

TEMMUZ 2018

Yüksek Lisans – Biyoloji

BELAN OTHMAN KANABE

GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HASTALARINDA LNCRNA-GAS5 ve
HEDEF GENİ *APOBEC3C* ' NİN miR-103 YOLUYLA
İFADELENME MODELLERİ

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS

BELAN OTHMAN KANABE
TEMMUZ 2018

**Meme Kanseri Hastalarında LncRNA-GAS5 ve Hedef Geni
APOBEC3C ' nin miR-103 Yoluyla İfadeleme Modelleri**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman[lar]

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof.Dr. Mustafa AL-ATTAR

Belan Othman KANABE

Temmuz 2018



© 2018 [Belan Othman KANABE]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Meme Kanseri Hastalarında LncRNA-GAS5 ve Hedef Geni *APOBEC3C*'nin miR-103 Yoluyla İfadeleme Modelleri

Öğrencinin, Adı Soyadı: Belan Othman KANABE

Tez Savunma Tarihi: 16.07.2018

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

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

Prof.Dr. Mustafa AL-ATTAR
İkinci Tez Danışmanı

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

.....

Doç. Dr. I. Didem KARAGÖZ

.....

Dr. Öğr.Üyesi. Önder YUMRUTAŞ

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Belan Othman KANABE

ABSTRACT

EXPRESSION PATTERNS OF LNCRNA-GAS5 AND ITS TARGET *APOBEC3C* GENE THROUGH MIR-103 IN BREAST CANCER PATIENTS

KANABE, Belan Othman

M.Sc. in Biology/ Biology

First Supervisor: Prof Dr. Mehmet OZASLAN

Second Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AL-ATTAR

July 2018

66 Pages

Recently, correlation between lncRNA-*GAS5* and miR-103 was studied. In addition, we predicted interaction between miR-103 and *APOBEC3C*, computationally. On the basis of these results, the first time we planned to evaluate the possible involvement of *GAS5* in breast carcinogenesis and to reveal any correlation between *GAS5* and *APOBEC3C*, miR-103 molecules. APOBEC enzymes are important players in immunity and may contribute to carcinogenesis. *APOBEC3C* belong to cytidine deaminases that able to mutate DNA and RNA by converting cytidine to uridine. Lately, more attention have been focused on non-coding RNAs, which was shown to regulate many key biological processes. Mounting evidence indicated that the aberrant expression of some lncRNAs include; lncRNA-*GAS5* and miRNA 103, might play an important functional role in cancer biology. In this study, 40 paired tumor and normal samples that were grouped according to the types of breast cancer and clinical characteristics of patients, were observed with gene expression analysis and *APOBEC3C* gene sequencing. Expression level of *APOBEC3C* and lncRNA-*GAS5* were significantly down-regulated. However, miRNA expression level significantly up-regulated. The expression of *GAS5* was positively correlated with the expression of *APOBEC3C* and negatively correlated with the expression of miR-103. As a result of *APOBEC3C* gene screening no mutation was observed. In conclusion, we observed reduced expression levels of *APOBEC3C* and lncRNA-*GAS5*, and increased expression level of miRNA 103 in breast cancer patients. In order to understand the relationship between the breast tumors and biomarkers; further analysis is warranted.

Key Words: *APOBEC3C*, Breast cancer, lncRNA-*GAS5*, miR-103, RT-qPCR, Sequencing

ÖZET

MEME KANSERİ HASTALARINDA LncRNA-GAS5 VE HEDEF GENİ APOBEC3C ‘ NİN MIR-103 YOLUYLA İFADELENME MODELLERİ

KANABE, Belan Othman

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji/ Biyoloji

Tez Danışmanı: Prof Dr. Mehmet ÖZASLAN

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa AL-ATTAR

Temmuz 2018

66 Sayfa

Son zamanlarda, LncRNA-GAS5 ve miR-103 arasındaki ilişki çalışılmıştır. Buna ek olarak, miR-103 ve APOBEC3C arasındaki etkileşim sayısal olarak tahmin edilmiştir. Bu sonuçlara göre meme karsinogenesinde ilk kez GAS5’ in muhtemel gerekliliğini hesaplamak planlanmıştır ve GAS5, APOBEC3C ve miR-103 molekülleri arasındaki herhangi bir korelasyonun varlığının gösterilmesi planlanmıştır. APOBEC enzimleri immünyetede önemli bir role sahiptir ve karsinogeneze katkı sağlayabilir. APOBEC3C sitidini üridine çevirerek DNA ve RNA’ yı mutasyona uğratabilen sitidin deaminazlara aittir. Son zamanlarda bazı anahtar biyolojik süreçleri düzenlediği gösterilen kodlanmayan RNA’ lar üzerinde büyük ilgi toplanmıştır. Güçlü kanıtlar lncRNA-GAS5 gibi bazı lncRNA’ ların ve miR-103’ ün anormal ifadenmesi kanser biyolojisinde önemli işlevsel bir rol oynayabildiğini göstermiştir. Bu çalışmada hastaların klinik özellikleri ve meme kanserinin türüne göre gruplandırılan 40 tümör dokusu ve normal doku örneği gen ifadenme analizinde ve APOBEC3C gen dizilenmesinde incelenmiştir. APOBEC3C ve lncRNA-GAS5’ in ifadenme seviyeleri önemli derecede baskılanmıştır. Bununla birlikte, miR-103 ifadenme seviyesinin ise önemli derecede aşırı düzenlendiği gözlenmiştir. GAS5 ifadenmesi APOBEC3C ifadenmesi ile pozitif korelasyon gösterirken miR-103 ifadenmesi ile negatif korelasyon göstermiştir. APOBEC3C geni taramasının sonucu ise herhangi mutasyon gözlenmemiştir. Sonuç olarak meme kanseri hastalarında APOBEC3C ve LncRNA-GAS5 ifadenme seviyelerinde azalma ve miR-103 seviyesinde ise artış gözlenmiştir. Meme tümörleri ve biyobelirteçleri arasındaki ilişkiyi anlamak için daha fazla analiz yapıp doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: APOBEC3C, dizileme, meme kanseri, lncRNA-GAS5, miR-103,RT-qPCR

TEŞEKKÜR

Öncelikle şurada olduğum yer ve sahip olduğum herşey için Allah' a şükrederim. Çalışmam boyunca benden yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli insanlara candan teşekkürlerimi sunmak isterim.

Çalışmam boyunca bana sürekli rehber olan ve destek veren değerli danışmanım Sayın Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İkinci tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Mustafa Al-ATTAR' a yardımlarından ve fikir desteğinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca değerli öğretim üyeleri hocalarım, Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ, Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ ve Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ' a yüksek lisans derslerim sırasında gösterdikleri sabır ve yardımdan ötürü çok teşekkür ederim.

Hayallerime kavuşmamda beni her zaman destekleyen ve yardımcı olan kıymetli eşim Rozhgar KHAILANY' e sonsuz minnettarlığımı sunarım.

Ayrıca eğitim hayatımın her aşamasında ve hayallerimi takip etmemde bana yön veren sevgili babama, anneme kayınpeder ve kayın valideme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTARCT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
1.1 Kanser.....	3
1.2 Kanserin Karakteristik Özellikleri.....	4
1.3 Kanserin Genetik Sebepleri.....	5
1.3.1 Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler.....	5
1.3.2 Epigenetik Değişimler.....	6
1.4 Meme.....	7
1.4.1 Meme Dokusu.....	7
1.4.2 Meme Fizyolojisi.....	8
1.5 Meme Kanseri.....	9
1.5.1 Başlama.....	10
1.5.2 Tutunma.....	10
1.5.3 İlerleme.....	10
1.6 Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etyolojisi.....	11
1.7 Meme Kanseri Türleri.....	12
1.7.1 Duktal Karsinoma in situ.....	12
1.7.2 Lobüler Karsinoma in Situ.....	12
1.7.3 İnvaziv Duktal Karsinoma [IDC].....	13
1.7.4 İnvaziv Lobüler Karsinoma [ILC].....	13
1.7.5 İnflamatuvar Meme Kanseri.....	13
1.7.6 Meme Başı / Areola' nın Paget's Hastalığı.....	13
1.8 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması.....	14
1.9 Meme Knseri Evreleri.....	15
1.10 APOBEC Ailesi.....	18
1.10.1 <i>APOBEC3</i> Süper Ailesi.....	19
1.10.2 <i>APOBEC3C</i> Geni.....	21

1.10.2.1 <i>APOBEC3C</i> Yapı ve İşlevi.....	21
1.11 Kodlanmayan RNA'lar.....	21
1.11.1 Uzun Kodlanmayan RNA [LncRNA] <i>GAS5</i>	22
1.11.1.1 <i>GAS5</i> ' in Yapısal Karakterizasyonu ve Biyolojik İşlevleri.....	22
1.11.1.2 Meme Kanserinde <i>GAS5</i>	23
1.11.2 MikroRNA 103.....	24
BÖLÜM II KAYNAK ÖZETLERİ	26
BÖLÜM III MATERYAL ve METOD	28
3.1 Örneklerin Toplanması.....	28
3.2 Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	29
3.3 RNA İzolasyonu.....	31
3.4 Komplementer DNA Sentezi.....	34
3.5 Primer Tasarımı.....	34
3.6 PCR Optimizasyonu.....	35
3.7 GAPDH Amplifikasyonu.....	37
3.8 Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
3.9 Gerçek zamanlı PCR.....	38
3.9.1 RT-PCR Bileşenleri.....	38
3.10 Nükleotid Dizileme.....	39
3.10.1 PCR Dizileme Aşaması.....	39
3.10.2 Ön-Dizileme Hazırlık Aşaması.....	39
3.10.2.1 PCR Ürünlerinin EksoSAP ile Temizlenmesi.....	39
3.10.2.2 Döngü Dizileme Reaksiyonu.....	40
3.10.2.3 PCR Ürünlerinin Temizlenmesinde Sefadex Spin-kolon Protokol.....	41
BÖLÜM IV BULGULAR	42
4.1 İfadeleme Sonuçları.....	42
4.1.1 <i>APOBEC3C</i> Gen İfadeleme.....	42
4.1.2 LncRNA- <i>GAS5</i> İfadeleme.....	44
4.1.3 MiRNA 103 İfadeleme.....	46
4.2 <i>APOBEC3C</i> , LncRNA- <i>GAS5</i> ve MiRNA 103 İfadeleme Korelasyonu.....	47
4.3 Mutasyon Tarama Sonuçları.....	49
4.3.1 <i>APOBEC3C</i> Mutasyon Sonuçları.....	50
BÖLÜM V SONUÇ ve TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	56

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Meme kanseri TNM Evrelemesi.....	16
Tablo 1.2 TNM genel evrelemesi.....	17
Tablo 3.1 Örnek alınan hastaların klinik özellikleri.....	29
Tablo 3.2 Kullanılan cihazlar, markaları ve üretim yerleri.....	30
Tablo 3.3 Kullanılan kimyasal maddeler, markaları ve üretim yerleri.....	31
Tablo 3.4 Kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri.....	31
Tablo 3.1 Total RNA miktar ve kalitesi.....	32
Tablo 3.6 <i>APOBEC3C/Exp</i> , <i>APOBEC3C/Mut</i> ve <i>lncRNA-GAS5</i> genlerinin primer dizileri, PCR ürün büyüklüğü ve bağlanma sıcaklıkları....	35
Tablo 3.7 Gradyan PCR reaksiyon bileşenleri ve 25µL total hacimdeki miktarları.....	36
Tablo 3.8 Gradyan PCR reaksiyon koşulları.....	36
Tablo 3.9 Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu karışımı.....	38
Tablo 3.10 Gerçek zamanlı PCR koşulları	39
Tablo 3.11 PCR ürünlerinin EksoSAP ile temizlenme koşulları.....	40
Tablo 3.12 Her reaksiyon için döngü dizileme protokolü.....	40
Tablo 3.13 PCR dizileme reaksiyonu ısı döngü koşulları.....	40
Tablo 3.14 Temizlenmiş PCR ürünü sefadeks spin-kolon bileşeni.....	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Kanserin karakteristik özellikleri.....	5
Şekil 1.2 Dişilerde meme yapısı özellikleri.....	8
Şekil 1.3 Bir meme kanseri gelişimine yol açan üç ardışık olay.....	10
Şekil 1.4 Meme kanseri evreleri.....	17
Şekil 1.5 Bir ya da iki CDA domain içeren insan APOBEC ailesi üyeleri.....	19
Şekil 1.6 <i>APOBEC3</i> lokusunun düzenlenmesi.....	20
Şekil 1.7 <i>APOBEC3</i> süper ailesinin Z domaini oluşumunun gösterilmesi.....	21
Şekil 1.8 22. Kromozom üzerinde <i>APOBEC3C</i> geninin lokalizasyonu.....	22
Şekil 4.1 <i>APOBEC3C</i> geninin qRT-PCR analiz sonuçları.....	42
Şekil 4.2 Normal ve kanserli dokularda <i>APOBEC3C</i> geni ifadenmesinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.3 <i>APOBEC3C</i> geninin normal ve tümör dokuda mRNA ifadenme seviyesinin miktarı.....	43
Şekil 4.4 LncRNA- <i>GAS5</i> ' in qRT-PCR analiz sonuçları.....	44
Şekil 4.5 Normal ve kanserli dokularda LncRNA- <i>GAS5</i> geni ifadenmesinin karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.6 Normal ve tümör doku örneklerinde <i>GAS5</i> RNA ifadenme seviyesi miktarı.....	45
Şekil 4.7 miRNA 103' ün qRT-PCR analiz sonuçları.....	46
Şekil 4.8 Normal ve kanserli dokularda miR-103 geni ifadenmesinin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.9 Normal ve tümör dokularda MİRNA 103 ifadenme seviyesi miktarı.....	47
Şekil 4.10 Meme kanseri hastalarında LncRNA- <i>GAS5</i> ve <i>APOBEC3C</i> geni ifadenmelerinin korelasyon analizi.....	48
Şekil 4.11 LncRNA- <i>GAS5</i> miR-103 ifadenmesini bastırmasının biyoinformatik ve korelasyon analizi.....	49
Şekil 4.12 <i>APOBEC3C</i> geni mRNA dizisi.....	50
Şekil 4.13 <i>APOBEC3C</i> geni kısmi dizileme sonuçları.....	50

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

RNA-GAS5	Ribonükleik asit-özel büyüme durdurucu 5
miR-103	Mikro ribonükleik asit 103
APOBEC3C	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi Altünite
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi
lncRNAs	Uzun kodlanmayan Ribonükleik asitler
LncRNA-GAS5	Uzun kodlanmayan Ribonükleik asit-spesifik büyüme durdurucu 5
RT-qPCR	Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
APOBEC1	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi 1C
APOBEC3A-D	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi 3 A-D
APOBEC3F	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi 3F
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi 3G
APOBEC3H	Apolipoprotein B mRNA Düzenleyici Katalitik Enzimi 3H
EMT	Epitelden mezenkimale geçiş
TIMP-3	Metalloproteinaz inhibitörü 3
HOTAIR	HOX transkript rehber RNA
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
C to U	Sitozinin Urasile dönüşümü
CpG	Guaninden önceki sitozin
HPL	İnsan plasental laktojen
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni 1
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni 2
DCIS	Duktal karsinom in situ
LCIS	Lobüler karsinom in situ
ALH	Atipik lobüler hiperplazi
IDC	İnvaziv duktal karsinom
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptörü
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü-2
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
TNBC	Üçlü negative meme kanseri
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TGF β RI	Dönüştürücü büyüme faktörü - β tip I reseptörü
TGF β RII	Dönüştürücü büyüme faktörü - β tip II reseptörü
TNM	Tümör-nod-metastaz
ApoB	Apolipoprotein B
AID	Aktivasyon indükleyici deaminaz
SHM	Somatik hipermutasyon
CSR	Sınıf Değişim Rekombinasyonu
WES	Tüm Ekzon Dizileme

WGS	Tüm Genom Dizileme
TCW	Sitozin içinde geçiş
LUAD	Akciğer adenokarsinom
AAL	Akut lenfoblastik lösemi
CLL	Kronik lenfositik lösemi
ncRNA	Kodlanmayan ribonükleik asit
5'TOP	5'- uç oligoprimidin
mRNPs	Mesajcı ribonükleoprotein parçaları
snoRNAs	Küçük nükleolar ribonükleik asitler
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
UVL	Ultra viole ışını
EtBr	Etidyum bromid
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
h3k4me3	Histon H3 proteini 4. lizin trimetilasyonu



BÖLÜM I

GİRİŞ

Meme kanseri, kötü prognoza sahip kanser türlerinde ilk sıralamada yer alıp kadınları etkileyen ve dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen habis tümördür [1]. Meme kanserinde habis tümörler hastaların yaşam süresini kısaltmakta ve ölüm oranını artırmaktadır [1]. Habis tümörler tüm meme kanseri türlerinde görülmez ancak hastaların büyük çoğunluğu kötü huylu meme kanseri türünü geliştirme riskini taşımaktadır. Habis tümör meme kanserinin metastaz yeteneği ile ilişkilidir [1]. Mikroskop altında görülen kanser hücrelerine bağlı olarak meme kanseri farklı türlere ayrılabilir [2]. Birçok meme kanseri hücrelerde [epitel hücreleri] başlayan bir kanser türü olan karsinomadır ve ikinci tür ise bez dokuda başlayan karsinoma olan adenokarsinomdur [2]. Aile öyküsünde meme tümörü olan kadınlar, memede bir hasar oluşumu açısından, ailesinde meme kanseri öyküsü bulunmayan kadınlara göre iki kat fazla tehlike altındadır [3].

Metastatik hücrelerin moleküler seviyede ve/veya radyolojik taramayla muhtemel erken teşhisi hastaların hayatta kalmasını artıracak ve belirlenen ilaçların toksisitesini azaltarak hastanın yaşam kalitesini artıracaktır [1,2]. Moleküler seviyede tanı hastalık gelişimi ile ilişkili temel mekanizmaları hedefleyecektir ve bu hedefleri kontrol altına alma ya da yok etme pratisyenlerin ve araştırmacı bilim adamlarının öncelikli hedefleri arasındadır [1,2]. Kanser gelişiminin dikkat çekici kısmı, belli bir zaman içerisinde somatik mutasyonlardan kaynaklı farklılaşmış hücreden köken alan bir klon olmasıdır ki bu hücrelerin bazıları hücre bölünmesi, proliferasyonu ve metastaza başlaması için immün koruma mekanizmasından kaçarak farklılaşma potansiyeli olmayan yalancı embriyonik totipotent hücreler gibi davranmaktadır [1]. Ancak bu her zaman doğru bir durum değildir çünkü çoğalan kütle dağılımı ile birlikte farklılaşmış doku fragmentleri bulunabilmektedir [1].

kullanılarak bir fare timoma hücre hattında apoptoz baskılama yeteneği ile tanımlanmıştır. GAS5' in meme kanseri, hepatosellüler karsinoma, mide kanseri, mesane kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [NSCLC] gibi birçok kanser türünde dahil olduğu ve anormal ifadelendiği yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [4]. Bununla birlikte GAS5 ifadelenmesi ve işleyiş mekanizması henüz meme kanserinde büyük ölçüde anlaşılamamıştır.

Günümüzde, birçok kilit biyolojik süreci düzenlediği görülen uzun kodlanmayan RNAlar [lncRNAlar] üzerinde yoğun bir ilgi söz konusudur [4]. Bazı lncRNA' ların anormal ifadelenmesinin kanser biyolojisinde önemli bir işlevsel role sahip olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur [4]. LncRNA' lar tümörleşme sürecinde proto-onkogenler [HOTAIR gibi] ya da tümör baskılayıcı genler [GAS5 [büyüme durması-spesifik transcript] gibi] olarak rol alabilir [4]. GAS5 fonksiyonel tarama Bunun dışında birçok miRNA' nın hedef genin ifadelenmesini azaltarak ya da baskılayarak tümörleşme sürecini teşvik ettiği gösterilmiştir [5]. Bunların arasında miR103' ün hedef genlerin ifadelenme düzeyini azaltarak meme kanserini teşvik ettiği bulunmuştur [5]. miR-103 için Wang ve ark. [2012], meme kanseri için aday bir tanımlayıcı marker olarak işe yarayabileceğini ve hastaların klinikopatolojik özelliklerinin yararlı bilgiler sağladığını bildirmişlerdir [5]. Chen ve ark. [2015], miR-103 ifadelenmesi üzerinde lncRNA-GAS5' in yarışmalı inhibisyonunu gösteren biyoinformatik analiz tahminlerde bulunmuşlardır [4].

APOBEC3 geni sitidin deaminaz gen ailesi üyelerinden biridir. 22 [6]. kromozom üzerinde gen duplikasyonu sonucu olduğu düşünülen bir küme içinde bulunan birkaç ilişkili gen ya da psödogenlerden biridir. Bu gen kümesinin üyeleri yapısal ve işlevsel olarak C-U RNA-düzenleyici sitidin deaminaz *APOBEC1* ile ilişkili proteinler kodlamaktadır [6]. Bu proteinlerin RNA düzenleyici enzimler olabileceği ve büyüme ya da hücre döngüsü kontrolünde rol aldığı düşünülmektedir [6]. *APOBEC* gen ailesinin ilk olarak virus restriksiyonunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Günümüzde ise *APOBEC* gen ailesindeki mutasyon ve ifadelenme değişimi güçlü bir şekilde meme kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur [7]. Bununla birlikte, *APOBEC* gen ailesinin nasıl düzenlendiği hala tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada miR-103 ifadenme seviyesini hesaplayarak lncRNA-*GAS5* ve onun hedef geni *APOBEC3C*' nin meme kanseri hastalarında ifadenme seviyesini belirlemeyi amaçladık. Son zamanlarda lncRNA-*GAS5* ve miR-103 arasındaki etkileşim oldukça yoğun çalışılmaktadır. Üstelik bu çalışmada miR-103 ve *APOBEC3C* arasındaki etkileşim sayısal tahmin olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada meme karsinogenezinde ilk defa *GAS5*' in muhtemel gerekliliğinin ve *GAS5*, *APOBEC3C* ve miR-103 molekülleri arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığının gösterilmesi planlanmıştır.

