

**ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE SİKLİN E1 GENİ AŞIRI İFADESİNİN
ROLÜ**

Nigar Pelin MAKAS

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz ALANYALI

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Nisan 2021

ÖZET

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE SİKLİN E1 GENİ AŞIRI İFADESİNİN ROLÜ

Nigar Pelin MAKAS

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Nisan 2021

Danışman: Doç. Dr. Filiz ALANYALI

Üçlü negatif meme kanseri (TNMK), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) ekspresyonundan yoksun, en agresif meme kanseri alt tipidir. Bazaloid yapıya sahip olmasına rağmen bazal meme kanserinden % 20-30 farklıdır. Diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında, kemoterapi TNMK' leri tedavi etmek için kullanılan ana yöntemdir. TNMK alt tipine özel, hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tedavi programı bulunmamaktadır. Siklin E1 (CCNE1), katalitik alt birimi Siklin bağlı kinaz-2 (CDK2) ile birlikte hücre döngüsü regülasyonunda, DNA replikasyonunda, kromozom segregasyonunda ve G1'den S-fazına geçişte kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada CCNE1 geni, mRNA ve protein seviyesinde, TNMK, diğer alt tip meme kanserleriyle istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. CCNE1 ifadesi, istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, CCNE1 geninin, diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla TNBC' de istatistiksel olarak yüksek mRNA ekspresyonu ve protein seviyeleri ile potansiyel bir tedavi hedefi ve hastalık prognozu biyobelirteci olabileceğini gösterdik.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, TNMK, Üçlü negatif meme kanseri, Biyobelirteç, CCNE1, Siklin E1

ABSTRACT

ROLE OF CYCLIN E1 OVEREXPRESSION IN TRIPLE NEGATIVE BREASTCANCER

Nigar Pelin MAKAS

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, April 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ALANYALI

Triple negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive breast cancer subtype, lacking the expression of the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). Although It has basaloid structure, it is %20-30 different from basal like breast cancer. Compared to other subtypes, which can be treated with targeted therapies, chemotherapy is the major regimen used to treat TNBCs. There is no viable target and therefore personalized treatment program specifically for TNBC subtype. CCNE1 along with its catalytic subunit Cyclin-dependent kinase-2 (CDK2), plays a critical role in cell cycle regulation, DNA replication, chromosome segregation, and G1-S transition. In this study, we showed that CCNE1 gene can be a potential treatment target and disease prognosis biomarker, with statistically high expression at mRNA and protein levels in TNBC compared to other breast cancer subtypes.

Keywords: Breast cancer, TNBC, Triple negative breast cancer, Biomarker, CCNE1, Cyclin E1

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Filiz Alanyalı' ya Yüksek Lisans çalışmalarımı yürütebilmem ve tamamlayabilmem için bana sunduğu yardım ve destek için çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ali Osmay Güre'ye Eğitim Araştırma Laboratuvarı ve cihazlarını kullanma onayımı verdiği için teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Dr. Nevin Belder'e çalışmış olduğum konuyu bulmam ve bütün deneysel çalışmalarımı planlamam konusunda beni takip ettiği için çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Doç. Dr. Özgür Şahin'e Bilkent Üniversitesi ÖŞ Grup Laboratuvarı'nın kapılarını samimiyetle bana açtığı için ve bütün laboratuvar imkanlarını, cömertçe bana sunduğu için teşekkür ederim. Prof. Dr. Sreeparna Banerjee'ye (ODTÜ), CCNE1 antikorunu benimle paylaştığı için çok teşekkür ederim. Dr. Özge Akbulut'a çalışmalarımın en başında, hücre kültürü teknikleri hakkında öğrettikleri ve tezimle ilgili bütün yardımları için çok teşekkür ederim. Omzumda elini hep hissettirdiği için kucak dolusu sevgilerimi sunarım. Dr. Pelin Ersan'a mRNA ve protein deneylerimde bana öğrettikleri için teşekkür eder ve tüm desteği için kucak dolusu sevgilerimi sunarım.

Dr. Seniye Targen'e ve Dr. Bircan Çoban'a tez yazarken, tecrübelerini benden hiç esirgemedikleri için ve arkadaşlıkları için teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans derslerimi, telefonda, sabaha kadar bana anlatmaktan hiç üşenmeyen can dostum Ceren Orhan'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Kucağımda 50 günlük bebeğimle başladığım bu süreçte, beni hiç yalnız bırakmayan eşim Giray Berkay Makas'a, çok sevdiğimiz oğlumuz Atlas Makas'a; ben Eskişehir' e gittiğimde, çocuğumla ilgilenen çok sevgili annelerime ve babalarımın teşekkür ediyorum. Eskişehir'e birçok kez benimle gelip ben dersteyken çocuğuma bakan yol arkadaşlarım, can dostlarım, Esra Özel'e ve Büşra Sadeler' e teşekkür ediyorum.

Hayatımı anlamlı kılan ve beni ben yapan herkese çok teşekkür ederim.

Nigar Pelin MAKAS

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nigar Pelin MAKAS

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri	1
1.2. Meme Kanserinin Alt Tiplerinin Sınıflandırılması.....	2
1.2.1. Üçlü negatif meme kanseri	5
1.2. Biyobelirteç ve Kanser Biyobelirteçleri Kullanım Alanları	6
1.3.1. Meme kanseri tanısında kullanılan biyobelirteç	8
1.3.2. TNMK için farklı biyobelirteçlerin tanımlanmasının önemi	9
1.4. Hücre Döngüsü ve Siklinler	9
1.4.1. CCNE' nin meme kanserindeki önemi	12
1.5. Tezin Amacı	13
2. MATERYAL	14
2.1. Kullanılan Materyaller	14
2.1.1. Tamponlar	14
2.1.2. Kimyasallar ve Reaktörler	15
2.1.3. Hücre Besiyerleri ve Diğerleri.....	16
2.1.4. Kitler	16

2.1.5. Ekipmanlar	17
2.1.6. Sarf malzemeler	18
3. METOTLAR	20
3.1. Hücre Hatları.....	20
3.1.1. Hücre hatlarının büyümesi için oluşturulan koşullar	21
3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	21
3.2.1. RNA izolasyonu	21
3.2.2. cDNA sentezi	22
3.2.3. mRNA ekspresyonu için qRT-PCR	24
3.2.4. qRT-PCR ekspresyon analizi	25
3.3. Protein izolasyonu	26
3.3.1. Protein miktar tayini.....	26
3.3.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	28
3.3.3. Western blotting tekniği ve proteinlerin görüntülenmesi.....	29
3.3.4. İmaje J Analizi.....	30
3.3.5. NCBI GEO Analizi.....	31
3.3.6. İstatistiksel analizler.....	31
3.3.7. Kaplan-Meier sağ kalım analizi	31
4. SONUÇLAR	32
4.1. Biyoinformatik analizler.....	32
4.2. Meme Kanseri Alt Tiplerinin Hücre Kültürü	35
4.3. Normal ve Kanserli Meme Hücre Hattında CCNE1 mRNA Seviyesi.....	37
4.4. Normal ve Kanserli Meme Hücre Hattında CCNE1 Protein Seviyeleri	38
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	40
KAYNAKÇA	42
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Meme kanserinin patolojik alt tipleri.....	3
Tablo 1.2. Meme kanserinin moleküler alt tiplerine göre sınıflandırılması.....	4
Tablo 1.3. Kanser biyobelirteçlerinin kullanım potansiyelleri.....	8
Tablo 1.4. Hücre döngüsünde siklin bağlı kinazlar (CDK) ve görevleri	11
Tablo 1.5. Hücre Döngüsü İnhibitörleri ve görevleri.....	11
Tablo 1.6. Hücre döngüsünün evrelerinde görev alan siklin, siklin bağlı kinaz ve hücre döngüsü inhibitörleri	12
Tablo 2.1. Kullanılan tampon isimleri ve hazırlanışları.....	14
Tablo 2.2. Kullanılan kimyasallar ve reaktörler.....	15
Tablo 2.3. Hücre büyütmek için gerekli materyaller	16
Tablo 2.4. Kullanılan kitler ve diğer bilgiler.....	16
Tablo 2.5. Kullanılan ekipmanlar ve diğer bilgiler	17
Tablo 2.6. Kullanılan sarf malzemeler ve diğer bilgiler	18
Tablo 3.1. Hücre hatlarının, klinik alt tipleri ve moleküler alt tipleri.....	20
Tablo 3.2. Ters transkripsiyon malzemeleri.....	23
Tablo 3.3. Termal Döngüleyici PCR programı (I.First strand cDNA Synthesis/Random hexamer primed synthesis)	23
Tablo 3.4. qRT-PCR reaksiyonu için ana karışım	24
Tablo 3.5. qRT-PCR analizi için ileri ve ters primerleri sekansları.....	24
Tablo 3.6. qRT-PCR program.....	25
Tablo 3.7. RIPA tamponu protokolü.....	26
Tablo 3.8. BCA standartları konsantrasyon ve absorbans değerleri	27
Tablo 3.9. Çözme ve istifleme jellerinin farklı konsantrasyonlarının içerikleri	28
Tablo 3.10. Western Blot Tekniğinde kullanılan antikorlar	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Normal bir meme yapısı	1
Şekil 1.2. 2016 yılı Türkiye kanser hastası istatistikleri.....	2
Şekil 1.3. Meme karsinomunun histolojik ayrımı Normal meme kanalı, in situ karsinom meme karsinomu ve invaziv meme kanseri yapısı.....	3
Şekil 1.4. Meme kanserinin gen ifade profiline göre moleküler sınıflandırılması	4
Şekil 1.5. Normal meme hücreleri ve memenin kanal-lobül yapısı	5
Şekil 1.6 Bazal benzeri meme kanseri altipi ve Üçlü negatif meme kanseri.....	6
Şekil 1.7. Kanser biyobelirteçleri kullanım alanları	7
Şekil 1.8. Hücre döngüsünde, interfazın kısımları yaklaşık olarak G1 fazı, S fazı, G2 fazıdır. M fazı 1 saat kadar sürmektedir. Ve döngü tekrar G1 fazına girerek devam etmektedir.....	9
Şekil 1.9. Siklin ve Siklin bağlı kinaz (Cdk)	10
Şekil 3.1. BCA Standart eğrisi.....	28
Şekil 4.1. CCNE1 gen ifadesinin moleküler alt tiplere ayrılmış gruplarda biyoinformatik analizlerle sınıflandırılması.....	32
Şekil 4.2. CCNE1 gen ifadesinin meme kanseri derecelerine göre biyoinformatik analizlerle sınıflandırılması.....	33
Şekil 4.3. TNMK hastalarında CCNE1 ifadesi ile TNMK olmayan alt türlerdeki CCNE1 ifadesinin kıyaslanması	34
Şekil 4.4. TNMK de CCNE 1 geni aşırı ifadesinin düşük sağ kalımının Kaptan Meier verileriyle GarphPad' de gösterimi	35
Şekil 4.5. CCNE1 q-RT PCR çalışması sonuçlarının grafikte gösterimi	37
Şekil 4.6. CCNE1 western çalışması sonucu.....	38
Şekil 4.7. Farklı hücre hatlarındaki CCNE1 protein ekspresyonu α - tübinin göre normalize edilmiştir	39

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. Kültüre edilen hücre hatları ve Leica inverted mikroskop 10x büyütme fotoğrafları	36
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

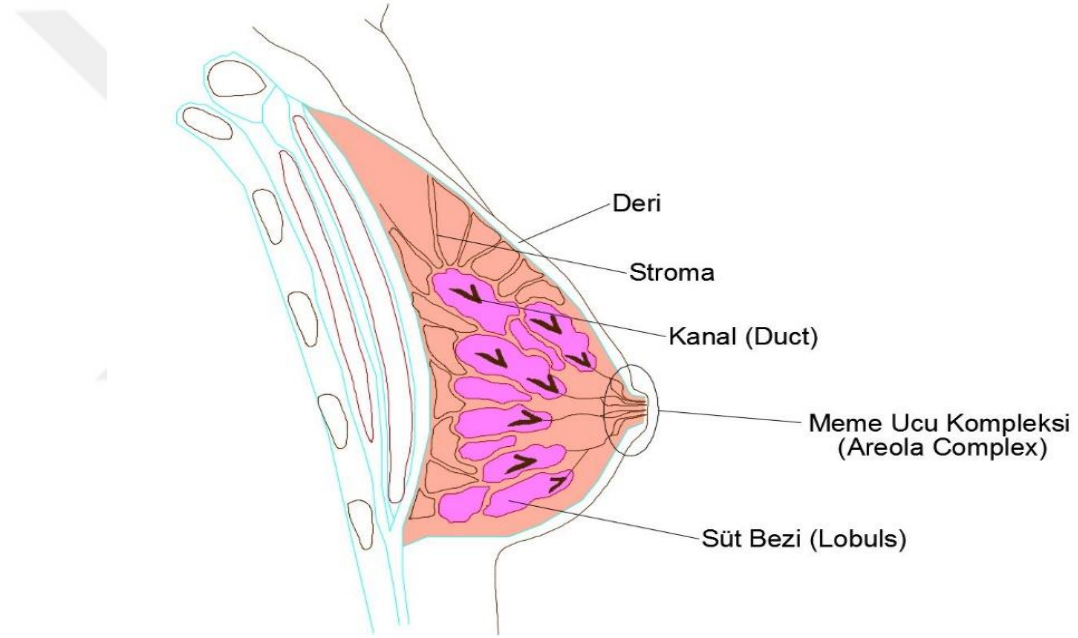
BCA	Bikinkoninik asit tahlili
BRCA1	Meme kanseri tip 1'e duyarlı protein
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CA	Kanser
CDK	Siklin bağı kinaz
CCNE	Siklin E
Cdc25	Hücre bölünme döngüsü 25
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
ddH2O	Ultra saf su
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Besiyeri
DCIS	İn-situ duktal karsinom
ER	Östrojen
EMK	Epitel mezenkimal geçiş
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FBS	Fetal bovin serumu
G1	Birinci büyüme fazı
HER	İnsan Büyüme Faktörü
IBC	İnflamatuvar meme kanseri
KT	Kemoterapi
Ki67	Kiel 67. protein
KRAS	Proto-onkogen, Kristen Rat Sarcoma
METTL3	Metiltransferaz benzer 3'e

