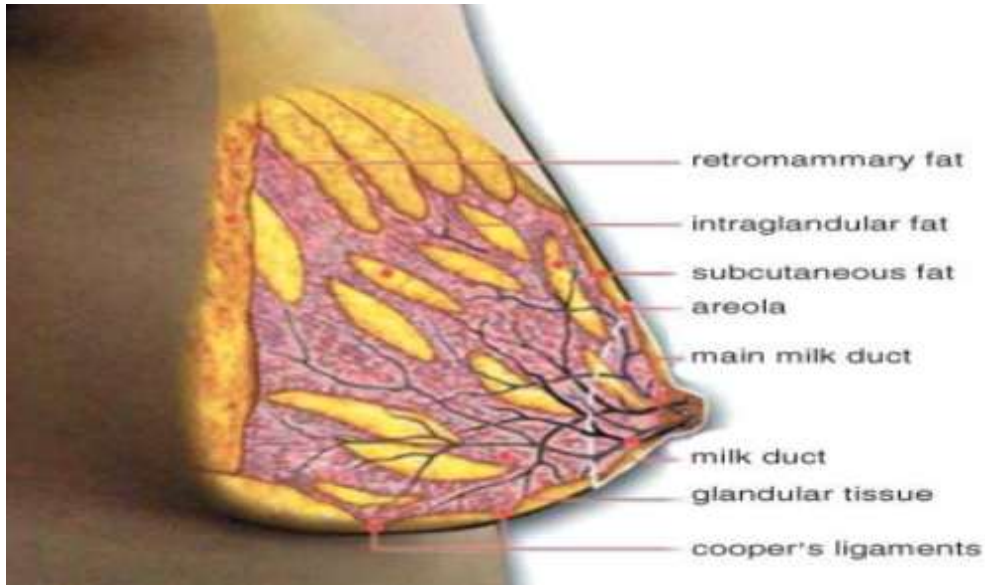
Bizim hipotezimize göre, *PAK-1*'i hedefleyen miR-221-3p'nin ER-pozitif meme kanseri olgularında Tamoksifen direncini önleyebileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla, bölümümüzdeki laboratuvarında ER-pozitif meme kanseri hücre hatlarında (CRL-1500, MCF7) ve kontrol olarak meme epitel hücre hattı CRL-4010'da miR-221-3p'nin ifadesi düzeyini ölçmek için Real-Time PCR (qRT-PCR) kullandık.

miRNA'ların pek çok kanser türünde ve ilaç direncinde çok önemli rolleri olduğu açıktır. Meme kanseri hücre hattında Tamoksifen direnciyle alakalı bu güçlü miRNA'yı düzenleyen mekanizmayı keşfederek, pek çok diğer hastalıklarda da onun nasıl düzenlendiğini göstermek mümkündür. Bu da bu hastalığın nasıl düzenlendiğiyle alakalı mekanizmalar hakkında bilgimizi arttıracak ve hastaların tedavisine yeni gelişmeler sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Anatomisi

Meme, morfolojik olarak göğüs duvarında bir tabandan ve meme ucunda, MAK'ın (meme-areola kompleksi) merkezi, bir çıkıntıdan (tepe) oluşan bir konidir (27). Yüzeysel doku tabakası deri altı yağ dokusunun (adipoz dokusu) 0,5-2,5 cm'i kadar deriden ayrılır (27). Asıncı Cooper ligamentleri yüzeysel fasiadan deriye doğru yayılan fibroz doku uzantılarıdır. Yetişkin meme, meme ucunu ve süt kanallarını kapsayan 14-18 adet düzensiz süt veren, çapı 2,0-4,5 mm olan lobdan oluşur; süt kanalları (süt veren kanallar) bir destek çerçevesi olarak işlev gören yoğun bağ dokusu ile çevrelenir (27). Bir meme bezi olarak, meme farklı tiplerde doku katmanlarından oluşan heterojen bir anatomik yapıya sahiptir; bu doku tiplerinden baskın olan iki tanesi memenin süt salgılama fonksiyonlarını etkileyen yağ ve salgı dokularıdır (27).



Şekil 2. 1. Normal meem dokusu anatomisi (27).

Kadın meme yapısı karmaşıktır ve adipoz doku, loblar, lobüller, süt kanalları ve lenf nodlarından oluşur (27).

### **2.1.1. Adipoz doku**

Kadın memesinin çoğu adipoz doku olarak adlandırılan yağ hücrelerinin bir toplamından oluşur. Bu doku göğüs kafesinin ortasından geçerek köprücük kemiğinden kol altına kadar uzanır (27).

### **2.1.2. Loblar**

Lobları da içeren deri altı yağ dokusu memeye şeklini verir (27). Yetişkin memesi, meme ucu yakınında 14-18 adet düzensiz şekle sahip, süt veren lob içerir (27).

### **2.1.3. Lobüller**

Her bir lob pek çok lobülden oluşmaktadır; bu lobüllerin uçlarında hormonal sinyallere yanıt olarak süt üretilen kesecikler vardır (27).

### **2.1.4. Süt kanalları**

Loblar ve lobüller, meme ucuna süt taşıyan tüp ya da kanal gibi görev yapan süt kanallarıyla birbirlerine bağlıdır (27). Süt kanallarının üçte ikisi meme ucu tabanının yaklaşık 30 mm mesafesindedir (27).

### **2.1.5. Lenf nodları**

Lenf nodları, lenf damarları ile birbirine bağlı olan küçük, fasülye şeklindeki bağışıklık sistemi hücrelerinin bir toplamıdır (28). Lenf damarları küçük damarlara benzer fakat onlar memeden uzağa doğru (kan yerine) lenf denilen açık renk bir sıvı taşırlar (28). Memedeki çoğu lenf damarı kol altında lenf nodlarıyla birleşirler (aksiller nodlar), bazı lenf damarları, göğüs içinde (iç meme nodları) ve köprücük kemiğinin altında ya da üstünde (supraklaviküler ya infraklaviküler nodlar) bulunan lenf nodlarına bağlıdır (28).

## **2.2. Meme Fizyolojisi**

Memenin temel işlevi bir bebeği beslemek için süt üretmek, depolamak ve salgılamaktır (29). Doğumdan sonra kadının vücudunda hormonlar tarafından meme uyarıldığında, meme içerisindeki lobüllerde süt üretilir. Kanallar meme ucuna sütü taşır (29). Meme ile besleme sırasında, süt meme ucu aracılığıyla bebeğe gelir (29). Memeye kan temini, ilk olarak ana meme dokusu altından akan iç meme arterinden sağlanır (29). Kan temini memeye besin, oksijen gibi, sağlar, meme süt üretimi sağlayan (laktasyon) özel bir organdır. Hamilelik ve laktasyon süresince, bu zamanlardaki hormonal değişikliklerden dolayı, meme dokusunda pekçok ilave değişiklik gözlemlenir (29).

## **2.3. Meme kanseri**

### **2.3.1. Epidemiyoloji**

Kadınlarda en yaygın görülen malignite meme kanseridir. Bu malignite, kadınlarda görülen tüm kanserlerin % 31'inin sebebini oluşturmaktadır (3-4). Meme kanseri vakaları ABD'deki tüm kanser vakalarının %14,5'ini oluşturmaktadır. Bununla beraber, memek kanseri ölüm oranı % 7,1 olarak ifade edilmiştir (3-4). ABD'de 2009 yılında yaklaşık 192.370 kadın için meme kanseri tanısı konulmuştur ve bu hastaların 40.170'i bu hastalıktan ölmüştür (3,4).

2012 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından gerçekleştirilen Türkiye'nin kanser istatistiklere göre hazırlanan deklarasyonda, ülkemizde en sık saptanan ilk 10 kanser türü arasında olan meme kanserinin, akciğer, prostat ve cilt kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türü olduğu belirtilmiştir (5-12). Meme kanseri, kadınlarda daha sık görüldüğü gibi (40,70 /100.000), % 0,8 'lik bir oranda erkeklerde de tespit edilir (5-12). Tedavideki gelişmelerin, tarama programları ve toplum bilincinin katkısıyla sağlanan erken teşhis sayesinde ölüm oranı azalmaktadır (5-12).

### **2.3.2. Etyoloji**

İnsan meme kanseri etyolojisi büyük çoğunlukla bilinmemektedir (30). Meme kanseri ile ilgili risk faktörleri üç ana belirleyici altında toplanabilir: aile öyküsü (kalıtsal) faktörler, hormonal ve üreme faktörleri, ve (yaşam tarzı dahil) çevresel faktörler (30). Kimyasal karsinogenler dahil olmak üzere çevresel ajanlar, meme kanserilerinin %70'ine atfedilen değişken risk faktörleridir (30). İlaç metabolize eden enzimlerin polimorfizmleri, çevresel kimyasallar, diyet ajanlar, ve endojen steroidlerden kaynaklanan risk faktörlerini etkileyebilir (30). Meme kanseri vakalarının %78'den fazlasına postmenopozal dönemde rastlanılır (30). Geç kanser oluşumu, genellikle insanlarda kimyasal karsinogenez ile ilgili uzun gecikme süreleri ile tutarlıdır (30).

### **2.3.3. Kanser Biyolojisi**

Normal hücrelerin derece derece malignan hücreye dönüşme işleminin artık genome verilen zarar sonucu ortaya çıkan sıralı mutasyonlara gereksinim duyduğu bilinmektedir (31). Bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar, belli bazı DNA bazlarının içsel

kimyasal instabilitesi ya da metabolizma boyunca oluşan serbest radikaller tarafından gerçekleşen ataklar gibi endojen süreçlerinin sonucu olabilir (31). DNA hasarı, iyonize edici radyasyon, UV radyasyonu ve kimyasal kanserojenler gibi dış etmenlerle etkileşim sonucu da oluşabilir (31). Bazı inaktive edici mutasyonlar, ilave mutasyonların oluşumunu engelleyerek genomik bütünlüğünün muhafaza edilmesinden sorumlu olan genlerde varolabilir (31).

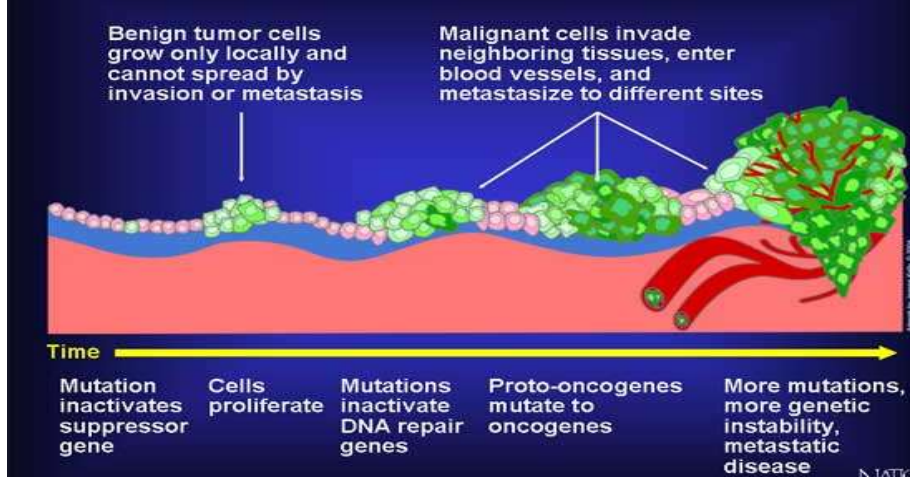
Normal hücrenin kötü huylu bir hücre dönüşümü, proliferasyon ve hücre ölümünü kontrol eden normal homeostatik mekanizmalarda rol alan genlerin, proliferasyonu tetikleyen ve hücre ölümüne karşı koruyan genlerin, onkogenler, aktivasyonu ve normal olarak proliferasyonu engelleyen genlerin, tümör baskılayıcı genler, inaktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlardan zarar göreceği yolları içerir (31).

#### **2.3.4. Kanser genetik yapısı**

Kanser temel olarak doku büyümesinin düzenlenmesindeki bir bozukluğun hastalığıdır. Normal bir hücrenin bir kanser hücresi haline dönüşmesi için, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen genler değişmiş olmalıdır (32).

Etkilenen genler iki geniş kategoriye ayrılır. Onkogenler hücre büyümesini ve proliferasyonunu tetikleyen genlerdir (33). Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini ve proliferasyonunu engelleyen genlerdir (33). Malign transformasyon yeni onkogenlerin oluşumu - normal onkogenlerin uygunsuz aşırı ifadenmesi ya da tümör baskılayıcı genlerin az yada hiç ifade edilmemesi yoluyla oluşabilir (33). Tipik olarak, normal bir hücreyi bir kanser hücresine dönüştürmek için pek çok gende değişiklik olması gerekir (Şekil 2.2) (33).





Şekil 2. 2. Kanser pek çok mutasyon barındırmaya meyillidir (34).

Genetik değişiklikler, farklı düzeylerde ve farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilir (33). Mitozdaki hatalar sonucu bütün bir kromozomun kazancı veya kaybı oluşabilir (33). Daha yaygın olarak, genomik DNA'nın nükleotit dizisindeki değişiklikler mutasyon görülmektedir (33).

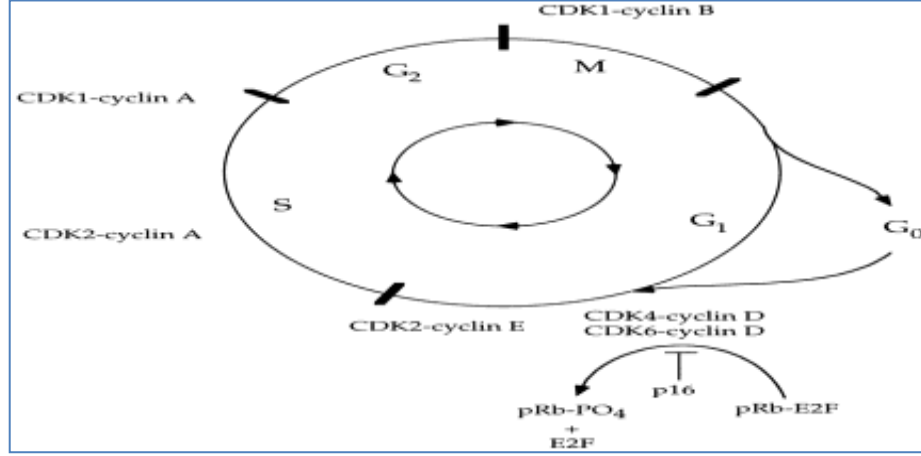
### 2.3.5. Hücre döngüsü ve kanser

Hücre progresyonunu ve bölünmesini içeren işlem olan hücre döngüsü kanserin en önemli parçasıdır (35). Normal hücrelerde hücrenin geliştiği, DNA'sını eşlediği ve bölündüğü hücre döngüsü, bir seri karmaşık sinyal yolağıyla kontrol edilir (35). Bu süreç ayrıca hataların düzeltildiğini garanti eden mekanizmalar içerir; ve eğer bu hatalar düzeltilmezse hücre intihara (apoptoz) gider (35). Bu düzenleyici işlem bozulur ve sonucunda genetik mutasyonlardan dolayı kanserde kontrolsüz hücre proliferasyonu görülür (35).

Neyse ki, bir takım özel olaylar dizisi içerisinde birbirleriyle etkileşim halinde olan proteinlerin hücre döngüsünü sıkı bir şekilde düzenlemesi sayesinde genellikle kanser önlenir (35). Bu olayların bir sonucu olarak, hücre döngüsünün devam mı edeceği yoksa fazlar arasında mı kalacağına karar verilir (35).

Kromozomlar eşlenir (DNA sentezi ya da S-fazı) ve her hücre bölünmesi döngüsünde genetik olarak özdeş iki kardeş hücre (mitoz veya M-faz) oluşturmak için ayrılırlar (35). Büyüme ve yeniden yapılanma fazları (boşluk fazlar G1 ve G2) bu olayları aralar (35). Hücreler bölünmeden sonra suskun bir duruma (G0) geçerek döngüyü durdurabilir (35).

Bütün bir döngüye geri dönüş emri geç G<sub>1</sub>'de verilir. İşlem döngü boyunca çeşitli CDK-siklin komplekslerinin düzenlenmiş aktivitesi ile kısmen elde edilir (Şekil 2.3) (35).



Şekil 2. 3 Memeli hücre döngüsünün şematik görünüşü (35).

### 2.3.6. Programlı hücre ölümü (Apoptoz, otofaji ve programlı nekrozu)

Programlanmış hücre ölümleri apoptoz, otofaji, programlanmış nekroz hücre içi bir program tarafından aracılık edildiğinde, hücrenin herhangi bir patolojik formatta ölümü olarak düşünülmektedirler (36). Hücre ölümünün bu üç formu kollektif olarak malign hücrelerin geleceğine karar verebilirler; apoptoz ve programlı nekroz her zaman hücreyi ölüme sevk ederler fakat otofaji hayatla ölüm arasında karar verici konumda olabilir (36).