1.1 Kanser

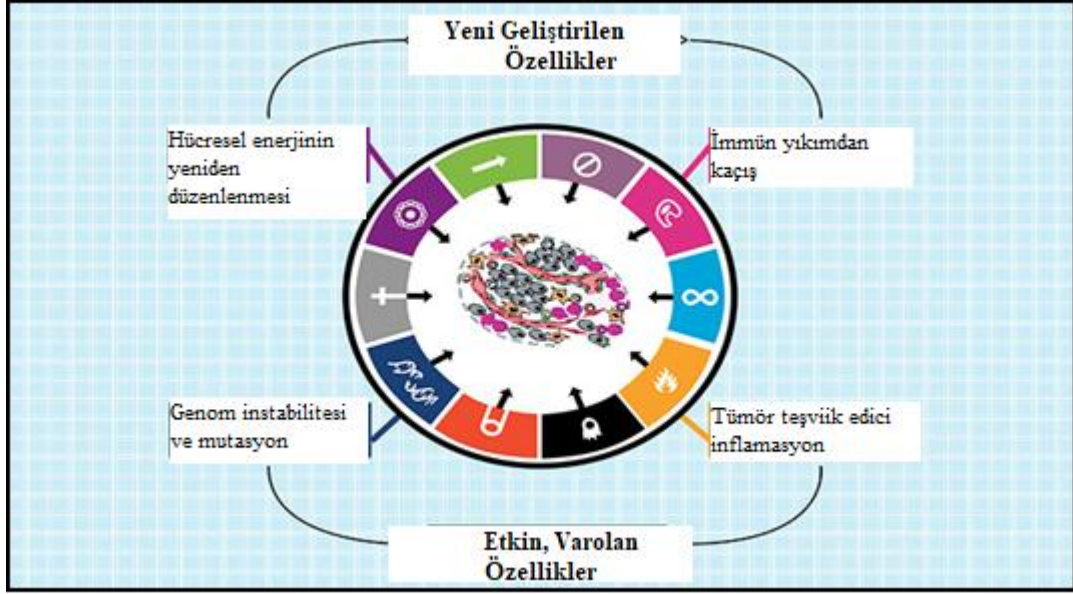
Kanser tüm dünyada büyük bir sağlık sorunu olan yaygın bir hastalıktır [8]. Kanseri primer bir lezyonda metastatic hücrelere dönüşebilen hücrelerin kontrol edilemeyen çoğalmasdır [8]. Metastatic hücreler çevre dokulara girebilme, sistematik olarak yayılma ve ikincil lezyonlara tohum atma yeteneğindedir [8]. Bu hastalığın hücreli kökenini belirli proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde biriken somatik mutasyonlardan aldığı düşünülmektedir [8]. Bu mutasyonlar çevresel sebeplerle [olguların %90-95' i] olabileceği gibi kalıtsal kökenli de olabilmektedir [9]. Yaygın çevresel faktörler kansere yol açabilmektedir: sigara, beslenme ve obezite, enfeksiyonlar, radyasyon, fiziksel aktivite eksikliği ve çevre kirliliği gibi [9]. Bu çevresel faktörler hücrenin genetik materyalindeki anomalilere sebep olur ya da bu anomalileri artırmaktadır [9]. Bu düzenleyici genlerdeki kalıtsal ve kazanılmış anomaliler kontrol edilemeyen hücre büyümesine ve sonuçta kanser gelişimine yol açabilmektedir [10]. Kanseri birbiri ile ilişkili büyük bir hastalık grubunu tanımlayan genel bir terimdir [10]. Diğer bazı hücrelerin hastalar için zararlı hale gelebilmesi için büyümeleri yıllar alırken kanser çok hızlı büyümektedir [10]. Kanseri tek bir mutasyon dikkate alınarak kolayca anlaşılabilir değildir [10]. Bir mutasyonun etkisi sıklıkla aynı hücredeki diğer mutasyonların içeriğine bağlı olmaktadır [10]. Kanseri bu yüzden az sayıda kaynak için yarışan hücrenin fenotipik ve genetik olarak heterojen popülasyonundan oluşan tümörlerin karmaşık evrimsel bir düzenidir [11].

Kanseri vücudun herhangi bir dokusunda gelişebilir ve kanserin başladığı organ ya da hücre türüne göre isimlendirilmektedir [12]. Kanseri türleri oldukça geniş kategorilerde gruplanabilmektedir [12]. Kanseri ana kategorileri şu şekildedir:

birincisi böbrek, akciğer ve meme gibi deri ya da epitel hücrelerden [iç ya da dış organlar] ve dokulardan kaynaklanan kanser türü olan karsinomadır [12]. Sarkoma kemik, kırıkdağ, yağ, kas, kan damarları ya da diğere bağ ve destek dokularda hücrenin transformasyonu ile başlayan kanserdir [12]. Lenfoma ve myeloma ise immün sistem hücrelerinde başlayan kanser türleridir [12]. Lösemi kemik iliğindeki kan şekillendiren öncü hücrelerde başlayan kanser türüdür [12]. Merkezi sinir sistemi kanserleri ise beyin ve omurilik dokularında başlayan kanser türleridir [12].

1.2 Kanserin Karakteristik Özellikleri

On yıl önce Hanahan ve Weinberg onlarca yıl süren yoğun kanser araştırmalarının bir özeti olarak kanserin altı karakteristik özelliğinin altını çizmişlerdir [13]. Kanseri hücre ile sağlıklı hücre arasındaki fenotipik farklılıkları tanımlamışlardır [11]. Kanseri bu karakteristik özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında altı biyolojik yeteneğinin kazanıldığını göstermektedir [14]. Bu özellikler neoplastik hastalıkların karmaşıklığını rasyonelleştirmek için düzenlenen ilkeleri kapsamaktadır [14]. Kanseri bu karakteristik özellikleri, hücre ölümüne direnç, çoğalma sinyalinin sürekliliği, büyüme baskılayıcılarından kaçış, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenez indüklemeye ve invazyon ve metastazı etkinleştirmedir [14,15]. Bu özelliklerin altında yatan sebepler ise kazanımlarını ve inflamasyonlarını hızlandıran genetik farklılıkları oluşturan ve çeşitli karakteristik fonksiyonları teşvik eden genom instabilitesidir [14]. Son zamanlarda kavramsal süreçte enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yapıdan kaçış olmak üzere iki yeni geliştirilen karakteristik özellik eklenmiştir [14]. Kanseri hücrelerine ek olarak tümörler karmaşıklığın başka bir boyutunu göstermektedir: tümör mikroçevresi oluşturarak karakteristik özelliklerin kazanımına katkıda bulunan görünüşte normal hücrelerin işe karışmış bir grubudur [14]. Bu kavramların geniş ölçüde yaygın uygulanabilirliğinin tanımlanması [Şekil 1.1] insan kanserleri tedavisinde yeni gelişimleri artan şekilde etkileyecektir [14].



Şekil 1.1 Kanser karakteristk özellikleri: bu şekil dört karakteristk özelliği göstermektedir [14].

1.3 Kanser Genetik Sebepleri

1.3.1 Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

Kanser genellikle iki farklı gruba ayırabileceğimiz genlerde bulunan mutasyonlardan kaynaklanır: kanser-teşvik edici onkogenler ve kanser-koruyucu tümör baskılayıcı genler [16]. Bazı mutasyonlar gen işlevinin kaybına [inaktivasyonuna] ya da kazanımına [aktivasyonuna] sebep olur [17]. Onkogen ve tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün içine ve dışına geçişleri düzenleyen proteinleri kodlayan terminal farklılaşmaya geçişte bir role sahip önemli düzenleyici genlerdir [17]. Tümör baskılayıcı gen ve onkogenlerdeki hasar kansere yol açan kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile sonuçlanır [17]. Tümör baskılayıcı işlev tamamıyla kaybolmadan önce her iki allel kopyası da inaktif olmalıdır, çünkü tümör baskılayıcı genler çekinik durumdadır [17]. Tümör baskılayıcı genlerdeki işlev kaybı mutasyonları genel olarak hücre döngüsü ve DNA replikasyonu bozukluğu, programlanmış hücre ölümü inhibisyonu [apoptoz] ya da immün sistemin koruyucu hücreleri ile tümör hücrelerinin etkileşiminin hasarı ile sonuçlanır [16]. Sıklıkla sinyal transdüksiyonu ve mitojenik sinyallerin düzenlenmesinde rol alan onkogenlerde işlev kazanım mutasyonları, hücrelerin aşırı büyüme ve çoğalması ile sonuçlanır ve proto-

onkogenin sadece bir allelindeki mutasyon, aşağı yöndeki olayları etkileyen mutant gen ürünü için yeterlidir [16,17]. Onkogenler genel olarak baskın durumdadır [17]. Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki mutasyonların yanı sıra tümörleşme hücredeki genetik değişikliklerin spontan oranını artıran olaylarla da desteklenebilmektedir [16]. Örneğin hücrel DNA hasarı tamir sistemindeki kalıtsal ya da spontan hasar ek mutasyonların birikimine ve hücrenin genetik ya da genomik instabilitesine yol açar [16].

1.3.2 Epigenetik Değişimler

Son 10-15 yıl boyunca elde edilen veriler sadece genetiksel değişimlerin değil aynı zamanda epigenetik değişimlerinde tümör gelişimi ve ilerleyişinde önemli role sahip olduğunu desteklemektedir [18]. Epigenetik düzenleme genel olarak DNA [replikasyon sonrası metilasyon], protein [histon modifikasyonları ve polycomb grup protein kompleksleri] ve RNA [RNA interferans] düzeyinde meydana gelmektedir [16,19]. Kanser hücrelerinde DNA metilasyonunun anormal modelleri 20 yıldan fazla bir süredir tanımlanmıştır ve global hipermetilasyon ve bölge-spesifik hipermetilasyon tümör hücrelerinde sıklıkla görülmektedir [19]. Hipermetilasyon, bir genin promotor bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelerek transkripsiyonu baskılamaktadır [16]. DNA hipometilasyonunun kanserdeki biyolojik önemi ise daha az anlaşılmıştır [16]. Günümüz modelleri promotor hipermetilasyonunun ve tümör baskılayıcı ya da DNA tamir genlerinin transkripsiyonel sessizleştirilmesinin ve bu genlerdeki mutasyonların karşılaştırılabilir bir sıklıkta meydana geldiğini önermektedir [16]. DNA metilasyonunun yanı sıra histon asetilasyonundaki değişim de gen ifadenmesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Histon deasetilasyonu aracılı inaktif kromatin tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında kritik bir bileşen olarak gösterilmiştir [20]. Farklı histon deasetilaz inhibitörleri günümüzde kanser tedavisi için klinik uygulamalarda kullanılmaktadır [20].

Son zamanlarda kodlanmayan RNA' ların birçok patolojik ve fizyolojik durumlarda önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir [21]. Özellikle farklı kanser türlerindeki miRNA bozulmaları geniş çaplı araştırılmaktadır [21,22]. Örneğin; miRNA' ların ifadenme seviyesindeki bozulmalar akciğer, meme ve prostat gibi

yaygın kanserlerde rol oynamasının yanı sıra waldenström makroglobulinemisi ve kolanjiyokarsinom gibi yaygın olmayan kanser türlerinde de rol oynamaktadır [21].

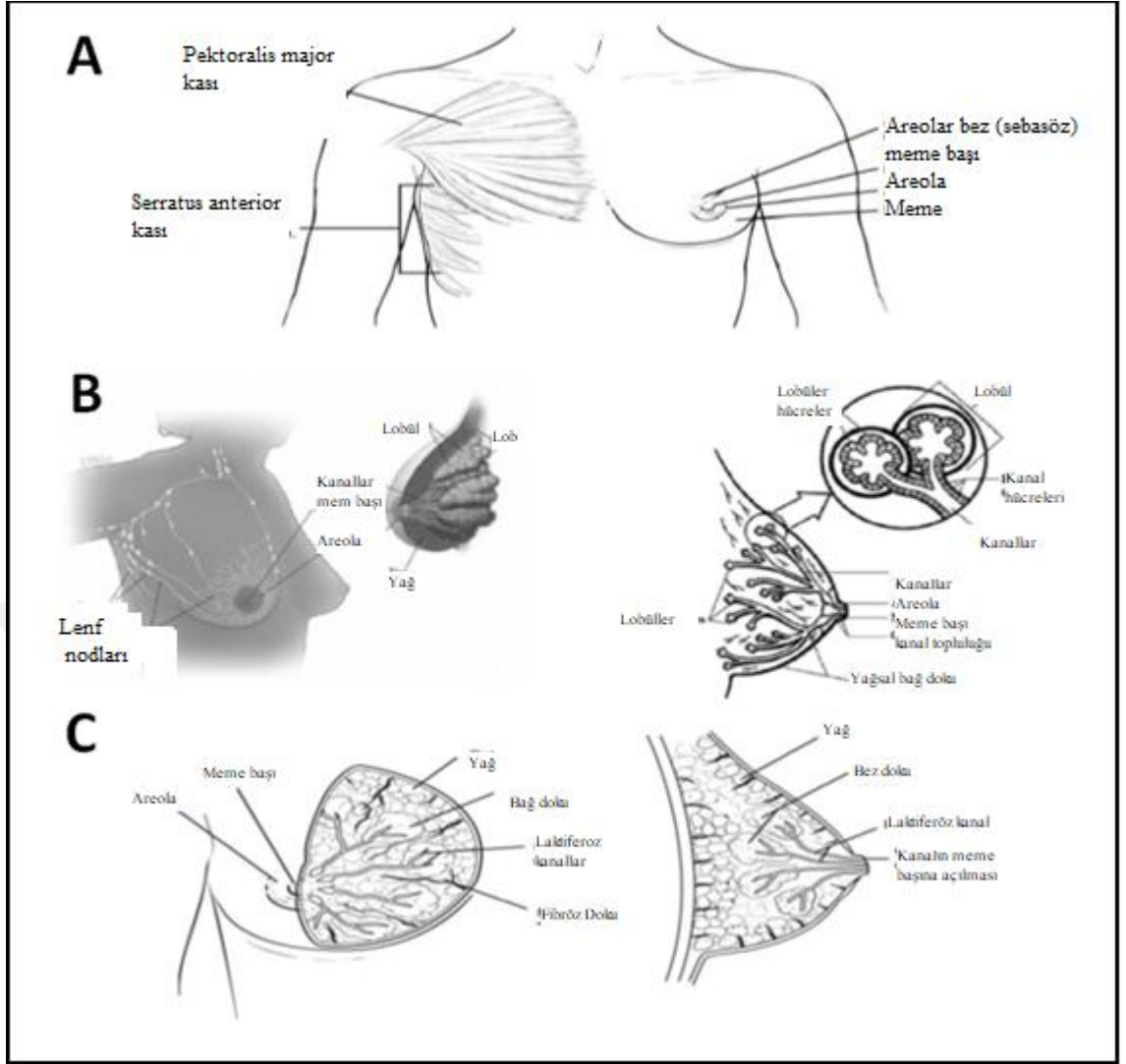
1.4 Meme

Meme göğüs kaslarının [pektoral] üzerini örten bir dokudur [23]. Kadınların memeleri yağ dokunun yanı sıra süt üreten [bez doku] özelleşmiş bir yapıdadır [23]. Yağ miktarı memenin ölçüsünü belirlemektedir [23]. Üç ana yapıdan oluşur: deri, derialtı doku ve parankim ve stromadan oluşan meme dokusu [23].

1.4.1 Meme Dokusu

Meme bezleri hamileliğin devamında süt salgılayan memelerde yerleşmiş özelleşmiş dokulardır [24]. Memeler anterior göğüs duvarı üzerinde iki ve altıncı kaburga kemiği arasında yer almaktadır [24]. Yüzeyseldir ve göğüs kasları üzerinde yer almaktadır [Şekil 1.2.A] [24]. Her memenin merkezinde bir meme başı vardır ve areola adı verilen koyu bir yuvarlakla etrafı çevrilmiştir [Şekil 1.2.B] [24]. Areola üzerindeki yağ salgılayan bezler [sebasöz] küçük kitleler halinde görülmektedir [Şekil 1.2.B] [24].

Göğüs duvarı kaslarının üzerinde tutunan memeler bez doku, fibröz doku ve yağ dokudan meydana gelmektedir [Şekil 1.2.C] [24]. Her memedeki bez doku lob adı verilen 15-20 kısımdan oluşur ki bu lobların herbiri de lobül adı verilen daha küçük kısımlardan oluşmaktadır [Şekil 1.2.B] [24]. Lobüller ise süt üreten düzinelere minik bulbuslardan oluşmaktadır [25]. Lob, lobül ve bulbuslar dukt adı verilen ince kanallarla birbirine bağlanır [Şekil 1.2.B] [25]. Fibröz doku ve yağ bez dokuyu destekler ve sınırları, kan damarlarını ve lenf nodlarını içerir [Şekil 1.2.B ve C] [25]. Lenf damarları lenf adı verilen renksiz sıvıyı taşımaktadır [25]. Lenf damarları lenf nodları adı verilen organlara açılır [25]. Lenf nodları ise vücut boyunca bulunan küçük fasulye büyüklüğünde yapıdadır [25]. Lenflerdeki molekülleri filtreler ve enfeksiyon ve hastalıklarla savaşmaya yardım eder [25]. Lenf nodu kümeleri koltukaltı aksillar bölgede meme yanında, köprücük kemiği üzerinde ve göğüs kemiği içerisindedir [Şekil 1.2.B] [25].



Şekil 1.2 A. Dişilerde meme yapısı; B.Meme içindeki loblar ve kanallar, meme yanındaki lenf nodları; C. Dişi meme dokusu [24,25,26].

1.4.2 Meme Fizyolojisi

Ergenlikten önce, erkek ve kadın memesi arasında işlevsel ya da yapısal farklılaşmış bir ayrım söz konusu değildir [27]. Ergenlik döneminde erkek ve kadınlarda meme yüzeyel düzenlenmiş çeşitli ilksel kanallardan oluşur [27]. Her primer kanalın kapalı ucunda daha az gelişmiştir ancak ilk olarak salgısal asinik bileşimidir [27,28]. Olgunlaşma gerçekleştiğinde dişi memesi morfoloji ve işlevinde göze çarpan bir değişim meydana gelir [27]. Bu değişimler çeşitli hormonal etkilere memenin farklı

cevaplarının bir sonucudur [27]. Dişî memesinin öncelikli fonksiyonu laktasyondur yani bir bebeğin beslenmesi için sütün sentezi, depolanması ve salgılanmasından sorumludur [27]. Erginlikte dişî memesinin ilk gelişimi öncelikle kanal sisteminin çoğalmasını ve dallamasını uyaran ve meme başlarının olgunlaşmasını ve öne çıkmasını uyaran östrojenle düzenlenir [27,28]. Meme bezi östrojen ve progesteron ile düzenlenir ve süt üretimi ve laktasyon sürecinin başarılı olması için tiroksin, glukokortikoidler ve insulin hormonunun seçili etkilerinin yanı sıra laktojenik hormon ile sağlanır [27]. Dişiler iki tür laktojenik hormon üretir: birincisi ön hipofiz bezinden salgılanan prolaktin ve ikincisi ise maternal plasenta tarafından serbest bırakılan gestasyonun son haftalarında salgılanan ve memeyi laktasyona hazırlayan insan plasental laktojendir [hpL] [27,28]. Bu periyodda, süt salgılamanın önemi yoktur ve laktasyon maternal kandaki yüksek seviyede östrojen ve progesterondan dolayı inhibe edilir [27,28]. Çocuğun doğumundan hemen sonra hpL maternal sirkülasyondan çıkar; progesteron ve östrojen seviyesi maternal kanda azalır ve tek laktojenik hormon olarak prolaktin görev yapar [28]. Bunun yanı sıra nöro hipofizden serbest kalan oksitosin hormonu laktasyonda önemli bir role sahiptir [28]. Emzirme olayı, prolaktin salgılanmasına aracılık eden oksitosin salınımını uyarır [27]. Sağlıklı, iyi emzirme yapan bir kadın günde 1 litre süt üretir [27,28]. Doğumdan sonra vücut doğrudan laktojenik hormonlarla uyarılır [27,28]. Daha sonra meme boyunca lobüllerde süt oluşur [27,28]. Menapozal evre vücudun östrojen ve progesterone üretiminin azalışı ile ilgili doğal bir süreçtir [27,28]. Bu hormonal uyarı eksikliği memedeki bez doku miktarının kademeli olarak azalıp yağ dokunun artmasına sebep olur [27]. Doku yoğunluğundaki muhtemel azalma özellikle mamografi ile tümör tespiti gibi teşhisler için meme dokunun daha uygun olduğunu ifade eder [27,28].

1.5 Meme Kanseri

Meme kanseri, meme başına süt taşıyan ya da süt yapan bezlere [lobüller] taşıyan ağaç benzeri tüpleri [duktlar] oluşturan epitelyal hücrelerden başlayan bir süreçtir [26]. Meme kanseri tümörünün gelişimi için meydana gelen çeşitli genetik değişiklikler vardır [26]. Bazı epidemiyolojik kanıtlara göre; tümör gelişiminin

başlaması ve gelişimi arasında onlarca yıl geçmelidir [26]. Meme kanseri gelişiminin üç ayrı aşaması vardır: başlama, tutunma ve ilerleme [Şekil 1.3] [26].

1.5.1 Başlama

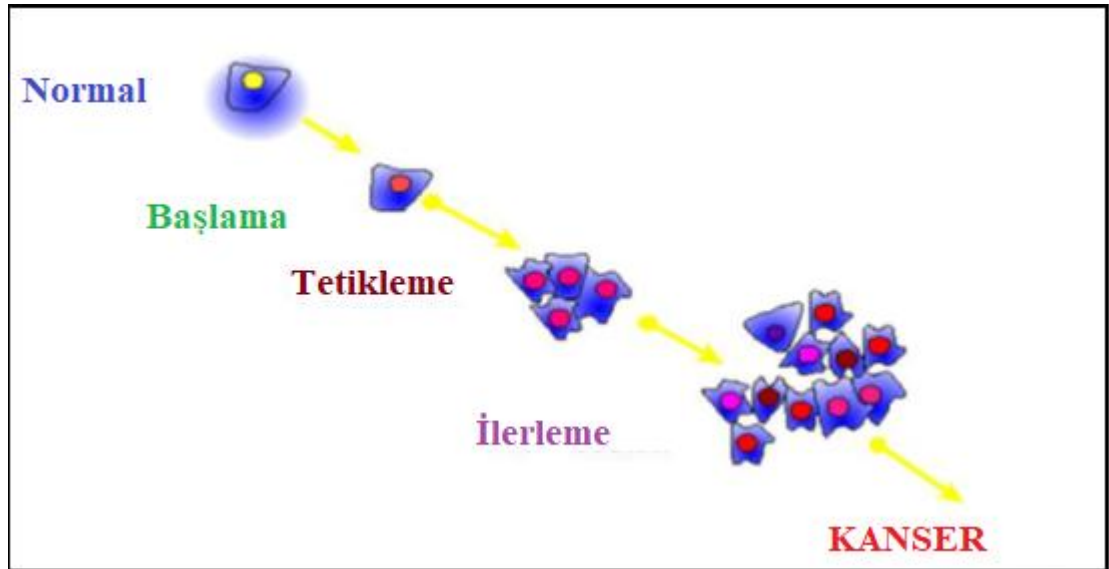
DNA' nın genetik dizisindeki tek bir değişiklik, bir hücreye meme kanseri oluşumu için potansiyel oluşturmaktadır [26]. Hücre tek bir değişiklikle kalırsa ve immün cevap ile baskılanırsa başlangıç aşaması yeni aşamaya geçmek için yeterli değildir [26].