MYT1	Miyelin transkripsiyon faktör 1
M	Mitoz fazı
NEAA	Esansiyel olmayan amino asit
PR	Progesteron
P/S	Penisilin/ Streptomisin
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PCNA	Çoğalan hücre nükleer antijeni
Rb	Retinoblastoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 besiyeri
RNA	Ribonükleik asit
qRT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dedosil sülfat
S	Sentez fazı
TNMK	Üçlü negatif meme kanseri

1. GİRİŞ

1.1. Meme Kanseri

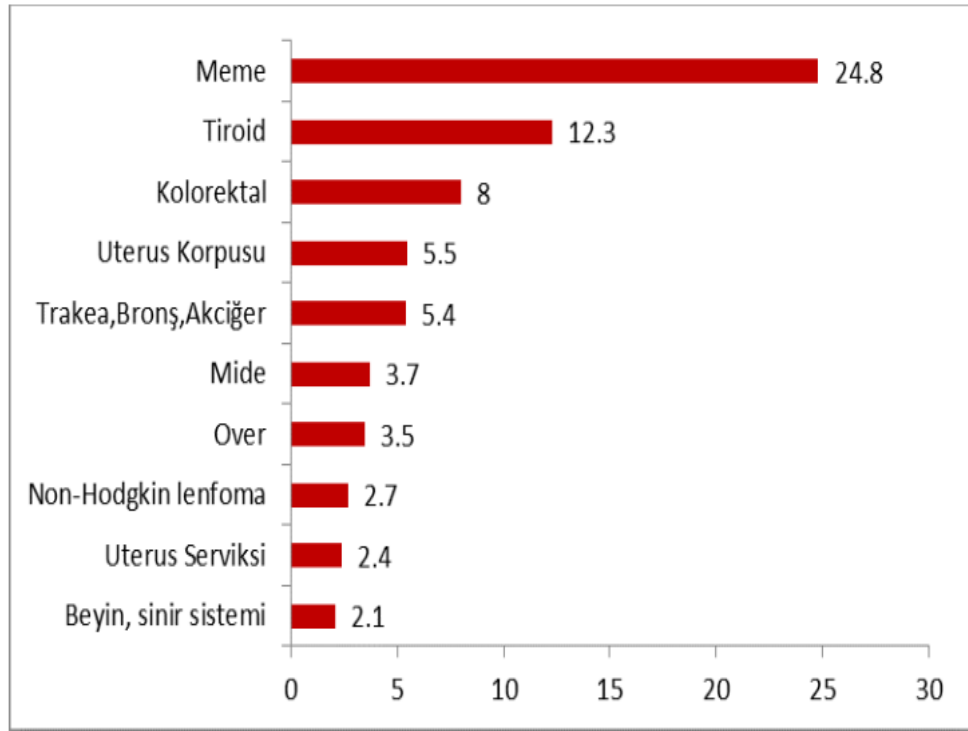
Meme, tübülo-alveoler yapıda 15-20 loblu ve birçok süt bezi (lobül) içeren bir organdır. Bebeğin beslenmesi için var olan bu organda süt, süt bezlerinde meydana gelerek, kanallar (duct) ile meme başına ulaşmaktadır (Şekil 1.1.). Bu süreci kontrol eden ve yöneten çok sayıda hormon vardır [1]. Bu süt bezlerini ve kanallarını kaplayan hücrelerin (luminal ve bazal hücreler), kontrolsüz çoğalması ve vücudun başka bölgelerine yayılmasına meme kanseri adı verilmektedir.



Şekil 1.1. Normal bir meme yapısı [2]

Amerikan Kanser Araştırmaları Derneği (Surveillance Research American Cancer Society) tarafından yapılan araştırmalar, meme kanserinin dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi olduğunu ifade etmektedir.

Türkiye Cumhuriyeti, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yapılan araştırmalara göre Türkiye’de de kadınlarda tüm yaşlar için en sık görülen kanser, meme kanseridir ve %24,8 oranı ile ifade edilmektedir (Şekil 1. 2.),[3].



Şekil 1.2. 2016 yılı Türkiye kanser hastası istatistikleri [3]

Ülkemizdeki istatistiksel veriden anlaşılacağı üzere meme kanseri, diğer kanser türleri göz önüne alındığında ilk sırada gelmektedir ve ciddiye alınması gereken önemli bir halk sağlığı sorunudur.

1.2. Meme Kanserinin Alt Tiplerinin Sınıflandırılması

Meme kanseri, biyolojik doğası gereği heterojen bir hastalıktır [1]. Bu özelliği sergileyen meme kanseri, patolojik, histolojik ve moleküler alt tiplerine göre sınıflandırılmaktadır [4]. Bu farklı özellikteki meme kanseri alt tiplerinin tedavi planlarının da farklı olması gerekmektedir [5]. Bütün bunlar değerlendirilerek, meme kanserlerinin klinik olarak doğru gruplandırılması, tedavide karar verme sürecinde çok önemlidir [6].

Hormon reseptörleri (HR) yani östrojen (ER) ve progesteron (PR) ile insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2' nün (HER2) normale kıyasla miktarı kıyaslanarak yapılan sınıflandırmasına, patolojik sınıflandırma denilmektedir. Tablo 1.1. 'de ifade edildiği gibi Luminal A [HR pozitif (+) ve HER2 negatiftir(-)], Luminal B [HR (+) ve HER2(+)], Üçlü negatif meme kanseri (TNMK), [HR (-) ve HER2 (-)], HER2 ile zenginleştirilmiş [HR (-) ve HER2 (+)] meme kanserleri olarak sınıflandırılmıştır [7].

Tablo 1.1. Meme kanserinin patolojik alt tipleri [7]

Meme kanseri patolojik alt tipleri	ER	PR	HER2
Luminal A	Pozitif	Pozitif	Negatif
Luminal B	Pozitif	Pozitif	Pozitif
TNMK	Negatif	Negatif	Negatif
HER2	Negatif	Negatif	Pozitif

Meme kanseri histolojik olarak, in situ kanser ve invaziv kanser olmak üzere ikiye ayrılır. İn situ kanserde maligni epitelyal hücreler bazal membran içerisinde sınırlı kalırken, invaziv kanserde neoplastik hücreler bazalda bulunan membranı aşarak dağılım göstermektedir (Şekil 1.3.) . Bu şekilde lenf ve kan damarlarına, lenf düğümlerine ve diğer organlara metastaz yapabilmektedir (Şekil 1.3) [8].

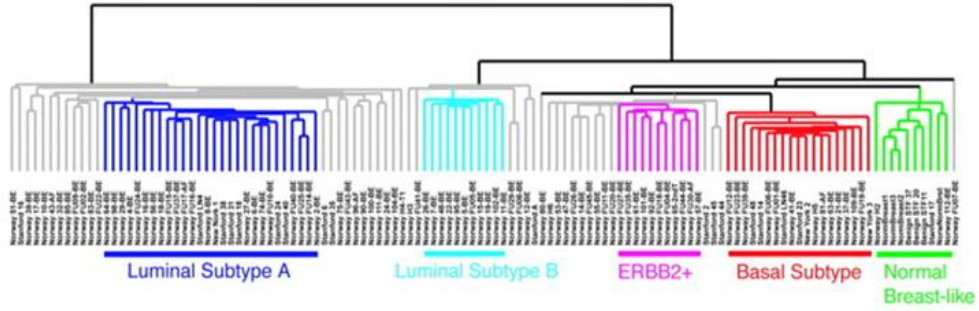


Şekil 1.3. Meme karsinomunun histolojik ayrımı Normal meme kanalı, in situ karsinom meme karsinomu ve invaziv meme kanseri yapısı [8]

İn-situ karsinom (DCIS), duktal ve lobüler; İnvaziv karsinom, tübüler, duktal lobüler, invaziv lobüler, infiltrate duktal, müsinöz olmak üzere sınıflara ayrılır [8].

2000' li tarihlerin başlarına kadar kabaca ER duyarlılığı ya da duyarsızlığına göre sınıflandırılan meme kanseri alt tipleri, Perou, Sorlie ve arkadaşları tarafından, gen ekspresyon modelleri incelenerek, inflamatuvar meme kanseri (IBC) hücreleri "portreleri" olarak değerlendirilmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmanın amacı, meme kanseri tümörlerinin, klinik davranışını ve tedavisine verilen yanıtı daha doğru şekilde

anlayabilmek ve taksonomide hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanarak beş ilişkili gen ekspresyon modelini bulgulamaktır (Şekil 1.4.) [9, 10].



Şekil 1.4. Meme kanserinin gen ifade profiline göre moleküler sınıflandırılması [11]

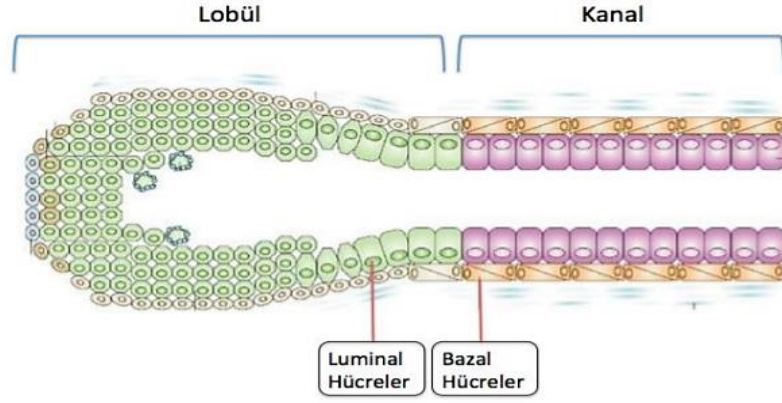
Meme kanseri moleküler olarak; Luminal A [ER (+), PR (+) ve HER2 (-)], Luminal B [ER (+), PR (+) ve HER2 (+)], HER2+ [ER (-), PR (-) ve HER2 (-)], Basal benzeri [ER (-), PR (-) ve HER2 (-)] ve Normal meme dokusu benzeri alt tiplerine ayrılmaktadır [11]. Normal meme benzeri kanser türü, microarray sınıflandırmalarında zayıf şekilde gözlemlendiği Perou ve arkadaşları tarafından belirtildiği de [10] yeterli bilgi bulunamadığı için Tablo 1. 2.'de yazar tarafından dahil edilmemiştir.

Tablo 1.2. Meme kanserinin moleküler alt tiplerine göre sınıflandırılması [11]

Meme kanseri moleküler alt tipleri	ER	PR	HER2
Luminal A	Pozitif	Pozitif	Negatif
Luminal B	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Basal benzeri	Negatif	Negatif	Negatif
HER-2	Negatif	Negatif	Pozitif

İnsan meme bezinde iki farklı epitel hücre vardır. Bunlar Şekil 1.5.' te ifade edildiği gibi bazal ya da mioepitelyal hücreler ve luminal hücrelerdir. Sınıflandırma yapılırken

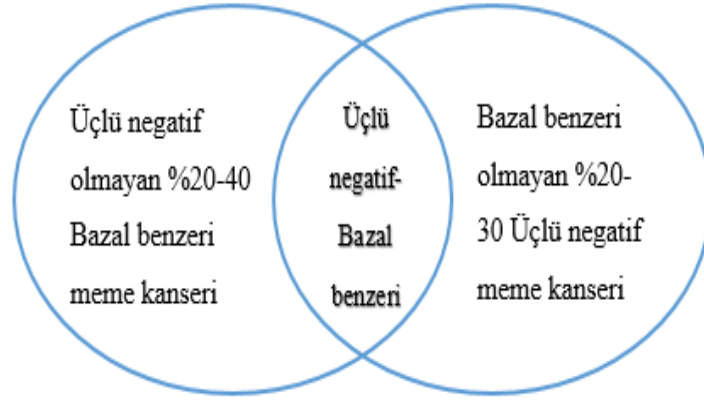
immünohistokimyasal (IHC) boyama ile uygun şekilde ayırt edilmiştir. (IHC belirteçler Ki67 ve PCNA' dır), [12].