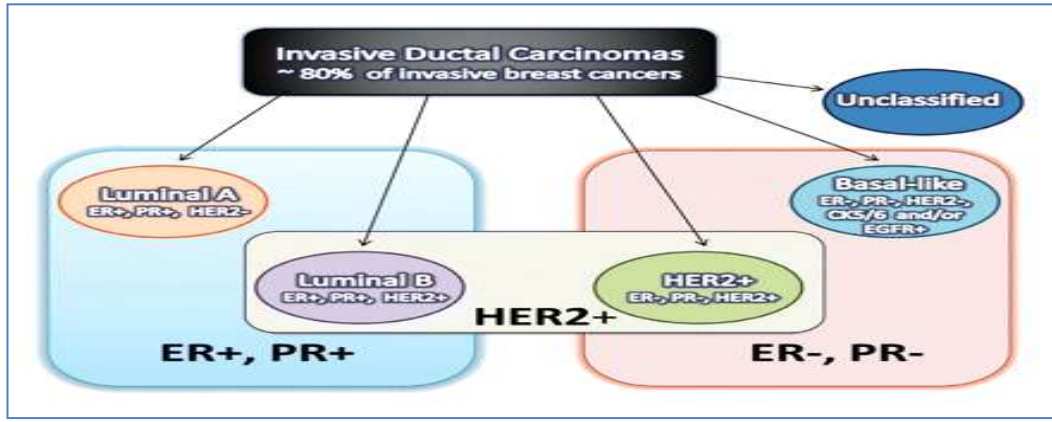
### 2.3.7. Tümörde yeni damar oluşumu ve metastaz

Metastaz kanser ölümlerinin başlıca nedenidir ve iki anahtar sürece bağlıdır: komşu hücreleri kuşatmak için kan/lenf damarları içerisine geçişle sağlanan kanser hücresi göçü ve kan dolaşımına erişim sağlayan tümörde yeni damar oluşumu (37). Metastatic süreç boyunca, primer tümörün yayılımına ve komşu bağ dokusu, lenf sistemi ve kan damarlarına invazyonuna sebep olan epitelyal ve endotelyal hücrelerinin (EC) göçü esas aşamadır (37).

### 2.3.8. Meme kanserinde tümör gelişimi

Dört farklı meme kanseri alt tipi ya da portresi tanımlanmıştır ve her biri farklı biyolojik özelliklere ve klinik sonuçlara sahiptir: normal meme tipi, lümen tipi, ERBB2-pozitif ve

bazal tipi (38). Genel olarak ER durumuna göre bölünmüş olan iki tip şöyledir: normal ER-pozitif alt tipi bazal epitel hücreleri ve yağ dokusu genlerinin yüksek ekspresyonu ile karakterizedir, aksine ER ifade edilen tümörler meme luminal hücreleri tarafından ifade edilen çok sayıda genin ekspresyonu ile karakterize edilir (38). ERBB2-pozitif tümörler ERBB2 onkogenini aşırı ifade ederler fakat ER ve ER'nin düzenlediği genleri düşük seviyede ifade ederler: bazal-tip tümörler büyük oranda ER-negatiftir ve meme bazal hücre keratini ifade ederler (13). Tümör alt tiplerinin prognozunda farklılıklar görülmektedir; lüminal tip iyi prognoz gösterirken bazal tip kötü prognoz göstermektedir. ER-negatif bazal tipleri ve ERBB2 alt tipleri daha çok ciddi bir şekilde azalmış total hayatta kalım ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.4) (38).



Şekil 2. 4. Çeşitli meme kanseri alt tiplerinin şematik gösterimi (38).

### 2.3.9. Meme kanserinde kromozom kararsızlığı (KK)

Mitotik uygunluk ve sitoplazmik organizasyon, normal sentrozom fonksiyonun sonuçlarıdır. Aşırı sayıda sentriyol ve peri centriolar materyalden anlaşılan kusurlu sentrozom yapısı meme ve solid tümörlerin genel tipik özelliğidir (39). Bu araştırmalar, sentrozomu malign tümörlerin gelişiminde rastlanılan kromozomal anormalliklerin kökeni olarak göstermiştir (39).

### 2.3.10. Meme kanserinde mikrosatellit kararsızlığı (MK)

Mikrosatellitler, DNA'nın kodlanmayan bölgelerinde rasgele yayılmış basit polimorfik dizilerinin tandem tekrarlarıdır (40). Bunlar kanser genetiğinde ve direkt olarak kanser teşhisinde kullanılabilir ve tümör oluşumunun genetik temelini ve kanserin ilerlemesini anlamada yardımcı olabilir (40). Mikrosatellit kararsızlığı (MK), yanlış eşleşme onarım genlerinin hatalı çalışması sonucu açığa çıkan replikasyon

hatalarını yansıtır, tümör hücrelerinde yeni, kalıtsal olmayan allellerin varlığıyla tespit edilir ve tümör gelişiminin özel bir yolağını gösterir (40).

MK meme kanseri vakalarının % 0-30'unda tespit edilmiştir (41). Medüller karsinom gibi, meme kanserinin özel tiplerinde de MK'nın düşük frekanslı olarak tespit edildiği görülmüştür (41).

### **2.3.11. Meme kanseri tipleri**

Meme kanserinin birçok türü vardır ancak bazıları oldukça nadirdir (42). Tek bir meme tümörü bu tiplerin bir kombinasyonu olabilir veya bazı durumlarda invaziv ve in situ kanser tiplerinin bir karışımı olabilir (42).

İn situ duktal karsinom (İSDK; ayrıca intraduktal karsinom olarak da bilinir) invaziv olmayan veya pre-invaziv meme kanseri olarak düşünülmektedir (43). Süt kanallarını saran damarlar İSDK'da kanser hücreleri gibi görünmeye başlarlar. Yaklaşık olarak 5 yeni meme kanseri olgusunun biri İSDK'dur (43).

İn situ lobüler karsinom (İSLK) genellikle kanser olarak kabul edilmez, ama gelecekte olabilecek kanser için risk oluşturabilir (44). İSLK, sık komşu invazif kanser alanı ile benzer genetik özellikler (e-kaderin geninin lokusu olan kromozom 16q'da heterozigosite kaybı) gösterebilir (44).

İnvaziv (veya infiltratif) duktal karsinom (İDK) meme kanserinin en yaygın türüdür (45). İDK memenin bir süt kanalında başlar, kanalının duvarından sızar ve memenin yağ dokusu içerisine doğru büyür (45).

İnvaziv lobüler karsinom (İLC) süt üreten bezlerde (lobüllerde) oluşur (45). İDK gibi vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilir (45). Yaklaşık olarak, 5 invaziv meme kanseri olgusunun biri İLK'dir (45).

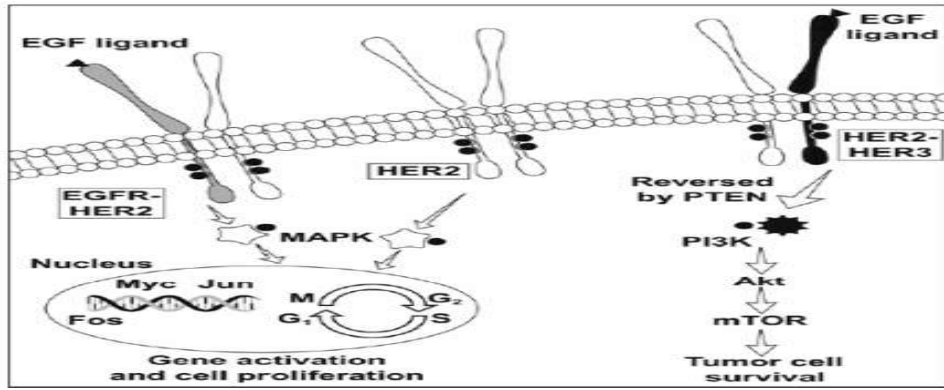
Meme kanserinin daha az yaygın türleri şunlardır; inflamatuvar meme kanseri, üçlü-negatif meme kanseri, meme başında oluşan Paget hastalığı, filod tümörü ve anjiyosarkom (45).

## 2.3.12. Meme kanserinde sinyal iletim yolları

### 2.3.12.1. HER2 aşırı ifadesinin onkojenitesi

EGF reseptör ailesi dört farklı reseptör içerir: EGFR (ErbB-1), HER2 (HER2/neu, ErbB-2), HER3 (ErbB-3) ve HER4 (ErbB-4) ve bunların anormal aktivitesi çeşitli kökenlerden insan kanserleri ile ilişkilidir (46).

Normal hücrelerde, HER2 bilinen herhangi bir liganda yüksek bir afinite ile bağlanmaz, fakat başka bir uyarılmış EGF reseptörünü çağırarak sinyal iletimi sağlayabilir (46). HER2'nin takip eden transaktivasyonu ve otofosforilasyonu, önemli ölçüde daha güçlü ve diğer reseptör çiftlerinden gönderilen sinyallerden daha uzun süreli etkisi olan hücre içi sinyallerini oluşturur HER2 ihtiva eden heterodimerler tarafından üretilen sinyallerin gücü için çok sayıda moleküler etmen vardır (Şekil 2.5) (46).

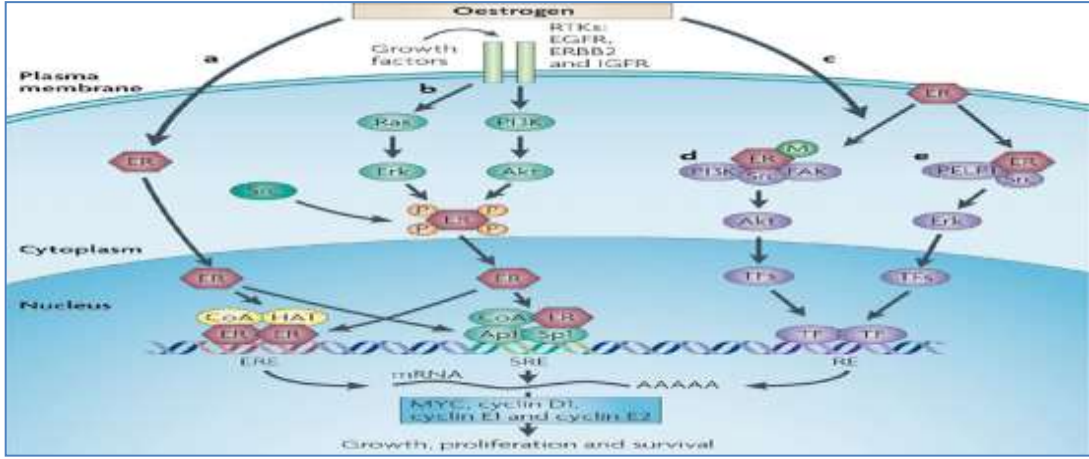


Şekil 2. 5. HER2 aşırı ifadesinin onkojenitesi (46).

### 2.3.12.2. Meme kanserinde moleküler seviyede estrogen etkisi

Bazı östrojen reseptörleri (ER) hücre yüzeyi membranı ile iletişim halindedir ve hücrelerin östrojene maruziyeti ile hızlı bir şekilde uyarılabilir (47).

Buna ek olarak, bazı ER'ler kaveolin-1 ile bağlantılı olarak hücre zarı ile iletişim halindedir ve G proteinleri, striatin, reseptör tirozin kinazları (örneğin, EGFR ve IGF-1) ve kompleksleri ve reseptör-dışı tirozin kinazlar (örneğin, Src) ile kompleks oluştururlar (47). Bu zara bağlı ER'lerin bazıları, Ca<sup>2+</sup> ve striatin yoluyla nitrik oksit (NO) seviyesinin artmasına yol açabilir (47). Sinyaller, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK/ERK) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K/AKT) gibireseptör tirozin kinaz yolları aracılığıyla çekirdeğe gönderilir (Şekil 2.6) (47).



Şekil 2. 6. Meme kanserinde moleküler seviyede östrojen etkisi (47).

## 2.4. Meme Kanseri Hücresi Alıcıları

Meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde ve sitoplazma ile çekirdeğinin içerisinde alıcılar vardır (48). Hormonlar gibi kimyasal haberciler bu alıcılara bağlanır ve bu hücrede değişikliklere yol açar. Meme kanseri hücreleri bu önemli alıcıları barındırabilir ya da barındırmayabilir: ER, progesteron alıcısı (PR) ve HER2 (48).

Meme kanseri türünün belirlenmesinin başlıca yollarından biri bu alıcıların olup olmadığıdır:

- Endokrin alıcısı (östrojen veya progesteron alıcısı) pozitif (48).
- HER2 pozitif (48).
- Üçlü negatif; östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olmayan (48).
- Üçlü pozitif, östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olan (48).

### 2.4.1. Endokrin alıcısı (östrojen veya progesteron alıcısı) pozitif

Bir hormon alıcısı pozitif tümör, belirli hormonlara özgü alıcıları ifade eden hücrelerden oluşan bir tümördür (48). Terim yaygın olarak ER pozitif tümör (yani ER pozitif hücreler içeren tümörler) anlamına gelir, ama aynı zamanda progesteron alıcısı pozitif tümörler içerebilir (48). ER+ kanser hücreleri büyüme için östrojene bağımlıdır, bu nedenle de tedavi için östrojenin etkilerini engelleyen ilaçlara (örneğin, tamoksifen) maruz bırakılırlar ve genellikle iyi bir şekilde tanı konulurlar (48).

### **2.4.2. HER2 pozitif**

Meme kanserlerinin yaklaşık % 20-25'inde, kanser hücreleri HER2/neu olarak bilinen bir proteini çok fazla üretirler (48). Bu meme kanseri türü çok daha fazla agresif ve hızlı büyüme eğilimindedir (48). HER2'nin aşırı ifadelenmesi, meme kanserinde onkojenik tetikleyici olarak görev yapan büyüme faktörü sinyal yollarının sürekli aktivasyonu sağlar (48). HER alıcılarında değişikliklere sahip tümörü olan kanser hastalarının, kötü bir klinik sonucu öngören faktörlerle alakalı olarak daha agresif bir hastalığa sahip olma eğilimindedir (48).

### **2.4.3. Üçlü negatif; östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olmayan**

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) immune histokimyasal yöntemlerle tanısı konulan heterojen bir hastalıktır ve ER veya PR'ni ifade edilmediği ve HER2'nin aşırı ifade edilmediği tümör tipi olarak tanımlanmaktadır (48). Prototip olarak ÜNMK agresif yapıdadır ve zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir ve bu da hastalığın kesin tanısını hastalara en uygun tedaviyi vermek adına önemli kılmaktadır (48). Morfolojik ve biyolojik analizler ÜNMK'nın farklı prognozları olan alt tiplerini belirleyebilir ve özellikle biyolojik analizler tedaviye yanıtı tahmin etmek için kullanılabilir (48).

### **2.4.4. Üçlü negatif; östrojen, progesteron veya HER2 için alıcıları pozitif olan**

Üçlü pozitif meme kanseri (ÜPMK) immünohistokimya ile teşhis edilen heterojen bir hastalıktır ve aynı zamanda ER, PR ve HER2'yi aşırı ifade eden tümör tipi olarak tanımlanır (48).

## **2.5. Meme Kanseri Evreleri**

Meme kanseri evrelemesi kanseri saptanması ve yönetimi ile ilgili mevcut durum hakkında yararlı bilgiler verir ve yeni stratejilerin uygulanmasında başarı sağlar (49). Tümör-nod-metastaz (TNM) sistemi 1942 yılında Pierre Denoix tarafından bulunmuştur ve hastalık prognozunu etkilediği düşünülen malign tümörlerin önemli morfolojik özelliklerine göre kanseri tanımlamak için bir altyapı sağlamıştır: primer tümör boyutu (T), bölgesel lenf nodu tutulumu varlığı ve kapsamı (N) ve uzak metastaz varlığı (M) (Tablo 2.1) (49).

**Tablo 2. 1.**Meme kanseri TNM evrelemesi (49)

<b>Evre</b>	<b>Tanım</b>
<b>Primer tümör (T)</b>	
<b>TX</b>	Primer tümör değerlendirilemiyor
<b>T0</b>	Primer tümör yok
<b>Tis</b>	İn situ karsinom
<b>T1</b>	En büyük boyutu $\leq 2$ cm olan tumor
<b>T2</b>	En büyük boyutu $>2$ cm ve $\leq 5$ cm olan tümör
<b>T3</b>	En büyük boyutu $>5$ cm olan tümör
<b>T4</b>	Göğüs duvarı veya deriye doğrudan uzantısı olan herhangi bir boyutta tümör
<b>Bölgesel lenf nodu</b>	
<b>(N)</b>	
<b>NX</b>	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor (örneğin, daha önce alınmış)
<b>N0</b>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
<b>N1</b>	Hareketli ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz
<b>N2</b>	Sabitlenmiş ya da kalıcı ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz
<b>N3</b>	İpsilateral infraklavikuler lenf nodunda metastaz
<b>Uzak metastaz (M)</b>	
<b>MX</b>	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
<b>M0</b>	Metastaz yok
<b>M1</b>	Uzak metastaz

Evre 0 ve 1 tüm evreleme sistemine göre meme kanseri gelişiminin en erken safhasını göstermektedir. Kanser hücreleri evre 0 ve 1’de çok kısıtlı bir alanda sınırlandırılmıştır (49). Evre 2 hala meme kanserinin erken dönemlerindedir, ancak kanser büyümeye yada yayılmaya başlamıştır (49). Hala göğüs alanına dahil edilir ve genellikle çok etkili bir şekilde tedavi edilir (49). evre 3’de meme kanseri memeye yakın dokuları işgal etmeye programlanmıştır ama işgal etmemiştir (49). Meme kanseri evre 4’de vücudun diğer bölgelerinde varlık göstermiştir (Tablo 2.2)(Tablo 2.2) (49).