1.5.2 Tutunma

Mutant hücre popülasyonunun genişlemesiyle sonuçlanan çok sayıda değişmiş hücre üretilen bir çoklu olay sürecidir, bununla birlikte bu hala bir kanser değildir çünkü hücreler hala tek tip moleküler değişikliğe sahiptir [Şekil 1.3] [26].

1.5.3 İlerleme

İnvazyon gibi malignant davranışların uyarıldığı mutant hücrelerin bir popülasyonunda çeşitli genetik değişikliklerin meydana geldiği bir süreçtir [Şekil 1.3] [26].



Şekil 1.3 Bir meme kanseri gelişimine yol açan üç ardışık olay [26].

1.6 Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve kadınlarda hala en yaygın ölüm sebebidir. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 1.300.000' den fazla yeni olgu tanımlanmış ve yaklaşık 521,000 kadın ölümünde ikinci kanser ilişkili ölümcül hastalık olarak belirtilmiştir [29,30]. Dünya genelinde kadınlar arasında tüm kanserlerin yaklaşık %21'ine tekabül etmektedir [31,32]. Meme kanseri vaka oranı Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa' da yüksektir [31]. Amerika ve İngiltere' de yaklaşık her dokuz kadından biri yaşamları boyunca meme kanseri riski taşırken bu oran erkeklerde sadece %1' dir [33]. Meme kanseri vaka oranı Güney Amerika ve Güney Avrupa' da orta derecede iken Afrika ve Asya' da düşüktür [31]. Ayrıca Sağlık Bakanlığı' nın 2012 yılına dair Türkiye' deki kanser istatistikleri raporlarına göre meme kanseri tespit edilen kanser türleri arasında ilk onda yer almaktadır [33].

Meme kanseri bir kadında herhangi bir yaşta teşhis edilebilir ancak meme kanseri gelişimi riski yaşla birlikte artar ve meme kanserinin yaklaşık %80' i 50 yaş üstü kadınlarda gözlenmektedir [31]. Birçok faktör kadınlarda meme kanseri riskini geliştirmektedir. Bu faktörler; genetik, aile öyküsü, yaş, hormonal ya da üreme faktörleri, alkol, obezite, yaşam koşulları ya da fiziksel inaktivite şeklinde sıralanabilir [32].

Gelişmiş ülkelerde erken yaş menarşisi, ilk doğumunu ileri yaşlarda olması, meme ile besleme eksikliği ve geç menopoz meme kanseri gelişiminin artan riskleri ile bağlantılı bulunmuştur [32]. Meme kanserinin risk faktörleri arasında olan genetik sebepler, genetik mutasyonları işaret ederek meme kanserli tüm kadınların yaklaşık %5-10' unu etkilemektedir [32]. Meme ve yumurtalık kanseri ile genetik olarak en çok ilişkili olan iki ana gen *BRCA1* ve *BRCA2*' dir [32].

Beslenme, yağ tüketimi, obezite, alkol alımı ve fiziksel aktivite seviyesi gibi yaşam stili sorunları meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur [31,32]. Beslenmenin meme kanseri riskini artırdığı düşünülmesine rağmen meme kanseri ile direct ilişkisinin olduğunu gösteren kanıtlar kesin değildir [31,32]. Bazı çevresel faktörler, 5 yılın üzerinde hormon tedavisi alan kadınlar için meme kanseri riskinin artmasına yol açan hormon yerine koyma tedavisi kullanımı ve dolaşımdaki östrojenlere maruz kalınması gibi üreme faktörleri ile büyük ölçüde ilişkilidir [31]. Kimyasal

karsinojenlere maruz kalma, radyasyon ve sigara içme gibi diğer çevresel faktörler meme kanserlerinin %70' inde tanımlanan değişken risk faktörleridir [31,32].

1.7 Meme Kanseri Türleri

Meme kanseri geleneksel mikroskopik morfolojik çalışmalara bağlı olarak farklı türlere bölünebilmektedir [34]. Çoğu meme kanseri epitelyal hücrelerden köken alan karsinomadır [34]. Meme kanserleri sıklıkla bezsel epitel dokudan köken alan karsinoma grubu olan adenokarsinomdur [34]. Meme kanserinin çok fazla çeşidi vardır hatta bunların bir kısmı çok yaygındır [34]. Meme tümörünün bir hücresi bu türlerin bir bileşimi olabilir ya da in situ kansere ve çoğu vakada olduğu gibi invaziv yapıya dönüşebilir [34].

1.7.1 Duktal Karsinoma in situ

Meme duktalarındaki hücrelerden kaynaklanan bir meme kanseri türüdür [35]. Duktal karsinoma in situ [DCIS] intraduktal karsinoma olarak da adlandırılmasının yanı sıra öncü-invaziv ya da invaziv olmayan meme karsinomu olduğu düşünülmektedir [36]. Yaklaşık beş yeni meme kanserinden biri duktal karsinomadır [35].

1.7.2 Lobüler Karsinoma in Situ

Lobüler karsinoma in situ [LCIS] genellikle kanser olarak görülmemektedir ve memenin lob ve bezlerinden gelişmektedir [37]. Lobüler karsinomanın morfolojik özellikleri ductal karsinomadan farklıdır [38]. Meme kanserlerinin yaklaşık %8' i lobüler kanserdir [37]. LCIS loblarda sınırlıdır ve vücudun diğer kısımlarına yayılmamaktadır [31]. Atipik lobüler hiperplazi [ALH] gibi lobüller içinde kalan progresif hücreleri işaret etmektedir [31]. LCIS' de, lobüllerde ALH' den daha fazla sayıda anormal hücre bulunmaktadır [31]. Ayrıca LCIS invaziv karsinomanın komşu lokusu olarak tekrar eden şekilde benzer genetik değişikliklere [E-kaderin geni lokusuna denk gelen kromozom 16q üzerindeki heterozigotluk kaybı gibi] sahiptir [31].

1.7.3 İnvaziv Duktal Karsinoma [IDC]

İnvaziv duktal karsinoma [IDC] duktal infiltratif karsinomadır [31]. Memede süt kanallarından gelişir ve kanalların dışındaki adipoz dokuyu istila eder [31]. Ek olarak, IDC lenf nodlarına metastaz yapma yeteneğine sahiptir ve herhangi bir organı istila etme ihtimali vardır [31]. IDC tüm meme kanseri teşhisleri içinde yaklaşık %85-90 oranla en yaygın meme kanseri türüdür [34].

1.7.4 İnvaziv Lobüler Karsinoma [ILC]

İnvaziv lobüler karsinoma küçük, küresel ve düşük yoğunlukta sitoplazma ile hedeflenmiş yapı içinde benign meme dokusu ile sınırlanmış ve tek sıra halinde infiltre olmuş stromaya sahip düz hücreler gibi görünen hücrelerden oluştuğu tanımlanmıştır [34,39]. İnvaziv lobüler karsinoma meme bezlerinin lobül kısmından [süt üretici bez] köken alır [39]. Ek olarak IDC gibi vücudun diğer organlarını istila edebilmektedir [39]. ILC tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık onda birinde görülmektedir [39].

1.7.5 İnflamatuvar Meme Kanseri

İnflamatuvar meme kanseri meme kanserinin daha az yaygın olan türlerindedir ancak en agresif türlerinden birisidir [40]. Morfolojik olarak küme ya da yaprak şeklindedir ancak bir tümör kütleleri gibi görünmez [40]. İnflamatuvar meme kanseri meme dokusunun düz ve yumuşak kısmında başlar ve özellikle meme derisi altı ya da meme derisinde var olabilen memenin herhangi bir dokusunu istila edebilmektedir [40].

1.7.6 Meme Başı / Areola' nın Paget's Hastalığı

Sıklıkla pürüzlü ya da kızarıklık deri gibi görünür [40]. Egzamatik alerjiye benzerdir ve kaşıntılı olabilir [40]. Paget's hastalığı deri yüzeyinin altında başlar ve deriye doğru gelişir [40]. Paget's meme başı, areola ve memenin süt kanallarına doğru yayılır [40]. BR' nin daha az yaygın olan diğer türleri ise üçlü-negatif meme kanseri, filloides tümör ve anjiyosarkomadır [40].

1.8 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması

Yapılan birçok çalışma sonucu meme kanserinin heterojen bir hastalık olduğunu ve gün geçtikçe artan öneminin varlığı ile farklı alttürlerinin olduğunu göstermektedir [41]. Meme kanserinin alttürlerinin tanımlanmasında ve daha sonra tümör evresini ölçerek tümör agresifliğini hesaplanmasında histopatoloji önemli bir tanılayıcıdır [41]. Histolojik özellikler bazen kanser gibidir bazen farkedilebilir prognostur ve bazen bir tür kanser tedavisinden başka bir şeye etkili bir cevaptır [41]. Bu sebeple onko-klinik karakterlerdeki bu çeşitlilik mikroskobik olarak benzer kanser kütleleri arasında farklı moleküler özelliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkar [41].

Meme kanserinin moleküler teşhisi IDC gibi ana alttürlerin daha da alt sınıflarının teşhisine izin verir [41]. Başlangıçta ilk biyobelirteç olan östrojen reseptör alfa [ER] keşfedildi ve 43 yıldan fazladır çalışılmaktadır [41]. Genellikle ER pozitif meme tümörleri daha iyi prognoza sahiptir ve ER-pozitif kanserli hastalar antihormon tedavisi için aday gösterilmişlerdir [41]. ER reseptörleri için pozitif olan tümörler, ER aktivitesinin eksikliğini ve tedaviye kötü yanıtı gösteren, progesteron reseptör [PR] kaybı ile östrojen-indüklenebilir gen seviyesi tarafından daha da alt türlere ayrılabilir [41]. İmmünohistokimyasal olarak meme kanseri iki sınıfa ayrılabilir: östrojen reseptör [ER] pozitif ve ER negatif tümörler [41]. Floresan in situ hibridizasyon [FISH] temeline göre olmakla beraber bu sınıflama meme tümöründe HER-2 ve reseptörü insan epidermal büyüme faktörü-2 [HER-2]'nin amplifikasyonuna ya da amplifikasyon olmamasına bağlıdır [41]. İkinci bir alt sınıflama HER-2 amplifikasyonunun bulunmasıyla yapılmıştır [41]. İnvaziv duktal karsinomanın yaklaşık %20'si HER-2 amplifikasyonuna ve aşırı ifadenme seviyesine sahiptir [41]. ER, PR ve HER-2 ekspresyon eksikliği olan tümörler üçlü-negatif meme kanseri olarak adlandırılır [TNBC] [41]. Bu sebeple meme kanseri üç alt gruba sınıflandırılır: ER/PR pozitif, ER negatif ya da HER-2 pozitif ve üçlü negatif [ER, PR ve HER-2 negatif] [41]. TNBC'nin geleneksel türleri normalde agresiftir ve hastalığı atlama zayıf değişiklikleriyle ilişkilidir ve bu da hasta tedavisinden emin olmak için hastalığın doğru tespiti çok önemlidir [41]. Histolojik ve moleküler tanımlar belirgin prognostlara sahip olabilen ve sonuçta tedaviye cevapta tahmin etmek için uygulanabilen TNBC'nin alttürlerini açıkça belirtmektedir [42]. Bununla birlikte meme kanserinde gen profilleri ifadenmesine bağlı yeni bir

moleküler sınıflama meme kanserini dört ayrı grupta toplamıştır: lüminal, bazal, HER-2 ve normal tip [41]. Bunun yanı sıra dönüştürücü büyüme faktörü- β [TGF- β], normal epitelde büyüme durmasını tetikleyen bir serbest sitokindir [29]. TGF- β tip II reseptörü [TGF β RII] ile etkileşim içerisinde ki bunu TGF- β tip I reseptörünün [TGF β RI] fosforilasyonu ve etkinleşmesi ve aşağı yöndeki uyarı silsilesinin aktifleşmesi takip etmektedir [43]. TGF- β ' nın sitostatik etkisi erken tümör ilerlemesinde görülmektedir ve hem apoptoz hem de hücre proliferasyonu düzenlemesine aracılık etmektedir [43]. Meme tümör gelişiminde başka bir önemli tümör baskılayıcı ise p53' tür [44]. p53 birçok kanser türündeki gerekliliği ile iyi bilinmektedir [43]. p53 geni insan meme kanserinde en çok değişen tümör baskılayıcı genlerden biridir ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %50' sinde p53 geni mutant durumdadır [43].

1.9 Meme Kanseri Evreleri

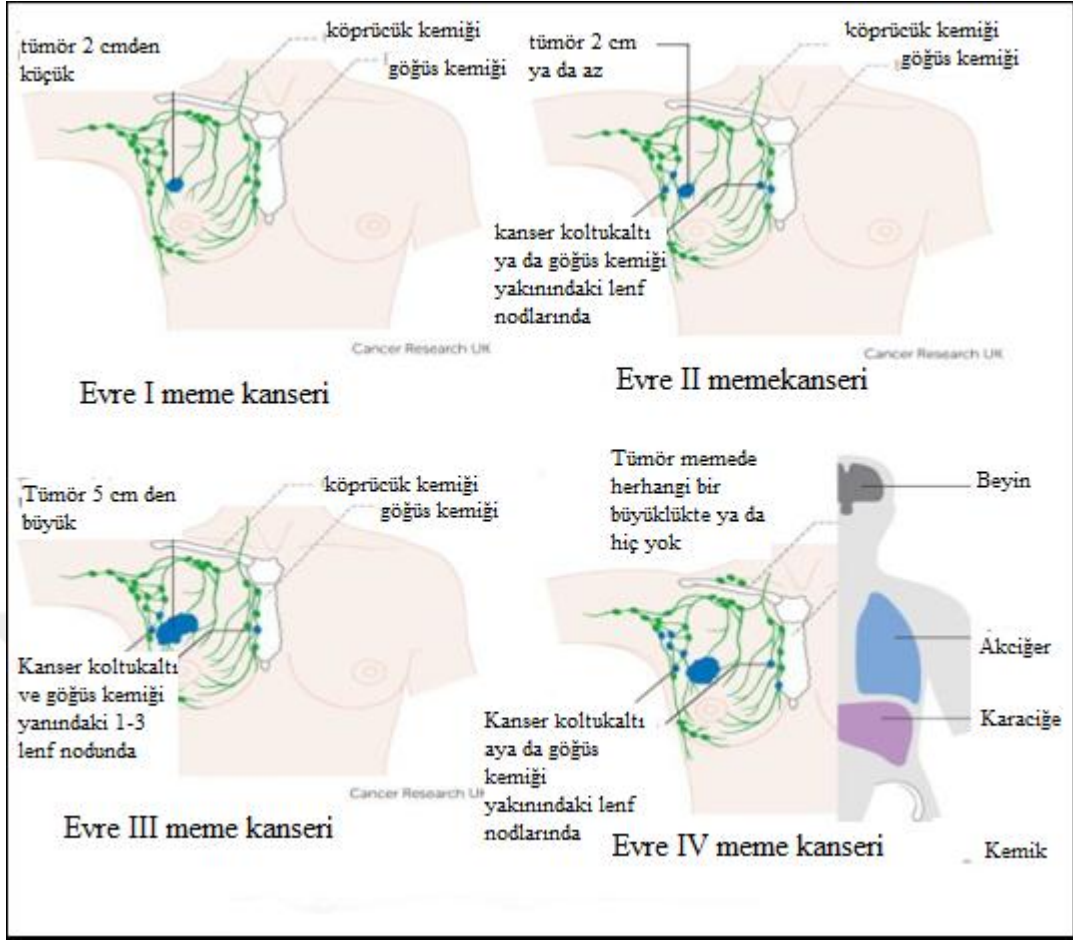
Meme kanseri evreleme, kanser tespiti ve kanser yönetiminin son durumu hakkında bilgi veren önemli bir sınıflamadır [45]. Kanser teşhis ve tedavisinde yeni stratejilerin başarılı uygulamalarının tamamlanmasına yardımcı olmaktadır [45]. Tümör-nod-metastaz [TNM] sistemi 1942' de Pierre Denoix tarafından bulunmuştur ve hastalığın seyrini etkilediği düşünülen malign tümörlerin ana morfolojik karakterlerine bağlı kanser tespiti için bir girişimi temsil etmiştir: primer tümör büyüklüğü [T], bölgesel lenf nodu tutulumu varlığı ve büyümesi [N] ve uzak metastazların varlığı [M] [Tablo 1.1] [45].

Meme kanseri göreceli olarak tahmin edilebilir ve tutarlı bir şekilde ilerlemektedir bu sebeple meme kanserini onun ilerlemesine bağlı olarak farklı "evre" lerde sınıflandırmak mümkündür [45]. Temel olarak, meme kanserinde geçerli olan birçok alttür ile birlikte sıfırdan dörde kadar numaralandırılmış beş "evre" vardır [45].

Tablo 1.1 Meme kanseri TNM Evrelemesi [45].

Sınıflama	Tanım
Primer Tümör [T]	
TX	Primer tümör ölçülemedi ya da bulunamadı
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	In sitü karsinom [tümör sağlıklı meme dokusunu istila etmemiş]
T1	En büyük çapı ≤ 2 cm olan tümör
T2	Tümör 2 cm' den büyük, ancak 5 cm I geçmemiş
T3	Tümör 5 cm den daha büyük
T4	Cilt ya da göğüs duvarına yayılan herhangi bir büyüklükteki tümör
T4a	Göğüs duvarına yayılan tümör
T4b	Deriye yayılan tümör ve memede şişkinlik olabilir
T4c	Hem göğüs duvarına hem de deriye yayılan tümör
T4d	Kızarıklık, şişmiş ve dokununca ağrıyan deri gösteren inflamatuvar karsinom
Bölgesel Lenf Nodları [N]	
NX	Daha önce çıkarıldığı için ölçülemeyen bölgesel lenf nodu
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Hareketli ipsilateral lenf nodu metastazı
N2	Komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı
N3	İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı
Uzak Metastaz [M]	
MX	Değerlendirilemeyen uzak metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Evre 0 ve I' de tüm evrelemeye göre meme kanseri gelişiminin en erken tespitidir [45]. Evre 0 ve I' de kanser hücreleri çok küçük bir alanda sınırlandırılır [45]. Evre II' de ise meme kanseri hala erken evrede olmasına rağmen kanserin büyüdüğüne veya yayıldığına ve komşu başka dokuları istila ettiğine dair kanıtlar vardır [45]. Bununla birlikte bu evredeki tümör hala meme bölgesindedir ve yaygın olarak tedaviden yüksek derecede etkilenir [45]. Evre III' de ise meme kanseri tümör hücresi oldukça gelişmiştir ve meme çevresindeki dokulara invazyon vardır [45]. Son olarak evre IV' de ise tümör hücrelerinin meme dokudan serbest kalarak vücutta farklı organlara yayıldığını tanımlamaktadır [Şekil 1.4] [Tablo 1.2] [45].



Şekil 1.4 Meme kanseri evreleri [46].

Tablo 1.2 TNM genel evrelemesi [45].

Tüm evre	T sınıfı	N sınıfı	M sınıfı
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
Evre IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
Evre IIB	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
Evre IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0

	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N yok	M0
Evre IIIC	T yok	N3	M0
Evre IV	T yok	N yok	M1

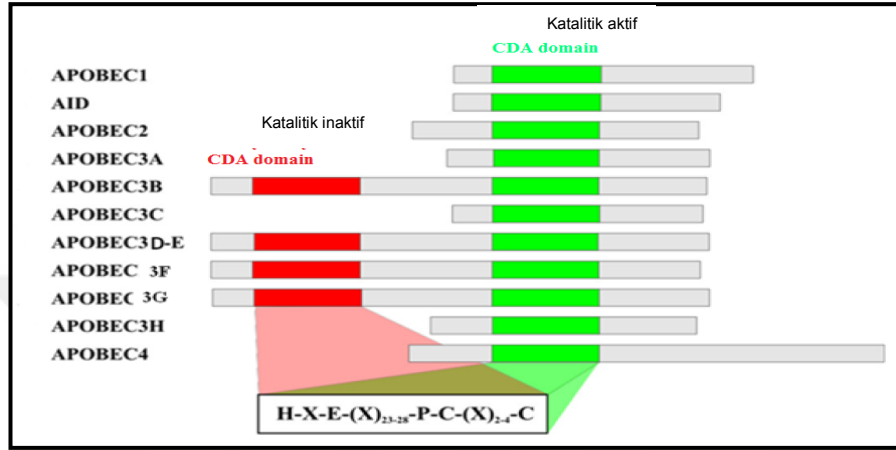
1.10 APOBEC Ailesi

İnsan apolipoprotein B mRNA-düzenleme enzimi katalitik polipeptid-benzeri geni [APOBEC], insanlarda onbir gen kümesinden oluşur. Bu gen kümeleri *APOBEC1*, *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*, *APOBEC3H*, *APOBEC4*, *APOBEC2* ve *AID* olarak adlandırılmıştır [Şekil 1.5] [47]. *AID/APOBEC* protein ailesi RNA ve DNA' yı hedefleyen sitidin deaminazlar olarak görev yaparlar [47,48]. *AID*, *APOBEC1* ve *APOBEC4* genleri 12. kromozom üzerinde lokalize olup *APOBEC2* geni 6. kromozom üzerinde lokalizedir. Yedi *APOBEC3* geni ise 22. kromozom üzerinde lokalizedir [*APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*, *APOBEC3H*] [47]. Bir sitidin deaminaz ailesi üyeleri, antikor çeşitliliği, DNA' nın değiştirilebilir elementlerinin inhibisyonu ve doğal bağışıklığı içeren hücrel süreçleri kapsayan farklı fizyolojik işlevleri yerine getirme yeteneğine sahiptir [47].

Teng ve ark. tarafından tanımlanan ve karakterize edilen bu aileye ait ilk enzim *APOBEC1*' dir [4948,49]. Apolipoprotein B mRNA-düzenleme enzimi katalitik protein 1 [*APOBEC1*], 25 yıl kadar önce klonlanmıştır ve RNA ya da DNA daki bir bazdan NH₂ grubunu çıkararak ApoB mRNA' sında sitidin 6666 deaminasyonundan sorumludur [49]. Bu süreçte, *APOBEC1* ApoB mRNA' sında sitidin 6666 demainasyonunu sitidini üridine çevirerek ve kısa bir ApoB protein oluşmasına sebep olan bir dur kodonu meydana getirerek yapar [49]. Sitidin 6666' nın deaminasyonu bir dur kodonu oluşturur ve kesilmiş bir APOB proteini üretimi ile sonuçlanır [49].