Şekil 1.5. Normal meme hücreleri ve memenin kanal-lobül yapısı [13]

1.2.1. Üçlü negatif meme kanseri

TNMK; ER, PR, HER2 reseptörlerinin ekspresyonunun olmamasıyla ifade edilen bir kanser grubudur. Tüm meme kanserlerinin %10-20' sini oluşturmaktadır [13]. Artmış anjiyogenez ve epitel mezenkimal geçiş (EMT) gözlenmektedir ve diğer türlere kıyasla daha agresif klinik ile karakterize olduğu gözlenmiştir. Heterojen bir tümör ve yüksek derece metastatik tümör hücrelerinin alt kümelerinin belirlenmesi, TNMK' nın hassas tedavisi için yardımcı olabilecek başka bir yöntemdir [14]. Bazaloid yapıda olmasına rağmen bazal benzeri meme kanserinden %20-30 oralarında farklıdır (Şekil 1.6.) [15]. TNMK diğer kanser tümörlerine kıyasla daha fazla tümör boyutu, tümör derecesi ve proliferasyon indeksi içermektedir. [16].



Şekil 1.6 Bazal benzeri meme kanseri altipi ve Üçlü negatif meme kanseri [17]

HER2 için hedefe yönelik çok etkili tedaviler mevcutken TNMK, standart bir tedaviden yoksundur. Bu kanser alt tipinin yakın zamana kadar omurga niteliğindeki tedavisi ilaçlı kemoterapidir (KT). Hasta, KT' ye olumlu yanıt verse de hastalık hemen tekrar edebilmektedir. Son zamanlarda yapılan yeni hedefli çalışmalar, bu alt tip için cesaret verici niteliktedir [17].

Rutin meme taramaları (mamografi) ile hastalar erken evrede tespit edilmektedir [17]. tümör küçükse, meme koruyucu cerrahi veya tüm memenin çıkarılması (mastektomi) [18] arkasından lokal radyasyon tedavisi uygulanmaktadır [19]. Bu uygulama ölüm oranını son 11 yılda oldukça azaltmıştır [20]. Hastalığın ilk evresinde ki geniş bir hasta grubu için iyileştirici yöntem olmuştur [21]. Fakat TNMK hastalarının tümörün alt tipine özel, hedefe yönelik ve dolayısıyla kişiselleştirilmiş bir tedavi programına gereksinimi bulunmaktadır. Yeni tedavi yollarının araştırılması TNMK hastaları için çok önemlidir [22].

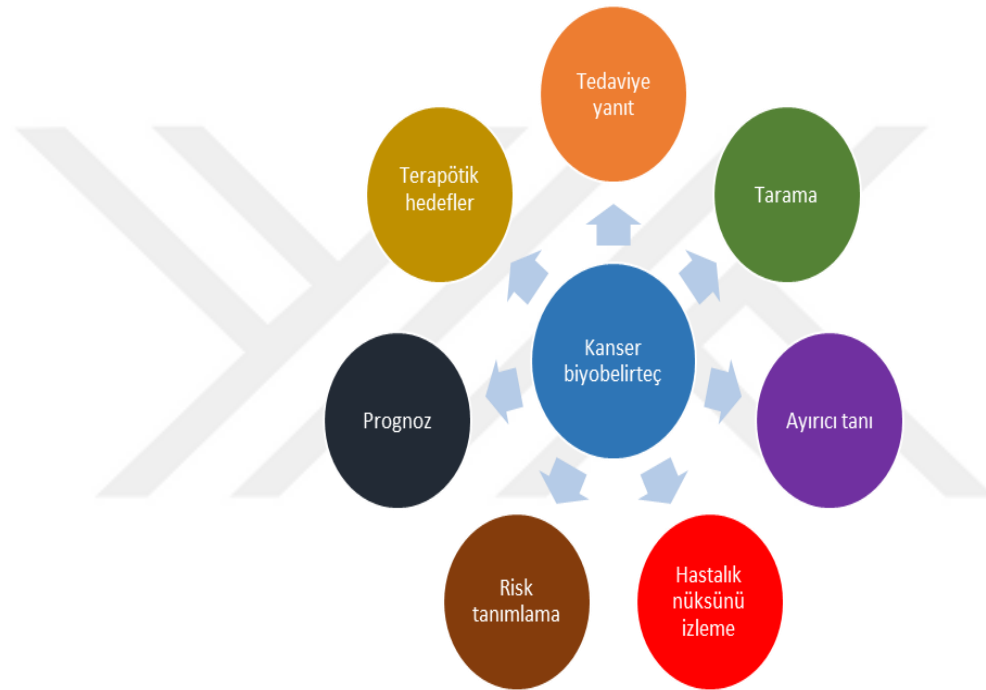
Son zamanlarda yapılan moleküler hedefli çalışmalar cesaret verici olmuştur. Bu çalışmalar sayesinde hem moleküler sınıflandırma da hem genom diziliminde ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu durum yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasına fırsat olmuştur [17] [5]. Bu tezde hastalığın prognozunun tespit edilmesinde kullanılabilir bir biyobelirteç ile çalışılmıştır.

1.2. Biyobelirteç ve Kanser Biyobelirteçleri Kullanım Alanları

Biyobelirteç, Ulusal Kanser Enstitüsü' ne (National Cancer Institute) göre “normal ya da anormal bir sürecin, durumun ya da bir hastalığın belirtisi olarak, kanda ya da diğer

vücut sıvılarında, dokularında bulunan biyolojik moleküldür (NCI) . Biyobelirteçler; protein, DNA, RNA, antikor veya peptit yapıda olabilmektedir [23].

Kanser biyobelirteçleri, Şekil 1.7.' de ifade edildiği gibi tedaviye yanıt, tarama, ayırıştırıcı tanı, hastalığın ilerlemesini izleme, risk değerlendirmesi yapabilme, prognoz, terapötik hedefleri belirlemede önem taşıyan ve bazı durumlarda birden fazla amaç için kullanılabilen biyobelirteçlerdir [23].



Şekil 1.7. Kanser biyobelirteçleri kullanım alanları [23]

Tablo 1.3.' de belirtildiği gibi kanser biyobelirteçlerini ve kullanım alanlarını, örnekler ile açıklayabiliriz: Ailesinde yumurtalık kanseri geçmişi olan bir hasta BRCA1 germ mutasyon hattı taşıyıcısı olup olmadığını anlamak için genetik testlere tabi tutulabilir. Böylece kansere yakalanma riskini belirlemiş olacaktır [24]. Tarama için kullanılan prostat kanseri antijeni PSA' dır [25]. Hastanın tarama sonucunda bir tümör gözlemlenirse ayırıcı bir tanı oluşturabilmek için o tümörlü yapıdan bir parça alınarak IHC belirteçleri ile değerlendirmek gerekecektir [26]. Hastaya “kanser” teşhisi koyulduktan sonra tedaviden bağımsız olarak prognozu belirlemeye yardımcı olabilmek için kullanılan bir dizi gen ifadesi vardır. Bu testlerden en çok kullanılan “Oncotype DX” olarak bilinen

21 gen testidir. Tedaviye yanıtın tahmini için kullanılan biyobelirteçler de mevcuttur [27]. Kolon kanseri bir hastanın adjuvan tedavisini takiben oluşmuş bir karaciğer metastazı varsa bunun takibi belirli serilerle CEA testi yaparak sağlanabilmektedir [28].

Tablo 1.3. *Kanser biyobelirteçlerinin kullanım potansiyelleri [23].*

Kullanım amacı	Örnek
Kansere yakalanma riskini tanımlama	BRCA1 germline mutasyonu (meme ve yumurtalık kanseri)
Tarama	Prostat kanseri spesifik antijeni (PSA)
Ayrıcı tanı	Orijindeki dokuyu bilmek için immünohistokimyasal belirteçlerden faydalanmak
Prognoz	21 gen testi (Oncotype Dx testi) 70 gen testi (MammaPrint) Meme kanseri indeksi 12 gen (Endopredict) 50gen testi (Prosigna)
Tedaviye yanıtı tahmin etmek	KRAS mutasyonu ve anti-EGFR antikoruna (kolorektal kanser) HER2 ekspresyonu ve anti HER2 tedavisi (Meme ve mide kanseri) Östrojen reseptörü ifadesi (Meme kanseri)
Hastalık nüksünü izlemek	Karsinoembriyonik antijen (CEA) hastalığın nüksünü izlemek için belirli aralıklarla yapılan belirteçtir.
Metastazik hastalıkta yanıtı veya ilerlemeyi izlemek	CA15-3 ve CEA belirteçleri

1.3.1. Meme kanseri tanısında kullanılan biyobelirteç

Adjuvan KT ve endokrin tedavisi mortalite oranını %50 oranında azaltmıştır. Erken meme insidansının artması, yoğun tedavi konusunda tartışılmış, bu durumun ailevi yükü artırdığı ve sosyal olarak yıpratıcı olduğu ve olumlu prognoz gösteren hastalara gereksiz bir zararlar da verebileceği düşünülmüştür [29, 30]. Bahsedilen bu hususların da etkisiyle araştırmalar, kesin hedefe yönelik ve yan etkisi az olan yeni adjuvan tedaviler geliştirilmesine odaklanmıştır. Son on yılda kanserin yavaş mı agresif mi olduğunu belirleyen prognostik araç ve terapötik hedef sağlamak için moleküler belirteçler üzerine

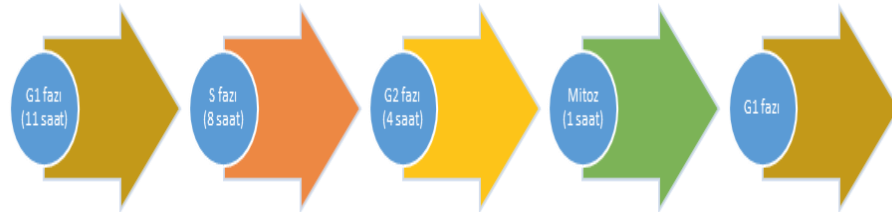
çalışılmaktadır [31, 32]. Meme kanseri, patolojik, morfolojik ve moleküler alt tiplere ayrılır ve heterojen tümör grubu içerir. Bu nedenle farklı biyolojik davranış, sunum, prognoz ile sonuçlanır. Hastalık evresini anlamak ve fayda gösterecek tedaviyi uygulamak için moleküler yapı esastır. Meme kanserinin biyobelirteçleri ER, PRG, HER2 reseptörleridir. IHC olarak tespit edilirler ve bize hastalar konusunda bilgi verirler. Yüksek risk altındaki kadınların taraması ve takibinde, yüksek meme kanseri duyarlılığı ile ilişkisi bilinen mutasyonlar için genetik testlerin rolü araştırılmaktadır [33].

1.3.2. TNMK için farklı biyobelirteçlerin tanımlanmasının önemi

TNMK için hedeflenen tedavi kısmen eksik kalmaktadır ve hastalar için süreç kısa zamanda ölüm ile sonuçlanmaktadır. Erken tanı koyulması ve tedavi uygulanması için TNMK alt tipine özgü farklı biyobelirteçlerin tanımlanması önemlidir [34]. Bu gereksinimi karşılayabilmek için de kanser hücrelerini çoğaltan faktörleri bulmak gereklidir. Bu faktörlerin en önemlilerinden bir tanesi de hücrelerin çoğalmasını etkileyen hücre döngüsüdür.

1.4. Hücre Döngüsü ve Siklinler

İki yavru hücre oluşturmak için birbirini takip eden iki mitoz arasında geçirilen süreye hücre döngüsü denilir. Hücre döngüsü, interfaz ve mitoz (M) olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. İnterfaz en uzun süren, hücre döngüsünün %95'ini oluşturan ve önemli olayların gerçekleştiği bir süreçtir. Şekil 1.8.'de ifade edildiği gibi interfaz, birinci büyüme fazı (G1) , sentez fazı (S), ikinci büyüme fazı (G2) olmak üzere birbirini takip eden 3 kısımdan oluşmaktadır.



Şekil 1.8. Hücre döngüsünde, interfazın kısımları yaklaşık olarak G1 fazı, S fazı, G2 fazıdır. M fazı 1 saat kadar sürmektedir. Ve döngü tekrar G1 fazına girerek devam etmektedir.

G1 fazı sonunda hücreler DNA çoğalması için S fazına ya girerler ya girmezler. Eğer bir hücre S fazına girmiyorsa G0 fazına girer ve hücre döngüsüne geri dönmesi

günler, aylar ya da yıllar alabilir. Bu süreç koşulların düzelmesine bağlıdır. Bu süreci, döngü mekanizmasında yöneten siklin, siklin bağlı kinaz (CDK) ve siklin bağlı kinaz inhibitörleridir. CDK' lar kritik olan proteinleri fosforile ederler ve döngünün devamlılığını sağlarlar. İnaktif durumlarında siklin ailesine bağlı kaldıkları bilinmektedir [35-39].