**Tablo 2. 2.** Total TNM evrelemesi (49).

<b>Total Evre</b>	<b>T kategorisi</b>	<b>N kategorisi</b>	<b>M kategorisi</b>
<b>Evre 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Evre 1</b>	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
<b>Evre IIA</b>	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Evre IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
<b>Evre IIIA</b>	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>Evre IIIB</b>	T4	Herhangi N	M0
<b>Evre IIIC</b>	Herhangi T	N3	M0
<b>EvreIV</b>	Herhangi T	Herhangi N	M1

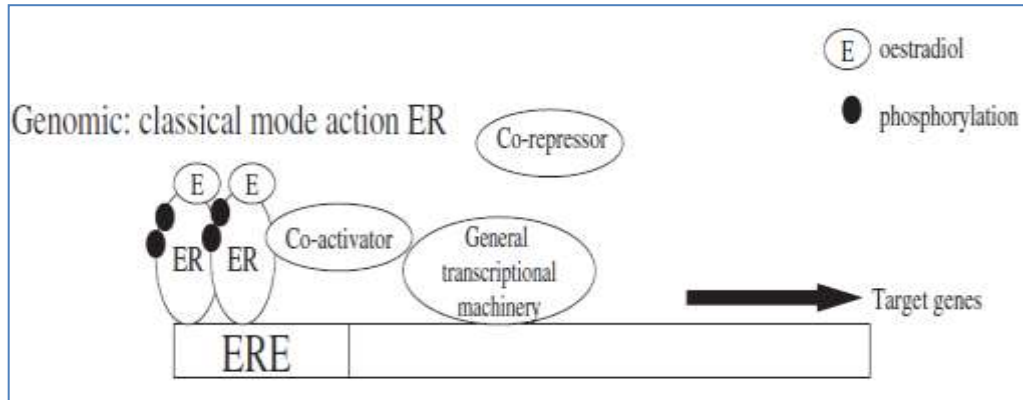
## 2.6. Meme Kanserinde Tamoksifen

Tamoksifen erkek ve kadınlarda meme kanserinin bazı tiplerini tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır (50). Tamoksifen ayrıca hasta yüksek risk (örneğin meme kanseri aile öyküsü gibi) taşıyorsa, hastanın meme kanserine yakalanma şansını azaltmak için de kullanılır. Tamoksifen, aktif metaboliti hidroksitamoksifen aracılığıyla, meme dokusunda ER'nin bir antagonistidir (50). Tamoksifen, menopoz öncesi kadınlarda hormon alıcısı-pozitif meme kanseri için kullanılan yaygın endokrin (anti-östrojen) tedavisidir ve her ne kadar aynı şartlarda aromataz inhibitörleri sık sık kullanılsa da, tamoksifen aynı zamanda menopoz sonrası kadınlarda uygulanan standard bir tedavidir (50).

Bazı meme kanseri hücreleri büyümek için östrojene ihtiyaç duyar (50). Östrojen bu hücrelerde ER'a bağlanarak onu aktif hale getirir (50). Tamoksifen de ER bağlanan bileşikler haline gelir ancak onu aktive etmez (50). Kompetitif antagonizmden dolayı, tamoksifen kilitle kırılmış anahtar gibi davranır ve başka bir anahtarın kilide sokulmasına engel olur, böylece östrojenin alıcısına bağlanmasına engel olur. Bu nedenle, meme kanseri hücre büyümesi engellenmiş olur (50).

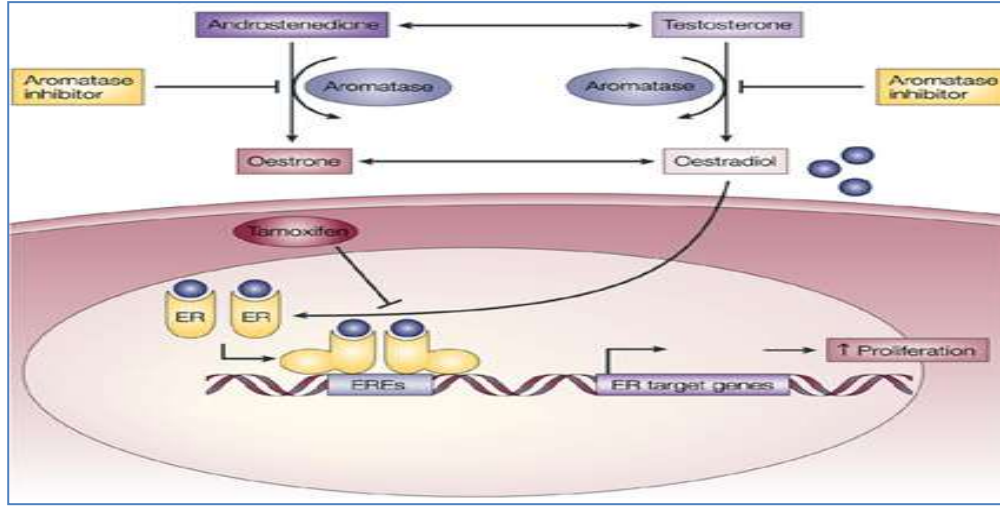
Tamoksifen DNA sentezini azaltan ve östrojenin etkilerini engelleyen bir nükleer kompleks oluşturarak meme kanseri hücreleri ve diğer doku hedeflerindeki ER'lere rekabetçi bir şekilde bağlanır (51). Tamoksifen, meme ve diğer dokularda östrojenle bağlanma bölgesi için yarışan, güçlü antiestrojenik özellikleri olan steroidal olmayan bir ajandır (51). Tamoksifen, hücrelerin hücre döngüsünün G1 ve G0 aşamalarında kalmalarına yol açar. Tamoksifen kanserli hücreleri öldürmekten çok bölünmelerini engellediğinden sitosidalen ziyade sitostatiktir (51).

Tamoksifen ER'ye bağlanır ve daha sonra DNA ile etkileşime girer (52). ER/tamoksifen oluşumu, östrojen tarafından aktive edilen genleri durduran eş-baskıcılar olarak bilinen diğer proteinleri ortama çağırır (52). Bu proteinlerden bazıları NCoR ve SMRT'dir (52). Tamoksifenin işlevi, büyüme faktörleri gibi pek çok farklı faktör ile kontrol edilebilir (52). Tamoksifen ErbB2/HER2 gibi büyüme faktörü proteinlerinin engellenmesine ihtiyaç duyar çünkü tamoksifen dayanıklı kanserlerde ErbB2 düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir(52). Estradiol ER'ye bağlanarak onun eşlenmesini, konformasyonel değişim geçirmesini ve proliferasyondan sorumlu östrojen duyarlı genlerin yukarı bölgesinde bulunan östrojen tepki elemanlarına (ERE) bağlanmasını sağlar (Şekil 2.7)(56).



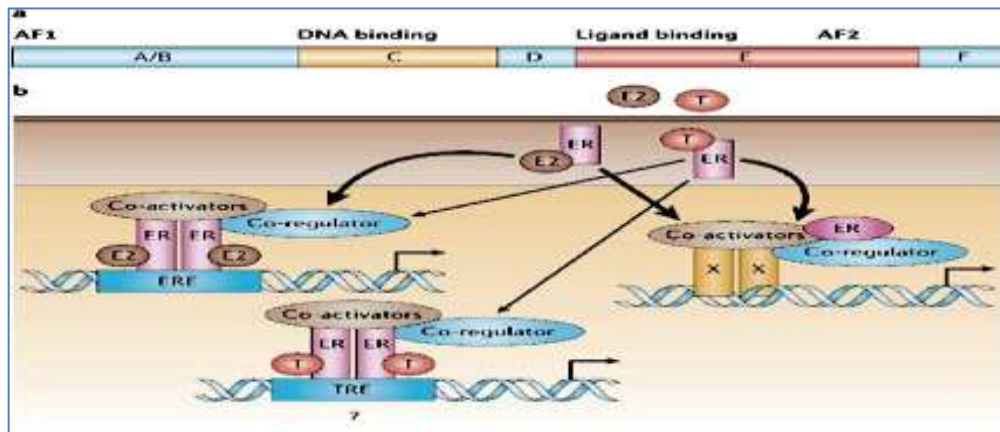
Şekil 2. 7. ER'nin işlevi (56).

Tamoksifen ER'ye bağlanmak için estradiol ile rekabet halindedir fakat aromataz inhibitörleri androjenik öncü moleküllerden östrojen sentezlenmesini azaltır (Şekil 2.8) (53).



Şekil 2. 8. Tamoksifenin aksiyon mekanizması (53).

Bir cinsiyet hormonu olan estradiol (aynı zamanda E2 veya 17  $\beta$ -estradiol), doğal olarak meydana gelen en güçlü östrojendir (53). Estradiol, diğer bazı östrojenlerin aksine, ER'lerin her ikisine de, ER $\alpha$  ve ER $\beta$ , iyi bir şekilde bağlanır (53). Estradiol serbestçe hücrelere girer ve sitoplazmik hedef hücre alıcılarını etkiler (53). ER ligandına bağlandıktan sonra, estradiol hedef hücrenin çekirdeğine girer ve haberci RNA oluşumunu sağlayan, gen transkripsiyonunu düzenler (53). ER iki bölgeden oluşmaktadır, AF1 ve AF2 (54). Tamoksifen varlığında, eşlenmiş ER'lerin AF2 bölgelerine bağlanarak onları engeller. Bu nedenle, transkripsiyon kısmen engellenmiş olur (Şekil 2.9) (54).



Şekil 2. 9. Tamoksifenin ER'ye bağlanma şekli (54).

## 2.7. Tamoksifen Dirençliliği

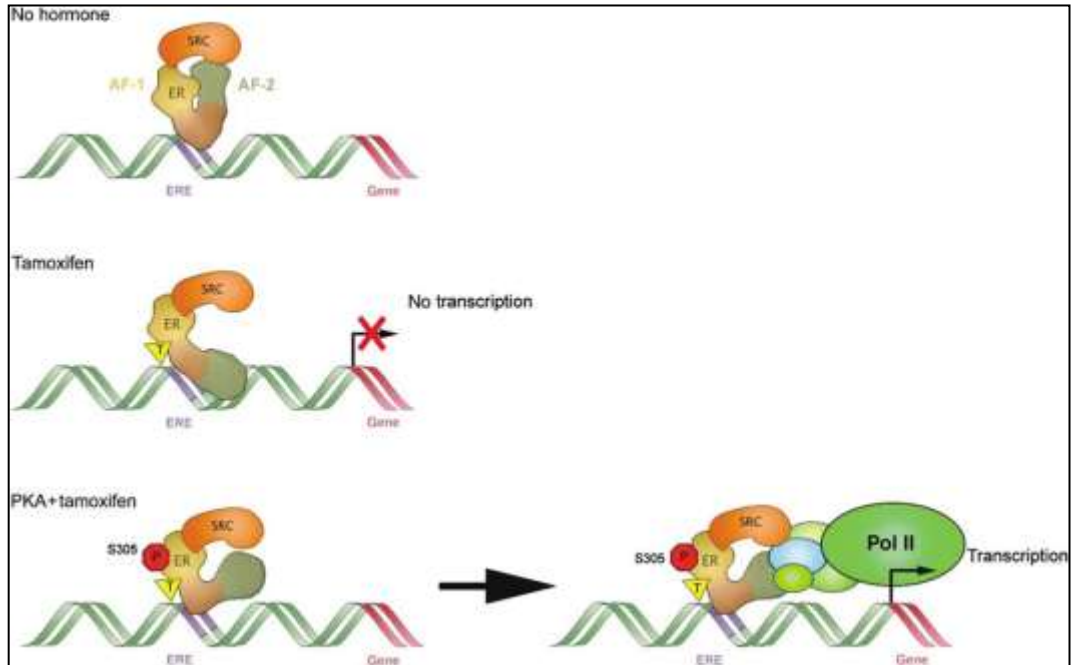
Tamoksifen karışık ER agonist/antagonist faaliyetleri ile ER'nin rekabetçi bir şekilde engellenmesini sağlayan böylece östrojen bağımlı gen transkripsiyonu ve tümör büyümesini durduran seçici ER modülatörüdür (55). ER-pozitif meme kanserinin tüm evrelerinde hastalara olan faydalarına rağmen, esas problem tedaviye karşı gelişen dirençtir ve bu direnç de de novo veya tedaviden kazanılan yarar sonrası gelişebilir (55). Tamoksifen direnci için temel mekanizmalar pek çok şekilde gelişebilir fakat büyük çoğunlukla bilinmemektedir (55). Son yıllarda ise, önemli bulgular artmış büyüme faktörü sinyalleşmesinin, özellikle EGFR/HER2 yolağı, bu dirence neden olduğunu ileri sürmektedir (55). Hepsi olmasa da birçok klinik çalışmadan elde edilen sonuçlar, HER2 ve/veya EGFR aşırı ekspresyonu gösteren meme kanserlerinin tamoksifenden muhtemelen daha az yarar gördüğünü öne sürmüştür(55). Tamoksifen direnç mekanizması olarak pekçok yol vardır (56):

1. Tamoksifenin etkileri çoğunlukla ER aracılığıyla düzenlendiğinden ve ER ifade derecesi tamoksifene cevabın iyi bir belirteci olduğundan dolayı, ER ifade kaybı tedaviye direnç oluşturabilir (56). Aslında, ER ifade eksikliği tamoksifene karşı oluşan de novo direncin baskın mekanizmasıdır ve bu özelliğe sahip hücrelerin çoğu ER/PR negatif tümörlerdir (56).
2. Östrojen düzeyi, tamoksifen alan menopoz öncesi kadınlarda normal seviyelerin üzerine çıkar. Artan estradiol seviyeleri böylece tamoksifen tarafından sağlanan ER doygunluğunu engelleyebilir ve dirence neden olabilir (56).
3. İlaç direncinin yaygın bir mekanizması da, ilacın hücre içine azalan alımı ve hücre dışına atılımının artışının bir sonucu olarak ilacın hücre içi düşük konsantrasyonudur; genellikle ilacın hücre dışına atılımının artışı membrandaki pompa P-glikoproteininin aracılığıyla gerçekleşir (56).
4. Eş aktivasyon ve ek engellemeyapan proteinler, ER tarafından sağlanan transkripsiyonel aktivasyonun düzenlenmesinde çok önemli rollere sahiptir ve böylece eş düzenleyicilerin ifadesinin değişmesi tamoksifen direnç fenotipine neden olabilir (56).

### 2.7.1. p21-Aktive edilmiş Kinaz-1 (PAK1) aracılıktamoksifen dirençliliği

Tamoksifen direnci, anti-östrojen tamoksifenin ER $\alpha$ 'yı transaktive eden agonistik özellikler kazandığı meme kanseri vakalarının yarısında görülmektedir (57). ER $\alpha$ 'nın p21-aktive edilmiş kinaz-1 (PAK1) aracılıklı serin 305 (S305) fosforilasyonu tamoksifen direncine yol açar (57). PAK1 tarafından sağlanan ER $\alpha$ 'nın S305 fosforilasyonu, ER $\alpha$  ve eş aktivatörü SRC-1 arasındaki oryantasyonun değişimine sebep olur, bu da tamoksifen varlığında transkripsiyon kompleksinin aktif olmasını sağlar (57). Bu değişen oryantasyon ER $\alpha$ 'nın C-ucunu ve SRC-1'i içerir ve bu AF-1 aracılıklı uzun biretkleşim gerektirir (57). ER $\alpha$ -S305PAK1 aracılı fosforilasyonu ve tamoksifenin bağlanması sonucu oluşan moleküller arası yeniden oryantasyon, anti-kanser ilaç olan tamoksifene karşı direnç için özgün bir model sağlar (57).

Tamoksifen varlığında, SRC-1 ER $\alpha$ 'nın AF-2 değil, AF-1 bölgesine bağlanır (57). PAK1 tarafından sağlanan ER $\alpha$ -S305 fosforilasyonu, ER $\alpha$ 'nın C-ucu ve SRC-1 arasındaki oryantasyonun değişmesine sebep olur (57). Bu PAK1 tarafından sağlanan ER $\alpha$ -S305'e özgü fosforilasyon, tamoksifen varlığında RNA polimeraz II'nin ortama çalıştırılması ve transkripsiyonun artmasıyla sonuçlanır (Şekil 2.10) (57).

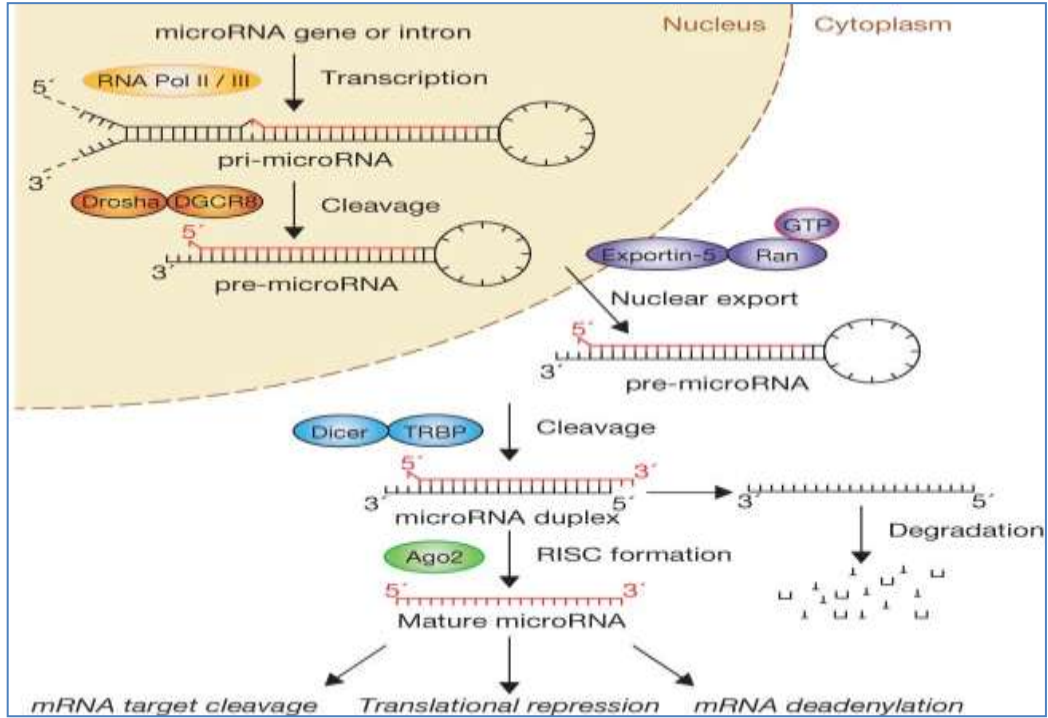


Şekil 2. 10. PAK-1 aracılıklı tamoksifen direncinin moleküler mekanizması (57).