1999 yılına kadar antikor gen çeşitliliğinin sağlanmasına katılan aktivasyon indükleyen deaminaz [*AID*]' ın, *APOBEC1* ile yüksek homolojide olduğu tespit edilmiştir [49]. Bununla birlikte Petersen ve ark. tarafından 2002' de *AID*' in sadece tek iplikli DNA' da sitozinleri deamine ettiği ancak RNA' da deaminasyon yapmadığı gösterilmiştir [49]. Aktivasyon indükleyen deaminaz [*AID*] tek iplikli DNA' da deoksisitidinleri deamine eder ve deoksiüridin oluşumunu sağlar ve bu

süreç B lenfositlerde antikor çeşitliliğini sürdürmek için somatik hipermutasyonun [SHM] ve sınıf-değişim rekombinasyonunun [CSR] temelini oluşturur [49]. Bu keşif enzimle katalizlenen C' nin U' e DNA düzenlemesinin ilk tanımlamasıdır ve antikor gen çeşitliliğinde bu aktivitenin önemini gösterecek gelecek çalışmalar için temel bir bilgi sağlamaktadır [47,48,49].



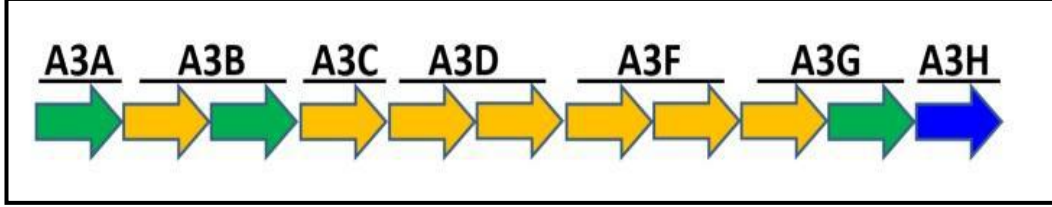
Şekil 1.5 Bir ya da iki CDA domain içeren insan APOBEC ailesi üyeleri. Enzim aktif deaminaz domainler [CDA] yeşil ile gösterilmiştir. *APOBEC1* tek iplikli RNA sitozin deaminazdır. Diğer üyelerin ya nükleik asitler üzerinde etkisi yoktur ya da tek iplikli DNA sitozin deaminazlardır. APOBEC ailesinin tüm üyeleri yeşil ve kırmızı renklerle belirtilmiş en az bir sitozin deaminasyon dizi motifi içerir [50].

1.10.1 APOBEC3 Süper Ailesi

Apolipoprotein B mRNA-düzenleyici katalitik polipeptid 3 [*APOBEC3* ya da A3] yedi polinükleotid sitidin deaminaz enzim ailesini kapsar [47]. İnsan genomu *APOBEC3* ailesinin yedi üyesine sahiptir: *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G* ve *APOBEC3H* [47]. Bu yedi gen de 22. kromozom üzerinde linear olarak düzenlenmiştir [Şekil 1.6] [47].

APOBEC3 proteinleri tek iplikli DNA polinükleotidlerinde doğal olmayan urasil birikintilerine dönüşen sitidin deaminasyonlarından sorumludur [51]. Sitozinin urasile deaminasyonu günde her hücrede 100-500 oranında gerçekleşen doğal bir süreçtir [hidrolitik deaminasyon] [52]. Tek iplikli DNA' daki deaminasyon miktarı çift iplikli DNA ile karşılaştırıldığında 140 kat fazladır [52]. Bunun yanı sıra bu

proteinlerin işlevleri, retroviral enfeksiyonların, hepatit B virüsü yayılımının ve endojen DNA elementlerinin retro-transpozisyonunun inhibisyonunu sağlayarak doğal hücrel bağışıklıkta önemli rol oynar [51,52].

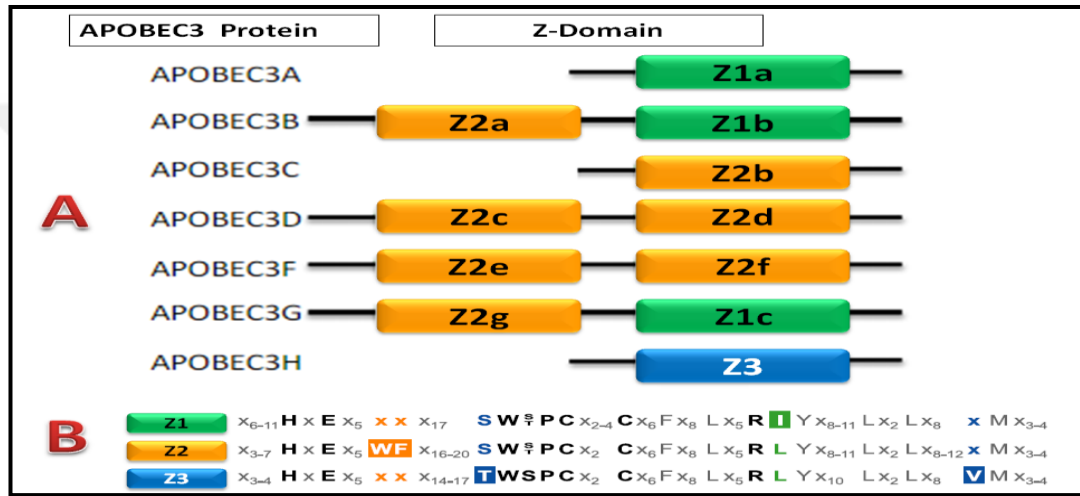


Şekil 1.6 *APOBEC3* lokusunun düzenlenmesi. *APOBEC3* proteinleri 22. Kromozomda doğrusal düzenlenir ve organize olur. Her *APOBEC3* protein yapısı gösterilmiştir. Her Z domain renkli oklar şeklinde gösterilmiştir [Z1; yeşil, Z2; sarı ve Z3; mavi] [53].

APOBEC3 retroviral RNA ile etkileşime olarak sağlayabilir ve konak hücrede viral toplanma sırasında retroviral partiküllerle birlikte ayrılır [51, 53]. *APOBEC3* içeren virus tarafından yeni hücrenin enfekte olmasından sonra yeni taşınan *APOBEC3* enzimi ters transkriptazla üretilmiş tek iplikli DNA' da sitidin birikintilerini urasile dönüştüren deaminasyon yapma yeteneğine sahiptir [51, 53].

Çinko bağımlı domainlerine göre *APOBEC3* proteinlerinin karakteristik özelliği üç farklı Z-domaini içinde sınıflandırılabilir [Z1, Z2, Z3] [51, 53, 55]. *APOBEC3*' nin tüm üyeleri korunmuş H-X-E-X25-31-P-C-X2-4-C çinko-bağlanma motifi içeren amino asit bileşimleriyle çeşitlenir [X herhangi bir amino asit olabilir] [Şekil 1.7] [52, 55]. Z -tanımlayıcı motifler olmasına rağmen X25-31--C-X2-4-C ile herbiri birbirinden farklıdır [52, 55]. Z1 ve Z2 domainlerini içeren her iki deaminazlar SW-S/T-C-X2-4-C motifi ile karakterizedir, Z3 domaini ise TW-S/T-C-X2-C motifi içermektedir [Şekil 2.7] [52, 55]. Polinükleotid substrata sitozinin urasile dönüşümünü kataliz etmek için bir ya da iki çinko ile bağımlı çalışan tek Z domaini bulunan [A3A, A3C ve A3H] ve çift Z domaini bulunan [A3B, A3DE, A3F ve A3G] proteinlerle birlikte *APOBEC3*' nin her proteini çinko-bağımlı sitidin deaminaz domaininin bir ya da iki kopyasını içerir [52, 55]. *APOBEC3* ailesi üyelerindeki Z-domainindeki çeşitlilik farklı biyolojik işlevlere yol açar ve farklı *APOBEC3* aile üyeleri aralarında yer değişimi sağlayabilir [52, 55].

APOBEC3 aile üyeleri genomik DNA hasarına katkıda bulunur [53]. Yedi binden fazla insan kanserinde yapılan tüm ekzon dizileme [WES] ve tüm genom dizileme [WGS] uygulamaları TCW [APOBEC3 için] motifi ile birlikte dC>dT geçişi gibi APOBEC mutasyon varlığının önemini ortaya koymuştur. Mesane, meme, yumurtalık, tiroid, akciğer adenokarsinomu, B hücre lenfoması, multiple myelom, akut lenfoblastik lösemi ve kronik lenfositik lösemi gibi çeşitli kanser türlerinde APOBEC mutasyonları önemli iken akut miyeloid lösemi, karaciğer, kolorektal kanser gibi diğer kanserlerinde bazı APOBEC belirtilerinden yoksundur [53].



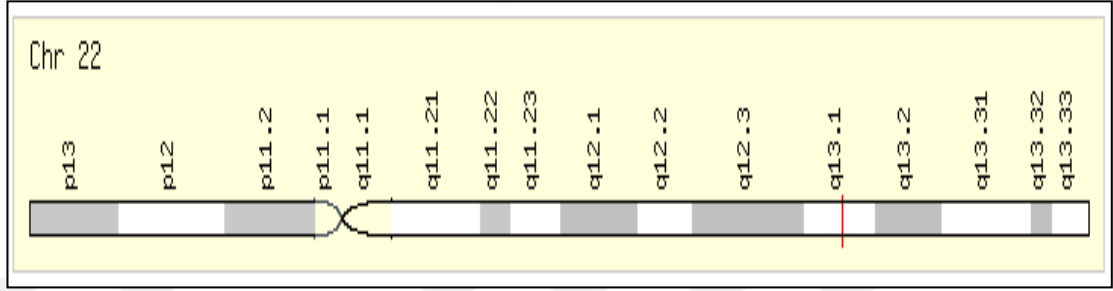
Şekil 1.7 APOBEC3 süper ailesinin Z domaini oluşumunun gösterilmesi. APOBEC3 ailesi Z domaini yapısı [üstte] her alttürde korunmuş ve farklı amino asitlerden oluştuğunu göstermektedir [altta]. Çinko deaminazdomaindeki korunmuş kısımlar koyu ve anormal aminoasitler ise renkli olarak gösterilmiştir [53].

1.10.2 APOBEC3C Geni

1.10.2.1 APOBEC3C Yapı ve İşlevi

APOBEC3C geni sitidin deaminaz gen ailesinin bir üyesidir. Yedi bağlantılı gen ya da 22q13.1 üzerinde gen dublikasyonu sonucu oluştuğu düşünülen bir kümede bulunan psödogenlerden biridir [Şekil 1.8] ve 4 ekzon içerir [6]. Bu gen kümesinin üyeleri yapısal ve işlevsel olarak sitozini urasile dönüştüren RNA düzenleyici sitidin deaminaz APOBEC1 ile ilişkili proteinler kodlar [6]. Bu proteinlerin RNA düzenleyici enzimler olabileceği ve büyüme ya da hücre döngüsü kontrolünde rol

aldığı düşünülmektedir [6]. APOBEC gen ailesi ilk olarak virüs sınırlamasında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Günümüzde APOBEC gen ailesindeki mutasyon ve ifadenme değişimleri meme kanseri riski ile önemli derecede ilişkili bulunmuştur [6]. Bununla birlikte, APOBEC gen ailesinin nasıl düzenlendiği henüz ayrıntılı olarak bilinmemektedir [6].



Şekil 1. 8 22 Kromozom üzerinde *APOBEC3C* geninin lokalizasyonu [56].

1.11 Kodlanmayan RNA'lar

Kodlanmayan bir RNA [ncRNA] primer DNA dizisinden yazılır ancak proteine dönüştürülmez; bu işlevsel bir RNA molekülüdür [57]. Epigenetik ilişkili kodlanmayan RNA'lar iki ana gruba ayrılabilir: kısa kodlanmayan RNA'lar ve uzun kodlanmayan RNA'lar []. Genel olarak ncRNA'lar transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar [57]. Her iki grup da DNA metilasyon hedeflenmesinde, heterokromatin şekillenmesinde, histon modifikasyonunda ve gen susturulmasında rol oynamaktadır [57]. Son yıllarda kodlanmayan RNA'ların hastalık sürecindeki ve kanser gibi birçok biyolojik süreçlerin düzenlenmesindeki önemli rollerinin anlaşılmasında büyük bir genişleme görülmüştür [57].

1.11.1 Uzun Kodlanmayan RNA [LncRNA] *GAS5*

1.11.1.1 *GAS5*' in Yapısal Karakterizasyonu ve Biyolojik İşlevleri

GAS5 büyüme durması esnasında yüksek derecede ifadelenen aday tümör baskılayıcı genlerin tanımlanmasının amaçlandığı bir çalışmada ilk kez izole edilmiştir [58]. *GAS5*, kromozom 1q25 üzerinde lokalizedir ve yaklaşık 630 nükleotid uzunluğundadır [59]. *GAS5*, genlerin 5'TOP sınıfının bir oligopirimidin sistemi özelliğine sahip olduğundan 5'-terminal oligopirimidin geni [5'TOP] olarak

sınıflandırılmıştır [58, 60]. 5'TOP genleri yaygın olmayan pirimidince zengin 5'-terminal diziyeye sahip bir gen sınıfıdır [58, 61]. 5'TOP genlerinin mRNA' ları hücre büyümesi durması sırasında mesajcı ribonükleoprotein partiküllerinde [mRNPlar] birikir [61, 62]. *GAS5* intronları 10 küçük nükleolar RNA [snoRNAlar] ve 2 olgun lncRNA izoformu kodlar: *GAS5a* ve *GAS5b*. *GAS5a* 77 nükleotid uzunluğunda ana isoform iken *GAS5b* sadece 45 nükleotid uzunluğundadır ve 32 nükleotid kayıptır [58]. Bununla birlikte, varsayılan açık okuma çerçevesi küçük ve az korunmuştur [61, 62]. *GAS5* protein kodlamaz ancak RNA' sını kesilir, poliadenilasyona uğrar ve ribozomalarla ilişkilidir [58] *GAS5'* in temel biyolojik aktivitesi çeşitli snoRNA kodlayan intronlar aracılığıyla olur [58]. *GAS5'* in işlevleri henüz tam olarak bilinmemektedir; bununla birlikte, *GAS5* ribozomal RNA biyosentezini düzenleyen birçok snoRNA kodlar [59]. *GAS5* transkripti dokularda her zaman bulunacak şekilde ifadenir ancak çoğalan hücrelerde stabil değildir [61]. Kesilen RNA' sını büyüyen hücrelerde düşük seviyededir ancak büyüme durması [serum açlığı, hücre yoğunluğuna karşı büyüme durması] esnasında ya da sikloheksamid, paktamisin ya da rapamisin ile translasyonun inhibisyonu sırasında yüksek seviyede ifadenir [61]. *GAS5* transkript seviyesinin artması sürekli bozulma oranı sebebiyle olduğu düşünülmektedir [61, 62]. Ayrıca *GAS5'* in, insan T lenfositlerinin normal büyümesinin durması için gerekli olduğuna dair kanıtlar vardır [58, 60, 61]. Yapılan bir çok çalışma ile insanlarda *GAS5'* in işlevleri ortaya konmaya çalışılmaktadır [58]. *GAS5* hücre döngüsü ve hücre progresyonu ile ilişkili iken *GAS5* inhibisyonu hücre apoptozunu azaltır ve hücre döngüsü sürecinin hızlanmasına katkı sağlar [58].

1.11.1.2 Meme Kanserinde *GAS5*

Yapılan birçok çalışma ile çeşitli insan kanserlerinde anormal *GAS5* ifadenmesi gösterilmiştir [63]. *GAS5* ifadenmesi çok sayıda kanser türünde azalmıştır ve bu durum *GAS5'* in bir tümör baskılayıcı olduğu fikrini vermektedir. Ek olarak, in vitro kanser hücre hatlarında *GAS5* aşırı ifadenmesi hücre büyümesinin durmasına katkıda bulunmuştur. Bu kısımda insan meme kanseri türlerinde *GAS5* ifadenmesi ile ilgili bulgular tartışılmıştır.

GAS5 transkript seviyesi, ters transkriptaz kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu analizi kullanılarak komşu kanser olmayan dokulara kıyasla kanserli dokularda

önemli derecede azaldığı gösterilmiştir [64]. *GAS5*' in azalan ifadesinin onkogenezde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir [64]. Bazı *GAS5* transkriptlerinin [*GAS52B*, *GAS53A* ve *GAS5O1*] meme kanseri hücre hatlarında büyüme durmasını ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir [63,64]. *GAS5* lncRNA üçlü-negatif ve östrojen pozitif meme kanseri hücre hatlarında apoptozu uyarıştır [63]. Azalan *GAS5* ifadelenmesi meme kanserinde apoptotik uyarıya hücre sel cevabı azaltmıştır [63]. Ayrıca meme kanseri hücre ölümünün boyutu hücre sel *GAS5* seviyesi ile doğru orantılı olup *GAS5* ifadelenmesi ile meme kanseri hastalarının prognozu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [63].

1.11.2 MikroRNA 103

miRNA' lar 18-24 nükleotidlik kısa, kodlanmayan RNA dizileridir, ilk kez 1993' de keşfedilmiştir ve translasyonel düzenleme yoluyla gen ekspresyonunu kontrol etmektedir [21, 65, 66]. mRNA' nın 3'-kodlanmayan bölgesi ile etkileşime girerek translasyonel kontrolü başlatır ve böylece gelişimsel süreçte önemli rol oynarlar [66]. Sonuçta miRNA' lar mRNA' yı bozarak ve/veya translasyonu baskılayarak hedef gen ifadelenmesini düzenlerler [65]. Son zamanlarda miRNA' ların birçok patolojik ve fizyolojik durumlarda önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir [21, 22]. Özellikle farklı kanser türlerindeki miRNA deregülasyonu geniş çaplı araştırılmaktadır [21]. Örneğin; miRNA ifadelenmesindeki bozulmaların sadece akciğer, meme ve prostat gibi yaygın kanserlerde değil aynı zamanda waldenstram makroglobinemi ve kolanjiyokarsinoma gibi nadir görülen kanserlerde de rol oynadığı gösterilmiştir [22].

Kanserlerde miRNA' ların anormal ifadelenmesi, tümörleşme sürecinde önemli role sahip olan kromozomal anomaliler, genomik mutasyon, polimorfizm, epigenetik değişimler gibi farklı mekanizmalarla ilişkilidir [65]. İnsan miRNA genlerinin yaklaşık %50' si sıklıkla kırılma bölgesindedir ve tümörlerde analizi için genomik dizileme gerektirir [65] ve miRNA' daki yüksek sıklıktaki genomik değişiklik insan melanoma, meme ve yumurtalık kanserlerinde yüksek çözünürlüklü array tabanlı genomik hibridizasyon ile çalışılarak gözlenmiştir [65]. miRNA' lar primer orijini bilinmeyen kanserlerin köken aldığı dokunun tespit edilmesinde yardımcı olabilir [66]. miRNA ifadelenme örnekleri prostat, kolon, yumurtalık, meme ve akciğer gibi

bazı insan kanserleri türlerinin gelişimini tanımlamak için analiz edilmiştir [21,66]. Birçok çalışmada meme kanserli hastalarla sağlıklı donörler ile arasında miR-145 ifadenme seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmuştur. Benzer şekilde prostat kanserinde miR-141 ve kolorektal kanserde miR-29a ifadenmeleri farklılık göstermiştir [66]. Genler ve gen ürünleri üzerindeki aşağı yönlü sinyal etkilerine göre miRNA' lar tümörlerde baskılanabilir ya da aşırı düzenlenebilir [65]. Malignant tümörlerde baskılanmış olan miRNA' lar için bir tümör baskılayıcı potansiyeli olduğu düşünülmektedir [65]. Aynı zamanda kanserlerde aşırı düzenlenen miRNA' ların onkogenik etkileri olduğu düşünülmektedir [65].

miR-103, günümüzde birçok çalışmanın odaklandığı ve bir onkogen olarak fonksiyon gösteren miRNA' dır ve kolorektal, endometrial ve prostat gibi birçok kanser türünde aşırı ifade edilmektedir [4].

BÖLÜM II

KAYNAK ÖZETLERİ

APOBEC3 enzimleri ilk kez Jarmuz ve ark. tarafından *APOBEC1*' e paralog olarak karakterize edilmiştir [67, 68] ve insanlarda yedi proteini kapsar [*APOBEC3A-D, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H*] [68]. Çinko-parmak domainlerinin sayısına göre *APOBEC3* proteinleri iki gruba ayrılır: tek bir çinko-parmak domainine sahip olan *APOBEC3A, APOBEC3C* ve *APOBEC3H*; iki çinko-parmak domainine sahip olan *APOBEC3B, APOBEC3D, APOBEC3G* ve *APOBEC3F* [68]. *APOBEC3C* enzimi retroviral DNA ara ürünlerinin deaminasyonu yoluyla retrovirüsleri inhibe ederek doğal bağışıklıkta önemli rol oynar [69]. *APOBEC3* aile üyelerinin Z domainlerindeki farklılık çeşitli biyolojik işlevlere yol açar ve kendi aralarında farklı *APOBEC3* aile üyeleri dönüşebilirler [69]. APOBEC gen ailesinin ilk olarak virüs sınırlamasında kritik rol oynadığı rapor edilmiştir [70]. Günümüzde, APOBEC gen ailesindeki mutasyon ve ifadenme değişimleri meme kanseri riski ile güçlü korelasyon göstermektedir [71].

Yeni çalışmalar çeşitli tümörlerde *APOBEC3B* ve *APOBEC3C*' nin değişen ifadenmesini göstermiştir [68]. Ayrıca, kanser örneklerinde *APOBEC3B* mRNA seviyesinde ile somatik baz yer değiştirme mutasyonu arasındaki güçlü korelasyon, *APOBEC3B*' nin sitozinden timine dönüşümü indükleyen somatik mutasyonlar için güçlü bir enzimatik kaynak olduğunu göstermektedir [68]. Bununla birlikte, meme kanseri alt türlerinde farklı mutasyonel modeller ve genomik değişiklikler rapor edilmiştir [68], bunun anlamı ise APOBEC-aracılı mutajenez ve APOBEC ailesi ifadenmesi kanser alttürlerinde farklı olabilmektedir [68]. Yanfeng ve ark. [2015], meme kanserlerinde APOBEC gen ailesinin genomik, transkriptomik ve epigenetik düzenlenmesini çeşitli yüksek-çıkıtlı [high-throughput] dizileme verilerini birleştirerek incelemişlerdir [68].