Siklinlerin fonksiyonları CDK' ları aktif hale getirmektir (Şekil1.9.). Hücre döngüsünün evrelerinde gözlemlenirler ve 15 tanesi tanımlanmıştır. CCND, CCNE, CCNA ve CCNB olarak bilinenleri bir ya da birden fazla CDK' ya bağlanabilmektedirler ve en önemlileridirler. CCND' nin üç formu vardır D1, D2, D3 olarak isimlendirilirler. G1 evresinde CDK4'e bağlanarak onu aktif hale getirir, oluşan bu birliktelik kritik görev olarak retinoblastoma (Rb) proteinini fosforilize eder. Rb fosforilasyonu hücre döngüsünde önemli bir anahtardır. Rb hipofosforilasyonu, E2F (transkripsiyon faktörü) ile biraraya gelerek, hücrelerin replikasyonunu engeller. Rb fosforilasyonu ise bu birlikteliği bozar ve transkripsiyon engelini ortadan kaldırır. CCNE'nin E1 ve E2 olmak üzere iki tipi vardır. S evresinde CDK2 ile bağlanabilir ve her iki siklin formunun eksikliğinde hücre dinlenme moduna girer ve döngüye dönemez. CCNE& CDK2 aktif birlikteliğinin S fazına geçmesiyle DNA polimerazın transkripsiyonu artırılır ve DNA, replikasyon için uyarılır. CCNA& CDK2 ile oluşan aktif kompleks yapı, G2 fazından M fazına geçiş noktasını yöneten önemli bir karar merkezidir.



Şekil 1.9. Siklin ve Siklin bağlı kinaz (Cdk)

Bu kompleks mitotik profazdaki olayları düzenler. CCNB& CDK1 ile kompleks oluşturan önemli bir medyatördür. Bu medyatör profazın ilerisine geçişi sağlamaktadır. Protein fosfotaz (cdc 25) tarafından aktif hale getirilir. CCNB& CDK1 kompleksi hücre çekirdeği içerisinde birikir ve çekirdek zarını eriterek mitozu başlatır (Tablo 1.4.) [35, 40].

Tablo 1.4. Hücre döngüsünde siklin bağlı kinazlar (CDK) ve görevleri [35, 40]

Siklin Bağlı Kinaz	Görevi
CDK4	CCND ile birleşir, Rb' yi fosforile eder..
CDK2	CCNE ile birleşir. G1/S geçişinde etkilidir. S evresinde CCNA ile birleşir, G2/M geçişine izin verir.
CDK1	CCNB ile birleşir, G2/M geçişinde izin verir.

CDK inhibitörleri, Siklin & CDK komplekslerinin fonksiyonlarını kontrol etmektedir. Cip/Kip ve INK4/ARF olmak üzere başlıca iki tip CDK inhibitörü vardır. Bu inhibitörler tümör engelleyici genlerdir ve tümör üzerinde sürekli değişikliğe uğrarlar. Cip/Kip tipinin p21, p27 ve p57 olmak üzere üç elemanı vardır (Tablo1.5.) .

Tablo 1.5. Hücre Döngüsü İnhibitörleri ve görevleri [41-43]

Hücre Döngüsü İnhibitörleri	Başlıca Görevleri
Cip/Kip ailesi (p21,p27,p57)	Siklin& CDK 'ya bağlanır ve bu yapıyı inhibe ederler.
INK4/ARF ailesi (p16, p14)	p16, CDK4'e bağlanarak, CCND& CDK4 yapısını yani Rb fosforilasyonunu engeller.

CDK kompleks yapıların arasına bağlanarak onları inaktif hale getirirler. p53 tümör engelleyici geni de hücre döngüsünde p21' in transkripsiyonel aktivasyonunu kontrol eder. İnsandaki kanserlerin çoğu bu gen mutasyonuna uğramıştır.

Hücre hasara uğramışsa, p53 geni, döngüsünün ilerlemesini yavaşlatan veya durduran hücre döngüsü kontrolörlerini uyarır belki de apoptoza sebep olmaktadır.

INK4/ARF ailesi CDK inhibitörleri genleri p16INK4a ve p14ARF olmak üzere iki proteini kodlar. p16INK4a inhibitörü CDK4' ü inhibe ederek CCND ile kompleks oluşturup Rb fosforilasyonunu engeller ve geç G1 evresinde hücre döngüsünü durdurur. p14ARF ise p53 geni üzerinde etkili davranarak p53' ün degradasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü bloke eder (Tablo 1.6.) [41-43].

Tablo 1.6. Hücre döngüsünün evrelerinde görev alan siklin, siklin bağlı kinaz ve hücre döngüsü inhibitörleri [44].

Hücre Döngüsü	Siklin	Siklin Bağlı Kinaz	Hücre Döngüsü İnhibitörü
G1	Siklin D1/ D2/ D3	CDK4/6	p16 ^{INK4A} , p15 ^{INK4B} , p18 ^{INK4AC} , p19 ^{INK4D}
G1/S	Siklin E1/E2	CDK2	p27 ^{kip1} / WAF1
S	Siklin E1/E2 Siklin A2	CDK2	p27 ^{kip1} , p57 ^{kip2}
G2/M	Siklin A2	CDK1 (cdc2)	
M	Siklin B1	CDK1	WEE1, MYT1

1.4.1. CCNE' nin meme kanserindeki önemi

CCNE normal bir hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişi sağlamaktadır. Eğer CCNE seviyesinde artış olursa bu geçiş hızlanmaktadır. Bu durumda CCNE genlerinin çoğalması, CCNE proteinlerinin meme kanseri hücre dizilerinde yapısal olarak daha çok ifade edilmesidir.

50 kilodalton (kDa) moleküler ağırlıktadır. Düşük izoformları 39 kDa ve 49 kDa molekül ağırlığındadır. Amino terminali değillerdir, fosforilasyonda tam uzunluktaki proteinlere kıyasla hiperaktiftir ve G1 fazdan S fazına ilerlemeyi indüklenirler. Yapılan bir araştırmada CCNE izoformlarının düzeylerinin meme kanseri hastalarındaki sonuçlarla ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. CCNE ve onun düşük izoformlarıyla yapılan bu çalışmada western blot ve IHC teknikleri kullanılarak ölçümler yapılmış ve

western blot ile ölçüldüğü halde IHC ile ölçülmeyen toplam CCNE seviyeleri kıyaslandığında, meme kanserli hastalar ve hayatta kalma arasında güçlü bir ilişki olduğu düşünülmüştür [44-46].

CCNE geni, 8q.22 kromozomal lokusunda yer almaktadır. Bu gen insanda, 2 farklı varyantı ile ifade edilmektedir (39kDa ve 49 kDa). Bu gen, 19. Kromozomda, q12 sitobant (cyto-band) ve 29811898- 29824308 baz çifti (bp) lokasyonludur [47].

1.5. Tezin Amacı

Meme kanserinde farklı siklinlerin ve inhibitörlerinin, neoadjuvan tedavideki önemi araştırılmıştır fakat yapılan çalışmalarda CCNE1 ve inhibitörleri ve onların meme kanseri tedavisindeki etkilerinin daha kapsamlı şekilde araştırılması gerektiği bulgusuna ulaşılmıştır. Meme kanserinin en agresif ve kötü prognoz gösteren alt tipi TNMK' da kemoterapi dışında etkili alternatif hedef tedavi moleküllerinin tespitine yönelik önemli bir ihtiyaç mevcuttur. Ayrıca CCNE1 geninin meme kanseri ve diğer pek çok kanserde önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmekle birlikte TNMK' da rolü ve etkisine yönelik yeterli bulgu bulunmamaktadır. Bu noktada CCNE1 geninin ifadesinin TNMK alt tipinde etkisinin ve tedaviye yönelik potansiyelinin mRNA ve protein seviyesinde incelenmesi ve aynı zamanda biyoinformatik analizlerle hasta örnekleri ile doğrulanması tezin temel amacını oluşturmaktadır.

- 1.Meme kanseri farklı alt gruplarına ait hücre hatlarında CCNE1 gen ifadesinin qRT-PCR ile araştırılması
2. Meme kanseri farklı alt gruplarına ait hücre hatlarında CCNE1 protein ifadesinin western blot tekniği ile araştırılması
3. Moleküler alt tip sınıflarına ayrılmış hasta verilerine bakılarak CCNE1 gen ifadesinin kıyaslanması
4. Meme kanseri derecelerinin CCNE1 ifadesine göre birbirleriyle kıyaslanılmasının yapılması
5. CCNE1 geninin ifadesinin TNMK ve TNMK olmama durumuna göre kıyaslanması
6. CCNE1 için TNMK da sağ kalım analizinin yapılması ve yüksek CCNE1 ifadeli hastaların daha kötü sağ kalıma sahip olduğunun GSE21653 hasta verileri kullanılarak Kaplan-Meier eğrisiyle ifade edilmesi

2. MATERYAL

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Tamponlar

Deney sırasında kullanılan tamponlar Tablo 2.1. 'de ifade edildiği gibidir.

Tablo 2.1. *Kullanılan tampon isimleri ve hazırlanışları*

Tampon	Eklenen malzemeler:
1X Anot tamponu I	300 mM'lık Tris, % 20 (v/v)'lik metanol
1X Anot tamponu II	25 mM'lık Tris, % 20 (v/v)'lik metanol
1X Katot tamponu	40 mM'lık 6-aminokaproik asid, % 20 (v/v)'lik metanol
1X PBS	137 mM'lık NaCl, 2.7 mM'lık KCl, 10 mM'lık Na ₂ HPO ₄ , 2 mM'lık KH ₂ PO ₄ (pH: 7.4)
1X SDS-PAGE Yürütme tamponu	25 mM'lık Tris, 14.41 g/l'lık glisin, % 1'lik (v/v) SDS
1X TBS-T	20 nM'lık Tris, 137 mM'lık NaCl, % 0,2'lik (v/v) Tween20
Bloklama Solüsyonu	12,5 gr BSA, 250 ml 1X TBS-T
RIPA Liziz tamponu	150 mM'lık NaCl, % 1'lik (v/v) NP-40, % 0,5'lik (v/v) Sodyum DOC, 50 mM'lık Tris- HCl (pH:8.0), 50 mM'lık NAF, 1 mM'lık NaVO ₄ , % 4'lük (v/v) Proteaz inhibitör, % 4'lük (v/v) fosfat inhibitör

2.1.2. Kimyasallar ve Reaktörler

Deneyde kullanılan kimyasallar ve reaktörler Tablo 2.2.' de ifade edildiği gibidir.

Tablo 2.2. *Kullanılan kimyasallar ve reaktörler*

Kimyasallar ve Reaktörler	Açıklamalar
4X Protein yükleme boyası	250 mM'lık Tris HCl (pH: 6.8), % 10'lük (w/v) SDS, % 0,1'lik (w/v) Bromofenol mavi, % 50'lik Gliserol (v/v), % 25'lik (v/v) β -merkaptoethanol
6-aminokaproik asit	Sigma Aldrich, USA
Akrilamid/ bisakrilamid	Applichem, Almanya
Amonyum peroksisülfat	Carlo Erba, İtalya
Bovin Serum Albümin	Santa Cruz, USA
Proteinaz inhibitör kokteyli	Roche Applied Science, Almanya
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, USA
ECL	Amersham Pharmacia Biotech, UK Thermo Fisher Scientific, USA
Etanol	Sigma Aldrich, St Louis, USA
İzopropanol	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Light Cycler 480 SYBR Green I Karışım	Roche Applied Science, Almanya
Metanol	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Nükleazsız su	Applied Biosystems/Ambion, USA
Protein cetveli (ladder)	Thermo Fisher Scientific, USA
Ponceu S	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Sodyum klorit	Merck, Darmstadt, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Almanya

TEMED	Serva, Heidelberg, Almanya
TRIsure	Bioline, Luckenwalde, Almanya
Trizma base	Sigma Aldrich, USA
Tween-20	VWR, Radnor, USA

2.1.3. Hücre Besiyerleri ve Diğerleri

Deneyde kullanılan hücre besiyerleri ve diğer malzemeler Tablo 2.3.' te belirtildiği gibidir.

Tablo 2.3. *Hücre büyütmek için gerekli materyaller*

Hücre Besiyerleri ve Diğerleri	Açıklamalar
DMEM	Lonza, Basel, İsviçre
Fetal sığır serumu (FBS)	Biowest, Fransa
İnsülin solüsyonu (sığır pankreasından)	Roche, Almanya
Esansiyel olmayan amino asit	Lonza, İsviçre
Penicillin/Streptomycin	Lonza, İsviçre
L-glutamine	Lonza, İsviçre

2.1.4. Kitler

Deneylerde kullanılan kitler Tablo 2.4. ' te ifade edildiği gibidir.

Tablo 2.4. *Kullanılan kitler ve diğer bilgiler*

Kitler	Açıklamalar
BCA Protein analiz kiti	Pierce, Rockford, IL, USA
İlk iplik cDNA sentez kiti	Fermantas, St. Leon-Roth, Almanya
Light Cycler SYBR Green I Master	Roche, USA

2.1.5. Ekipmanlar

Deneyde kullanılan laboratuvar ekipmanları Tablo 2.5.' te ifade edildiği gibidir.