## 2.8. MikroRNA meme kanseri

MikroRNA'lar (miRNA) hedef proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen son zamanlarda keşfedilen, küçük, 18-25 nükleotid uzunluğunda, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir (58). miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak, translasyonu engeller ve bazı durumlarda transkriptin hızlı bir şekilde yıkımına sebep olurlar(58).

MiRNA'ların oluşumu, büyük çoğunlukla RNA polimeraz II tarafından genomik DNA'dan transkribe edilen birincil transkript ile başlar (59). Aktif kısım, nükleer ribonükleaz III, Drosha, ile kesilen bir kök-ilmik (stem-loop) yapısı içinde ihtiva edilmektedir (59). Öncü molekül olarak adlandırılan bu kök ilmik yapısı çekirdekte dışarı taşınır (59). Öncü molekül sitoplazmada olgun miRNA'yı oluşturmak için RNase III enzimi Dicer tarafından işlenir (59). Olgun ürün RNA ile tetiklenen susturucu kompleksine (RISC) yüklenir ve orada hedef mRNA'nın translasyonunun baskılanması düzenler(Şekil 2.11) (59).



Şekil 2. 11. MikroRNA'nın işleme yolağı (59).

Her bir miRNA'nın birden çok geni hedeflediği düşünülmektedir ve çalışmalar son zamanlarda miRNA'ların hayvanların ve bitkilerin, karsinogenez de dahil, tüm önemli hücrel süreçlerinde önemli düzenleyici rolleri olduğunu bildirmiştir (60). Meme

kanseri de dahil, birincil insan kanserlerinde değişen miRNA ifade düzeyleri tümörü tanısı, sınıflandırılması, evrelemesi ve tanısı için kullanılmıştır (60). 76 neo-plastik ve 34 normal meme dokusu örnekleri ile yapılan yeni bir çalışmada, birçok miRNA'nın değişen ifadesi ileincelenen tümörün doğasının doğru bir şekilde tahmin edilebildiği gözlemlenmiştir (60). Son çalışmalar da, kanser ilaç direncini veya duyarlılığını kazandırmada miRNA'ların önemli rol üstlendiğini göstermiştir (60).

Farklı kanserler farklı organlarda metastaza neden olabilir ve meme kanseri genellikle akciğer, kemik ve beyin dokularına sıçrama yapar (61). Metastatik kanserler sıklıkla geleneksel tedavilere direnç gösterirler ve klinikte iyileştirilemezler, bu nedenle moleküler mekanizmaları daha kapsamlı bir şekilde anlama ihtiyacı doğmuştur (61). Son beş yıl içinde yapılan araştırmalar, miR-10b miR-335, mir-373, ve miR-520 gibimeme kanseri metastazını düzenleyen pek çok miRNA'nın olduğunu belirlemiştir (61). Ayrıca, miR-200 ve let-7 miRNA aileleride metastaz düzenlenmesinde rol almaktadır (61).

MiRNA ifadesinin düzenlenmesi konusu gitgide büyüyen, yeni ve heyecan verici bir konudur (62). Şimdiye kadar, pek çok miRNA çalışması miRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin düzenlenmesini araştırmıştır veya belirli hastalıkların miRNA ifade profillerini incelemiştir, ancak miRNA ifadesinin düzenlemesine ilişkin çok az bilgi mevcuttur (62). Günümüzde, miRNA düzenlemesinin üç farklı mekanizmasıbelirtilmiştir:metilasyon ileözendirici bölgenin susturulması yoluyla epigenetik düzenleme,çeşitli transkripsiyon faktörleri ile ifade seviyesindeki düzenleme ve miRNA birincil transkriptinin ve öncü molekülünün transkripsiyon sonrası işlenmesinin düzenlenmesi (62).

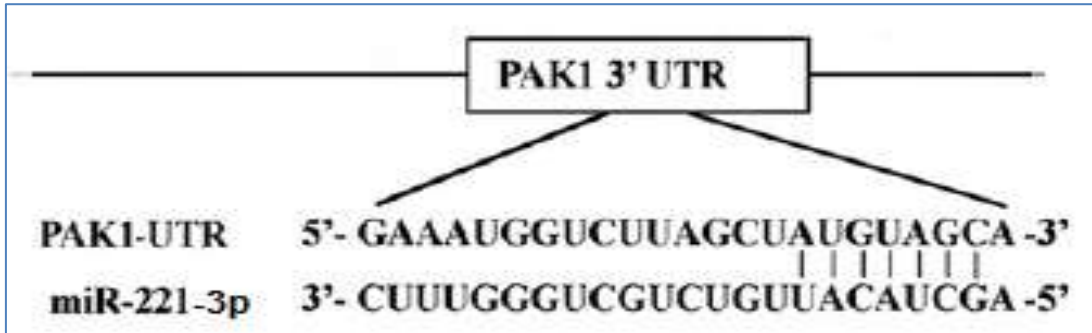
## **2.9. miR-221-3p veTamoksifen Dirençliliği Üzerine Etkileri**

miR-221, X kromozomu üzerinde bir gen kümesi içinde bulunmaktadır ve tek bir birincil transkript olarak ifade edilmektedir. Daha sonra farklı dizilere sahip iki ayrı ve farklı olgun miRNA'ya ayrılır ve miR-221-3p ve miR-221-5p olarak işlenir. Bu miRNA'ların pek çok kanser türünde bozulmuş olduğu ve kanser oluşumunda çok önemli olduğu gösterilmiştir (63-65).

Onkojenik bir mikroRNA olan miR-221, endotel hücrelerindeki hücre migrasyonu ve çoğalmasını önleyen CD117'yi hedef alır. miR-221 aynı zamanda anti-anjiyojenik bir miRNA'dır (66). Son zamanlarda gerçekleştirilen önemli çalışmalar ayrıca miR-221'nin anjiyogenezi tetikleyici bir özelliğe sahip olduğunu öne sürmüştür (66). RISC proteinlerinden olan SND1 ve AEG-1 karaciğer kanserinde miR-221 ifade seviyesinin artmasını sağlamaktadır. miR-221 karaciğer kanserinde tümör anjiyogenezine neden olur (66).

Artan tamoksifen direnci ile artan miR-221/222 ekspresyonunun sebep olduğu p27Kip1 seviyesindeki azalma arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir, dahası bu da çok yönlü biyolojik süreçlerde hücre döngüsü engelleyicilerinin önemini vurgulamaktadır (67).

Bizim çalışmamızda, *PAK1* kaynaklı tamoksifen direnci konu alınmıştır. Bizim hipotezimize göre, *PAK1* tarafından sağlanan ER $\alpha$ -S305 fosforilasyonu *PAK1*'in miR-221-3p ile transkripsiyonel engellenmesi ile tersine çevrilebilir çünkü miR-221-3p *PAK1*'in 3'UTR bölgesini hedeflemektedir (Şekil 2.12) (57,68).



**Şekil 2. 12.** miR-221-3p'nin çekirdek bölgesi ile PAK1 3'UTR bölgesinde bulunan miR-221-3p bağlanma bölgesinin dizi eşlenmesi (68).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır haldeki steril medyumlar ticari firmalardan sağlandı. Cam malzemeler 160 C’de 60-90 dakika sterilize edildi (otoklavlandı). 0,22µm delik büyüklüğündeki mikrobiyolojik filtreler kullanılarak tüm sıvı maddeler süzüldü ve steril edildi. Steril kabin (SafeMate 1.2, BioAir, LAF Technologies Pty Ltd, Victoria, Avustralya), 15 dakika ultraviyole ışık açılarak ve bunu takiben 15 dakika havalandırılarak steril edildi. Sterilize edilen kabine alınacak malzemeler ise %70 alkolle silinerek içeri alındı. Kabinin heryeri %70’lik alkol ile silindikten sonra, hücre hatları üreticinin tavsiyelerine göre hazırlandı.

#### 3.2. Hücre Soyları ve Kültür Aşaması

Tezin amacına uygun olan 5 farklı meme kanseri hücre soyu (SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1, MDA-MB-231) ve kontrol olarak meme epitel hücre soyu (hTERT-HME1), ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Almanya) firmasından alınmıştır (Tablo 3.1).

**Tablo 3. 1.** Kullanılan hücre soylarının özellikleri.

Hücre soyu	ATCC adı	Kanser	Alıcı durumu	Histopatoloji
SKBR3	HTB-30	Meme kanseri	ER(-),PR(-), HER2(+++)	Adenokarsinom
MCF7	HTB-22	Meme kanseri	ER(+),PR(+), HER2(-)	Adenokarsinom
HCC1500	CRL-2329	Meme kanseri	ER(+),PR(+), HER2(-),p53(+)	Primer duktal karsinom
ZR-75-1	CRL-1500	Meme kanseri	ER(+),PR(-), HER2(-)	İnvaziv duktal karsinom
MDA-MB-231	HTB-26	Meme kanseri	ER(-),PR(-), HER2(-),EGF(+), TGFa(+)	Adenokarsinom
hTERT-HME1	CRL-4010	Meme normal dokusu		İnsan meme epiteli

25 cm<sup>2</sup> lik flask halinde alınan bu altı farklı hücre hattı rutin olarak, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Sığır Serum (FCS) (Sigma, Deisenhofen, Almanya), 1 ml Penisilin/streptomisin solüsyonu (Sigma, Deisenhofen, Almanya) destekli 10 ml 10x DMEM solüsyonu (Sigma, Deisenhofen, Almanya) olacak şekilde % 5 karbondioksitli ortamda yetiştirildi.

Hücre soylarının hepsi ilk geldikleri gün, 37° C karbondioksitli etüvde 24 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı. Bir sonraki gün kirlilik olup olmadığı kontrol edildi. 48 saat sonra flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara

37C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin'den 1-2 ml eklendi. Flasklar 5-7 dakika 37 C CO2 etüvde bekletildi. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları inverted mikroskop ile kontrol edildi. Daha sonra flasklara Tripsin'in aktivitesini durdurmak için 5 ml FCS'li DMEM eklendi. Kalkan hücreler, 50 ml'lik flakonlara alındı ve oda ısısında 3000 devir ile 4 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. Dipte kalan hücreler hafifçe çözdürüldü ve yaklaşık 0,5 ml sıvı içerisindeki hücreler steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml besi yeri konmuş flasklara (hücresinin yoğunluk durumuna göre 2-4 flask) dağıtıldı.

### **3.3. Hücre Soylarından Total RNA (miRNA dahil) Eldesi**

Hücre soylarından miRNA'yı da içerecek şekilde total RNA izole etmek için miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) üreticinin tavsiyelerine uygun şekilde kullanılmıştır.

Öncelikle %100'e yakın olduğu tespit edilen hücre soyu kaldırıldı, santrifüj yardımıyla çöktürüldü, süpernatant atıldı ve üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent(Qiagen GmbH, Hilden, Almanya)eklendi. Elde edilen homojenat oda sıcaklığında (15–25 C) 5 dakika boyunca muhafaza edildi. Üzerine 140 µl kloroform eklenir ve şiddetli bir şekilde 15 sn boyunca çalkalandı.2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında tutuldu. 15 dakika boyunca 4 C'de 12.000g'de santrifüj yapıldı ve üst faz yeni bir tüpe alındı. Tüpteki miktarın 1,5 katı (yaklaşık 525 µl) 100% etanol eklendi ve pipet ile iyice karıştırıldı. En fazla 700 µl örnek 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklendi ve oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000g'de santifuje tabi tutuldu. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Kalan örnek olduğunda işlem tekrarlandı. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000g'de santifuj uygulandı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000g'de santifuj uygulandı. (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözeltilerine %96-100 etanol eklenmelidir). Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve bu sefer oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000g'de santifuj uygulandı. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30–50 µl RNase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk boyunca 8000g'de santifuj uygulandı. Toplama tüpündeki birikinti total RNA'yı içermekteydi.

### 3.4. RNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA Eldesi

#### 3.4.1. mRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için Ipsogen RT Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Test edilecek (10 µl) her bir RNA örneğinin 1 µg'ı 65 C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Hemen 5 dakika buzda bekleterek soğutuldu. Tüpün altındaki sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi. Revers Transkriptaz ön karışımı buzda hazırlandı ve buzda tutuldu (Tablo 3.2).

**Tablo 3. 2.** mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri.

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
5x Revers Transkriptaz tamponu	5
dNTP	2
Random primer (100 µM)	5,25
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	0,5
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1
DTT	1,25
<b>Örnek başına RT ön karışım hacmi</b>	<b>15</b>

Ön karışım dikkatlice karıştırıldı, kısa süreli santrifüj edildi ve her bir RNA örneğinin 10 µl'si için (40 ng/µl için) ön karışımdan 15 µl eklendi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazındaki kayıtlı revers transkripsiyon programı çalıştırıldı (Tablo 3.3). Tüpün altındaki cDNA'yı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi ve qPCR gerçekleştirene kadar -20<sup>0</sup> C' de saklandı.

**Tablo 3. 3.** mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları.

Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
10	25
60	50
5	85
5	4

Tepkime tamamlandıktan sonra elde edilen tek sarmal cDNA örneklerinin dondurulup çözülerek oluşan kaybı önlemek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine 2 µl eşit miktarlarda dağıtıldı. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.4.2. .miRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki miRNA'yı cDNA'ya çevirmek için miScript II RT Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Elde edilen kalıp RNA buzda çözdürüldü. 10x miScript NucleicsMix ve 5x miScript HiSpec tamponu oda sıcaklığında çözdürüldü. Çözeltilerin iyice karıştığından emin olundu. Tüpe vurarak her çözelti karıştırıldı. Tüplerin kenarlarından toplanmış sıvı için kısa bir sentrifüj edildi ve sonrasında buzda depolandı.

Tablo 3.4'e göre RT ön karışımı buzda hazırlandı. Karıştırılır ve buza koyuldu. RT ön karışımı kalıp RNA haricinde cDNA sentezinin ilk strandi için gerekli olan herşeye sahipti.

**Tablo 3. 4.** miRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri.

<b>Bileşenler</b>	<b>Reaksiyon Hacmi (µl)</b>
5x miScript HiSpec tamponu	4
10x miScript Nucleics karışımı	2
miScript Reverse Transcriptase karışımı	2
RNaz içermeyen su	Değişken (ör: 12-x eklenir.)
Template miRNA	Değişken (ör: x hacmi bulunur.)
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

miScript RT karışımı -20°C'den master karışımı hazırlamadan önce alındı ve buza konuldu. Ön karışımı kullanıldıktan sonra hızlı bir şekilde tekrar buzdolabına konuldu.

Kalıp miRNA, RT ön karışımı içeren her tüpe eklendi. Yavaşça karıştırılıp, kısa bir şekilde sentrifüj edildi ve buza tekrar konuldu.

Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazı kullanılarak Tablo 3.5'deki gibi karışım 37C'de 60 dk inkübe edildi. miScript RT karışımını inaktive etmek için karışım 95C'de 5 dk inkübe edildi.

**Tablo 3.5.** miRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları.

Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
60	37
5	95

Tepkime tamamlandıktan sonra elde edilen tek sarmal cDNA örnekleri dondurulup çözülerek oluşan kaybı önlemek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine 2 µl eşit miktarlarda dağıtıldı. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.5. Elde Edilen cDNA'lardan Kalite ve Miktar Tayini

İfade analizi deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlemek amacıyla ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) kullanılarak yapıldı. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA miktarları mRNA cDNA'sı için 50 ng/µl'e çekilirken, miRNA cDNA'sı için 100 ng/µl'e çekildi.

### 3.6. PAK1 ve miR-221-3p İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi

Eş zamanlı PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışımaya verir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR Green boyasından alınan ışımının sınır değeri aştığı noktaya Ct yada Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışımaya sınır değeri aşmıştır. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi

gerekmektedir.Çünkü SYBR Green belirli bir DNA molekülüne bağlanan spesifik bir boya değil, tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boyadır.

### 3.6.1. Primer Seçimi

Gen ifadesi primerleri; genin ifade edilip edilmediğini anlamak için kodlanan bölgelerin herhangi bir yerinde olabilir. Fakat kodlanan bir RNA ürünü söz konusu olduğu için ilgili RNA ürününden başka bir kirliliği çoğaltmamak için primer dizayn ederken primerlerden bir ya da her ikisinin ekzon-ekzon kesişim bölgesini içermesine dikkat edilmelidir. Aksi takdirde çoğalan ürünün ortamı kirleten DNA ürününden mi kaynaklı olup olmadığını bilemeyiz. Bu bağlamda *PAK1* primerleri, NCBI veritabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri Tablo 3.6’da gösterilmiştir. Hamarat (housekeeping) gen olarak *BETA-ACTIN* geni kullanıldı.