Hem meme kanseri hücre hatlarından hem de tümör örneklerinden elde edilen transkriptom verileri, APOBEC3B ve APOBEC3C genlerinin meme tümörlerinde transkripsiyon seviyesinde önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur [68]. Son zamanlarda yoğun bir şekilde birçok kanser doku ve hücrelerinde kodlanmayan RNA' ların yeniden düzenlenmesi üzerine odaklanılmış ve bu RNA' ların tümörleşme sürecine katkısı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [58, 63]. Çok sayıda lncRNAmeme kanseri dokularında normal meme dokularına kıyasla farklı ifadenme örnekleri gösterdiği bildirilmiştir [58, 63]. *GAS5* lncRNA' sının insan kanserlerinde gerekliliği ilk kez meme kanserinde çalışılmıştır [58]. Mourtada-Maarabouni ve ark. 2009 yılında *GAS5*' in meme kanser dokularında baskılandığını rapor etmişlerdir [72]. Genel olarak *GAS5*' in çeşitli kanser türlerinde baskılandığı ve kötü prognozlu kanser hastalarında düşük seviyede bulunduğu bulunmuştur [63]. Bunun yanı sıra *GAS5*' in farklı hücre türlerinde hücre proliferasyonunu ve/veya apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir ve meme tümör büyümesinin inhibisyonu yoluyla *GAS5*' in tümör baskılayıcı rolü ortaya konmuştur [63]. Li ve ark. [2016], trastuzumaba dirençli SKBR-3/Tr hücrelerinde ve trastuzumab uygulanan hastalardan alınan meme kanseri dokularında azalmış *GAS5* seviyesi tespit etmişlerdir [73]. Ding YX ve ark., [2017] azalan *GAS5* ifadenmesinin EMT' yi uyarak meme kanserinin akciğere metastazını teşvik ettiğini ve bu sonuca göre lncRNA-*GAS5*' in meme kanserinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini bildirmişlerdir [63].

Birçok çalışmada üzerinde odaklanılan miR-103, bir onkogen olup meme, kolorektal, endometriyal ve prostat kanseri de dahil bir çok kanser türünde aşırı ifadelendiği bildirilmiştir [4, 74, 75]. Boren ve ark. ve Chung ve ark. ilk kez endometriyal kanserlerde miR-103' ün anormal aşırı ifadenmesini göstermişlerdir [76, 77]. Ayrıca Dongqi Yu ve ark., miR-103' ün endometriyal kanser hücre hatlarında tümör baskılayıcı *TIMP-3*' ün ifadenmesini transkripsiyon sonrası aşamada baskılayarak büyüme ve invazyonu teşvik ettiğini rapor etmişlerdir [79]. Jeremy ve ark. [2016] ise miR-103a-3p' nin meme kanseri hastalarında aşırı düzenlenmiş ifadenmesini bulmuşlardır [80].

BÖLÜM III

MATERYAL ve METOD

3.1 Örneklerin Toplanması

Hasta örnekleri Irak' ın Süleymaniye şehrinde bulunan Hiwa Hastanesi' nden toplanmıştır. Toplamda 80 örnek analiz edilmiştir. Meme kanserinin türüne göre gruplandırılmış 40 hasta ve 40 normal meme dokusu karşılaştırılmıştır [Tablo 3.1] ve ayrıca hastaların yaşını ve tümör derecesini içeren klinik özellikler de karşılaştırılmıştır. Memeden alınan doku örnekleri daha sonraki analizler için -80⁰C' de saklanmıştır.

Çalışmaya katılan tüm hastalardan gönüllü olur formu alınmıştır ve çalışma için lokal etik kurul izni alınmıştır. Etik kurul izin no: 02.04.2017/137.

Tablo 3.1 Örnek alınan hastaların klinik özellikleri.

No	Yaş	Kanser türü	ER	PR	HER2/neu	Evre
1	55	İnvaziv duktal karsinom, ilik benzeri	0	0	0	III
2	51	İnvaziv duktal karsinom	8	7	1	II
3	25	İnvaziv duktal karsinom	8	7	3	III
4	27	İnvaziv duktal karsinom	8	7	1	II
5	36	İnvaziv duktal karsinom	6	5	2	I
6	36	İnvaziv duktal karsinom	0	0	0	III
7	55	İnvaziv duktal karsinom	8	7	0	II
8	85	Matriks üreten metaplastik karsinom	0	2	0	II
9	42	İnvaziv duktal karsinom	8	7	0	III
10	32	İnvaziv duktal karsinom	3	4	0	III
11	51	İnvaziv duktal karsinom	6	6	0	III
12	34	İnvaziv duktal karsinom	2	2	3	I
13	59	İnvaziv duktal karsinom	8	7	0	II
14	46	İnvaziv duktal karsinom, ilik benzeri	0	0	3	III
15	59	İnvaziv duktal karsinom	8	8	1	II
16	44	İnvaziv duktal karsinom	8	7	0	II
17	60	İnvaziv duktal karsinom	8	5	1	I
18	56	İnvaziv duktal karsinom	8	0	1	I
19	40	İnvaziv duktal karsinom	0	0	3	II
20	80	İnvaziv duktal karsinom	0	0	3	II
21	33	İnvaziv duktal karsinom	8	8	1	II
22	33	İnvaziv duktal karsinom	8	8	1	II
23	49	İnvaziv duktal karsinom	4	8	1	I
24	47	İnvaziv duktal karsinom	8	8	1	III
25	65	İnvaziv duktal karsinom	8	8	0	I
26	51	İnvaziv duktal karsinom	5	4	0	III
27	42	İnvaziv duktal karsinom	8	8	1	II
28	52	İnvaziv duktal karsinom	8	5	3	III
29	57	İnvaziv duktal karsinom	0	0	1	III
30	44	İnvaziv duktal karsinom	0	0	2	III
31	30	İnvaziv duktal karsinom	8	5	0	II
32	37	İnvaziv duktal karsinom	2	0	0	III
33	42	İnvaziv duktal karsinom	8	8	0	II
34	43	Matriks üreten metaplastik karsinom	0	0	0	III
35	39	İnvaziv duktal karsinom	8	6	0	I
36	46	İnvaziv duktal karsinom	6	7	0	III

37	49	İnvaziv duktal karsinom	8	8	0	I
38	30	İnvaziv duktal karsinom	6	7	0	II
39	53	İnvaziv duktal karsinom	7	5	0	III
40	56	İnvaziv duktal karsinom	7	3	0	II

3.2 Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve çözeltiler Tablo 3.2, 3.3 ve 3.4’ de gösterilmiştir.

Tablo 3. 2 Kullanılan cihazlar, markaları ve üretim yerleri.

Cihaz	Marka	Üretim Yeri
Isıtıcı magnetic karıştırıcı	Velp	İtalya
Buzdolabı	Bosch	Türkiye
İnkübatör	Uniequip	Almanya
Vorteks	VELP	İtalya
Santrifüj 5810R	Eppendorf	Almanya
Mikropipet seti	Eppendorf	Almanya
Biyolojik güvenlik kabini	Bilser	Türkiye
Mikrosantrifüj 5425D	Eppendorf	Almanya
Termal ısı döngüleyici [PCR]	Eppendorf	Almanya
RT-qPCR cihazı	Biorad	Amerika
Yatay jel elektroforezi	EC apparatus	Amerika
Mikrodalga fırın	Arcelik	Türkiye
Otoklav	Hirayama	Japonya
Yatay çalkalayıcı	J.P.SELECTA	İspanya
Biyofotometre	Eppendorf	Almanya
UV translüminatör	UVPBioChemisystem	Amerika
Hassas terazi	Shimadzu	Japonya
Nükleotid dizi analzileyci	AB	Singapur

Tablo 3.3 Kullanılan kimyasal maddeler, markaları ve üretim yerleri.

Kimyasal maddeler	Marka	Üretim yerleri
Etidyum bromid	Sigma	Almanya
Safe boyama	GenetBio	Kore
İsopropanol	Sigma	Almanya
Bağlanma silanı	Promega	Almanya
Jel koruyucu	Merck	Darmstadt,Almanya
MgCl ₂	Fermentase	Amerika
Tris	Fermentase	Amerika
dNTP	Fermentase	Amerika
Taq DNA polimeraz	Fermentase	Amerika
Agaroz	Prona	Madrid, İspanya
EDTA	Merck	Darmstadt,Almanya
100 bç belirteç	Fermentase	AB
Bromofenol Mavisi	Merck	Darmstadt,Almanya
Oranj G	Sigma	Almanya
Etil alkol	Sigma	Almanya
Sephadex G-50	Sigma	İsveç
BigDye	Invitrogen	Amerika

Tablo 3.4 Kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri

Çözeltiler	İçeriği
10X TBE	108,9 g Tris 55 g borik asit 9,37 g EDTA 1000 ml distile su
6X Oranj G yükleme boyaması	% 60 gliserol 15% Oranj G 10 mM Tris - HCl pH 7,6 60 mM EDTA
Etidyum bromid	0,5 Etidyum bromid 1 ml distile su

Ekso-Sap

Eksonükleaz I [10 U/ μ l]

Karides Alkalin fosfataz [1U/ μ l]

5x dizileme tampon

Steril su

3.3 RNA İzolasyonu

Meme dokudan RNA örnekleri üretici firmanın önerdiği yöntem doğrultusunda ticari izolasyon kiti kullanılarak elde edildi [Bioneer, ExiPrep™ Doku Total RNA kiti, Kore]. Total RNA konsantrasyonunun miktarı ve kalitesi biyofotometre [Eppendorf, Almanya] kullanılarak ölçülmüştür. Tablo 3.5’ de total RNA’ nın miktarları ve kalitesi gösterilmiştir.

Tablo 3. 2 Total RNA miktar ve kalitesi.

Örnekler	Konsantrasyon ng/ μ L	260/280
1N	231.222	1.893
1T	322.457	1.882
2N	952.435	2.078
2T	892.456	2.056
3N	292.898	2.066
3T	453.546	1.826
4N	222.782	2.053
4T	171.098	2.057
5N	933.361	2.078
5T	392.003	2.035
6N	76.864	2.003
6T	83.454	1.895
7N	29.113	2.028
7T	234.017	2.024
8N	135.745	2.082
8T	234.417	2.075
9N	246.605	1.896
9T	302.377	1.812

10N	933.361	2.078
10T	204.342	2.038
11N	1920.844	2.009
11T	1252.796	2.094
12N	2542.87	2.035
12T	2048.686	2.102
13N	1404.37	2.086
13T	369.865	1.801
14N	14.467	1.797
14T	39.966	1.866
15N	12.322	1.744
15T	16.014	1.888
16N	3110.082	1.761
16T	3144.817	1.814
17N	2748.671	1.914
17T	1539.505	2.053
18N	2820.112	1.815
18T	3006.285	1.863
19N	24.605	1.855
19T	10.491	1.822
20N	21.525	1.832
20T	20.775	1.992
21N	315.932	2.001
21T	482.891	2.075
22N	1361.41	2.002
22T	133.735	2.052
23N	20.155	1.886
23T	28.609	1.862
24N	227.833	2.049
24T	56.611	1.909
25N	53.744	1.877
25T	12.262	1.774
26N	21.525	1.854
26T	11.579	1.891
27N	24.792	1.849
27T	12.713	1.765
28N	10.231	1.723
28T	39.872	1.801

29N	109.887	2.014
29T	325.734	2.055
30N	38.151	1.987
30T	92.508	2.052
31N	34.709	1.803
31T	65.987	1.907
32N	76.987	2.012
32T	234.012	1.801
33N	234.900	1.804
33T	34.345	1.904
34N	231.098	2.019
34T	56.912	1.905
35N	123.075	2.008
35T	146.901	2.001
36N	39.309	1.801
36T	89.009	1.812
37N	67.981	1.909
37T	58.802	1.801
38N	98.009	1.798
38T	65.909	1.809
39N	49.092	1.803
39T	87.901	1.901
40N	45.321	1.811
40T	91.099	1.801

3.4 Komplementer DNA Sentezi

APOBEC3C gen ifadenleme seviyesini ölçmek için izole edilen mRNA Ipsogen RT Kit [Qiagen, GmbH, Hilden,Almanya] kullanılarak komplementer DNA [cDNA]' ya dönüştürülmüştür. Ayrıca, miR-103 ve Lnc-RNA *GAS5*' in ifadenleme analizleri için izole edilen kodlanmayan RNA' lar miScript II RT Kit [Qiagen GmbH, Hilden, Germany] kullanılarak cDNA' ya dönüştürülmüştür. Master-cycler pro PCR Sistem [Eppendorf, Almanya] ile cDNA' nın termal döngü süreci tamamlanmıştır. Çalışma alanı %70 [v/v] etanol ile temizlenmiş ve her aşamada filtrelili pipet uçları kullanılmıştır. Kit çözeltileri eritilmiş ve buz üzerine konmuştur. Örneklerdeki DNA kontaminasyonunu kontrol etmek için ters-transkriptaz olmadan hazırlanan bir kontrol

reaksiyonu önerilmiştir. Elde edilen total RNA' ların konsantrasyon miktarı eşit olmadığı için her örnek için farklı hacimlerde total RNA alınmıştır.

3.5 Primer Tasarımı

Bir primer DNA sentezinin başlangıç noktası olarak görev yapan bir dizi nükleik asittir. Primer seçimi dizideki hedef bölgeye bağlıdır. *APOBEC3C/Exp* and *APOBEC3C/Mut*, and *LncRNA-GAS5/Exp* mRNA dizileri için primer çifti tasarlanmıştır. Bunun için online primer tasarım programı <http://workbench.sdsc.edu> kullanılmıştır. Primerlerin dizileri, bağlanma sıcaklığı ve PCR ürünlerinin büyüklüğü Tablo 3.6' da gösterilmiştir. miRNA 103 için ise miScript Primer Assay [Qiagen, Almanya] kullanılmıştır.

Gen ifadenmesi için seçilen primerler genin kodlanan herhangi bir bölgesinden seçilmelidir. Tasarlanan primer dizisi bir ya da iki ekzon-ekzon birleşimi bölgesini içermelidir böylece ilgilenilen RNA ürününden başka bir ürünün kopya sayısının artması önlenmektedir. Aksi takdirde hangi ürünün kopya sayısının arttığını ya da başka bir kontaminasyon olup olmadığını bilemeyiz. Bu bağlamda, *APOBEC3C/Exp* ve *LncRNA-GAS5* primerleri tasarlanmış olup *APOBEC3C/Mut* UTR' ler olmadan mutasyon görülen kodlanan dizi bölgesi tasarlanmıştır.

Tablo 3.6 *APOBEC3C/Exp*, *APOBEC3C/Mut* ve *LncRNA-GAS5* genlerinin primer dizileri, PCR ürün büyüklüğü ve bağlanma sıcaklıkları

Primer adı	Dizi 5' -3'	Optimal bağlanma sıcaklığı	PCR ürün büyüklüğü
<i>APOBEC3C/Exp</i> .			
İ. Primer	AACCTATGGGAAGCCAACGA	54.2 °C	179 bç
G. Primer	GGAGACAGTATGTCGTCGCA		
<i>LncRNAGAS5/Exp</i> .			
İ. Primer	TGGTTCTGCTCCTGGTAACG	55,3 °C	185 bç
G. Primer	AGGATAACAGGTCTGCCTGC		
<i>APOBEC3C/Mut</i> .			
İ. Primer	CGCTTCAGAAAAGAGTGGGAC	56.1°C	662 bç
G. Primer	GAGGCTAGAGGAGACAGACCA		

3.6 PCR Optimizasyonu

Her primer çiftinin gradyan PCR çalışması için bir cDNA kullanıldı. Amplifikasyon Master-cycler pro PCR Sistemi [Eppendorf, Almanya] kullanılarak yapıldı. Tüm primerlerin optimum erime sıcaklığının tespiti agaroz jel elektroforezinin sonucuna göre hesaplandı. Gradyan PCR için kullanılan karışım Tablo 3.7' de gösterilmiştir.

Tablo 3.7 Gradyan PCR reaksiyon bileşenleri ve 25µL total hacimdeki miktarları.

Kimyasal bileşenler	Miktar [µL]
dH ₂ O	14.875µL
10X PCR tampon amonyum sülfat [NH ₄] 2SO ₄	2.5µL
25 mM MgCl ₂	2µL
2 mM dNTP	1.5µL
20 mM ileri primer	1µL
20 mM geri primer	1µL
5 U/ML Taq DNA polimeraz	0,125 µL
Kalıp cDNA	2µL
Toplam	25µL

Termal ısı döngüsü programı 35 döngüye kurulmuştur ve Tablo 3.8' de verilen sıcaklık değerleri ve süreler uygulanmıştır.

Tablo 3.8 Gradyan PCR reaksiyon koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
1 . Ön denatürasyon	95°C	3 dakika
2 . Denatürasyon	95°C	30 saniye
3 . Primer bağlanma	55°C - 60°C	30 saniye
4 . Uzama	72°C	30 saniye
	35 döngü	
5 . Son uzama	72°C	2 dakika
Bekleme	4°C	0

PCR ürünleri %2' lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi ve etidyum bromid ile boyandı. Jel 100 voltta 45 dakika yürütüldü. cDNA fragmentleri UV ışık altında gözlemlendi. Yapılan analiz sonucunda her primer için optimal bağlanma sıcaklıkları şu şekilde belirlendi: *APOBEC3C*/Exp için 54.2°C, *LncRNAGAS5*/Exp için 55,3°C ve *APOBEC3C*/Mut için 56,1°C.

3.7 GAPDH Amplifikasyonu

Her hücrede sürekli olarak ifade edilen referans genler tespit edilen özel gen öncü dizileri tarafından tanımlanmaktadır [81]. Bununla birlikte, moleküler biyoloji çalışmalarında referans genlerin kullanımı ifadenme seviyelerinin hücreden hücreye, örnekten örneğe ve/veya hastadan hastaya aynı kaldığı varsayımına dayandırılmaktadır [81]. Tüm yöntemlerin doğrulanmaya ihtiyacı olmasına rağmen, verilerin normalizasyonunda onaylanmış alternatif yöntemin yokluğunda referans gen ifadenmesinin biyolojik farklılığının olup olmadığını tespit etmek zordur [81]. Bir hücre iskeleti proteini olan β -aktin ve bir glikoliz enzimi olan GAPDH anekdotsal kanıtlar temeline dayalı en yaygın olarak kullanılan iki referans genidir [81].

Bu çalışmada, *LncRNA-GAS5* ve *APOBEC3C*, miR-103 genlerinin ifadenme seviyesinin ölçülmesi için GAPDH referans gen olarak kullanıldı.

3.8 Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez bir karışımdaki molekülleri ayırmak ve özellikle protein ve nükleik asit gibi makromolekülleri saflaştırmak için farklı elektrik yüklerini kullanan bir tekniktir [82]. DNA molekülleri negatif yüklüdür. Bir elektriksel alana yerleştirilirler ve pozitif kutba doğru göç ederler [82]. Bir molekülün göç oranı iki faktöre bağlıdır: [i] şekli ve [ii] yük/kütle oranı [82].

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi primer optimizasyonu amacıyla kullanılmıştır. Örnekler %2' lik agaroz jelde yürütüldü ve DNA' yı UV ışık altında görünür kılan bir bileşim ile boyandı. Etidyum bromid [EtBr] agaroz jelde DNA' yı boyamak için rutin olarak kullanılır. cDNA örnekleri 100 voltta 45 dakika elektriksel alanda yürütüldü. PCR ürün büyüklüğü ise 179-662 bp kadardır.

3.9 Gerçek zamanlı PCR

Gerçek-zamanlı PCR DNA bağlanma boyalarının yardımı ile eş zamanlı aynı anda amplifikasyonun takip edilmesine de olanak sağlar. SYBR Green boyası bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanır ve ışığa verir. Primer bağlanmasını takiben uzama basamağı sırasında hedef DNA çift iplikli yapı almaya başladıkça DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artar ve bu yüzden ışığa yayılımı artar. SYBR Green boyasından yayılan ışın sınır değeri gösterir ve C_t ya da C_p değeri olarak adlandırılır. Bu noktada DNA çoğalmıştır ve DNA'ya bağlanan boyadan yayılan ışın sınırı geçmiştir. Işıklar sınırı aştığında amplifikasyon kesin olmuştur ancak doğru amplikonun takip edilip edilmediğini tespit etmek için erime eğrisi analizi yapılmalıdır. Çünkü SYBR Green özel bir DNA molekülüne bağlanabilen spesifik bir boya değildir; aksine tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanabilir.

3.9.1 RT-PCR Bileşenleri

Gerçek-zamanlı PCR reaksiyonu IQ5 RT-qPCR [Biorad, Amerika] cihazının uygulamasına bağlı olarak çalışılmıştır. *APOBEC3C*, *LncRNA-GAS5* and *miRNA 103* ifadenme analizinde kullanılan karışım RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix [Qiagen GmbH, Hilden, Almanya]'dır. Gerçek-zamanlı PCR karışımı Tablo 3.9' a göre buz üzerinde hazırlanmıştır. Karışım kısaca karıştırılıp buz üzerine alınmıştır. Gerçek-zamanlı PCR karışımı mRNA' dan elde edilen cDNA dışında tüm bileşenleri içermektedir.

Tablo 3.9 Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu karışımı.

Bileşen	Miktar [μ l]
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	7.125
İleri Primer [10 μ M]	1
Geri Primer [10 μ M]	1
RNaz/DNaz içermeyen su	12.875
cDNA [50 ng]	3
Toplam	25

Her örneğin cDNA' sı RT-PCR karışımını içeren tüm tüplere eklendi. Her tüp dikkatlice karıştırıldı kısa bir santrifüj edildi ve tekrar buz üzerine alındı. IQ5 RT-qPCR cihazına Tablo 3.10' da verilen koşullar kaydedildi ve çalıştırıldı.

Tablo 3.10 Gerçek zamanlı PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık [⁰ C]	Süre [sn]	Döngü
Enzim aktivasyonu	95	10 dakika	
Denatürasyon	95	15	
Primer bağlanma/uzama	60	60	40
Erime eğrisi	65	1	
	95	Sürekli	

3.10 Nükleotid Dizileme

3.10.1 PCR Dizileme Aşaması

APOBEC3C/Mut' un 40 cDNA fragmenti [20 tümör+20 normal] agaroz jelden kesip çıkarıldı ve PCR amplifikasyonu için kalıp cDNA kaynağı olarak kullanıldı. Diğer bileşenlerin oranları Tablo 3.7' de verilmiştir. Her örnek için PCR karışımının toplam hacmi 25 μ L' ye sabitlenmiştir ve daha sonra ısı döngü cihazında [Eppendorf, Almanya], Tablo 3.8' de gösterilen koşulların aynısı ile amplifiye edilmiştir.