Tablo 2.5. *Kullanılan ekipmanlar ve diğer bilgiler*

Ekipmanlar	Açıklamalar
Otoklav	Varioklav, Dampfsterlisatoren, Almanya
Kuru sterilizatör	Nüve-KD200, Türkiye
Çeker ocak	Variolab Mobilien W90, Kazakistan
Buz makinası	Hoshizaki, Aichi-Tokyo, Japonya
Ependorf santrifüjü	Heraeus, Hanau, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Beckman coulter GS15R, USA
Saf su ve ultra saf su cihazı	Sartorius Arium , Fransa
Etüv FN500	Nüve, Türkiye
Axiovision 4.3 mikroskop	Carl Zeiss, Munich, Germany
Nikon TS100 inverted mikroskop	Nikon, Japonya
Leica DMI8 inverted mikroskop	Leica, Almanya
Sınıf II biyogüvenlik kabini	Nüve, Ankara, Turkey
Hücre kültürü karbondioksit inkübatörü	Nuaire, USA
Pipet seti	Gilson, USA
Pipetör	Gilson, USA
Vakum motoru	Isolab, Almanya
Soğutucu (-80°C)	Hettich, Hollanda
Derin dondurucu (-20°C) ve buzdolabı (4°C)	Bosch, Almanya
Horizontal çalkalayıcı	Bellco, USA

LightCycler 96 qRT-PCR	Roche Applied Science, Almanya
Mini-PROTEAN Jel döküm modülü	Biorad, Hercules, USA
Mini-PROTEAN 4'lü hücre sistemi	Biorad, Hercules, USA
Nanodrop One	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Test tüpü ısıtıcısı	Stuart Scientific, UK
Thermocycler PCR	Thermo Fisher Scientific, USA
Güç kaynağı	Biorad, Hercules, USA
Semidry Western Blot transfer ünitesi	Biorad, Hercules, USA
Synergy HT mikropilaka okuyucu	Biotek, Winooski, USA
Amersham imager 600 görüntüleme cihazı	Amersham, USA
Vorteks	Isolab, Almanya
Su banyosu	Nüve, Türkiye

2.1.6. Sarf malzemeler

Deneyde kullanılan sarf malzemeler Tablo 2.6.' da ifade edildiği gibidir.

Tablo 2.6. *Kullanılan sarf malzemeler ve diğer bilgiler*

Sarf malzemeler	Açıklamalar
100 mm plate	Greiner bio-one, Almanya
145 mm plate	Greiner bio-one, Almanya
Filtreli pipet ucu (10 µl-20 µl-200 µl-1000 µl)	Greiner bio-one, Almanya
Lamel (18x18)	Marienfeld, Almanya
Kriyojenik tüp (1,5ml)	Greiner bio-one, Almanya
Thoma lamı	Marienfeld, Almanya

Parafilm	VWR, Radnor, USA
PCR tüp	Axygen, Corning, USA
Plastik serolojik pipet (5ml-10 ml-25 ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Cam Pasteur pipet (145ml-225ml)	Isolab, Almanya
PVDF Membran	Biorad, USA
Reaksiyon tüpleri (500 µl-1.5 ml-2 ml)	Axygen, USA
Erlen (250 ml-500 ml-1 L)	Corning Incorporated, USA
Whatman kağıdı	GE Healthcare, UK
qRT-PCR Plakası	Roche Applied Science, Almanya
Şırınga filtresi (0,20 ya da 0,45mikron- 25mm)	Corning, ABD
Şırınga (50ml)	Ayset, Türkiye

3. METOTLAR

3.1. Hücre Hatları

İnsan meme kanserli hücre hatları, MCF7, T47D, ZR75-1, MDA.MB.453, MDA.MB.231, HCC1143, MDA.MB.468, CAL51, MDA.MB157, BT474, MDA.MB.436 ile birlikte normal meme epitel hücre hattı MCF 12A Doç. Dr. Özgür Şahin, Bilkent Üniversitesi, HCC38 hücre hattı Doç Dr. Ali Osmay Güre, Bilkent Üniversitesi tarafından hediye edilmiştir. Bu çalışma da kullanılan hücre hatlarının, klinik alt tipleri ve moleküler alt tipleri Tablo 3.1.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre hatlarının, klinik alt tipleri ve moleküler alt tipleri

Hücre hatları	Klinik alt tipleri	Moleküler Alt tipleri
MCF12A	Normal meme epitel hücre hattı	Normal meme epitel hücre hattı
MCF7	ER(+)	Luminal
T47D	ER(+)	Luminal
ZR75-1	ER(+)	Luminal
MDA.MB.453	HER2	HER2(+)
BT474	HER2	HER2(+)
HCC38	TNMK	Basal benzeri
CAL 51	TNMK	Basal benzeri
HCC1143	TNMK	Basal benzeri
MDA.MB.231	TNMK	Basal benzeri
MDA.MB.468	TNMK	Basal benzeri
MDA.MB.157	TNMK	Basal Benzeri
MDA.MB.436	TNMK	Basal benzeri

3.1.1. Hücre hatlarının büyümesi için oluşturulan koşullar

Bütün hücreler 37° C, %5 karbondioksit (CO₂) ile inkübe edilmiştir. MCF12A, MCF7, T47D, ZR75-1, MDA.MB.453, HCC38, MDA.MB.231, HCC1143, MDA.MB.468, Cal51, MDA.MB157, BT474, MDA.MB.436 hücrelerini büyütmek için Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) içerisine penisilin/streptomisin (P/S) %1, Esansiyel olmayan aminoasid (NEAA) %1, fetal sıgır serumu (FBS) %10 ve DMEM içerisinde dahil değilse L-glutamin %1 eklenir. Bunlara ek olarak BT474 hücre besiyerine fazladan insülin %0,1 eklenmiştir.

MCF7, T47D, ZR75-1 hücrelerini büyütmek için fenol olmayan DMEM içerisine P/S %1, NEAA %1, FBS %10, insülin %0,1 eklenmiştir.

HCC38, HCC1143 hücrelerini büyütmek için Roswell Park Memorial Institute 1640 besiyeri (RPMI) içerisine P/S %1, NEAA %1, FBS %10, L-glutamin %1 eklenir.

MCF12A hücre hattı için DMEM içerisine P/S %1, NEAA %1, FBS %10, L-glutamin %1, insülin %0,1, epidermal büyüme faktörü (EGF) 20ng/ml, hidrokortizon 500ng/ml eklenmiştir.

Hücreler 100 mm plate içerisinde açılmış, ilerleyen aşamada 145 mm plate ile büyütülerek %70 doluluk sağlamaları gözlenmiştir.

3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

3.2.1. RNA izolasyonu

3.1.1.' de bahsedildiği gibi besiyerleri içerisinde ve uygun koşullarda büyütülen hücreler, belirtilen sürelerin sonrasında 1X PBS ile yıkanmıştır, tripsinize edilmiştir ve 1,5ml' lik reaksiyon tüplerinde pelet elde edilmiştir. Üzerine 500 µl TRIsure eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika süresince homojenize ve lize karışım oluşturulmuştur. TRIsure protokolüne bağlı olarak bundan sonraki işlemler çeker ocak altında yapılmıştır. Oluşan karışıma 100ul kloroform eklenerek oda sıcaklığında kuvvetlice 15 saniye karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiş, sonrasında +4 soğuklukta 13000g devirde 15 dakika santrifüj edilerek faz oluşumu gözlenmiştir. RNA izolasyonu için şeffaf olan yani en üstteki faz, farklı bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenmiş 5 dakika süresince kuvvetlice karıştırılmış, inkübasyon için 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Sonrasında +4 soğuklukta 13000g devirde 10 dakika santrifüj

edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Peletleri yıkamak için 1ml %75' lik etanol eklenmiştir. Bu durumda pelet hareket edebildiği gözlenmiş, pelete zarar vermemek için karıştırılmamıştır. +4 soğuklukta 13000g devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Peletleri yıkamak için 1ml %100'lük etanol eklenmiş ve aynı şeylere dikkat ederek, +4 soğuklukta 13000g devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Sonrasında peletler bir petri kutusu içerisinde, oda sıcaklığında 30 dakika süresince bekletilmiştir. Kuruduğu gözlenen peletlerin üzerine 10µl-20µl arasında nükleazsız su eklenerek pipetaj yapılmıştır ve pelet çözdürülmüştür. Sonrasında nanorop cihazında ölçümler alınmış, saklamak için -80 soğutucuya yerleştirilmiştir.

3.2.2. cDNA sentezi

3.1.1.' de bahsedildiği gibi besiyerleri içerisinde ve uygun koşullarda büyütülen hücreler, belirtilen sürelerin sonrasında 1X PBS ile yıkanmış, tripsinize edilmiş ve 1,5ml' lik reaksiyon tüplerinde pelet elde edilmiştir. Üzerine 500 µl TRIsure eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika süresince homojenize ve lize karışım oluşturulmuştur. TRIsure protokolüne bağlı olarak bundan sonraki işlemler çeker ocak altında yapılmıştır. Oluşan karışıma 100ul kloroform eklenerek oda sıcaklığında kuvvetlice 15 saniye karıştırılmış, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında +4 soğuklukta 13000g devirde 15 dakika santrifüj edilerek faz oluşumu gözlenmiştir. RNA izolasyonu için şeffaf olan yani en üstteki faz, farklı bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenmiş 5 dakika süresince kuvvetlice karıştırılmış, inkübasyon için 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Sonrasında +4 soğuklukta 13000g devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Peletleri yıkamak için 1ml %75' lik etanol eklenmiştir. Bu durumda peletin hareket edebildiği gözlenmiş, pelete zarar vermemek için karıştırılmamıştır. +4 soğuklukta 13000g devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Peletleri yıkamak için 1ml %100'lük etanol eklenmiş ve aynı şeylere dikkat edilerek, +4 soğuklukta 13000g devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Sonrasında peletler bir petri kutusu içerisinde, oda sıcaklığında 30 dakika süresince bekletilmiştir. Kuruduğu gözlenen peletlerin üzerine 10µl-20µl arasında nükleazsız su eklenmiş ve pipetaj yapılarak pelet çözdürülmüştür. Sonrasında nanorop cihazında ölçümleri alınmıştır. cDNA, Tablo 3.2.' deki talimatlar

gibi RevertedAid RT (Thermo Fisher Scientific) kiti kullanılarak, her örnek için 2 µg RNA'dan üretilmiştir. Termal döngüleyici PCR programı Tablo 3.3.' deki gibi seçilerek cDNA elde edilmiştir. cDNA' ları saklanmak için -80 soğutucu kullanılmıştır.

Tablo 3.2. *Ters transkripsiyon malzemeleri*

Reaktörler	Konsantrasyon/Hacim
RNA	2 µg (X µL)'lık
Nucleassız su	(12-X) µL'lık
Random heksamer primer	1 µL'lık
5X Reaksiyon tamponu	4 µL'lık
Ribolock Ribonucleaz inhibitör (20U/µl)	1 µL'lık
dNTP karışım (10mM)	2 µL'lık
RevertAid RT	1 µL'lık

Tablo 3.3. *Termal Döngüleyici PCR programı (I.First strand cDNA Synthesis/Random hexamer primed synthesis)*

Sıcaklık	Zaman
25°C	5 dakika
42°C	60 dakika
70°C	5 dakika
4°C	∞

3.2.3. mRNA ekspresyonu için qRT-PCR

Tablo 3.4.' de verilen protokole göre Tablo 3.5.'de listelenen her bir primer çifti için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. qRT-PCR reaksiyonu için ana karışım

Reaktör	Hacmi
SYBR Green I boya	5 µl' lik
İleri Primer (20 µM)	0.25 µl'lik
Ters Primer (20 µM)	0.25 µl'lik
Nucleaz-olmayan su	2.5 µl'lik

Tablo 3.5. qRT-PCR analizi için ileri ve ters primerleri sekansları

Gen Sembolü	Gen ID	İleri Primer	Ters Primer
CCNE1	898	5'-gccagccttgggacaataatg-3'	5'-cttgacggtgagttgggt-3'
18S	100008588	5'-ctaccacatccaaggaagca-3'	5'-ttttcgtcactacctccccg-3'

qRT-PCR reaksiyonu 96 kuyucuklu plate kullanılarak her kuyucuğa 8 µl (1X) ana karışım ekledikten sonra üzerlerine 2 µl cDNA (20ng) (3.2.2. cDNA Sentezi

anlatılmıştır.) dikkatlice pipetlenerek karıştırılmıştır. Jelatin ile üzeri sıkıca kapatılmıştır. +4 sıcaklıkta 1000rpm de 1 dakika santrifüjlenmiş ve LightCycler 96 qRT-PCR cihazında Tablo 3.6.' da ifade edilen qRT-PCR programında çalıştırılmıştır.

Tablo 3.6. qRT-PCR program

İnkübasyon öncesi							
Hedef Sıcaklık (°C)	Veri alma	Süre (hh:mm:ss)	Eğim oranı (°C/s)	Her °C' veri alma (°C)	Saniyeiki Hedef (°C)	Adım (°C)	Döngü
95	Yok	00:05:00	4.4	5	0	0	0
Amplifikasyon							
95	Yok	00:00:10	4.4	5	0	0	0
58	Tek	00:00:20	2.2	5	0	0	0
72	Yok	00:00:20	4.4	5	0	0	0
Erime eğrisi							
95	Yok	00:00:05	4.4	5	0	0	0
55	Yok	00:01:00	2.2	5	0	0	0
95	Sürekli	00:00:00	0.11	5	0	0	0
Soğutma							
40	Yok	00:00:30	2.2	5	0	0	0

3.2.4. qRT-PCR ekspresyon analizi

qRT-PCR verileri, göreceli kantifikasyon yöntemi ile analiz edilmiştir. Yinelenenlerin Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır. Kontrol numunelerinin ortalama Ct değeri, hedef gen ve referans gen için muamele numunelerinin ortalama Ct değerinden

ayrı ayrı çıkarılmıştır (ΔC_t değerleri). Daha sonra hedef genin verimliliği ($2^{-\Delta C_t}$) referans genin verimliliğine normalize edilmiştir ($\Delta\Delta C_t$ değerleri).