**Tablo 3. 6.** *PAK1* geninin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.

Primer Adı	İleri Dizi (F)	Geri Dizi (R)
<i>PAK1</i>	TGCCTTGAATGTGAAGGCT GT	GATTTTGTGTGCTCTGGGCG
<i>BETA- ACTIN</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGA CA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGC A

Tasarımı yapılan primerlerin % GC oranı, Tm değerleri, ürün uzunlukları ve primer uzunlukları gibi primer özellikleri Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 3. 7.** Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri.

Primer Adı	Ürün boyutu (bç)	Tm (°C)	% GC	Primer uzunluğu (bç)	
<i>PAK1</i>	126	F	60,48	47,62	21
		R	60,11	55,00	20
<i>BETA-ACTIN</i>	140	F	59,89	55,00	20
		R	60,18	43,48	23

miR-221-3p ifade analizi için primerler hazır olarak alınmıştır. miR-221-3p için Hs\_miR-221\_1 miScript Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) ve referans olarak da RNU6B\_13 miScript Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

### 3.6.2. PCR bileşenleri

Eş zamanlı PCR reaksiyonu Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine(Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı kullanılmıştır. *PAK1* ifade analizi için hazırlanan ön karışımda RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılırken, miR-221-3p için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

#### 3.6.2.1. *PAK1* ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri

Tablo 3.8'e göre eş zamanlı PCR ön karışımı buzda hazırlandı. Karıştırıldı ve buza koyuldu. Eş zamanlı PCR ön karışımı cDNA haricinde ifade analizi reaksiyonu için gerekli olan her şeye sahipti.

**Tablo 3. 8.** *PAK1* ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.

Bileşenler	Hacim (µl)
RT <sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix	12,5
F Primer (10 µM)	0,5
R Primer (10 µM)	0,5
Rnaz/Dnaz içermeyen su	10,5
cDNA (50 ng)	1
<b>Total</b>	<b>25</b>

Her örneğe ait cDNA, eş zamanlı PCR ön karışımı içeren her tüpe eklendi. Yavaşça karıştırıldı, kısa bir şekilde sentrifüz edildi ve buza tekrar konuldu.

Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazındaki kayıtlı programı çalıştırıldı (Tablo 3.9).

**Tablo 3. 9.** *PAK1* ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları.

Bileşenler	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	Döngü
Enzim aktivasyonu	95	10 dak	40 döngü
Denaturasyon	95	15	
Primer bağlanması/uzama	60	60	
Erime eğrisi	65	1	
	95	Devamlı	

### 3.6.2.2. miR-221-3p ifade düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri

Tablo 3.10'a göre eş zamanlı PCR ön karışımı buzda hazırlandı. Karıştırıldı ve buza koyuldu. Eş zamanlı PCR ön karışımı miRNA cDNA'sı haricinde ifade analizi reaksiyonu için gerekli olan her şeye sahipti.

**Tablo 3. 10.** miR-221-3p ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.

Bileşenler	Hacim (µl)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	6,25
10x miScript Universal Primer	1,25
10x miScript Primer Assay (İlgili miRNA primeri)	1,25
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3,125
cDNA (5 ng/µl)	0,63
<b>Toplam hacim</b>	<b>12,5</b>

Her örneğe ait miRNA cDNA'sı, eş zamanlı PCR ön karışımı içeren her tüpe eklendi. Yavaşça karıştırıldı, kısa bir şekilde sentrifüz edildi ve buza tekrar konuldu.

Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazındaki kayıtlı programı çalıştırıldı (Tablo 3.11).

**Tablo 3. 11.** miR-221-3p ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR ayarları.

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	Döngü
Enzim aktivasyonu	95	15 dak	40 döngü
Denaturasyon	94	15	
Primer bağlanması	55	30	
Uzama	70	30	

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Hücre soyları arası *PAK1* ve miR-221-3p ifade düzeylerinin kıyaslanmasında SPSS 21 programı (IBM software, Pointe Claire, Quebec, Kanada) kullanılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak, ikili karşılaştırmalar Student't testi, ikiden fazla karşılaştırmalar ise tek yönlü varyans (One Way ANOVA) testi uygulanarak karşılaştırıldı. İstatistiksel çözümlerinde  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı.

Kısmi miktarlara dayalı yöntemde her hücre soyu için ölçümü yapılan *PAK1* geninin ölçüm değerleri *BETA-ACTIN* geni ve miR-221-3p'nin ölçüm değerleri RNU6B-13 ile normalize edilmiştir. Referans olarak alınan *BETA-ACTIN* geni ve RNU6B-13 belirli



şartlar altında ifade düzeyi değişmeyen, her doku yada hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden ifade edilen hamarat genlerdir.

qRT-PCR yönteminde Cp (Crossing points) değerleri elde edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarında, hücre soyları arası istatistiksel analiz yapılırken  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu değer bize ilgili genin bir hücre hattındaki ifade düzeyinin, kontrol baz alınarak diğer hücre hattındaki göre kıyaslanmasını sağlar; yani, katsayı bilgisi edinilir.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})}$$

qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslaması için  $2^{-\Delta Ct}$  formülü kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu değer bize o genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değiştiğini gösterir; yani, göreceli ifade bilgisi edinilir.

$2^{-\Delta Ct}$  formülü

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-\Delta(\text{Gen Ct-Referans Ct})}$$

## 4. BULGULAR

Terapötik yaklaşımın sonucu ve hastalığın ilerlemesinin karmaşıklığı bireysel hasta yaklaşımı gerektiren hastalık koşullarının tanımlanmasını bir bilmece gibi uzun bir uğraş gerektiren bir olguya dönüştürmektedir (73). Lenf nodu ve metastaz, histolojik sınıflandırma, steroid seviyesi ve büyüme faktörü alıcıları, östrojen uyarıcı genler, ERBB2 gibi proto-onkogenler ve p53'deki mutasyonların dokuya özgü fenotipik ve histopatolojik tanımlamalarının tamamı hastalığın ilerleyişi ve tanısı hakkında bazı bilgiler verebilmektedir (73). Üçlü negatif hastalar hakkında çıkarım yapmak daha da zordur (73). Hastalık durumunda, kanser hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşim, stroma ile ilişkisi ve çoğalmaya meyilli davranışları onları kontrol altında tutmak için ana konudur ve moleküler seviyede fenotipik değişimleri açıklamak oldukça efor gerektirir (73). Bu çalışmada, miR-221-3p'nin düzenleyici rolleri, onun çeşitli meme kanseri hücre hatlarındaki ifade düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir.

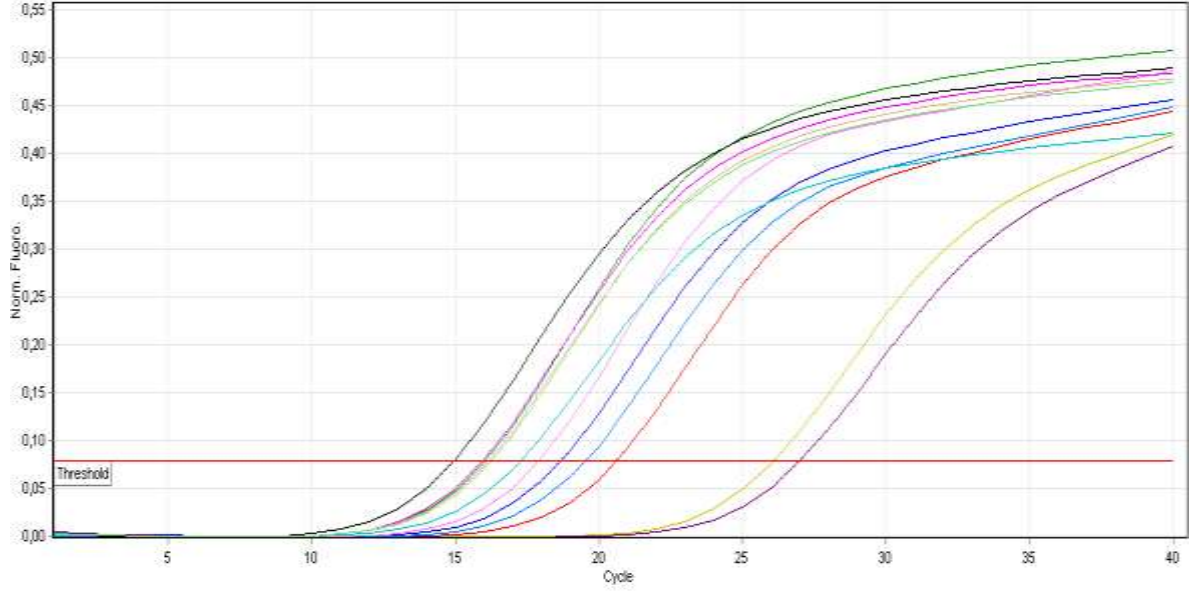
### 4.1. miR-221-3p Gen İfadesi Sonuçları

SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından ve hTERT-HME1 meme epitel hücre soyundan miRNA'yı da içerecek şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen RNA'da ki miRNA cDNA'ya çevrilmiş ve miktar tayini yapılmıştır (Tablo 4.1). Daha sonra bu yoğunluklar ifade analizi öncesi 100 ng/µl'ye çekilmiştir.

**Tablo 4. 1.** Hücre soylarından elde edilen miRNA cDNA'larının derişimleri.

Hücre soyu	Derişim (ng/µl)
SKBR3	1095,50
MCF7	1944,37
HCC1500	1825,47
ZR-75-1	2398,66
MDA-MB-231	1757,80
hTERT-HME1	1747,98

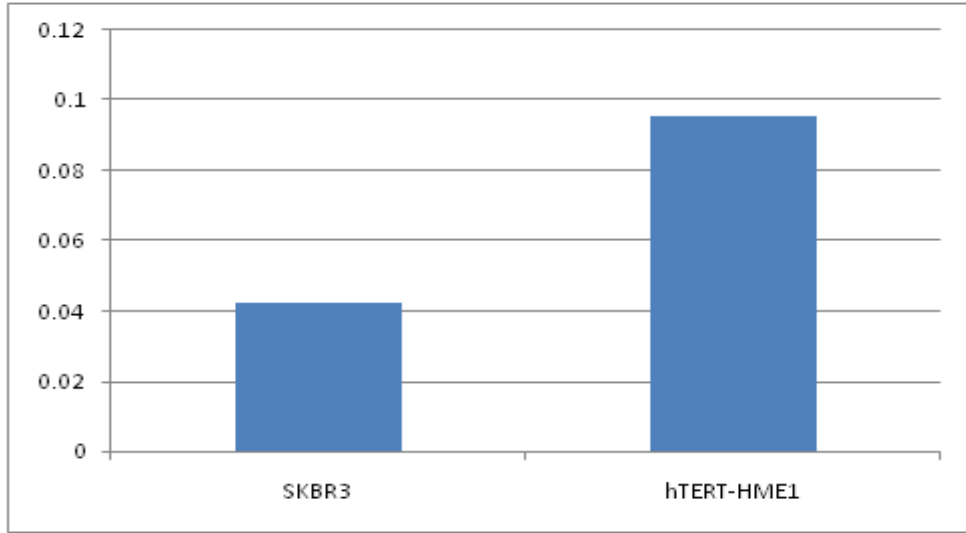
Bu altı hücre soyunun miR-221-3p ifade sonuçları eş zamanlı PCR yöntemiyle ölçülmüştür. miR-221-3p ifadesinin normalizasyonu yapılırken hamarat miRNA olan RNU6B-13 kullanılmıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4. 1.** miR-221-3p ve RNU6B-13'e ait qRT-PCR analizi sonucu. Örnekler 15 ile 27 döngüleri arasında en yüksek eğim vermiştir.

#### **4.1.1. miR-221-3p'nin SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

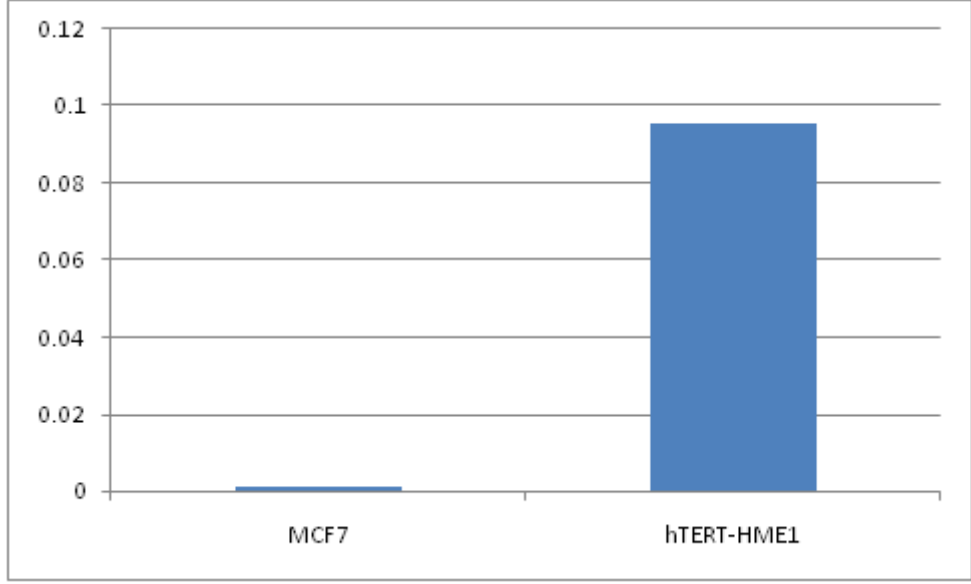
Şekil 4.2'de miR-221-3p'nin meme kanseri hücre soyu olan SKBR3 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri SKBR3 için 0,0423 iken hTERT-HME1 için 0,0953'dü. Bu sonuçlara göre; miR-221-3p SKBR3 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4. 2.** miR-221-3p'nin RNU6B-13 ile normalizasyonu sonucu, SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafikselolarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ).

#### **4.1.2. miR-221-3p'nin MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

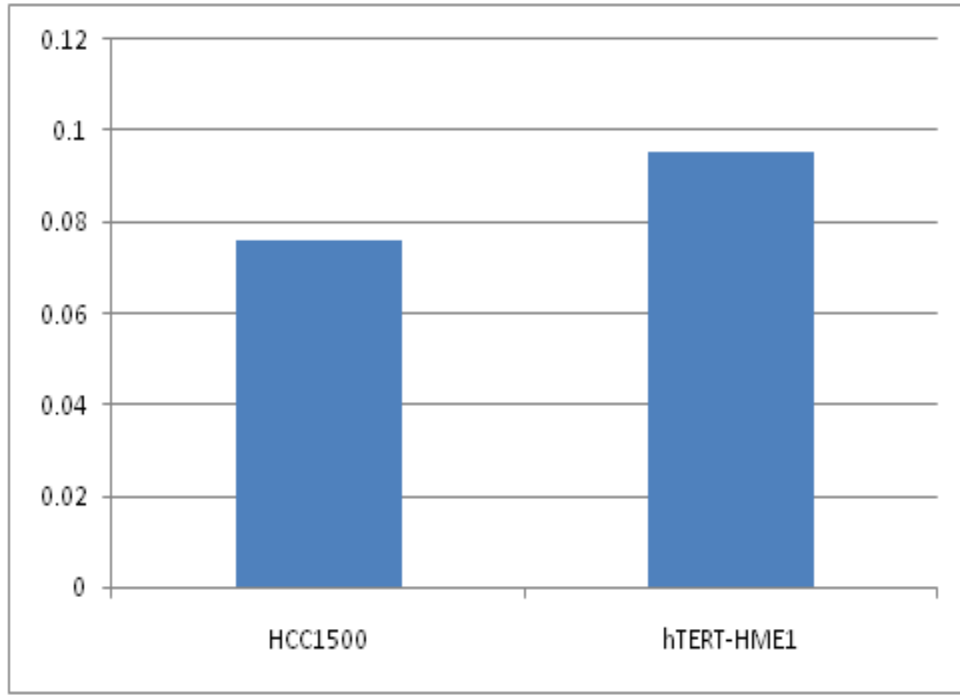
Şekil 4.3'de miR-221-3p'nin meme kanseri hücre soyu olan MCF7 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri MCF7 için 0,0008 iken hTERT-HME1 için 0,0953'dü. Bu sonuçlara göre; miR-221-3p MCF7 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4. 3.** miR-221-3p'nin RNU6B-13 ile normalizasyonu sonucu, MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir (p<0,05).