3.10.2 Ön-Dizileme Hazırlık Aşaması

3.10.2.1 PCR Ürünlerinin EksoSAP ile Temizlenmesi

EksoSAP karışımı steril su, ekzonükleaz I [10U/ μ l], karides alkalın fosfataz [1U/ μ l] içermektedir. Ekzonükleaz I primerleri parçalamak için ve karides alkalın fosfataz bağımsız, ilişkisi olmayan nükleik asitleri parçalamak için kullanılır. Bu şekilde kalıp dizi hazırlanmış olur. EksoSAP karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

5 μ l PCR ürünü+2 μ l EksoSAP.

cDNA kalıbının saflaştırılması ısı döngü cihazında [Eppendorf, Almanya] Tablo 3.11' de verilen koşullara göre yapılmıştır.

Tablo 3.11 PCR ürünlerinin EksoSAP ile temizlenme koşulları..

Basamak	Sıcaklık	Süre
1 – Artık primerlerin parçalanması	37 °C	30 dakika
2 – Enzim parçalanması	85 °C	15 dakika
3 - Bekleme	4 °C	∞

3.10.2.2 Döngü Dizileme Reaksiyonu

BigDye ışığa oldukça hassas olduğundan döngü dizileme reaksiyon karışımı hazırlanırken tüm ışık kaynakları kapatılmalıdır. Döngü dizileme için protokol ise Tablo 3.12’ de verilmiştir.

Tablo 3.12 Her reaksiyon için döngü dizileme protokolü.

Kimyasal maddeler	Miktar
DNA	1µl
İleri primer [0.8 µM]	2µl
5X BigDye tamponu	2µl
BigDye [v3. 0] Karışımı	1µl
ddH ₂ O	4µl

Daha sonra cDNA eklendi ve ısı döngü cihazında program Tablo 3.13’ de gösterildiği gibi kaydedilip çalıştırıldı.

Tablo 3.13 PCR dizileme reaksiyonu ısı döngü koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
1. Ön denatüreyasyon	96°C	1 dakika
2. Denatürasyon	96°C	10 saniye
3. Primer bağlanma	50°C	5 saniye
4. Uzama	60°C	30 dakika
	25 döngü	
Bekleme	4° C	∞

3.10.2.3 PCR Ürünlerinin Temizlenmesinde Sefadeks Spin-kolon Protokolü

Sefadeks çözeltisi Tablo 3.14' de gösterilmiştir.

Tablo 3.14 Temizlenmiş PCr ürünü sefadeks spin-kolon bileşeni.

Bileşen	Miktar
Sefadeks G-50 toz	4 g
ddH ₂ O	42 ml

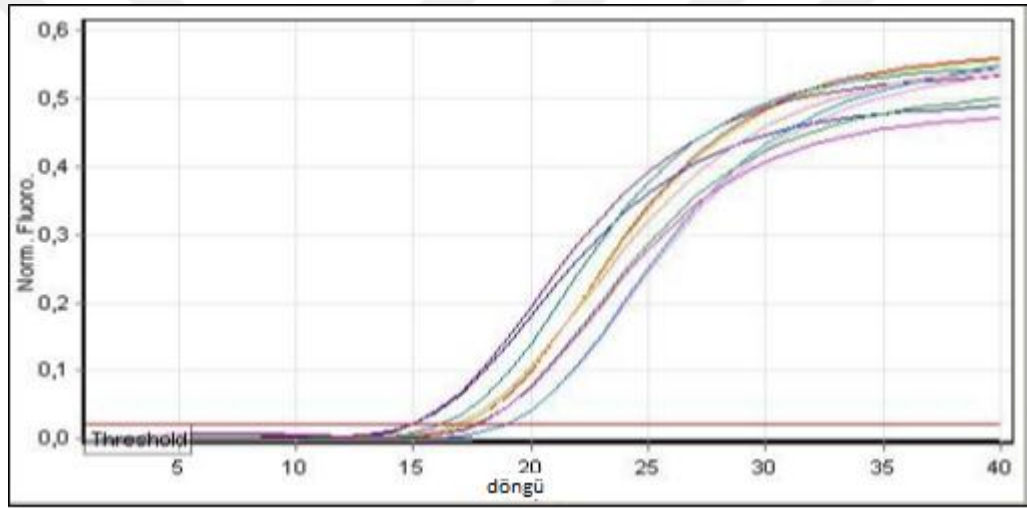
Hazırlanan çözelti 45 dakika vorteks üzerinde karıştırıldı. Boş alıcı kolon 1.5 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 850 µl sefadeks çözeltisi her kolonun içine eklendi. Tüpler 3,800 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi ve daha sonra toplayıcı kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Daha sonra 10 µl PCR ürünü hazırlanan kolona eklendi. PCR örnekleri toplayıcı kolona dikkatli bir şekilde kolonun tam merkezindeki matriksin üzerine dokunmadan eklendi. Tüpler 3,800 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi.

BÖLÜM IV BULGULAR

4.1 İfadeleme Sonuçları

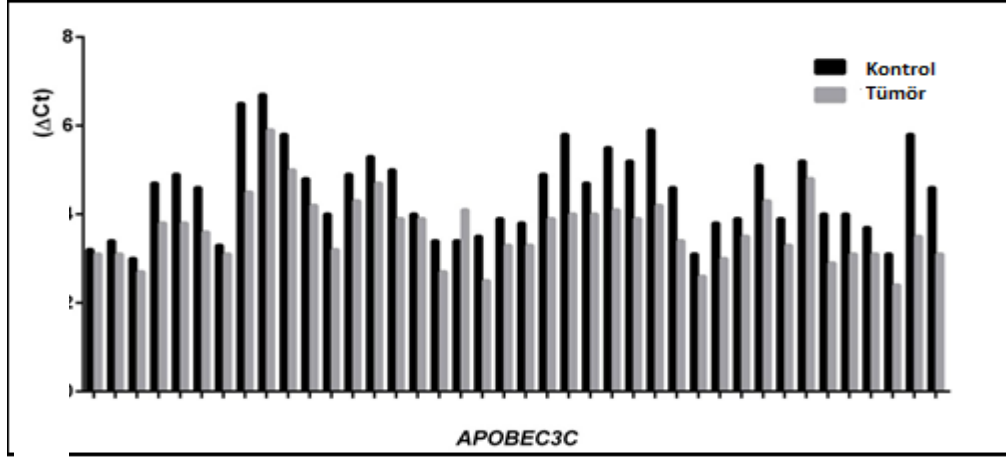
4.1.1 *APOBEC3C* Gen İfadeleme

40 meme kanseri ve normal doku örneklerindeki *APOBEC3C* geninin ifadeleme seviyesi gerçek-zamanlı qPCR ile elde edildi. Hedef genin normalizasyonu için referans gen olarak *GAPDH* kullanıldı [Şekil 4.1].



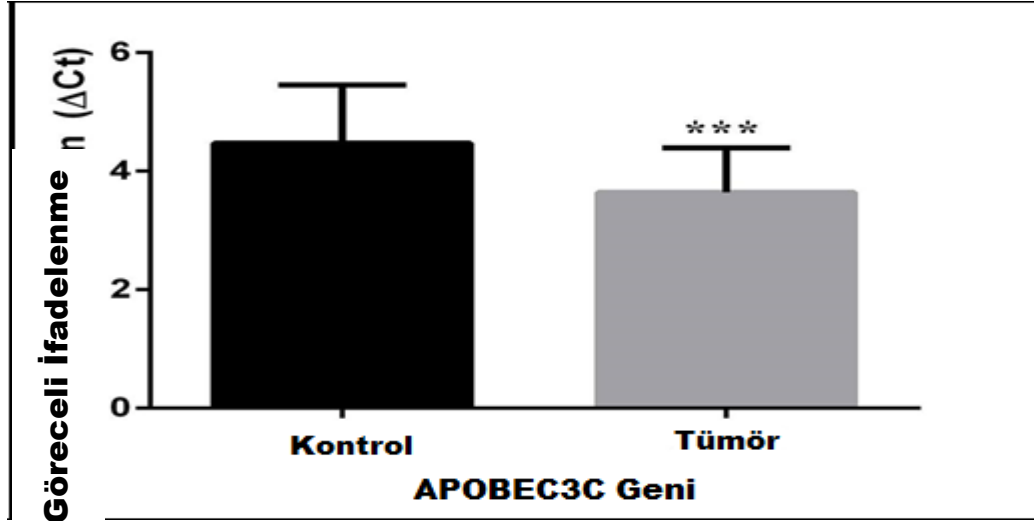
Şekil 4.1 *APOBEC3C* geninin qRT-PCR analiz sonuçları. Örnekler 20. ve 26. Döngüde en yüksek eğriyi göstermiştir.

40 kanser hastasından elde edilen *APOBEC3C* gen ifadeleme seviyesi normal ve tümör dokularında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda her hastanın ifadeleme seviyesi farklı olduğu Şekil 4.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Normal ve kanserli dokularda *APOBEC3C* geni ifadenmesinin karşılaştırılması. Her normal kontrolün ve tümörlerin ΔC_T değerine göre *APOBEC3C* geni ifadenme seviyesi normal kontrole göre kanser hastalarında azalmıştır.

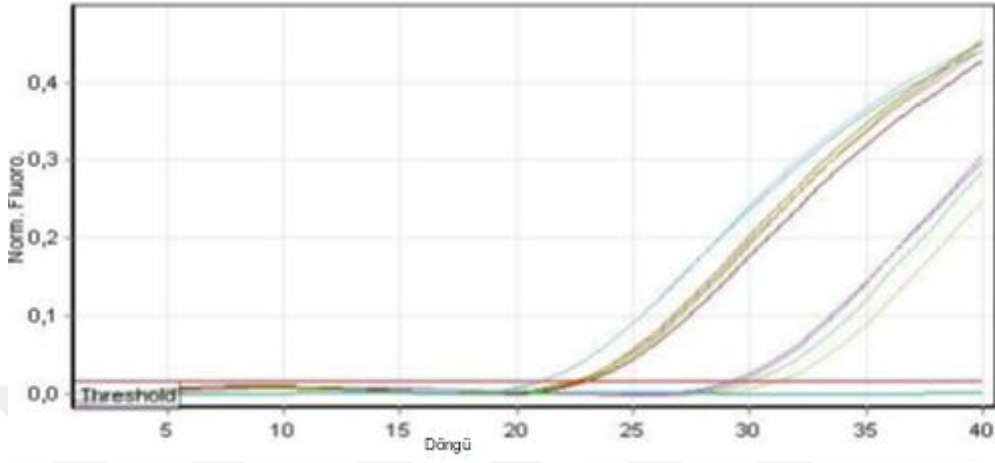
APOBEC3C geni ifadenme seviyesi 40 örnekten elde edildi: tümör ve normal doku. İfadenme seviyesi RT-qPCR ile ölçüldü ve *APOBEC3C* mRNA' sını ifadenme miktarı tümör örneklerinde normal örneklerle karşılaştırıldığında azalmış bulundu. İstatistiksel olarak yüksek seviyede anlamlı bulundu [$p = 0.0001$, T-test; $p > 0,05$]. Hem tümör dokuda hem de normal dokuda mRNA ifadenme seviyesinin istatistiksel sonucu Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4. 3 *APOBEC3C* geninin normal ve tümör dokuda mRNA ifadenme seviyesinin miktarı [$p=0,0001$]. Kontrol örneklerinin ortalaması =4.473 ve tümör örneklerinin ortalaması=3.645.

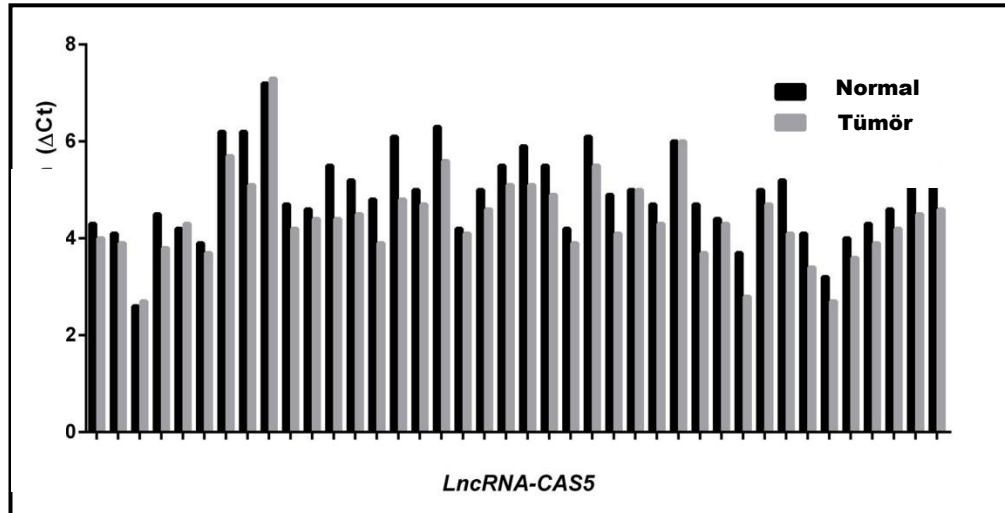
4.1.2 LncRNA-GAS5 İfadeleme

40 örnekten LncRNA-GAS5 ifadenme sonuçları gerçek-zamanlı PCR ile elde edilmiştir. Normalizasyon için GAPDH referans geni kullanılmıştır [Şekil 4.4].



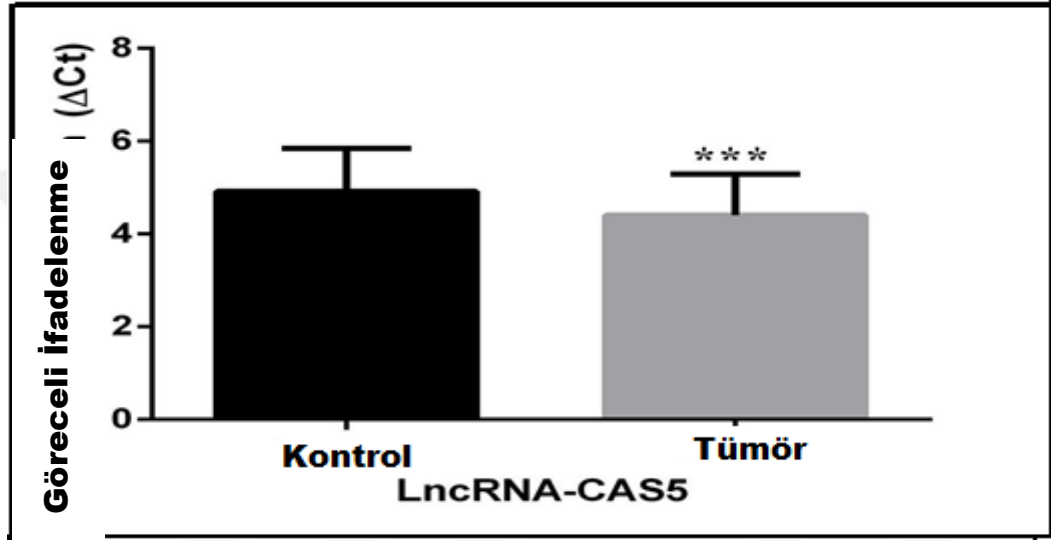
Şekil 4.4 LncRNA-GAS5' in qRT-PCR analiz sonuçları. Örnekler en yüksek eğriyi 20. ve 30. döngülerde vermiştir.

40 kanser hastasının LncRNA-GAS5 ifadenme seviyesi normal ve tümörlü dokuda analiz edilmiştir. Her hastanın ifadenme seviyesi farklı çıkmıştır. Normal doku ve tümör doku arasındaki bu karşılaştırma Şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.5 Normal ve kanserli dokularda LncRNA-GAS5 geni ifadenmesinin karşılaştırılması. Her normal ve tümörlü dokuda ΔC_T değerine göre LncRNA-GAS5 RNA ifadenme seviyesi. Tümörlü dokuda normal kontrole göre RNA ifadesi azalmıştır.

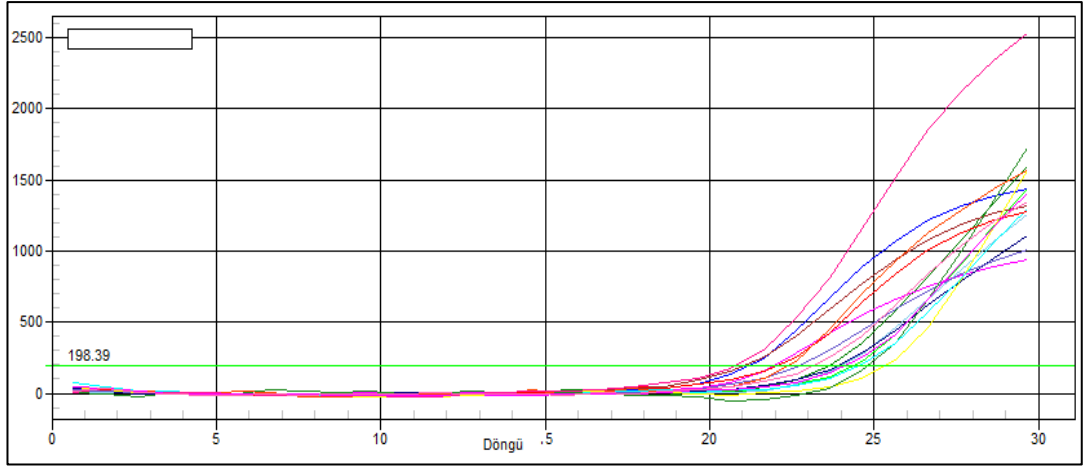
LncRNA-*GAS5* ifadenme seviyesi tümör ve normal dokuda 40 örnekte analiz edilmiştir. İfadenme seviyesi RT-qPCR ile ölçülmüş olup *GAS5*' in RNA ifadenme miktarı tümör örneklerinde normal dokuya göre azalmıştır. İstatiksel olarak yüksek seviyede anlamlı bulunmuştur [$p = 0.001$, T-test; $p > 0,05$]. Hem normal hem tümör dokuda *GAS5* ifadenme düzeyinin istatiksel sonucu Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Normal ve tümör doku örneklerinde *GAS5* RNA ifadenme seviyesi miktarı [$p=0,001$]. Kontrol örnekler ortalaması = 4.918 ve tümör örnekleri ortalaması = 4.403.

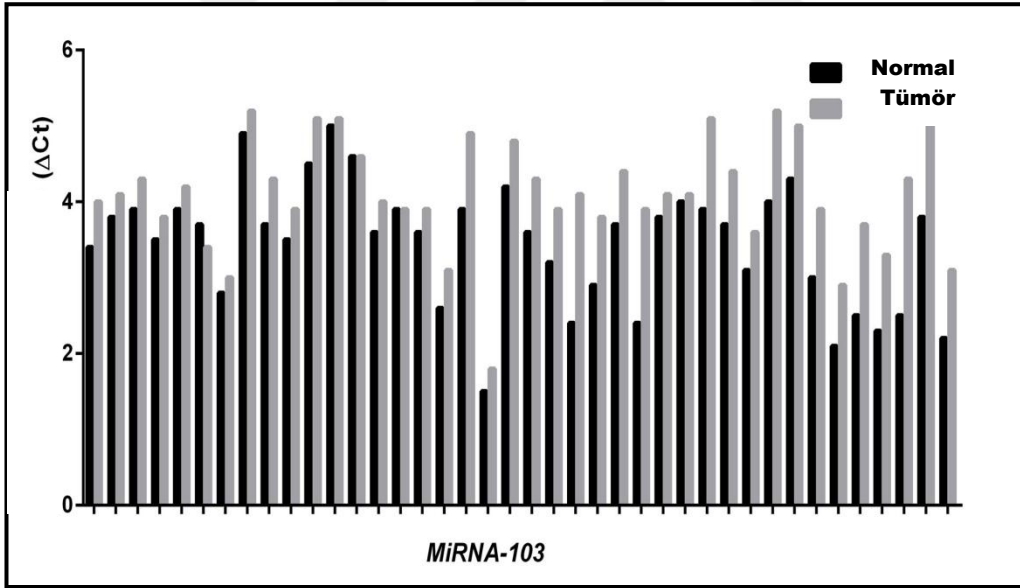
4.1.3 MiRNA 103 İfadenmesi

40 meme kanseri ve normal doku örneklerindeki MiRNA 103 ifadenme seviyesi gerçek-zamanlı qPCR ile elde edildi. Hedef genin normalizasyonu için referans gen olarak *GAPDH* kullanıldı [Şekil 4.7].



Şekil 4.7 miRNA 103' ün qRT-PCR analiz sonuçları. Örnekler en yüksek eğriyi 20. ve 31. döngülerde vermiştir.