3.3. Protein izolasyonu

Hücre pelletleri boyutuna bağlı olarak RIPA (Tablo 3.7.) liziz 50 μ l -100 μ l tampon eklenmiştir ve yukarı aşağı iyice pipetlenerek karıştırılmıştır. Her bir 1,5ml ependorf tüp her 5 dakikada bir toplam 30 ya da 40 dakika olmak üzere vortekslenmiştir. +4 sıcaklıkta 15000 rpm'de 1 saat süresince santrifüjlenmiş ve protein lizatı başka bir tüpe alınmıştır. Bütün bu çalışmalar buz üzerinde yapılmıştır. İzole edilen proteinler -80 soğutucuya yerleştirilmiştir.

Tablo 3.7. RIPA tamponu protokolü

Birleşenler	Stok Konsantrasyonu	Final Konsantrasyon	1 ml için
NaCl	2 M'lik	150 mM'lik	75 μ l'lik
NP-40	%10'lik	%1'lik	100 μ l'lik
Sodyum DOC	%10'lik	%0.5'lik	50 μ l'lik
SDS	%10'lik	%0.1'lik	10 μ l'lik
Tris HCl (pH 8.0)	2 M'lik	50 mM'lik	25 μ l'lik
NAF	1 M'lik	50 mM'lik	50 μ l'lik
NaVO ₄	100 mM'lik	1mM'lik	10 μ l'lik
Proteaz inhibitör	25X'lik	%4'lik	40 μ l'lik
Fosfataz inhibitör	10X'lik	%4'lik	40 μ l'lik
Ultra saf su (ddH ₂ O)			600 μ l'lik

3.3.1. Protein miktar tayini

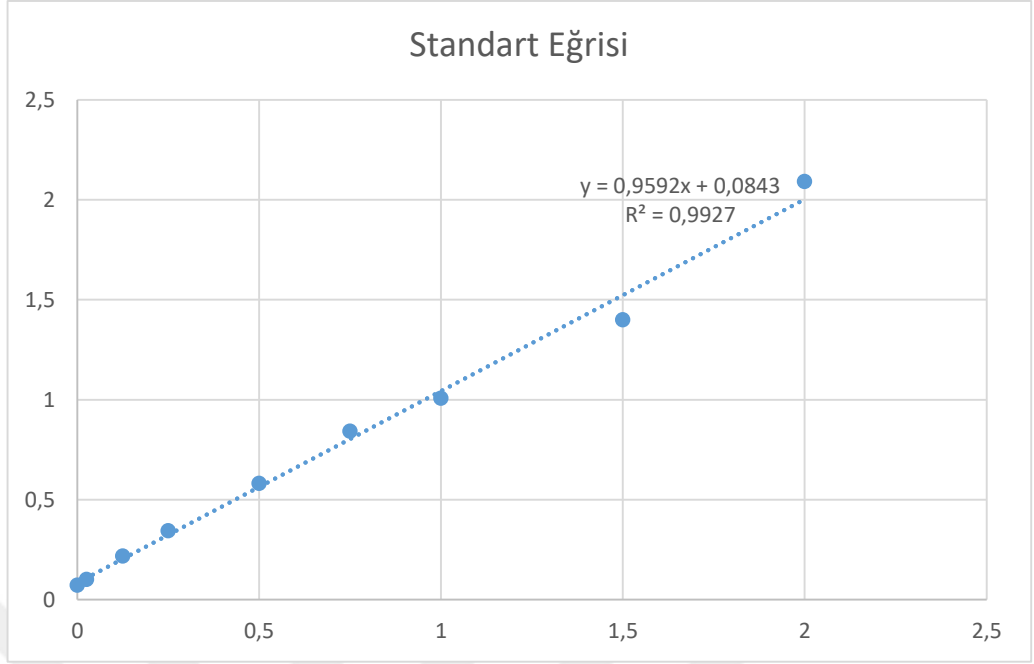
BCA protein assay kit kullanılarak, kullanılan proteinlerin miktar tayini yapılmıştır. -80 dolaptan çıkartılan proteinler, buz üzerine alınmış, erimesi beklenmiştir. Vortekslenerek 96 kuyucuklu plakada, her örnek için 2 tekrar olacak şekilde her

kuyucuğa, 3 µl örnek eklenmiştir. A+B BCA kiti karışımıdır ve aralarında 50:1 oranı vardır. Bu durumda 16 çeşit protein için 2 tekrar ile 32 kuyucuk isimlendirilmiştir. 32x200 yani 6400 µl A ve 128 µl B miktarları ile A+B karıştırılmış ve her kuyucuğa 200 µl pipetlenmiştir. Pipetleme sonrasında 37°C’de 30 dakika alüminyum folyoya sarılıp inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemler sırasında süreler dikkat edilerek SynergyHT mikropılaka okuma cihazı ile 562 nm de okuma yapılmıştır. Sonuçlar bir excel dökümanı olarak elde edilmiştir (Tablo 3.8.). BSA standartlarından alınan absorbans okumalarına bağılı olarak standart bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Tablo 3.9.) ve örnek konsantrasyonları, eğrinin çizgi grafiğinden ölçülmüştür.

Tablo 3.8. BCA standartları konsantrasyon ve absorbans değerleri

Standartlar	X	y1	y2	Y (ortalama)
Vial	Konsantrasyon (ug/ul) $X=5(y-a)/b$	Absorbans		
A	2	2,091	2,091	2,091
B	1,5	1,4	1,4	1,4
C	1	1,008	1,008	1,008
D	0,75	0,842	0,842	0,842
E	0,5	0,581	0,581	0,581
F	0,25	0,344	0,344	0,344
G	0,125	0,218	0,218	0,218
H	0,025	0,101	0,101	0,101
I	0	0,073	0,073	0,073

Tablo 3.8.’deki gibi $y=a+bx$ formülü kullanılarak $a=0,084308$, $b=0,959224$, $R^2 = 0,992676$ BCA standart eğrisi Tablo 3.9’ de gösterildiği gibi oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. *BCA Standart eğrisi*

3.3.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein örnekleri, 4X protein yükleme boyası ile karıştırılmış ve 95°C sıcaklıkta 3-5 dakika test tüpü ısıtıcısında bekletilmiştir. Poliakrilamit jel Tablo 3.10' a bağlı olarak çeker ocak altında hazırlanmıştır.

Tablo 3.9. *Çözme ve istifleme jellerinin farklı konsantrasyonlarının içerikleri*

Reaktör	Çözücü			İstifleme
	(Resolving) jel			(Stacking) jel
	8%	10%	12%	5%
Ultra saf su	2.3 ml'lik	1.9 ml'lik	1.6 ml'lik	1.36 ml'lik
%30'luk akrilamit	1.3 ml'lik	1.7 ml'lik	2 ml'lik	340 µl'lik
1 M Tris	(pH=8.8)	(pH=8.8)	(pH=8.8)	(pH=6.8)

	1.3 ml'lik	1.3 ml'lik	1.3 ml'lik	260 µl'lik
%10'luk SDS	50 µl'lik	50 µl'lik	50 µl'lik	20 µl'lik
%10'luk APS	50 µl 'lik	50 µl'lik	50 µl'lik	20 µl'lik
TEMED	5 µl 'lik	5 µl'lik	5 µl'lik	2 µl'lik
Toplam hacim	5 ml'lik	5 ml'lik	5 ml'lik	2 ml'lik

Mini-PROTEAN Jel döküm modülü kullanılarak, ilk olarak çözücü jel çözeltisi dökülmüştür ve jel polimerleşene kadar izopropanol ile üzeri kaplanmıştır (kabarcık oluşmasını engellemek için yapılmıştır). Çözücü jel kurduktan sonra izopropanol dökülüp yavaşça kurulanmıştır. Alttaki jelin üzerine istifleme jel çözeltisi dökülmüştür. Bu jelin içerisine 10 veya 15 oyuklu tarak yerleştirilmiştir. Her kuyucuğa 10-20 µg protein örnekleri yüklenmiş ve boş kuyucuklar seyreltilmiştir. Protein yükleme boyası ile doldurulmuştur. Elektroforez başlangıçta 90 V' de 20 dakika sonrasında 110-120 V' de 90-120 dakika uygulanmıştır.

3.3.3. Western blotting tekniği ve proteinlerin görüntülenmesi

Semi-Dry transferi için 3 mm kalınlığındaki Whatman marka membran kağıtlarından üçü (7x9 cm²) anot tamponu-I' de, ikisi anot tampon-II' de ve beşi katot tamponunda ıslatılmıştır. PVDF membran ilk önce 3 dakika %100 metanole ve ardından 1 dakika anot tamponu II' ye daldırılmıştır. Whatman kağıtları, jel ve membran Biorad Semi-Dry Turbo Blot makinesinde, anottan katoda şu sırayla istiflenmiştir: 3 adet anot I, 2 adet anot II, PVDF membran, çözücü jeli, 5 adet katot

Whatmann marka membran kağıtlarının 25V' de 30 dakikada transferleri sağlanmıştır. Sonra, protein örneklerini PVDF membranı üzerinde görselleştirmek için 3 dakika boyunca Ponceu S boyaması yapılmıştır. Daha sonra, membranlar, ultra saf su ile yıkanmıştır. Membran ilgili spesifik kDa' dan kesilmiştir. Kesilen membranlar, yavaş çalkalama ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama solüsyonu (Tablo 2.1.) ile bloke edilmiştir. Daha sonra bloklama solüsyonu çıkarılmıştır ve membranlar birincil antikor (Tablo 3.11) ile oda sıcaklığında gece boyunca (yaklaşık 16 saat) +4 ° C' de inkübe edilmiştir.

Birincil antikor inkübasyonundan sonra, membranlar çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 1X TBS-T ile üç kez yıkanmıştır, her seferinde bir önceki yıkama solüsyonu dökülmüştür. Ardından oda sıcaklığında en az 3 saat ikincil antikor inkübasyonu yapılmıştır. Daha sonra membranlar, çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 1X TBS-T ile üç kez yıkanmıştır. İnkübasyonlar, horizontal çalkayıcılar ile yapılmıştır. Antikorlar 2 yada 3 kez tekrarlı kullanılabilir. -20 soğutucuda saklanmıştır Blok tampon 2 yada 3 kez tekrarlı kullanılabilir ve +4 soğutucuda saklanmıştır.

Tablo 3.10. *Western Blot Tekniğinde kullanılan antikorlar*

Antikor	Marka	Katalog numarası	Dilüsyonu
CCNE1	Merck	05-363	1:1000
Anti- α -Tubulin	Sigma-DM1A	32-293	1:2500

İnkübasyonları ve yıkamaları tamamlanan PVDF membranlardan kemilüminesans görüntüleri alınmıştır. Bunun için Amersham Imager 600 cihazında görüntüleme yapmak için Amersham ECL reaktifi yada Pierce ECL Western Blotting Substratı farklı pozlar için kullanılmıştır.

3.3.4. Imaje J Analizi

Western Blot görüntüsü ImageJ tarafından işlenmiş, görüntü türü 8 bit olarak belirlenmiştir. Protein ekspresyon seviyelerine karşılık gelen bantlar tek tek seçilmiş ve bant yoğunlukları ImageJ' de grafikler olarak verilmiştir. Her bir grafiğin alanı, çizimlerle oluşturulan her bir tepe noktası etiketlenerek seçilmiştir. Bu ölçümlerin yüzdesi bir excel dosyasına çıkarılmıştır. Hedef proteinlerin ifadeleri, α -Tübilin referans proteine normalize edilmiştir (Hedef hücre protein ifadesi/ α -Tübilin ifadesi). Çıkan veriler GarphPad' de bir grafik üzerinde, çalışılan her hücre hattı, kendi alt tipine göre gruplandırılarak, CCNE1 protein ekspresyonlarının ifadeleri gösterilmiştir.

3.3.5. NCBI GEO Analizi

Hasta veri setleri NCBI GEO veri tabanından GSE21653' den [48] alınmıştır. Bu veri tabanı yüksek gen ekspresyon değişikliklerini araştırmak için kurulmuştur.

Sistemin kendi analiz motoru üzerinden "Analyze with GEO2R" seçilmiş verilerin olduğu tablo bulunmuştur. "Define group" seçeneği ile bazal benzeri, luminalA, luminal B, HER2, normal benzeri alt grupları oluşturulduktan sonra grup üyeleri, verilerin kayıtlı olduğu tablodan seçilmiştir. Gruplar tamamlandıktan sonra karşılaştırmayı başlatmak için "Top 250" seçeneği seçilmiştir. P değerlerine göre anlamlılıkları sıralanmıştır. "Set Column" seçeneği ile mevcut istatistiklerin ve ek açıklamaların olduğu sayfaya yönlendirilmiştir. Bu analizde 626 hasta verisi kullanılarak excel dosyasına kaydedilmiştir. Sonrasında Graphpad' de t-testi (2-tailed Student's t-test) kullanılarak, alt tiplerin CCNE1 ekspresyonları birbirleriyle kıyaslanmıştır.