#### **4.1.3. miR-221-3p'nin HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

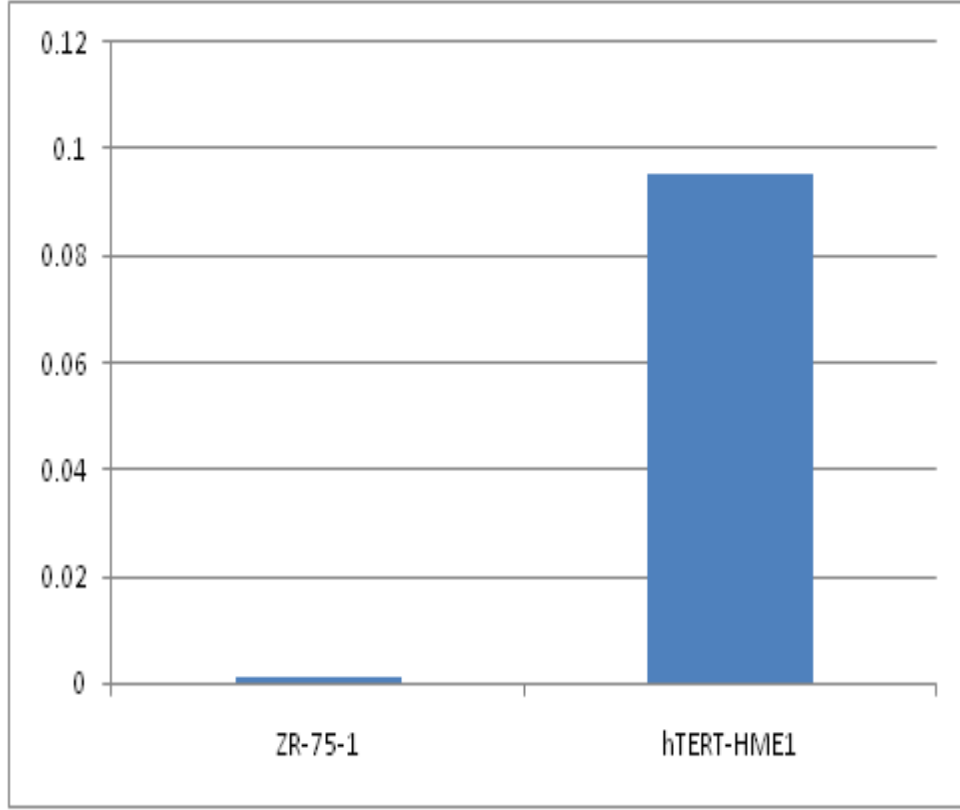
Şekil 4.4'de miR-221-3p'nin meme kanseri hücre soyu olan HCC1500 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri HCC1500 için 0,0758 iken hTERT-HME1 için 0,0953'dü. Bu sonuçlara göre; miR-221-3p HCC1500 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).



**Şekil 4. 4.** miR-221-3p'nin RNU6B-13 ile normalizasyonu sonucu, HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

#### **4.1.4. miR-221-3p'nin ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

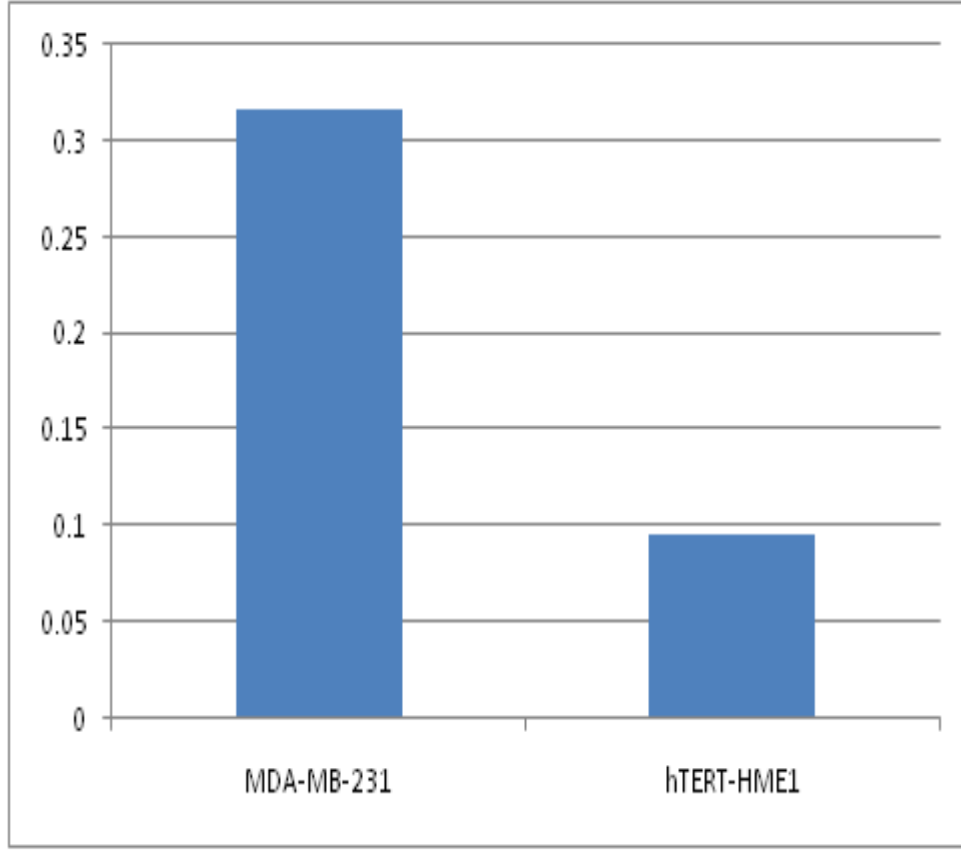
Şekil 4.5'de miR-221-3p'nin meme kanseri hücre soyu olan ZR-75-1 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri ZR-75-1 için 0,0011 iken hTERT-HME1 için 0,0953'dü. Bu sonuçlara göre; miR-221-3pZR-75-1 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ )



**Şekil 4. 5.** miR-221-3p'nin RNU6B-13 ile normalizasyonu sonucu, ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir (p<0,05).

#### **4.1.5. miR-221-3p'nin MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

Şekil 4.6'da miR-221-3p'nin meme kanseri hücre soyu olan MDA-MB-231 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri MDA-MB-231 için 0,3164 iken hTERT-HME1 için 0,0953'dü. Bu sonuçlara göre; miR-221-3p MDA-MB-231 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05).

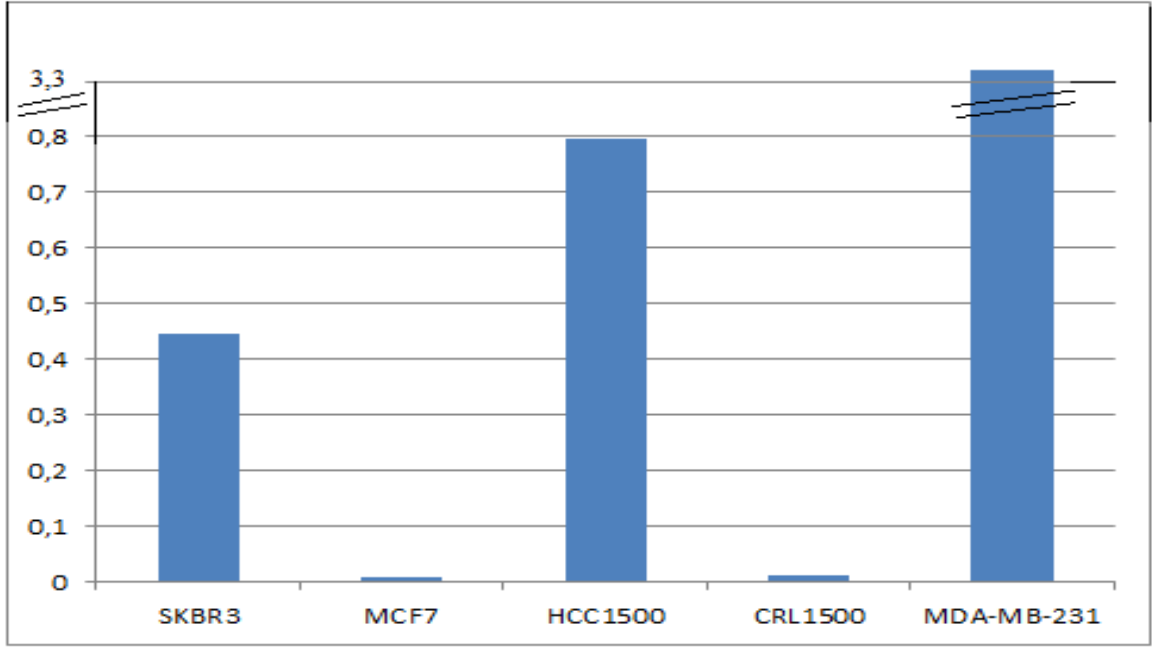


**Şekil 4. 6** miR-221-3p'nin RNU6B-13 ile normalizasyonu sonucu, MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p < 0,05$ ).

#### **4.1.6. miR-221-3p' nin SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları**

Şekil 4.7'de miR-221-3p'nin ifade düzeyinin meme kanseri hücre soyları olan SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231'de kontrol hücre hattı olan hTERT-HME1 baz alınarak birbirlerine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: SKBR3 için 0,4444, MCF7 için 0,0092, HCC1500 için 0,7955, ZR-75-1 için 0,0122 ve MDA-MB-231 için 3,3172.





Şekil 4. 7. miR-221-3p'nin SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir.

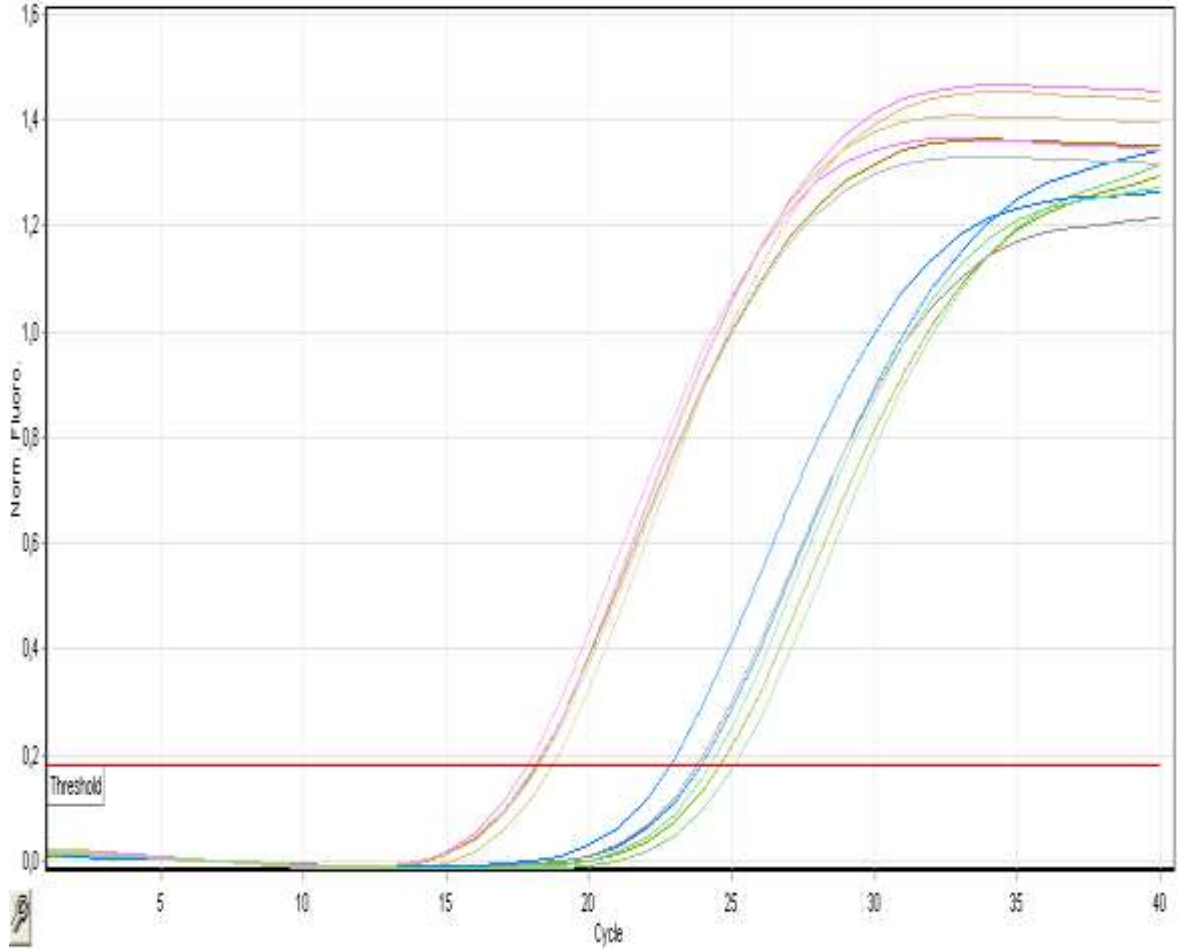
#### 4.2. *PAK1* Geninin Gen İfadesi Sonuçları

SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından ve hTERT-HME1 meme epitel hücre soyundan total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen RNA'da ki mRNA cDNA'ya çevrilmiş ve miktar tayini yapılmıştır (Tablo 4.2). Daha sonra bu yoğunluklar ifade analizi öncesi 50 ng/µl'ye çekilmiştir.

Tablo 4. 2. Hücre soylarından elde edilen mRNA cDNA'larının derişimleri.

Hücre soyu	Derişim (ng/µl)
SKBR3	1874,5
MCF7	1841,34
HCC1500	1885,97
ZR-75-1	2051,33
MDA-MB-231	1709,19
hTERT-HME1	1640,49

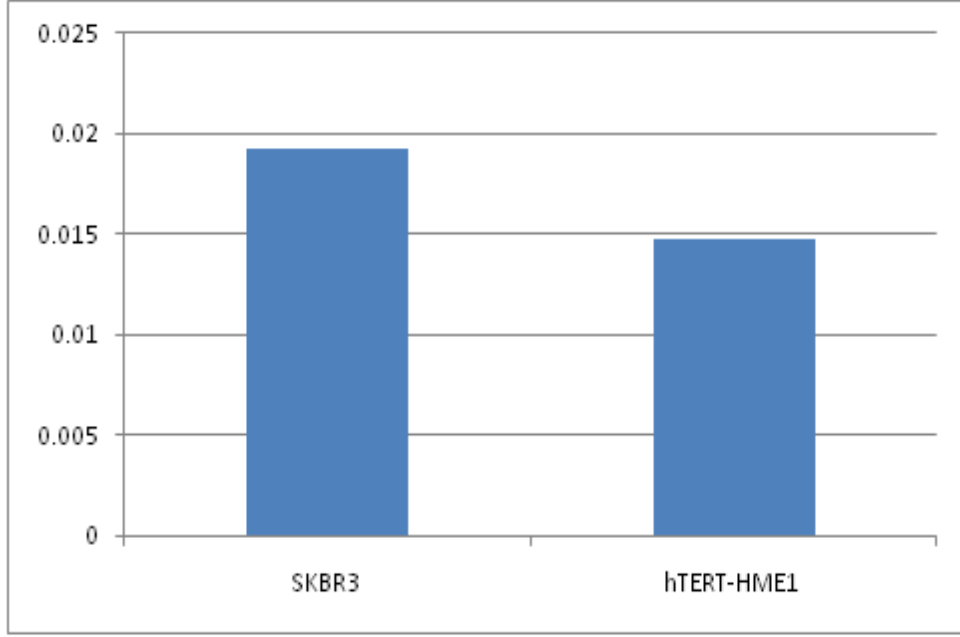
Bu altı hücre soyunun *PAK1* ifade sonuçları eş zamanlı PCR yöntemiyle ölçülmüştür. *PAK1* ifadesinin normalizasyonu yapılırken hamarat gen olan *BETA-ACTIN* kullanılmıştır (Şekil4.8).



Şekil 4. 8. *PAK1* ve BETA-ACTIN'e ait qRT-PCR analizi sonucu. Örnekler 18 ile 25 döngüleri arasında en yüksek eğim vermiştir.