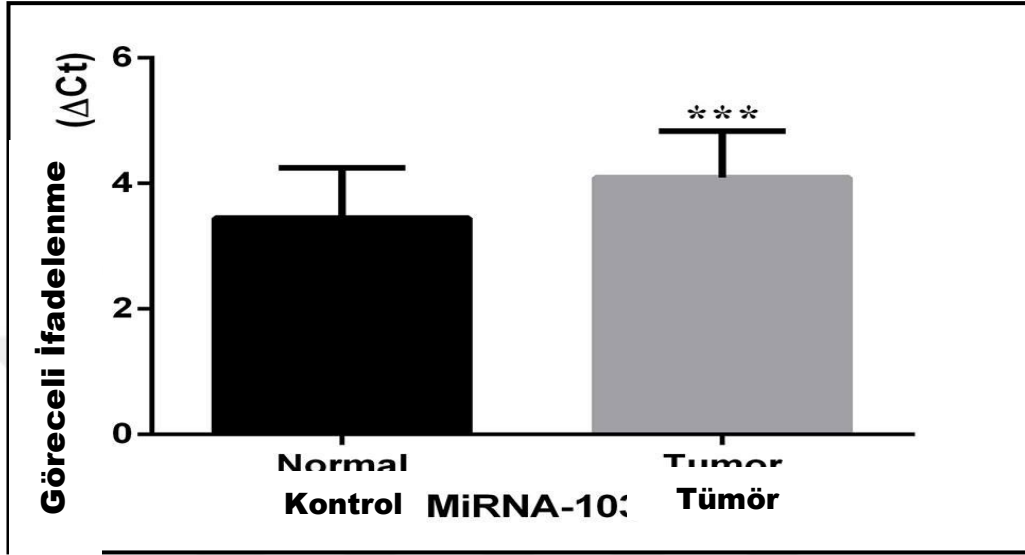
40 kanser hastasından elde edilen *APOBEC3C* gen ifadenenme seviyesi normal ve tümör dokularında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda her hastanın ifadenenme seviyesi farklı olduğu Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Normal ve kanserli dokularda miR-103 geni ifadenenmesinin karşılaştırılması. Her normal kontrolün ve tümörlerin ΔC_T değerine göre miR-103 geni ifadenenme seviyesi. mRNA ifadenenme seviyesi normal kontrole göre kanser hastalarında artmıştır.

miRNA 103 ifadenenme seviyesi 40 normal ve tümör örneğinden elde edilmiş olup ifadenenme seviyesi RT-qPCR ile ölçülmüştür. miRNA 103 ifadenenme miktarı

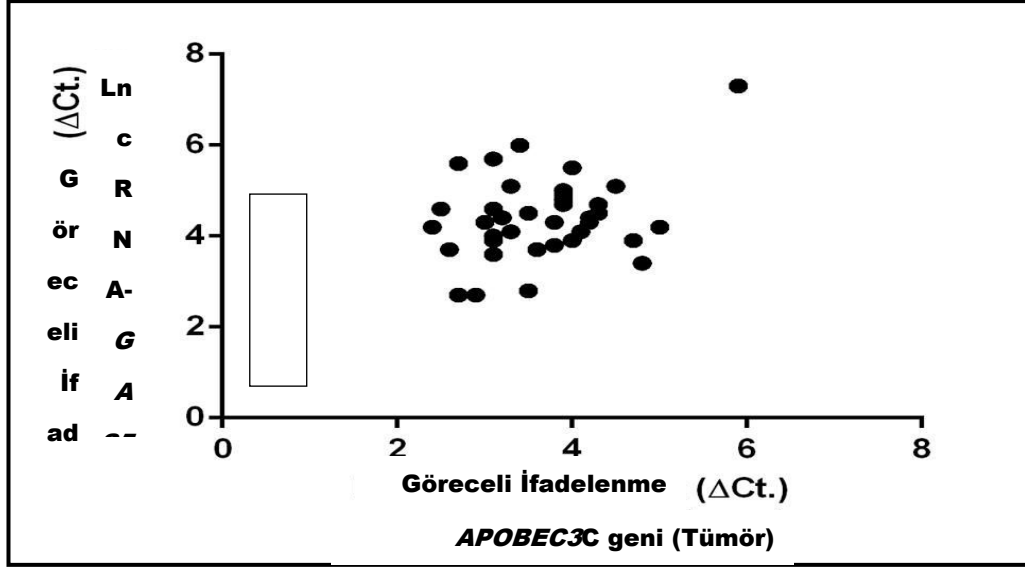
normal örneklerin ifadenme seviyesi ile karşılaştırıldığında tümör örneklerinde arttığı gözlenmiştir. İstatiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur [p = 0.0001, T-test; p > 0,05]. Normal ve tümör dokudaki miRNA 103 ifadenmesinin istatiksel sonucu Şekil 4.9’ da verilmiştir.



Şekil 4.9 Normal ve tümör dokularda MİRNA 103 ifadenme seviyesi miktarı [p=0,0001]. Kontrol örneklerinin ortalaması= 3.448 ve tümör örneklerinin ortalaması= 4.095.

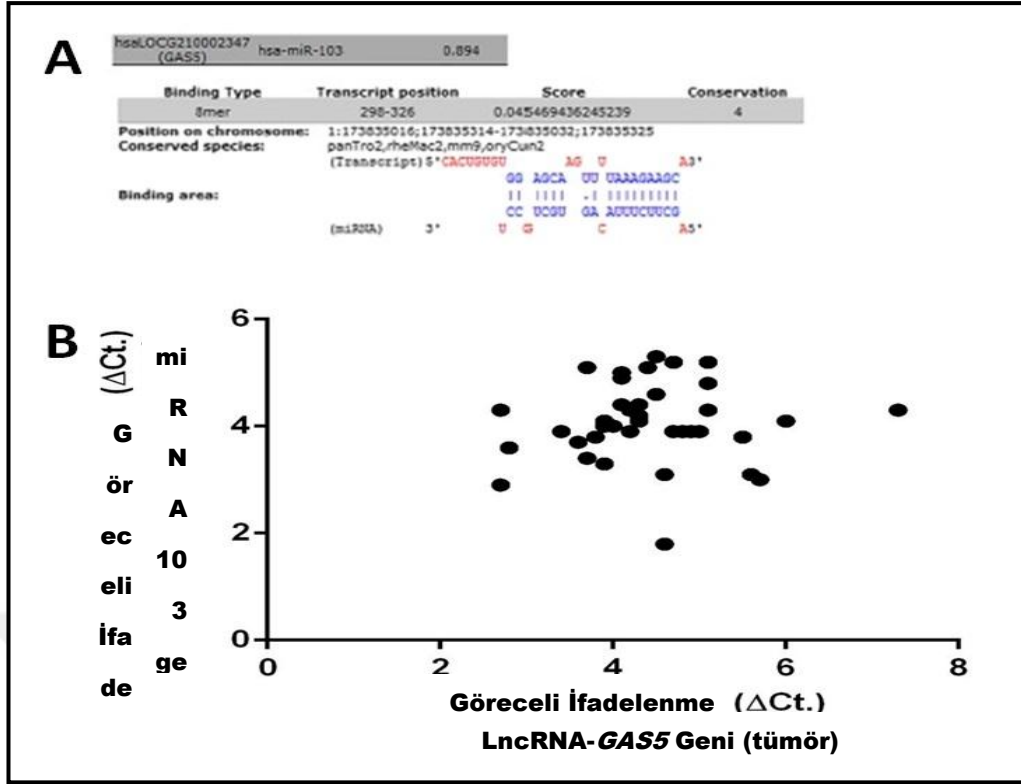
4.2 APOBEC3C, LncRNA-GAS5 ve MiRNA 103 İfadenme Korelasyonu

LncRNA-GAS5’ in meme kanseri hücrelerindeki rolünü tanımlamak için meme kanseri hastalarından alınan doku örnekleri ile sağlıklı kontrollerden alınan doku örneklerinde qRT-PCR ile Lnc-GAS5’ in relatif ifadenmesini çalıştık. Meme kanserli hastalarda sağlıklı örneklere göre düşük seviyede LncRNA-GAS5 ifadenmesi gözlemlendi [Şekil 4.6]. daha sonra meme kanseri hastalarının dokusunda ve sağlıklı kontrol dokularda APOBEC3C ifadenmesini tespit ettik. Şekil 4.3’ de gösterildiği gibi APOBEC3C ifadenmesi de meme kanseri hastalarında azalmıştır. Meme kanserinde APOBEC3C ve GAS5 arasındaki ilişkiyi keşfetmek için GAS5 ve APOBEC3C arasında korelasyon analizi çalışılmıştır. GAS5 ifadenmesi ile APOBEC3C ifadenmesi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. APOBEC3C ve GAS5 arasındaki korelasyon Şekil 4.10’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Meme kanseri hastalarında lncRNA-GAS5 ve APOBE3C geni ifadenmelerinin korelasyon analizi.

Son zamanlarda, GAS5' in miR-103' e bağlandığı online biyoinformatik analizlerle tahmin edilmektedir [Şekil 4.11a] [4]. Bu çalışmada, meme kanserli hasta dokularında ve sağlıklı kontrol dokularında miR-103 ifadenmesi analiz edilmiştir. Ve miR-103' ün meme kanseri hastalarının dokularında önemli seviyede aşırı düzenlendiği tespit edilmiştir [Şekil 4.9]. Ek olarak, yapılan korelasyon analizi sonucunda GAS5 ve miR-103 arasında negatif bir korelasyon varlığı gözlenmiştir [Şekil 4.11].



Şekil 4.11 LncRNA-GAS5, miR-103 ifadenmesini bastırmıştır. a] LncRNA-GAS5 ve miR-103 kombinasyonunun biyoinformatik analizi [4] b] LncRNA-GAS5 ve miR-103 ifadenmesinin meme kanseri hastalarında korelasyon analizi.

4.3 Mutasyon Tarama Sonuçları

APOBEC3C geninin mRNA dizisi taranmıştır. Bu çalışma farklı genotipleri bulmak için yapılmıştır. *APOBEC3C* geninin kodlanmayan bölgeler dışındaki kodlanan dizisi nükleotid dizileme ile taranmıştır [Şekil 4.12].