3.3.6. İstatistiksel analizler

İki deneysel grubu karşılaştırmak için t-testi (2-tailed Student's t-test) yapılmıştır. Üst ve alt çizgilere karşılık gelen değerler, gruptaki minimum ve maksimum değeri göstermektedir. Grafikler ve eğriler GraphPad, kullanılarak çizilmiştir. Anlamlılık eşiği: "* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns, önemli değil " olarak yorumlanmaktadır.

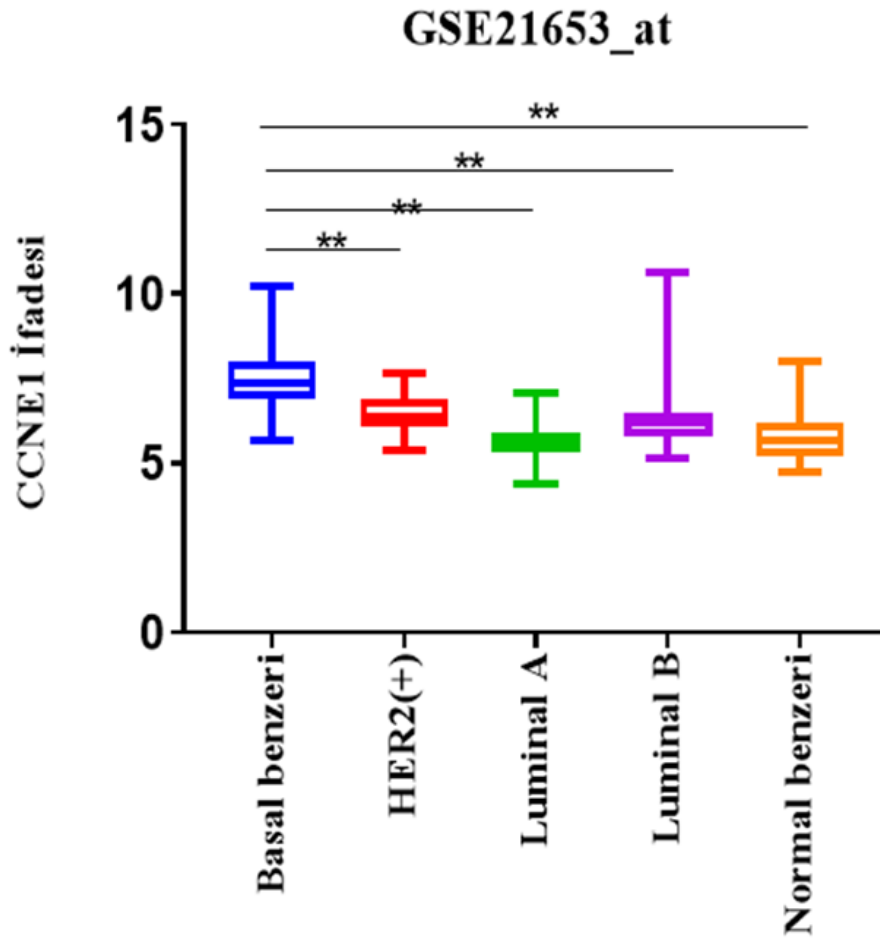
3.3.7. Kaplan-Meier sağ kalım analizi

Kaplan-Meier sağ kalım analizi, TNMK hastalarının CCNE1 geninin mRNA' daki ifadesinin sağ kalıma etkisini değelendirmiştir. GSE21653 [48] veri kaynağındaki TNMK hastalarının uzak metastaz sağ kalımına (DMFS) bakılmıştır. Elde edilen hasta verileriyle GraphPad kullanılarak grafik elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR

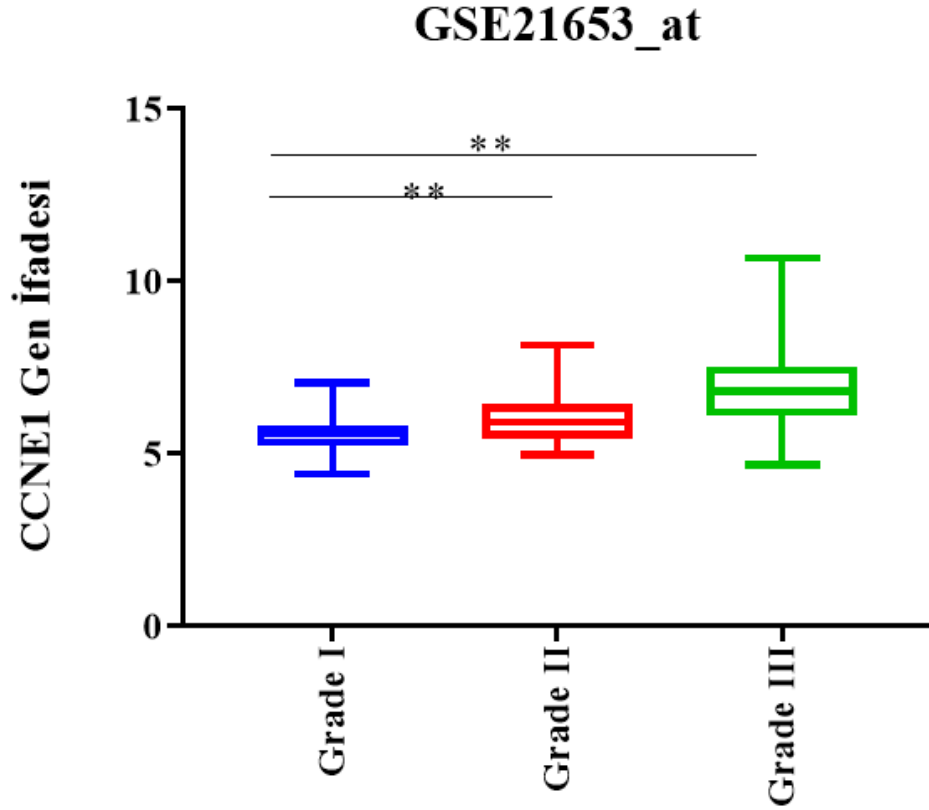
4.1. Biyoinformatik analizler

Hasta verileri GSE21653 [48]' den alınmıştır. Elde edilen hasta bilgileriyle GraphPad, t-test (2-tailed Student's t-test) kullanılarak, HER2, luminal A, luminal B ve normal benzeri meme kanseri alt tipleri, bazal benzeri alt tipiyle Şekil 4.1.'deki gibi kıyaslanmıştır. Bazal benzeri alt tipinin $p^{**}<0,01$ anlamlılıkta CCNE1 gen ifadesinin diğer alt tiplere kıyasla daha fazla olduğu bulgulanmıştır.



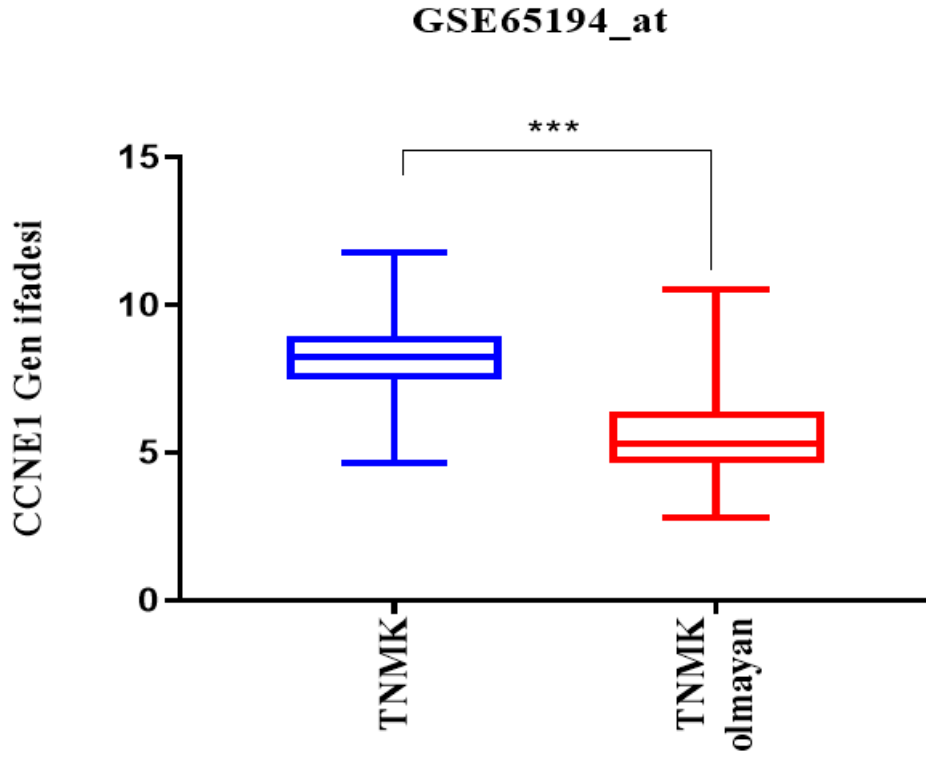
Şekil 4.1. CCNE1 gen ifadesinin moleküler alt tiplere ayrılmış gruplarda biyoinformatik analizlerle sınıflandırılması

Hasta verileri GSE21653 [48]'den alınmıştır. Elde edilen hasta bilgileriyle GraphPad t-test kullanılarak, seviye II ve III TNMK hastası, seviye I'e göre Şekil 4.2.'deki gibi kıyaslanmıştır. Seviye III olan hastalarda $p^{**}<0,01$ anlamlılıkta CCNE1 gen ifadesinin hastalığın seviyesi arttıkça arttığı bulgulanmıştır.



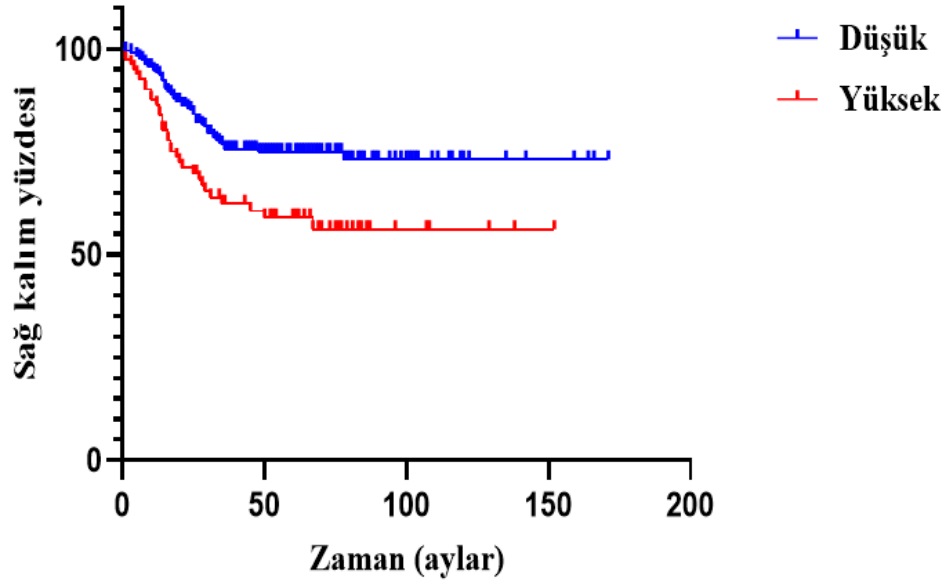
Şekil 4.2. CCNE1 gen ifadesinin meme kanseri derecelerine göre biyoinformatik analizlerle sınıflandırılması

Hasta verileri GSE21653 [48]'den alınmıştır. Elde edilen hasta bilgileriyle GraphPad t-test kullanılarak, TNMK olan hastalar ile TNMK olmayan hastaların kıyaslanması sonucunda, TNMK olan hastaların $p^{**}<0,01$ anlamlılıkta CCNE1 gen ifadesine sahip olduğu Şekil 4.3.'teki gibi bulgulanmıştır.