#### 4.2.1. *PAK1*'nin SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları

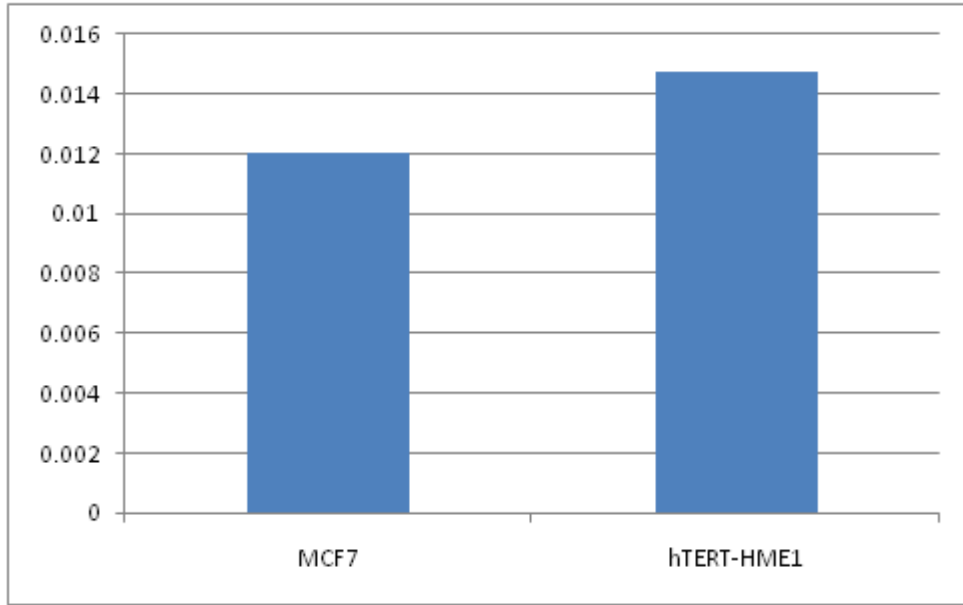
Şekil 4.9'da *PAK1*'nin meme kanseri hücre soyu olan SKBR3 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri SKBR3 için 0,0192 iken hTERT-HME1 için 0,0147'dü. Bu sonuçlara göre; *PAK1* SKBR3 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre yüksek bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



Şekil 4. 9.PAK1'nin BETA-ACTIN ile normalizasyonu sonucu, SKBR3 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

#### 4.2.2. PAK1'nin MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları

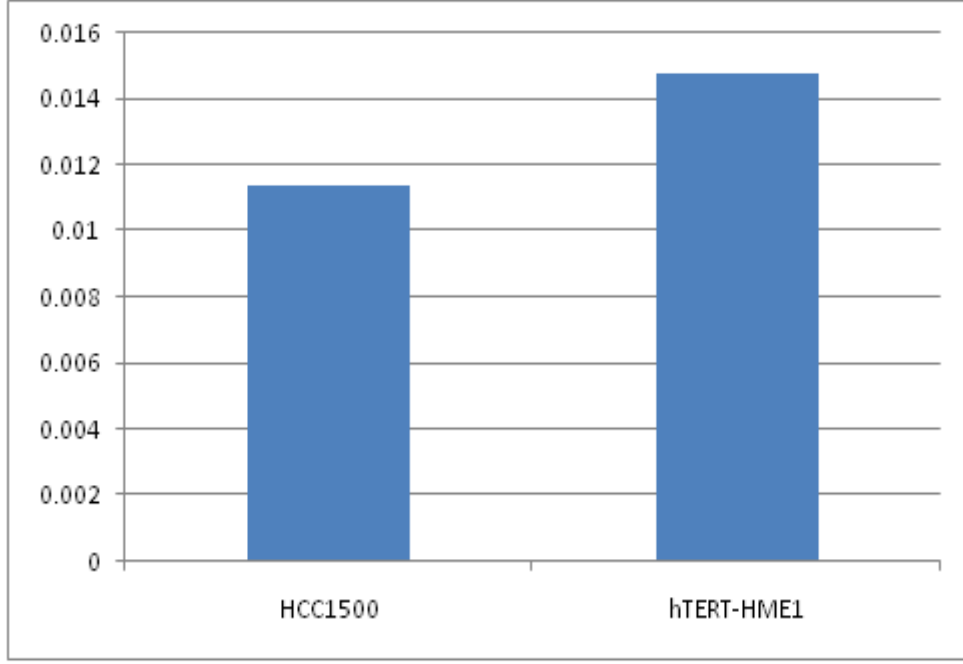
Şekil 4.10'da PAK1'nin meme kanseri hücre soyu olan MCF7 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri MCF7 için 0,0120 iken hTERT-HME1 için 0,0147'di. Bu sonuçlara göre; PAK1/MCF7 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4. 10.** *PAK1*'nin *BETA-ACTIN* ile normalizasyonu sonucu, MCF7 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

#### **4.2.3. *PAK1*'nin HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

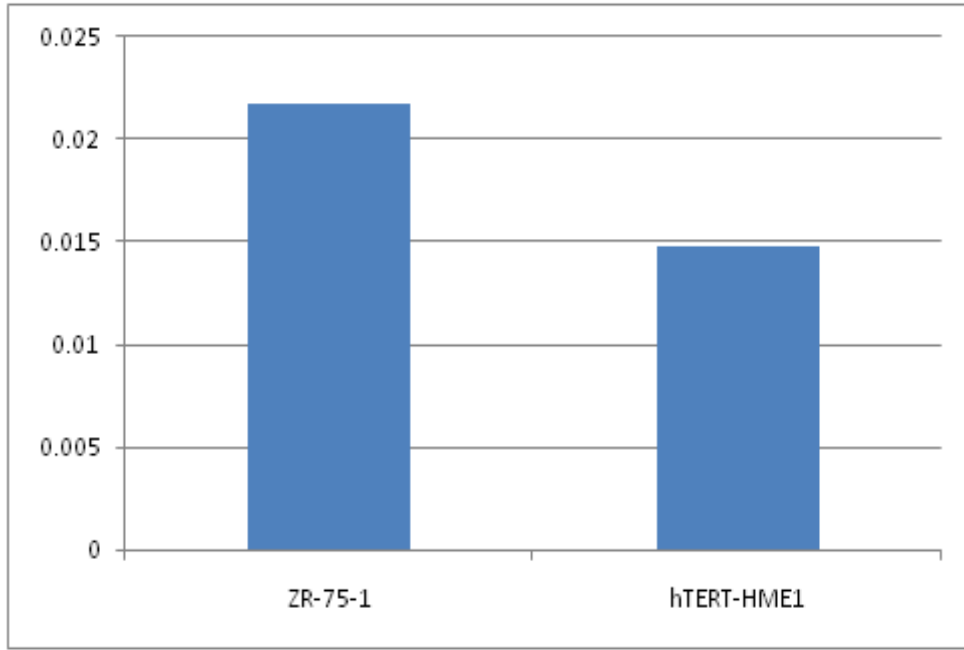
Şekil 4.11'de *PAK1*'nin meme kanseri hücre soyu olan HCC1500 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri HCC1500 için 0,0113 iken hTERT-HME1 için 0,0147'di. Bu sonuçlara göre; *PAK1*/HCC1500 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4. 11.** *PAK1*'nin *BETA-ACTIN* ile normalizasyonu sonucu, HCC1500 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

#### **4.2.4. *PAK1*'nin ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

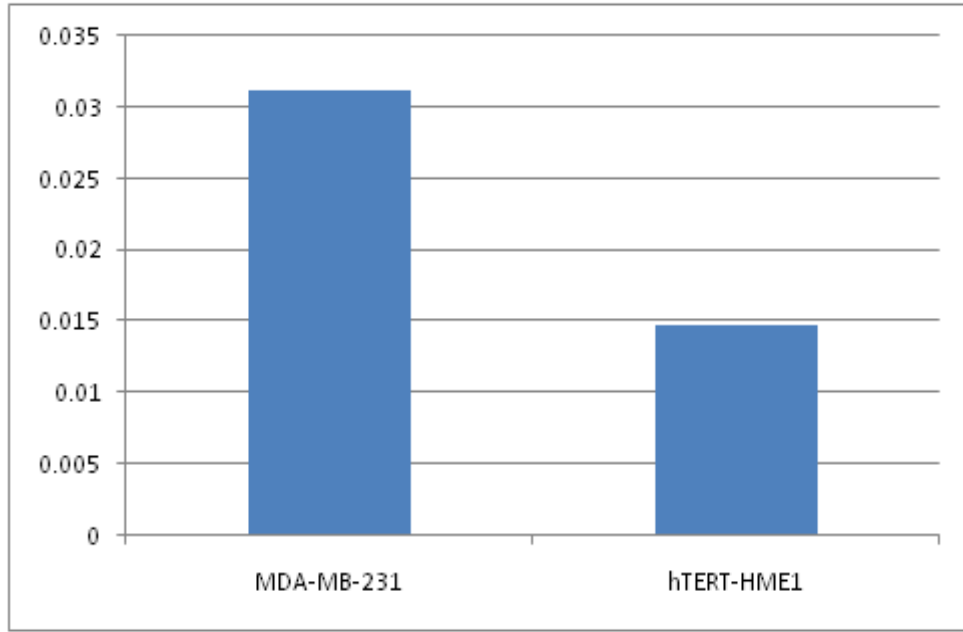
Şekil 4.12'de *PAK1*'nin meme kanseri hücre soyu olan ZR-75-1 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri ZR-75-1 için 0,0217 iken hTERT-HME1 için 0,0147'di. Bu sonuçlara göre; *PAK1* ZR-75-1 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre yüksek bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4. 12.** *PAK1*'nin *BETA-ACTIN* ile normalizasyonu sonucu, ZR-75-1 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

#### **4.2.5. *PAK1*'nin MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soylarındaki karşılaştırmalı ifade sonuçları**

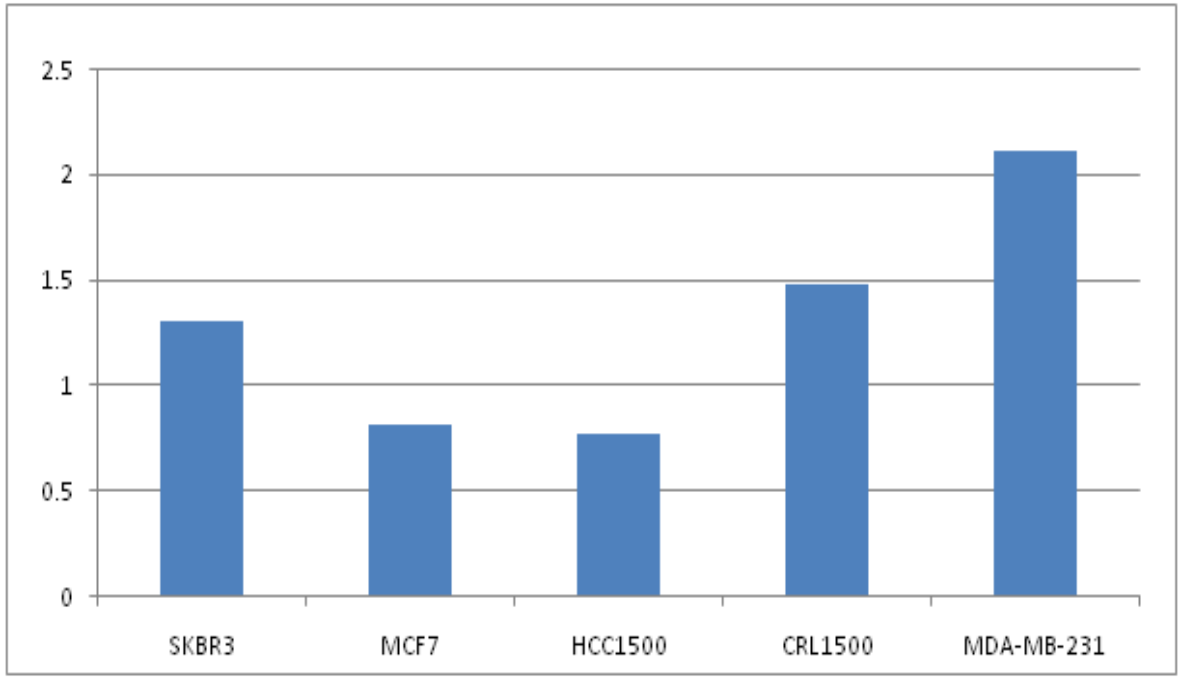
Şekil 4.13'de *PAK1*'nin meme kanseri hücre soyu olan MDA-MB-231 ve meme epitel hücre soyu olan hTERT-HME1'deki ifade değerleri gösterilmiştir. Grafiğe göre  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanan göreceli ifade düzeyleri MDA-MB-231 için 0,0312 iken hTERT-HME1 için 0,0147'di. Bu sonuçlara göre; *PAK1* MDA-MB-231 hücre soyunda kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4. 13.** *PAK1*'nin *BETA-ACTIN* ile normalizasyonu sonucu, MDA-MB-231 ve hTERT-HME1 hücre soyları arası ifadesel fark grafiksel olarak gösterilmiştir ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.6. *PAK1*'in SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları**

Şekil 4.14'de *PAK1*'in ifade düzeyinin meme kanseri hücre soyları olan SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231'de kontrol hücre hattı olan hTERT-HME1 baz alınarak birbirlerine göre kıyaslanması gösterilmiştir. Grafikte  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları şöyledir: SKBR3 için 1,3013, MCF7 için 0,8122, HCC1500 için 0,7684, ZR-75-1 için 1,4742 ve MDA-MB-231 için 2,1140.



**Şekil 4. 14.** *PAK1*'in SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir.

Sonuç olarak, miR-221-3p'nin relatif ifade düzeyi hücre hatlarına bağlı bir şekilde değişkenlik göstermektedir. Özellikle, ER+ hücre hatlarındaki ifade düzeyi oldukça azdı (Tablo 3.1 ve Şekil 4.3-4.5). İfade düzeyindeki bu azalma *PAK1* relatif ifade seviyesi ile alakalı değildir ve bu da miR-221-3p ve *PAK1* arasında bu hücre hatlarında bir etkileşimin olmadığını öngörmektedir (Şekil 4.2-4.6'ya göre Tablo 3.1 ve Şekil 4.9-4.13). miR-221-3p ve *PAK1* relatif ifade seviyeleri ve katlı değişim ifade düzeyleri aynı ifade paternine sahiptir.



## 5. TARTIŞMA

Kadınlarda en yaygın malignite olan meme kanseri, tüm kadın kanserlerinin % 31'ni meme kanseri oluşturmaktadır (5). Ülkemizde en sık saptanan ilk 10 kanser türü arasında bulunan meme kanseri akciğer, prostat ve cilt kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türüdür (5). Tedavi, tarama programları ve toplum bilincinin gelişimiyle sağlanan erken teşhisin sayesinde ölüm oranı azalmaktadır (69). Fakat her yeni bulunan tedavi seçeneğine kanser hücresinin tepkisi (direnci) gecikmemektedir ve bu da hastalığa karşı elde edilmek istenen tedavi başarısını düşürmektedir (69).

Hormon almaçlarının ifadesinin, tümör dokusunda tümörleşmede erken tespit edilen ve tümör biyolojisi hakkında önemli bilgiler veren kalıcı etkenler olduğu, meme kanseri hücre almaçlarının ifadeleme çalışmaları sonucu elde edilen önemli bir bulgudur (13-15). Bu nedenle, risk faktörleri hem tümörlerin gelişimiyle hem de onların biyolojisi ve ilerlemesiyle bağlantılı olabilir (13-15). Böylece, meme kanserindeki risk faktörü oluşumlarının tümörün morfolojik ve moleküler özelliklerine göre değişip değişmediğini belirlemek tedavi için önemli bir bilgi sağlamaktadır (13-15).

Spesifik hormon almaçlarına özgü geliştirilen meme kanseri ilaçlarının (HER2-Trastuzumab, ER-Tamoksifen, vb). her ne kadar etki mekanizmaları dâhiyane olsa da bu ilaçlara karşı gelişen ilaç direncine çok sık rastlanmaktadır (69). Ayrıca, miRNA'ların pek çok kanser türünde ve ilaç direncinde çok önemli rolleri olduğu açıktır (26). Biz de bu bilgiyi kullanarak özellikle ER+ meme kanseri hastalarında kullanılan Tamoksifen ilacına karşı gelişen direncini çok kiritik rollere sahip miRNA'lar üzerinden açıklamayı amaçladık. Hipotez olarak *PAK1* genini hedefleyen miR-221-3p'nin ER-pozitif meme kanseri olgularında Tamoksifen direncini önleyebileceğini düşünmekteyiz. Çünkü, bizim hipotezimize göre, *PAK1* tarafından sağlanan ER $\alpha$ -S305 fosforilasyonu *PAK1*'in miR-221-3p ile transkripsiyonel engellenmesi ile tersine çevrilebilir çünkü miR-221-3p *PAK1*'in 3'UTR bölgesini hedeflemektedir (57,68). Bu amaçla, bölümümüzdeki laboratuvarında ER-pozitif meme kanseri hücre hatlarında (MCF7, HCC1500, ZR-75-1), ER-negatif meme kanseri hücre hatlarında (SKBR3, MDA-MB-231) ve kontrol olarak meme epitel hücre hattı CRL-4010'da miR-221-3p'nin ifade düzeyini ölçmek için Real-Time PCR (qRT-PCR) kullandık.

Bizim sonuçlarımızı değerlendirecek ve literatürle kıyaslayacak olursak öncelikle ER+ meme kanseri hücrelerinden başlamak gerekir. Çünkü Tamoksifen ER+ meme kanseri hücreleri üzerinde etkilidir (51). Çalışmamızda ER+ meme kanseri hücresi olarak meme adenokarsinom hücre hattı MCF7, primer duktal karsinom hücre hattı HCC1500 ve invaziv duktal karsinom hücre hattı ZR-75-1 kullanılmıştır.

Şekil 4.3'e göre MCF7 hücre hattında miR-221-3p ifade düzeyi kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Aynı zamanda, Şekil 4.10'a göre MCF7 hücre soyunda *PAK1* ifade düzeyi hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Şekil 4.4'e göre HCC1500 hücre hattında miR-221-3p ifade düzeyi kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Aynı zamanda, Şekil 4.11'e göre HCC1500 hücre soyunda *PAK1* ifade düzeyi hTERT-HME1'e göre düşük bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Şekil 4.5'e göre ZR-75-1 hücre hattında miR-221-3p ifade düzeyi kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Aynı zamanda, Şekil 4.10'a göre ZR-75-1 hücre soyunda *PAK1* ifade düzeyi hTERT-HME1'e göre yüksek bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Bu üç hücre hattında *PAK1* geninin miR-221-3p tarafından hedeflenip aktivitesinin düzenlenip düzenlenmediği üzerinden yorum yapmak gerekirse, MCF7 ve HCC1500 hücre hatlarında *PAK1* ile miR-221-3p ters orantı göstermezken, yalnızca ZR-75-1 hücre soyunda miR-221-3p'nin ciddi bir şekilde azalması *PAK1* geninin ifadesinde artışa sebep olmuştur. Elimizde Tamoksifen dirençli bir hücre hattı olmadığı için bu değişimi hücre soylarının histopatolojisi yani kanserin şiddeti üzerinden yorumlayabiliriz. Yani, *PAK1*'daki miR-221-3p bağımlı artış, ZR-75-1 hücre soyunun invaziv özelliğe sahip olup diğer ER+ hücre hatları MCF7 ve HCC1500'ün daha hafif bir kanser şiddetine sahip olmasına bağlanabilir.