APOBEC3C geni DNA dizisi NCBI internet sitesinden elde edilmiştir ve bu referans dizi ile meme tümörlerinin DNA dizileri [şüpheli dizi] karşılaştırılmıştır.

```

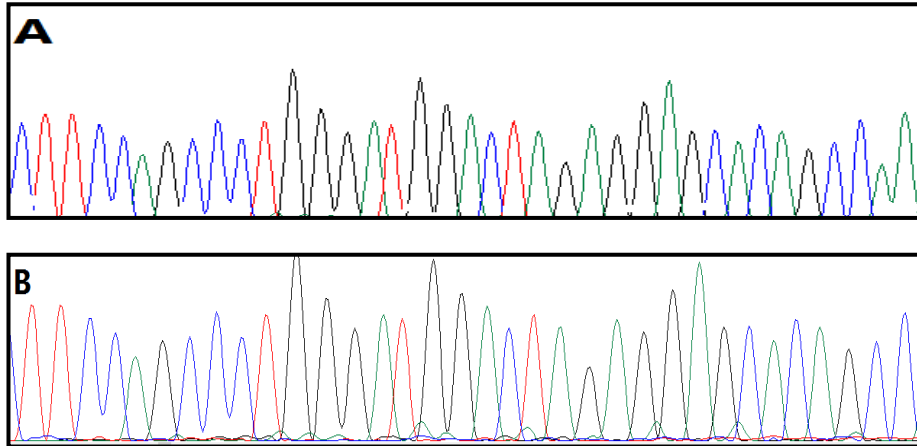
1 ttaaagaggg ctgctcaact gcaaggacgc tgtaagcagg aagagaagcc acagcgcttc
61 agaaaagagt gggacagggg caagcatatc taagaggctg aacatgaatc cacagatcag
121 aaacccgatg aaggcaatgt atccaggcac attctacttc caatttaaaa acctatggga
181 agccaacgat cggaacgaaa cttggctgtg cttaccctg gaaggataa agcgccgctc
241 agttgtctcc tgggaagacgg gcgtcttccg aaaccagggtg gattctgaga cccattgtca
301 tgcagaaagg tgcttctct cttggttctg cgacgacata ctgtctcta acacaaagta
361 ccaggtcacc tggtagacat cttggagccc ttgccagac tggcagggg aggtggccga
421 gttcctggcc aggcacagca acgtgaatct caccatctc accgcccgc tctactactt
481 ccagtatcca tgttaccagg aggggctccg cagcctgagt caggaagggg tcgctgtgga
541 gatcatggac tatgaagatt taaatattg ttgggaaaac tttgtgtaca atgataatga
601 gccattcaag cttggaagg gattaaaaac caactttcga cttctgaaaa gaaggctacg
661 ggagagtctc cagtgaaggg tctccctggg cctcatggtc tgtctctct agcctcctgc
721 tcatgctgca cgggcctccc ctccaccctg gaccgctct gttctgctt ggctatcctg
781 agccccctct ggcctcaggg ccattccaca gtgctccct gcctcaccg ttctctctg
841 ctcttccaga ctcttctgc agaggctct ttctgcctc atggctatc atccccccc
901 acagaccccg ttctccagc ctgctgccc ctaacctggc ttttccatc tccccagcat
961 aaccaaact tactaaact atcctaggct gggcatgggt actcagcct gtaatcccc
1021 agcaatttgg gaggcaaagg tgggagaatc gcgtgagccc aggagtcca gaccaggctg
1081 ggtcacatga caaagcccca tctctacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

Şekil 4.12 *APOBEC3C* geni mRNA dizisi, kodlanan bölge kahverengi ile boyanmıştır.

4.3.1 *APOBEC3C* Mutasyon Sonuçları

APOBEC3C geni DNA dizisi NCBI internet sitesinden elde edilmiş olup hasta örneklerinin DNA dizisi [şüpheli dizi] ile karşılaştırmak için referans dizi olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte referans dizi ile karşılaştırıldıktan sonra 20 hedef bölge için PCR kalıp dizilerinde bir değişim bulunamamıştır [GenBank dizi]. Şekil 4.13’ de herhangi bir değişim olmayan kısmi dizileme sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.13 *APOBEC3C* geni kısmi dizileme sonuçları. A] *APOBEC3C* geni normal örnekte dizileme ile analiz edilmiştir B] *APOBEC3C* geni tümör örneklerinde dizileme ile analiz edilmiştir, mutasyon [değişim] bulunmamıştır.

BÖLÜM V

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada miR-103 ifadenme ölçümü yoluyla RT-qPCR kullanılarak meme kanseri hastalarında lncRNA-GAS5 ve onun hedef geni *APOBEC3C* ifadenme seviyeleri araştırılmıştır. Daha sonra lncRNA-GAS5 ve miR-103 arasındaki etkileşim çalışılmıştır. Ek olarak muhtemel mutasyonları bulmak için genetik analizleyici ile *APOBEC3C* mRNA dizisinin kodlanan bölgesi tarandı. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen, malign olabilen meme dokusundan köken alan karmaşık ve heterojen bir tümördür [29,38]. Meme kanseri ile ilgili yapılan birçok moleküler çalışma bir ya da iki önemli karakteristik özelliğe odaklanmıştır; mRNA ifadenme profili ya da DNA kopya sayısı dizi analizi [83].

Protein kodlama dünyası sadece olayın bir yönünü sunar ve son zamanlarda meme kanseri biyolojisinde yeni faktörlerin ve kavramların bulunması için muazzam bir çaba ve atılımlar yapılmaktadır. Çeşitli kodlanmayan RNA'ların [miRNA'lar] gen hedefleyen sinyal yollarında ve meme karsinogenezinde rol aldığı gözlenmiştir [63]. Bazı miRNA'lar diğer genleri düzenleyerek dolaylı yoldan spesifik hedef genleri etkilemektedir, örneğin; onkomiR olan mir221/222 apoptozun aşırı düzenlenen modülatörü p53'ü baskılayarak meme kanseri proliferasyonunu teşvik etmektedir [3]. miR21 meme kanserinde p53 düzenleyici genlerin ifadenmesini inhibe ederek p53 yolağına zıt olarak çalışır [3]. miR125b, miR375 ve miR504 gibi miRNA'ların başka bir sınıfı p53 mRNA'sını doğrudan hedefler ve p53 ifadenmesini olumsuz yönde düzenler [3]. Yukarıda belirtildiği gibi kodlanmayan RNA'lar çeşitli kanserlerde sıklıkla yeniden düzenlendiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Aynı zamanda, meme kanseri dokularında normal dokularla karşılaştırıldığında çok sayıda lncRNA'nın farklı ifadenme örneği gösterdiği belirtilmiştir [63]. Örneğin, Yang ve ark.

[2016] yeni nesil dizileme kullanarak meme kanserinin HER-2 zenginleştirilmiş alt türünde anormal ifadenme gösteren 1300' den fazla lncRNA tanımlamıştır [85]. Aynı zamanda Shen ve ark. [2015], üçlü negatif meme kanserinde [TNBC] farklı ifadelenen 1750' den fazla lncRNA tespit etmişlerdir [86]. Bu sonuçlar açıkça lncRNA' ların anormal ifadenme modellerinin meme kanseri karsinogenezinde önemli ve sıklıkla küçümsenen bir rol oynadığını göstermektedir.

İnsan genomunda APOBEC ailesi toplamda 11 gen içermektedir [68]. Zn⁺² –bağımlı DNA sitozin deaminaz kodladıkları bilinmektedir [68,69]. Bu 11 üyenin yedisi, apolipoprotein B mRNA düzenleyici enzim, katalitik polipeptid –benzeri 3 genleri [*APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOB EC3G*, ve *APOBEC3H*] 22. kromozom üzerinde ardışık yerleşmişlerdir [68,70]. *APOBEC1*, *APOBEC2*, *APOBEC4* ve aktivasyon-indükleyici sitidin deaminaz [AICDA] olan diğer dört üye ise başka kromozomlar üzerinde yerleşmiştir [71]. APOBEC ailesi proteinleri DNA sitozin deaminaz domainlerinin farklı sınıflarını ve farklı doku ifadenme profilleri gösterir [68], ki bu da çeşitli biyolojik işlevlere sahip olabileceklerini göstermektedir [68]. Örneğin, *APOBEC* proteinleri virüs replikasyonu sınırlamasında ve LINE-1 retrotranspozisyonun inhibisyonunda farklı aktiviteler gösterir [68]. Son çalışmalar *APOBEC3B*' nin çeşitli tümörlerde artan ifadenmesini göstermektedir [68,69,70]. Aynı zamanda, kanser örneklerinde *APOBEC3B* mRNA seviyelerinde somatik baz yerdeğiştirme mutasyonunun güçlü bir korelasyonu, *APOBEC3B*' nin C' den T' e somatik mutasyonu indükleyen enzimatik bir kaynak olduğunu göstermiştir [68]. Bununla birlikte meme kanseri alttüplerinde farklı mutasyon örnekleri ve genomik değişimler rapor edilmiştir [68], bu da APOBEC aracılı mutajenezin ve APOBEC ailesi ifadenmesinin kanser alttüplerinde farklı olabileceği anlamına gelmektedir [68].

Bu çalışmada *APOBEC3C* ifadenme seviyesi Şekil 4.2 ve 4.3' de gösterildiği gibi azalmıştır ve T-testi yapılarak istatistiksel olarak yüksek seviyede önemli bulunmuştur [p > 0,05]. Yanfeng ve ark. [2015], *APOBEC3C* seviyesinin azalmış olduğunu rapor etmişlerdir. Birçok ifadenme profil araştırmaları meme kanserinin histolojik alt türlerini ayırdetmek için potansiyel gen ifadenme modellerini önermektedir [68]. Gen ifadenme analizi birçok özel tanımlayıcı belirteç göstermektedir. Bizim

ifadelenme analizlerimiz *APOBEC3C* ifadelenme örneklerinin meme kanseri dokuları ve klinik sonuçlarla korelasyon gösterdiğini önermektedir. Bu da diğer APOBEC ailesi genlerinin meme kanseri alttürlerinde ifadelenme anomalilerine ve klinik sonuçlara katkı sağlayabileceği ek çıkarımlar sağlamaktadır.

DNA hipermetilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlanmayan RNA' lar gibi epigenetik faktörler genlerin ifadelenme değişimine yol açan ana faktörlerdir. Özellikle öncü dizideki DNA hipermetilasyonu düşük ifadelenme seviyesine yol açan ana etmenlerden biridir [87]. Zhang ve ark. [2014] tarafından meme kanseri hücre hatlarında APOBEC aile üyelerinin aktivasyon ve inaktivasyonunun epigenetik profilleri tespit edilmiştir [87]. Yapılan bu çalışmanın sonucuna göre normal meme epitel hücresi hatları ile karşılaştırıldığında *APOBEC3C* geni düşük ifadelenme gösterirken diğer APOBEC üyeleri meme kanseri hücre hatlarında ifadelenmemiş ya da baskılanmıştır [87]. Zhang ve ark. [2014]' nin H3K4me3, H3K27ac ve H3K36me3 içeren 74 epigenetik belirtecin aktifleştirildiği bu çalışmalarında ER+ ve ER- meme kanseri hücre hatlarında *APOBEC3* genleri gözlenmiştir. Ek olarak tüm diğer APOBEC aile üyeleri ER-hücre hattında öncü dizilerinde DNA hipermetilasyonu göstermiştir. Bu da onların ifadelenmemesine ya da baskılanmasına katkı sağlayabilir [87]. Sonuç olarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu meme kanseri hücre hatlarında APOBEC aile üyelerinin gen ifadelenme modellerini düzenleyebilmektedir [87]. Ayrıca hücre hatlarının mikroçevresinin genlerin ifadelenme seviyesini etkilediği Leonard ve ark. [2013] tarafından yumurtalık kanserlerinde *APOBEC3B* mRNA ifadelenmesinin değişkenlik gösterdiği bulunarak desteklenmiştir [87]. Bununla birlikte, normal yumurtalık dokusu ile karşılaştırıldığında *APOBEC3B* önemli derecede aşırı düzenlenmiştir [87]. Ek olarak, *APOBEC3C* normal yumurtalık dokularıyla karşılaştırıldığında tümör dokularda düşük seviyelerde bulunmuştur ya da en sonunda tümörlerden gelişen hücrelerde çok az ifadeleniği tespit edilmiştir [88]. Bu faktör tümör gelişimi sırasında meydana gelen mikroçevre değişimlerinden etkilenmiştir [88]. Ayrıca, kodlanmayan RNA' ların hücre döngüsü ve apoptoz kontrolünde merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir; bazıları onkogen olarak tanımlanmışken bir kısmı tümör baskılayıcı gen olarak rol

oynayabilmektedir [63]. Hedef genlerin ifadenmesini transkripsiyonel baskılama ya da transkripsiyon sonrası susturma yoluyla düzenlemektedirler.

Bu çalışmada lncRNA-*GAS5*' in ifadenme seviyesi Şekil 4.5 ve 4.6' da gösterildiği gibi azalmıştır ve istatistiksel olarak yüksek derecede önemli olduğu T-testi yapılarak doğrulanmıştır [$p > 0,05$]. İnsan kanserlerinde *GAS5*' in rolü ilk kez meme kanserinde çalışılmıştır. 2009 yılında Mourtada-Maarabouni ve ark. *GAS5*' in meme kanseri dokularında baskılandığını rapor etmişlerdir [72]. Genel olarak *GAS5* çeşitli kanser türlerinde baskılanmış olarak bulunmuştur ve düşük ifadenme seviyesi kanser hastalarında sıklıkla kötü prognozun belirteci olmuştur [58-60]. Ayrıca meme kanser hücrelerini de içeren farklı hücre türlerinde *GAS5*, hücre proliferasyonunu ve /veya apoptozu teşvik ettiği ve tümör baskılayıcı role sahip olduğu ise meme tümör büyümesinin inhibisyonunu teşvik etmesiyle gösterilmiştir [58, 63]. Li ve ark. [2016], trastuzumaba dirençli SKBR-3/Tr hücrelerinde ve trastuzumab tedavisi alan hastalardan elde edilen meme kanseri dokularında *GAS5* seviyesinin azaldığını bulmuşlardır [73]. *GAS5* baskılanması in vivo hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini artırmıştır ve *GAS5*' in düşük seviyesi histolojik derece ve ileri TNM evreleri ile ilişkili bulunmuştur [58, 63]. Bu, *GAS5*' in trastuzumab tarafından azaltıldığını ve trastuzumaba dirençli meme kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını göstermiştir [58, 63]. Bizim çalışmamızda bulunan *GAS5*' in azalan ifadenme sonucu daha önce yapılan tüm çalışmalarla uyumludur.

Son zamanlarda çeşitli mikroRNA' ların [miRNAlar] hedef gen ifadenmesini baskılayarak tümörleşmeyi ya da metabolik hastalıkları teşvik ettiği tespit edilmiştir [48]. Bunların arasında miR-103' ün hedef genlerinin ifadenmesini baskılayarak kolorektal kanseri teşvik ettiği bulunmuştur [4]. Boren ve ark. [2008] ve Chung ve ark.[2009] endometrial kanserde miR-103 aşırı ifadenmesini ilk kez tanımlamışlardır [76, 78]. Ayrıca Dongqi Yu ve ark. endometrial kanser hücre hatlarında miR-103' ün *TIMP-3* tümör baskılayıcı genin ifadenmesini transkripsiyon sonrası aşamada baskılayarak büyüme ve invazyonunu uyardığını bildirmişlerdir [79]. Bu çalışmada miR-103 ifadenme seviyesi artmıştır ve yapılan T-testi sonucu istatistiksel olarak yüksek derecede önemli bulunmuştur [$p > 0,05$]. Bizim sonuçlarımız Jeremy ve ark. [2016]' nın meme kanseri hastalarında miR-103a-

3p ifadelenmesinin aşırı düzenlendiğini bulduğu çalışma ile benzerlik göstermektedir [80]. Daha önceki çalışmalara göre mir-103' ün kanserde bir tümör baskılayıcıdan çok bir onkomiR olarak rol oynadığı gösterilmiştir [80]. Meme kanseri ile ilişkili miR-103' ün aşırı ifadelenmesi metastaz, tümör nüksü ve kötü netice ile ilişkilendirilmiştir [80]. Başka bir açıdan bir meme kanseri çalışmasında miR-103' ün üçlü negatif meme kanserinde kanser kök hücre oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur.

Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerinde *GAS5*' in baskılandığı bulunmuştur. Ek olarak, *APOBEC3C* ifadelenmesinin de baskılandığı gösterilmiştir. Güncel online biyoinformatik tahminlere göre *GAS5*, miR-103' e bağlanmaktadır [4]. *GAS5* plazmidi ya da si-*GAS5*' in kanser hücrelerine transfeksiyonu yoluyla miR-103 mRNA seviyesi önemli derecede sırasıyla azaltılıp artırılmıştır [4]. Meme kanseri hücrelerinde *GAS5* ifadesinin azaldığı sırada miR-103' ün *APOBEC3C* mRNA seviyesini azalttığını bulduk.

Bu çalışmada *APOBEC3C* geninin kodlanan dizi bölgesi nükleotid dizileme analizi ile analiz edilmiştir. Bununla birlikte, daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak kodlanan bölgede herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Yanfeng ve ark. [2015] *APOBEC3C* ifadelenme seviyesi ile her ekzondaki mutasyonlar arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmiştir [68].

Sonuç olarak, meme kanseri hastalarında *APOBEC3C* ve lncRNA-*GAS5* ifadelenme seviyelerinde önemli derecede azalış ve miRNA 103 ifadelenme seviyesinde ise önemli derecede artış tespit edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde *APOBEC3C* ve lncRNA-*GAS5* arasında pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir. *GAS5* ifadelenmesindeki değişimler meme kanseri tedavisi için potansiyel terapötik bir hedef sunabilmektedir. Meme tümörleri ve biyobelirteçleri arasındaki ilişkiyi anlamak için daha fazla analiz yapıp doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Dang, C.V. [1999]. C-Myc Target Genes Involved In Cell Growth, Apoptosis, And Metabolism, *Molecular Cell Biology*, **19**:1-11.
- [2]. Rozhgar, A.K, Ari, Q.N., Nadhum, J.I. [2016]. PCR- Based Quantification Of Exon 21 In BRCA2 Gene In Breast Cancer Patients In Erbil Province, *Zanko Journal Of Pure And Applied Science*, **28**; 94-97.
- [3]. Rozhgar, A.K., Al-Attar, M., Amer, A.H. [2017]. Association Of P53 Gene Expression Alteration Among Breast Cancer Patients In Erbil Province, *Cukurova Medical Journal*, **42**: 205-209.
- [4]. Chen, G., Wei-Qi, S., Ping, S., Lian, J., Hong-Yan, D. [2015]. Lncrna-GAS5 Induces *PTEN* Expression Through Inhibiting Mir-103 In Endometrial Cancer Cells, *Journal Of Biomedical Science*, **22**:100.
- [5]. Wang, X., Wu, X., Yan, L., Shao, J. (2012). Serum Mir-103 As A Potential Diagnostic Biomarker For Breast Cancer, *Journal South Medical University*, **5**: 0631-04.
- [6]. National Centre Of Biotechnology Information. Avialable At: [Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/21508357](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508357) 01/10/2012 23: 02. Accessed 02. 04.2018.
- [7]. ACS. American Cancer Society. [2015] *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society.

- [8]. Litwin, M.S. [2007]. Urologic Diseases In America. 4th Edition. Washington: NIH Publication.
- [9]. Donald J. Abraham. [2003]. Burger's Medicinal Chemistry And Drug Discovery. 6th edition. German: Wiley.
- [10]. Agarwal, N. [2011]. Herbal Medicine: Alternative Treatment For Cancer Therapy, International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research, **2[9]**: 2249-2258.
- [11]. Breastcancer. Avialable At: [Org.Http://Www.Breast. Org.Au/ Kidney cancer /Tab-Id/799/Default.aspx](http://www.breast.org.au/Kidney%20cancer/Tab-Id/799/Default.aspx). Accessed 23. 04.2018.
- [12]. Craig A. Almeida, Sheila A. Barry. [2010]. Cancer: Basic Science And Clinical Aspects. 1st edition. Wiley-Blackwell.
- [13]. Pietrasa, K. [2010]. Hallmarks Of Cancer: Interactions With The Tumor Stroma, Experimental Cell Research, **316**: 1324-1331.
- [14]. Hanahan, D., Weinberg, RA. [2011]. Hallmarks Of Cancer: The Next Generation, Cell, **144**: 646-674.
- [15]. Gutschner, T., Diederichs, S. [2012]. The Hallmarks Of Cancer, *Landes Bioscience* **9**: 703-719.
- [16]. Stemmer, K. [2008]. Molecular Characteristics Of Kidney Cancer. Phd Thesis. Biology, Der Universität Konstanz.
- [17]. Cassidy, J., Bisset, D., Roy, A.J. [2006]. Oncology. 2nd Edition New York: Oxford.

- [18]. Junker, K., Ficarra, V., Kwon, E.D., Leibovich, B., Thompson, R.H., Oosterwijk, E. [2013]. Potential Role Of Genetic Markers In The Management Of Kidney Cancer, *European Urology*, **63**: 333-340.
- [19]. Hardy, T.M., Tollefsbol, T.O. [2011]. Epigenetic Diet: Impact On The Epigenome And Cancer, *Epigenomics*, **3**[4]: 503-518.
- [20]. Sterner, D.E., Shelley, L. [2000]. Berger. Acetylation Of Histones And Transcription-Related Factors, *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **64**: 435-459.
- [21]. Kamini, S., Reena, V.K., Subbaya, S. [2013]. Micrnas As Biomarkers In Cancer, *Diagnostics*, **3**:84-104.
- [22]. George, G.P., Mittal, R.D. [2010]. Micrnas: Potential Biomarkers In Cancer, *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, **25**:4-14.
- [23]. Golan, H., Srebrnik, A., Morentin, H. M., Wohl, Y., Brenner, S. [2005]. The Normal And Abnormal Breast, *Sexuality, Reproduction And Menopause*, **3**: 31-36.
- [24]. Schaefer, L., Blouse, A., McIntosh, N. [2002]. Resource Collection: Guidelines For Performing Breast And Pelvic Examinations Learning Resource Package Training Material, *International Journal Of Gynecology & Obstetrics*, **129**: 45-52.
- [25]. [Http://Www.Cancer.Gov/Cancertopics/Pdq/Treatment/Breast/Patient/Page2](http://Www.Cancer.Gov/Cancertopics/Pdq/Treatment/Breast/Patient/Page2).
- [26]. [Http://Www.Bcerc.Org/Index.Htm](http://Www.Bcerc.Org/Index.Htm). Accessed 23. 04.2018.
- [27]. Ellis, H., Mahadevan, V. [2013].Anatomy And Physiology Of The Breast, *Surgery-Oxford International Edition*, **31**:11-4.

- [28]. Hassiotou, F., Geddes, D. [2013]. Anatomy Of The Human Mammary Gland: Current Status Of Knowledge, *Clinical Anatomy*, **26**: 29-48.
- [29]. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive Molecular Portraits Of Human Breast Tumors, *Nature*, **4**: 61-70.
- [30]. WHOC. World Health Organization Cancer. Fact Sheet N°297. WHO Media Centre.[2015]. At: [Http://Www.Who.Int/Mediacentre/Factsheets/Fs297/En/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/).
- [31]. Abdulkareem, I.H. [2013]. A Review On Aetio-Pathogenesis Of Breast Cancer, *Journal Of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, **22**: 142.
- [32]. Mcpherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. [2000]. ABC Of Breast Diseases Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, And Genetics, *British Medical Journal*, **9**:624-628.
- [33]. Başaran, B.B., Güler, M.R.K, Eryılmaz, Z., Yentür, G. K.,Pulgat, E. [2015]. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2014. Ankara: Sentez Matbaacılık Ve Yayıncılık.
- [34]. Leong, A.S., Zhuang, Z. [2011]. The Changing Role Of Pathology In Breast Cancer Diagnosis And Treatment, *Pathobiology*, **78**[2]:99-114.
- [35]. Virnig, B. A., Tuttle, T. M., Shamliyan, T., & Kane, R. L. [2010]. Ductal Carcinoma In Situ Of The Breast: A Systematic Review Of Incidence, Treatment, And Outcomes, *Journal Of The National Cancer Institute*, **102**[3]: 170-178.
- [36]. Eheman, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., White, M.C. [2009]. The Changing Incidence Of In Situ And Invasive Ductal And

Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **18**[6]:1763-9.

- [37]. Weinberg, R. [2013]. *The Biology Of Cancer*. Garland Science; 2013 May 14.
- [38]. Shiovitz, S., Korde, L.A. [2015]. Genetics Of Breast Cancer: A Topic In Evolution, *Annals Of Oncology: Official Journal Of The European Society For Medical Oncology/ESMO*, **26**[7]:1291.
- [39]. Selvi, R.. [2015]. Invasive Lobular Carcinoma. *Inbreast Diseases*. Pp. 281-286. Springer India.
- [40]. Types Of Breast Cancer. Reproduced With Permission From The National Breast Cancer Centre. Date Of Access: 18.10.2013. [Http://:Www.Nbcc.Org.Au](http://www.nbcc.org.au) [P.38].
- [41]. Sarkar, S., Mandal, M. [2011] *Breast Cancer: Classification Based On Molecular Etiology Influencing Prognosis And Prediction*. Intech Open Access Publisher.
- [42]. Penault-Llorca, F., Viale, G. [2012]. Pathological And Molecular Diagnosis Of Triple-Negative Breast Cancer: A Clinical Perspective, *Annals Of Oncology*, **23**: 19-22.
- [43]. Ostad, S.N., Parsa, M. [2011]. *Breast Cancer From Molecular Point Of View: Pathogenesis And Biomarkers*. 3rd edition. Intech Open Access Publisher.
- [44]. Hanahan, D., Weinberg, R.A. [2011]. Hallmarks Of Cancer: The Next Generation, *Cell*, **144**[5]: 646-74.

- [45]. Singletary, S.E., Connolly, J.L. [2006]. Breast Cancer Staging: Working With The Sixth Edition Of The AJCC Cancer Staging Manual, *A Cancer Journal For Clinicians*, **56**[1]: 37-47.
- [46]. Cancer Research UK. [2014]. TNM Breast Cancer Staging. Date Of Access: 30/02/2018. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/treatment/tnm-breast-cancer-staging#ogrzmq7hm48feq5.99jul30>.
- [47]. Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., Navaratnam, N. [2002]. An Anthropoid-Specific Locus Of Orphan C To U RNA-Editing Enzymes On Chromosome 22, *Genomics*, **79**[3]: 285.
- [48]. Shandilya, S., Bohn, M.F., Schiffer, C.A. [2014]. A Computational Analysis Of The Structural Determinants Of *APOBEC3*'s Catalytic Activity And Vulnerability To HIV-1 Vif, *Virology*, 471.
- [49]. Neuberger, M.S., Harris, R.S., Di Noia, J., Petersen-Mahrt, S.K. [2003]. Immunity Through DNA Deamination, *Trends In Biochemical Sciences*, **28**[6]:305.
- [50]. Bernstein, C., Prasad, A.R., Nfonsam, V., Bernstein, H. [2010] DNA Damage, DNA Repair And Cancer. 4th Edition. Wiley.
- [51]. Refsland, E.W., Stenglein, M.D., Shindo, K., Albin, J.S., Brown, W.L., Harris, R.S. [2011]. Quantitative Profiling Of The Full *APOBEC3* Mrna Repertoire In Lymphocytes And Tissues: Implications For HIV-1 Restriction. *Nucleic Acids Research*. **38**[13]: 4274-84.
- [52]. Nilsen, H., Haushalter, K.A., Robins, P., Barnes, D.E., Verdine, G.L., Lindahl, T. [2001]. Excision Of Deaminated Cytosine From The Vertebrate

Genome: Role Of The SMUG1 Uracil–DNA Glycosylase. *The EMBO Journal*. **20**[15]: 4278-4286.

- [53]. Larue, R.S., Andrésdóttir, V., Blanchard, Y., Conticello, S.G., Derse, D., Emerman, M., Greene, W.C., Jónsson, S.R., Landau, N.R., Löchelt, M., Malik, H.S. [2009]. Guidelines For Naming Nonprimate *APOBEC3* Genes And Proteins, *Journal Of Virology*, **83**[2]: 494.
- [54]. Shandilya, S., Nalam, M.N., Nalivaika, E.A., Gross, P.J., Valesano, J.C., Shindo, K., Li, M., Munson, M., Royer, W.E., Harjes, E., Kono, T. [2010]. Crystal Structure Of The *APOBEC3G* Catalytic Domain Reveals Potential Oligomerization Interfaces, *Structure*, **18**[1]: 28-38.
- [55]. Shandilya S, Bohn MF, Schiffer CA. [2015]. A Computational Analysis Of The Structural Determinants Of *APOBEC3*'s Catalytic Activity And Vulnerability To HIV-1 Vif, *Virology*, **34**: 105-116.
- [56]. [Http://Www.Genecards.Org/Cgi-Bin/Carddisp.Pl?Gene=MACC1AS1&Search = Macc1](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MACC1AS1&search=Macc1) 03-08-2012 14:30. Accessed In 01.05.2018.
- [57]. Aliaksandr AY, Igor VK. [2015]. Long Non Coding Rnas: Apotential Novel Class Of Cancer Biomarkers, *Frontiers In Genetics*, **6**:1-10.
- [58]. XIN YU And ZHENG LI1. [2015]. Long Non-Coding RNA Growth Arrest-Specific Transcript 5 In Tumor Biology [Review], *Oncology Letters*, **10**: 1953-1958.
- [59]. Coccia, E.M., Cicala, C., Charlesworth, A. [1992]. Regulation And Expression Of A Growth Arrest-Specific Gene [*GAS5*] During Growth, Differentiation And Development, *Molecular And Cellular Biology*, **12**: 3514-3521.

- [60]. Fleming, J.V, Fontanier, N., Harries, D.N., Rees, W.D. [1997]. The Growth Arrest Genes *GAS5*, *Gas6* And *CHOP-10* [Gadd153] Are Expressed In The Mouse Preimplantation Embryo, *Molecular Reproduction And Development*, **48**: 310-316.
- [61]. Tcherkezian, J., Cargnello, M., Romeo, Y. [2014]. Proteomic Analysis Of Cap-Dependent Translation Identifies LARP1 As A Key Regulator Of 5'TOP Mrna Translation. *Genes And Development*. **28**: 357-371.
- [62]. Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., Chrousos, G.P. [2010]. Noncoding RNA *GAS5* Is A Growth Arrest-And Starvation-Associated Repressor Of The Glucocorticoid Receptor, *Science Signaling*, **3**: 34-41.
- [63]. Cerk, S., Schwarzenbacher, D., Adiprasito, JB. [2016]. Current Status Of Long Non-Coding Rnas In Human Breast Cancer, *International Journal Of Molecular Sciences*, **17**: 1485-1505.
- [64]. Pickard, M.R., Williams, G.T. [2015]. Molecular And Cellular Mechanisms Of Action Of Tumour Suppressor *GAS5* Lncrna, *Genes*, **6**: 484-499.
- [65]. Zhao, Y., Srivastava, D. [2007]. A Developmental View Of MicroRNA Function, *Trends In Biochemical Sciences*, **32**: 189-197.
- [66]. Weining, Y., Daniel, Y.L., Yaacov, B.D. [2011]. The Roles Of Micromnas In Tumorigenesis And Angiogenesis, *International Journal Of Physiology, Pathophysiology And Pharmacology*, **3**:140-155.
- [67]. Rebhand, S., Huemer, M., Greil, R., Geisberger, R. [2015]. AID/APOBEC Deaminases And Cancer, *Oncoscience*, **2**: 320-333.

- [68]. Zhang, Y., Delahanty, R., Guo, X., Zheng, W., Long, J. [2015]. Integrative Genomic Analysis Reveals Functional Diversification Of APOBEC Gene Family In Breast Cancer, *Human Genomics*, **9**:34.
- [69]. Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. [2002]. An Anthropoid-Specific Locus Of Orphan C To U RNA-Editing Enzymes On Chromosome 22, *Genomics*, **79**[3]: 285-96.
- [70]. Rogozin, I.B., Basu, M.K., Jordan, I.K., Pavlov, Y.I., Koonin, E.V. [2005]. APOBEC4, A New Member Of The AID/APOBEC Family Of Polynucleotide [Deoxy]Cytidine Deaminases Predicted By Computational Analysis, *Cell Cycle*, **4**[9]: 1281-1285.
- [71]. Sato, Y., Probst, H.C., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Neuberger, M.S., Rada, C. [2010]. Deficiency Inapobec2 Leads To A Shift In Muscle Fiber Type, Diminished Body Mass, And Myopathy, *The Journal Of Biological Chemistry*, **285**[10]: 7111–7118.
- [72]. Mourtada-Maarabouni, M.; Pickard, M.R.; Hedge, V.L.; Farzaneh, F.; Williams, G.T. [2009]. GAS5, A Non-Protein-coding RNA, Controls Apoptosis And Is Downregulated In Breast Cancer, *Oncogene*, **28**: 195–208.
- [73]. Li, W.; Zhai, L.; Wang, H.; Liu, C.; Zhang, J.; Chen, W.; Wei, Q. [2016]. Downregulation Of Lncrna GAS5 Causes Trastuzumab Resistance In Breast Cancer, *Oncotarget*, **7**: 27778–27786.
- [74]. Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P. [2012]. The Functions And Regulation Of The PTEN Tumour Suppressor, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**[5]: 283-296.

- [75]. Geng, L., Sun, B., Gao, B., Wang, Z., Quan, C., Wei, F. [2014]. MicroRNA-103 Promotes Colorectal Cancer By Targeting Tumor Suppressor DICER And PTEN, *International Journal Of Molecular Sciences*, **15**[5]: 8458-8472.
- [76]. Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Wei, Z. [2008]. MicRNAs And Their Target Messenger RNAs Associated With Endometrial Carcinogenesis, *Gynecologic Oncology*, **110**[2]:206-215.
- [77]. Chen, HY., Lin, YM., Chung, HC., Lang, YD., Lin, CJ., Huang, J. [2012]. Mir-103/ 107 Promote Metastasis Of Colorectal Cancer By Targeting The Metastasis Suppressors DAPK And KLF4, *Cancer Research*, **72**[14]:3631-3641.
- [78]. Chung, TK., Cheung, TH., Huen, NY., Wong, KW., Lo, KW., Yim, SF. [2009]. Dysregulated MicRNAs And Their Predicted Targets Associated With Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma In Hong Kong Women, *International Journal Of Cancer*, **124**[6]:1358-1365.
- [79]. Yu D, Zhou H, Xun Q, Xu X, Ling J, Hu Y. [2012]. MicroRNA-103 Regulates The Growth And Invasion Of Endometrial Cancer Cells Through The Downregulation Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 3, *Oncology Letters*, **3**:1221-1226.
- [80]. Jeremy, TH., Chang, F., Wang, WC., Huang RS. [2016] Identification Of MicRNAs As Breast Cancer Prognosis Markers Through The Cancer Genome Atlas, *Plos One*, **11**: 1-13.
- [81]. Glare, MDEM., Bailey, J., Walters, EH. [2013]. B-Actin And GAPDH Housekeeping Gene Expression In Asthmatic Airways Is Variable And Not Suitable For Normalising Mrna Levels, *Thorax*, **57**: 765 - 770.

- [82]. Brown, TA. [2010]. Gene Cloning And DNA Analysis. Sixth Ed: Wiley Blackwell.
- [83]. Rivenbark, AG., O'Connor, SM., Coleman, WB. [2013]. Molecular And Cellular Heterogeneity In Breast Cancer: Challenges For Personalized Medicine, *American Journal Of Pathology*, **183**:1113-24.
- [84]. Ling, H., Vincent, K., Pichler, M., Fodde, R., Berindan-Neagoe, I., Slack, F.J., Calin, G.A. [2015]. Junk DNA And The Long Non-Coding RNA Twist In Cancer Genetics, *Oncogene*, **34**: 5003–5011.
- [85]. Yang, F., Lyu, S., Dong, S., Liu, Y., Zhang, X., Wang, O. [2016] Expression Profile Analysis Of Long Noncoding RNA In HER-2-Enriched Subtype Breast Cancer By Next-Generation Sequencing And Bioinformatics, *Oncotargets And Therapy*, **9**: 761-772.
- [86]. Shen, X.; Xie, B.; Ma, Z.; Yu, W.; Wang, W.; Xu, D.; Yan, X.; Chen, B.; Yu, L.; Li, J. [2015]. Identification Of Novel Long Non-Coding Rnas In Triple-Negative Breast Cancer, *Oncotarget*, **6**: 21730–21739.
- [87]. Zhang, Y., Delahanty, R., Guo, X., Zheng, W., Long, J. [2014]. Integrative Genomic Analysis Reveals Functional Diversification Of APOBEC Gene Family In Breast Cancer, *Human Genomics*, **9**:34-46.
- [88]. Leonard, B., Hart, S.N., Burns, M.B., Carpenter, M.A, Temiz, N.A, Rathore, A, Vogel, R.I., Nikas, J.B., Law, E.K., Brown, W.L., Li, Y. [2013]. *APOBEC3B* Upregulation And Genomic Mutation Patterns In Serous Ovarian Carcinoma, *Cancer Research*, **73**: 7222-7231.