Çalışmamızda ER- meme adenokarsinom hücre hatları da kullanılmıştır: SKBR3 ve MDA-MB-231. Bu hücre hatlarındaki miR-221-3p ve *PAK1* ifade profillerini inceleyecek olursak, Şekil 4.2'ye göre SKBR3 hücre hattında miR-221-3p ifade düzeyi kontrol hücre soyu hTERT-HME1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Aynı zamanda, fakat Şekil 4.9'a göre SKBR3 hücre soyunda *PAK1* ifade düzeyi hTERT-HME1'e göre yüksek bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuca göre SKBR3 hücre hattındaki miR-221-

3p'nin ifade düzeyinin azalıp *PAK1*'in ifade düzeyinin artması, *PAK1* ifade düzenlenmesinde miR-221-3p'nin rolünün de olabileceğine yorumlanabilir. Ama bu noktada *PAK1* ifade profilini ER mekanizması üzerinden yorumlamak mümkün olmaz. İkinci olarak, MDA-MB-231 hücre soyunda miR-221-3p ve *PAK1*'in ifade düzeylerinin hTERT-HME1'e göre yüksek olması, bu hücre soyunda *PAK1*'in ifade düzenlenmesinde miR-221-3p'nin etkisinin olmadığına yorumlanabilir.

miR-221-3p'nin ve *PAK1*'in SKBR3, MCF7, HCC1500, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hTERT-HME1 baz alınarak hesaplanan katlı değişimifade sonuçlarını incelemek gerekirse, hücre soyları arası ifade kıyaslaması ne hücrelerin histopatolojisiyle ne de ER ve diğer hücre almaçlarının durumuyla tutarlı bir şekilde açıklanamamaktadır (Şekil 4.7 ve 4.14).

Bir çalışmaya göre aktin hücre iskeleti oluşum yolağında rol alan *PAK1* geninin let-7 miRNA'sı tarafından direk olarak hedeflendiği ve aktivitesinin engellendiği öne sürülmektedir (70).*PAK1*'in ifadesinin let-7 tarafından engellenmesi meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu ciddi anlamda engellemektedir (70). Bu sebeple miR-221-3p ile *PAK1* ifadesinin engellenip engellenmediği ya da engellenmesinde, hem teorik hem de başka çalışmalarca deneysel olarak *PAK1*'i hedeflediğini bildiğimiz miR-221-3p'nin rol alıp almadığını çalışmamızda araştırmak doğru noktadır. Bizim çalışmamızda SKBR3, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında *PAK1* ifadesinde artış gözlenmektedir ve bu hücre soylarından SKBR3 ve ZR-75-1'de miR-221-3p ifadesinin ciddi anlamda düştüğü görülmektedir. Bu iki hücre hattındaki profile göre diyebiliriz ki, meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu tetikleyen *PAK1* ifadesinin miR-221-3p tarafından düzenleniyor. Fakat diğer *PAK1* ifadesi kontrol hücre soyuna göre yüksek olan MDA-MB-231 hücre hattında *PAK1* ifadesi için farklı düzenleyici mekanizmalar olabilir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalara göre ER- olan meme kanseri tümör örneklerinde HER2 ifadesi *PAK1* aktivasyonu ile bağıntılı bir şekilde düzenlenmektedir (71). Ayrıca, HER2+ meme kanseri hücrelerinde *PAK1* aktivitesinin engellenmesinin, tümör oluşumunu durdurduğu ve Erk ve Akt uyarı yollarını baskıladığı bulunmuştur (71). Bu bilgiye göre bizim çalışmamızda ER- ve HER2+ olan SKBR3 hücre soyunda *PAK1* aktivitesinin kontrol hücre soyuna göre yüksek olması literatürle uyumludur ve

aynı hücre hattında *PAKI*'i hedefleyen miR-221-3p'nin ifadesinin düşük olması *PAKI*'in ifadesel düzenlenmesinde rolü olabileceğini göstermektedir.

*PAKI* geninin aşırı ifadeleneşmesi luminal meme kanserinde görülen bir olgudur ve *PAKI* proteininin aşırı ifadeleneşmesi lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilen bir olgudur (72). *PAKI*'i aşırı ifadeleyen meme kanseri hücreleri, *PAKI*'in engellenmesinin ardından hızlı bir şekilde apoptoza uğrarlar (72). Bu durumda, *PAKI*'in aşırı ifadelendiğini gördüğümüz SKBR3, ZR-75-1 ve MDA-MB-231 hücre soylarında apoptozun baskılandığı ve bu baskının da SKBR3 ve ZR-75-1 hücre soylarında azalan miR-221-3p ifade düzeyinden kaynaklandığı düşünülebilir. Sonuç olarak, literatürdeki bu bulguya göre SKBR3 ve ZR-75-1 hücre soyları için miR-221-3p'nin anti-apoptotik etkiye sahip olduğunu ve çalışmamızdaki diğer hücre hatlarında bu eğilimi görmediğimizden dolayı miR-221-3p'nin bu etkisinin bu hücre hatlarında ortaya çıkmadığını söyleyebiliriz.

En başta miR-221-3p üzerinden Tamoksifen direnci için yorum yapmayı amaçladık ama başka mekanizmalar üzerinden de miR-221'in meme kanseri ve diğer kanser türlerinde de etkili olduğu bilinmektedir (66). Bu da miR-221'in pek çok hedeflediği gen olduğu gerçeğini ispatlamaktadır (66). Mesela, onkojenik bir miRNA olan miR-221, endotel hücrelerindeki hücre migrasyonu ve çoğalmasını önleyen CD117'yi hedef alır (66). miR-221 aynı zamanda anjiyojenik bir miRNA'dır (66). Son zamanlarda gerçekleştirilen önemli çalışmalar ayrıca miR-221'nin anjiyogenezi tetikleyici bir özelliğe sahip olduğunu öne sürmüştür (66). RISC.proteinlerinden olan SND1 ve AEG-1 karaciğer kanserinde miR-221 ifade seviyesinin artmasını sağlamaktadır (66). miR-221 karaciğer kanserinde tümör anjiyogenezine neden olur (66). Ayrıca, artan tamoksifen direnci ile artan miR-221/222 ekspresyonunun sebep olduğu p27Kip1 seviyesindeki azalma arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir, dahası bu da çok yönlü biyolojik süreçlerde hücre döngüsü engelleyicilerinin önemini vurgulamaktadır (67).

Çalışmanın kısıtlı yönlerinden bahsedilecek olursa, protein seviyesinde bir analizin ve çıkarımın eksikliği en başta gelecektir. miR-221-3p'nin artışı ve azalışından *PAKI*'in nasıl etkilendiğini araştırırken protein seviyesinde bir analiz daha gerçekçi olacaktır. Çünkü mRNA düzeyinde bir değişikliğin protein seviyesine nasıl yansıtacağını bilemeyiz. Ayrıca, miR-221-3p'nin *PAKI*'i nasıl etkilediğini araştırırken, mimic ve inhibitör miR-221-3p'yi dışarıdan vererek miRNA'nın etkisini artırıp azaltmalı ve *PAKI* üzerindeki etkisini öyle incelemeliyiz. Aksi takdirde bizim çalışmamızdaki gibi

hali hazırda hücrenin o anki durumunda barındırdığı miR-221-3p'nin aktivitesini incelemiş oluruz. Dahası, tüm bu uygulamalarda hücrenin hayatsal olarak nasıl etkilendiğini incelemek üzere; hücre canlılığı, apoptoz, otofaji, ve hücre döngüsü analizleri yapılmalıdır. Bu sayede kanser hücrelerinin hayati olarak nasıl etkilendiğini daha iyi analiz edebiliriz. Son olarak, ilaç direnci çalışmaları için ilaca dirençli hücre hattının oluşturulması, imkan yoksa ticari olarak alınıp deneylerin onun üzerinden yapılması daha uygun olacaktır.

Görüldüğü gibi pek çok farklı çalışma miR-221-3p'nin meme kanserinde ve bazı diğer kanser türlerinde hem kanseri tetikleyen hem de kanseri engelleyen rolü olduğunu ortaya koymuştur. Biz de histopatolojik olarak farklı özelliklere sahip altı farklı meme kanseri hücre soyunda miR-221-3p'nin ifade profilini çıkardık ve literatürle uyumlu bir şekilde hem kanseri tetikleyebileceğini hem de baskılayabileceğini ortaya koyduk. Bunu yaparken de miR-221-3p tarafından hedeflenen *PAK1* geninin de meme kanserindeki fonksiyonunu ifade düzeyleri üzerinden yorumlamaya çalıştık. Bu sayede meme kanserinin nasıl düzenlendiğiyle alakalı mekanizmalar hakkında bilgimizi arttıracak ve hastaların tedavisine yeni gelişmeler sağlayacak bilgiler elde etmeye çalıştık.

## KAYNAKLAR

1. Beenken SW, Wanger FB, Bland K. History of the therapy of breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM (eds). *The Breast*, 3rd edition. St. Louis:Saunders – Elsevier, 2004,3-18.
2. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 2001; 7: 548±52.
3. [http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric-2-4-1x\\_what\\_are\\_the\\_key\\_statistics\\_for\\_breast\\_cancer\\_5.asp](http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric-2-4-1x_what_are_the_key_statistics_for_breast_cancer_5.asp). Retrieved 5/12/2010.
4. GLOBOCAN 2012. 2012. (<http://globocan.iarc.fr/>)
5. T. C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistiği Yıllığı 2012. 2012. (<http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/istaturk2012.pdf>)
6. Davidson, B.,Konstantinovsky, S., Kleinberg, L, Nguyen, M.T.P., Bassarova, A., Kvalheim, G., Nesland, J.M. andReich, R., 2006, The Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma, *Gynecologic Oncology*, 102, 453-461 p.
7. Giacotti, V., 2006, Breast cancer markers, *Cancer Letters*, 243, 145-159 p.
8. Grunewald, T.G.P.,Kammerer, U., Schulze, E., Schindler, D., Honig, A., Zimmer, M. andButt, E., 2006, Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells, *Experimental Cell Research*, 312, 974- 982 p.
9. Sivaraman, V.S.,Wang, H., Nuovo, G.J. and Malbon, C.C., 1997, Hyper expression of Mitogen-activated Protein Kinase in human breast cancer, *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1478-1483 p.
10. Wang Y, Liu S, Zhang G, Zhou C, Zhu H, Zhou X, Quan L, Bai J and Xu N, 2005, Knockdown of c-Myce expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research*, 7, R220- R228 p.
11. Yılmaz, H.H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinç, A., Olcayto, E.Ö., Özgül, N. and Tuncer, M., 2011, Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(1), 10-16 p.
12. Vanpoznak, C. And Seidman, A.D., 2002, *Encyclopedia of Cancer*, Academic Press, Amsterdam, 2nd Edition, 287-299 p.
13. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*.2000;406:747–52.

14. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001;98:10869–74.
15. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003;100:8418–23.
16. Sørliie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001;98(19):10869–10874.
17. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006; 58 (4): 773–81.
18. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 2006; 116 (3): 561–7.
19. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005; 365 (9472):1687-717.
20. Ariazi, E.A., Ariazi, J.L., Cordera, F. & Jordan, V.C. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 6, 181–202 (2006).
21. Jordan VC. Tamoxifen (ICI46, 474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol* 2006; 147 (Suppl 1): S269–76.
22. D Paul and KH Cowan. Drug resistance in breast cancer. *CONT CANC R.* 1999;3,pp. 481-517
23. Dorssers LC, Van der Flier S, Brinkman A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EM, Klijn JG, Beex LV, Foekens JA. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs.* 2001; 61(12):1721-33.
24. Zwart W, Griekspoor A, Berno V, Lakeman K, Jalink K, Mancini M, Neefjes J, Michalides R. PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ER alpha towards co-activator SRC-1. *EMBO J.* 2007; 26(15):3534-44.
25. Fernández- Hernando, Carlos, Yajaira Suárez, Katey J. Rayner, and Kathryn J. Moore. "MicroRNAs in lipid metabolism." *Current opinion in lipidology* 22, no. 2 (2011): 86.

26. Zhang X, Mao H, Chen JY, Wen S, Li D, Ye M, Lv Z. Increased expression of microRNA-221 inhibits *PAK1* in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 431(3):404-8.
27. Ramsay DT, Kent JC, Hartmann RA, and Hartman PE. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *J Anat.* 2005 June; 206(6): 525–534.
28. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23:7703–7720.
29. Speroff L. Role of progesterone in normal breast physiology. *J Reprod Med.* 1999; 44 (2 Suppl):172-9.
30. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki I. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000; 343:78–85.
31. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000; 21(6):167-223.
32. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358 (5): 502–11.
33. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2001; 1 (2): 157–62.
34. Cancer Tends to Involve Multiple Mutations-slide 49. *Understanding Cancer Series.* National Cancer Institute. 2013.
35. Collins K, Jacks T, and Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *PNAS* 1997; 94, 2776–2778.
36. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012; 45 (6):487-98.
37. Fiorio Pla A, Gkika D. Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Front Physiol.* 2013; 4:311.
38. Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Livasy CA, Coleman WB. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Labmedicine.* 2010;41:6



39. Burrell RA, Juul N, Johnston SR, Reis-Filho JS, Szallasi Z, Swanton C. Targeting chromosomal instability and tumour heterogeneity in HER2-positive breast cancer. *J Cell Biochem.* 2010; 111 (4):782-90.
40. Janatova M, Pohlreich P. Microsatellite markers in breast cancer studies. *Prague Med Rep.* 2004; 105 (2):111-8.
41. Adem C, Soderberg CL, Cunningham JM, Reynolds C, Sebo TJ, Thibodeau SN, Hartmann LC, Jenkins RB. Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers. *Int J Cancer.* 2003; 107 (4):580-2.
42. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA and Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J. Mol.Med.* 1997; 75, 429–439.
43. Ernster VL, Ballard-Barbash R, Barlow WE, et al. Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *Journal of the National Cancer Institute.* 2002; 94 (20): 1546–54.
44. Afonso N, Bouwman D. Lobular carcinoma in situ. *Eur. J. Cancer Prev.* 2008; 17 (4): 312–6.
45. Virnig BA, Tuttle TM, Shamliyan T, Kane RL. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *Journal of the National Cancer Institute.* 2010; 102 (3): 170–8.
46. Esteva FJ and Pusztai L. Optimizing Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer: The Molecular Rationale. *Oncology.* 2005; 19 :5-16.
47. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (9):631-43.
48. Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol.* 2012; 23 Suppl 6:vi19-22.
49. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56 (1):37-47.
50. The BIG 1-98 Collaborative Group. Letrozole Therapy Alone or in Sequence with Tamoxifen in Women with Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361:766.

51. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 1998; (7): 927–37.
52. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*. 2000;103 (6): 843–52.
53. Johnston SRD and Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3, 821-831
54. Shang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 360-368
55. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:4741–8.
56. Ring A and Dowsett M. Mechanisms of Tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11 643–658.
57. Zwart W, Griekspoor A, Berno V, Lakeman K, Jalink K, Mancini M, Neefjes J and Michalides R. PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERα to co-activator SRC-1. *The EMBO Journal*. 2007; 26, 3534–3544.
58. Filipowicz W, Bhattacharyya S, and Sonenberg N. Mechanisms of post transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*. 2008; 9 (2), 102-14.
59. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(3):228-34.
60. Iorio M, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*. 2005; 65 (16), 7065-70.
61. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. Let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007; 131(6):1109–1123.
62. Thomson J, Newman M, Parker J, Morin-Kensicki E, Wright T, and Hammond S. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & Development*. 2006; 20 (16), 2202-7.

63. Ciafr S, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 334 (4), 1351-8.
64. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri M, Troncone G et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13 (2), 497-508.
65. Lee E, Gusev Y, Jiang J, Nuovo G, Lerner M, Frankel W et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2007; 120 (5), 1046-54.
66. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008; 79 (4): 581–8.
67. Sun T, Yang M, Kantoff P, Lee GS. Role of microRNA-221/-222 in cancer development and progression. *Cell Cycle*. 2009; 8 (15): 2315–6.
68. Zhang X, Mao H, Chen JY, Wen S, Li D, Ye M, Lv Z. Increased expression of microRNA-221 inhibits *PAK1* in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 431 (3):404-8.
69. Ahmad S, Gupta S, Kumar R, Varshney GC, Raghava GP. Herceptin resistance data base for understanding mechanism of resistance in breast cancer patients. *Sci Rep*. 2014; 4 :4483.
70. Hu X1, Guo J, Zheng L, Li C, Zheng TM, Tanyi JL, Liang S, Benedetto C, Mitidieri M, Katsaros D, Zhao X, Zhang Y, Huang Q, Zhang L. The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2013; 11(3): 240-50.
71. Arias-Romero LE1, Chernoff J. p21- activated kinases in ErbB2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases*. 2010;1(2):124-128.
72. Ong CC1, Jubb AM, Haverty PM, Zhou W, Tran V, Truong T, Turley H, O'Brien T, Vucic D, Harris AL, Belvin M, Friedman LS, Blackwood EM, Koeppen H, Hoeflich KP. Targeting p21-activated kinase 1 (*PAK1*) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (17):7177-82.
73. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Over expression of the steroid receptor co activator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res*. 2001;61(3):903-7

## ÖZGEÇMİŞ

Ben (Tayeb Sadeq Tayeb TAYEB) Irak vatandaşı.tarihinde doğdum 06/11/1982 Ninova ilinde/Irak. bekar. ilk, orta ve ortaokul inceledik Nineveh'teki.Ben okudu Selahaddin Üniversitesi, Bilim Edebiyat Fakültesi, biyoloji Bölümü'nde Erbil'de ve 2008 yılında mezun oldu.Bundan sonra, öğretmen olarak çalıştım Milli Eğitim Bakanlığı.ben inceledik Yüksek Lisans Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. ek olarak Dil annem ben bu yabancı dil konuşabilir ek olarak Dil annem, yabancı bazı dillerde konuşuyorum örneğin (Arapça, İngilizce ve biraz Türk).