Şekil 4.3. *TNMK hastalarında CCNE1 ifadesi ile TNMK olmayan alt türlerdeki CCNE1 ifadesinin kıyaslanması*

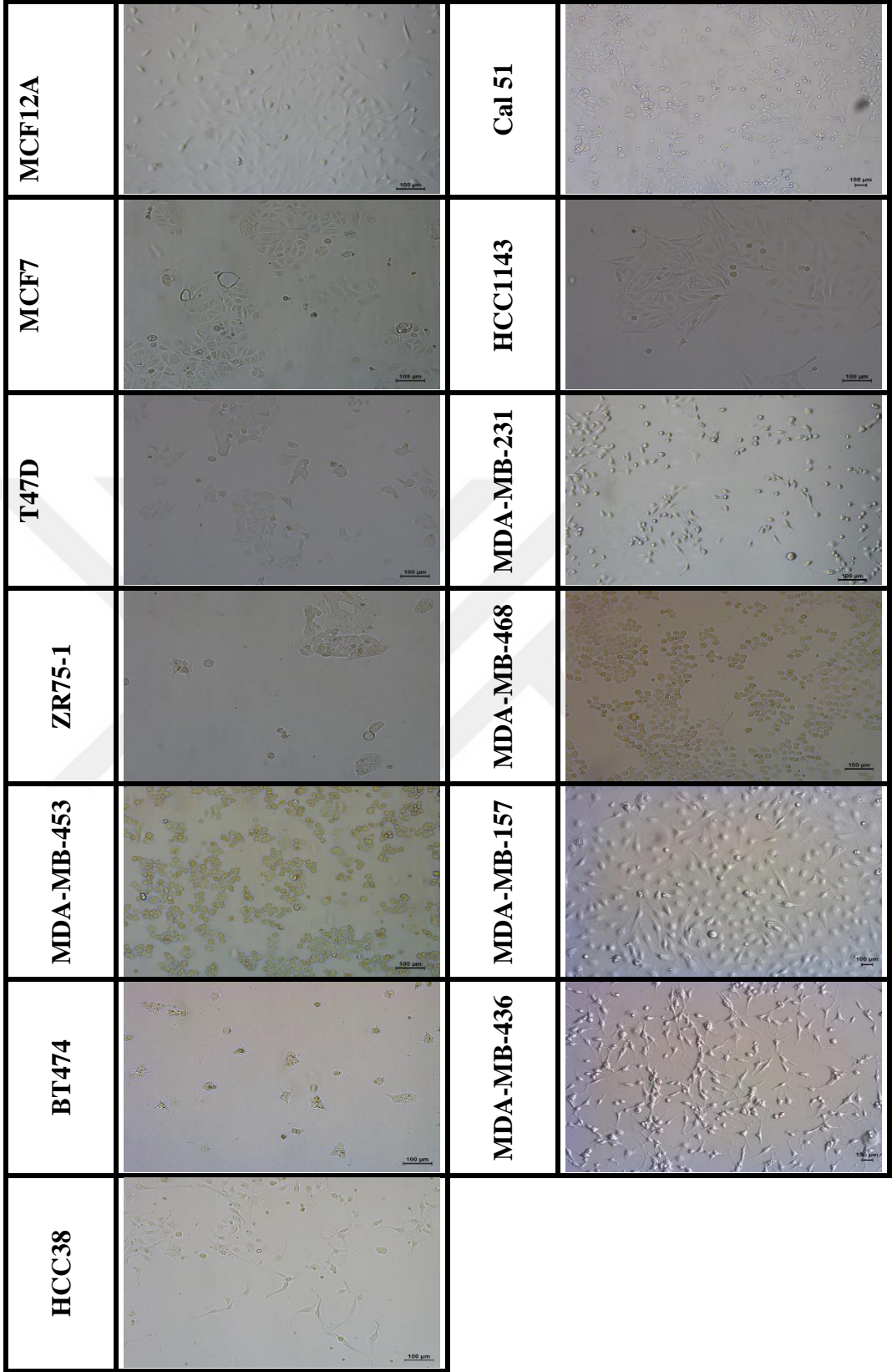
3.3.7 'de belirtildiği gibi Kaplan-Meier sağ kalım analiziyle CCNE1 geninin düşük ve yüksek ifadesinin DMFS eğrisi, GraphPad üzerinde survival testi kullanılarak Şekil 4.4.'teki gibi çizilmiştir.



Şekil 4.4. TNMK de CCNE 1 geni aşırı ifadesinin düşük sağ kalımının Kaptan Meier verileriyle GarphPad' de gösterimi

4.2. Meme Kanseri Alt Tiplerinin Hücre Kültürü

MCF12A Normal meme epitel hücre hattı ve MCF7, T47D, ZR75-1, MDA.MB.453, MDA.MB.231, Cal51, HCC1143, MDA.MB.468, HCC38, MDA.MB.157, BT474, MDA.MB.436 kanserli meme hücre hatları kültüre edilmiştir ve Leica DMI8 inverted mikroskop ile 10X büyütme yapılarak Görsel 4.1' de gösterildiği şekilde fotoğrafları çekilmiştir. Genel olarak deneyler sırasında kullanılan hücrelerin pasajları 20 pasaj farkını geçmemiştir. Hücre doluluk oranının %60-70 oranında olmasına özen gösterilmiştir.

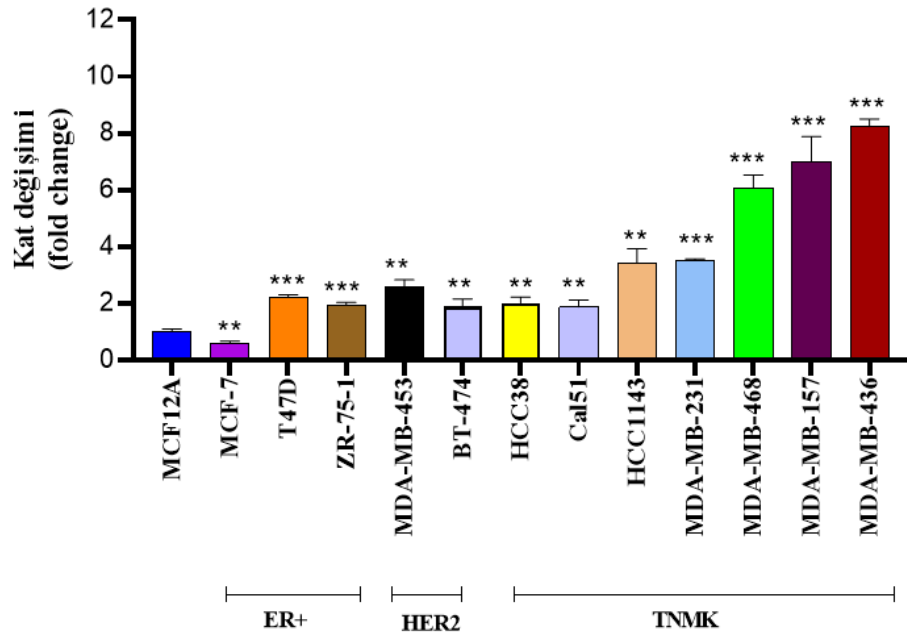


Görsel 4.1. *Kültüre edilen hücre hatları ve Leica inverted mikroskop 10x büyütme fotoğrafları*

4.3. Normal ve Kanserli Meme Hücre Hattında CCNE1 mRNA Seviyesi

Bütün hücrelerin (Görsel 4.1.) mRNA'larından qRT-PCR, normal meme hücre hattına göre meme kanserli hücre hatları normalize edilerek, kat değişimi grafiği üzerinde, CCNE1 anlamlılıklarını ve mRNA seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirmiştir (Şekil 4.5.).

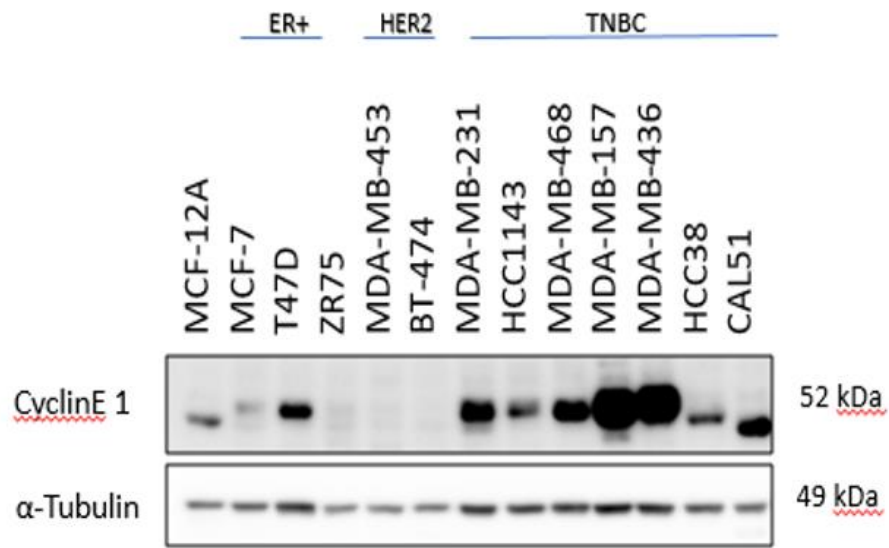
Tek tek ele alınırsa, MCF7 [ER(+)], **p<0,01; T47D ***p<0,001; ZR-75-1 [ER(+)], ***p<0,001; MDA-MB-453 (HER2) ***p<0,001; BT-474 (HER2) **p<0,01; HCC38 (TNMK) **p<0,01; CAL 51 (TNMK) **p<0,01; HCC1143 (TNMK) **p<0,01; MDA.MB.231 (TNMK) ***p<0,001; MDA.MB.468 (TNMK) ***p<0,001; MDA.MB.157 (TNMK) ***p<0,001; MDA.MB.436 (TNMK) ***p<0,001 anlamlılıktadır. Aynı zamanda, T47D ve ZR75-1 [ER(+)] hücre hatlarında, normal hücre hattına kıyasla CCNE1 ifadesinin daha fazla olduğu gözlemlenirken; ER(+) olan MCF-7 hücre hattında CCNE1 ifadesinin, normal hücre hattına kıyasla azaldığı gözlenmiştir. HER2 hücre hatlarında, normale kıyasla CCNE1 ifade artışı gözlenmektedir. Bu analiz ile tüm meme kanseri alt türlerinde mRNA seviyelerini tarayarak TNMK hücre hatlarında en fazla CCNE1 gen ifadesinin oluştuğunu gözlemlemiştir bulunmaktayız (Şekil 4.4.).



Şekil 4.5. CCNE1 q-RT PCR çalışması sonuçlarının grafikte gösterimi

4.4. Normal ve Kanserli Meme Hücre Hattında CCNE1 Protein Seviyeleri

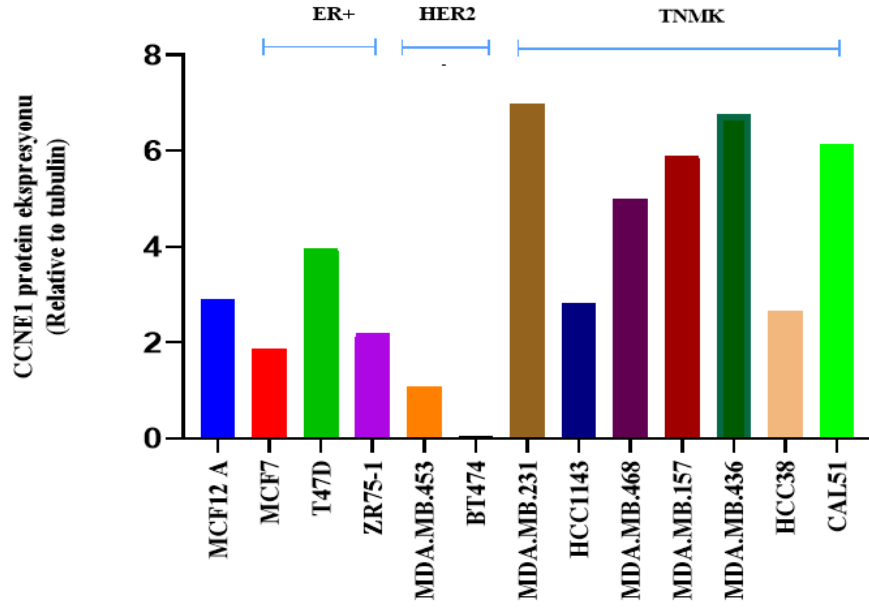
mRNA seviyelerine bakıldıktan sonra aynı hücre hatlarında (Görsel 4.1.) protein seviyeleri değerlendirilmiştir. SDS Page teknik ile jelde protein yürütmesi ve western blot teknikleri uygulanarak elde edilen proteinler Amersham 600 Imager system cihazında görüntülenmiştir ve CCNE1 protein görüntülemesi α -Tubulin'e göre belirlenmiştir. 49 kDa seyrinde gözlenen α -Tubulin'e kıyasla TNMK alt tipleri hücre hatlarının pozlanması Şekil 4. 6. paylaşıldığı gibi ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. CCNE1 western çalışması sonucu

Genel olarak bakıldığında mRNA ile uyumlu şekilde TNMK olanlarda yüksek ifadeli olduğu gözlenmiştir. ER (+) hücre hatlarında, MCF7 az miktarda protein ifadesi gözlenmektedir. T47D ifadesi daha nettir. Fakat ZR75-1 ifade oluşturmamıştır. HER2 hücre hatlarında MDA.MB.453 ve BT474 ifade oluşturmamıştır. TNMK alt grup hücre hatlarına bakıldığında MDA.MB 231, HCC1143, MDA.MB468, MDA. MB157, MDA.MB436, HCC38, Cal51 hücrelerine bakıldığında 52 kDa seyrindeki CCNE1 protein ifadesi oldukça belirgin şekilde gözlenmektedir. Bu nicel gözlemin Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda, MCF 12A hücreleri CCNE1 protein ifadesi 2-4 arasında kalırken, ER (+) hücrelerinin 2-4 arasında olduğunu, HER2 hücrelerinin 0-2

arasında TNMK hücrelerinin 2-8 arasında anlamlı bir fazlalık farkı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7.)



Şekil 4.7. Farklı hücre hatlarındaki CCNE1 protein ekspresyonu α -tübilin göre normalize edilmiştir

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Meme kanseri sürekli artış gösteren ve kadınlarda sık gözlenen bir hastalıktır. Erken tanı ve yeni geliştirilen adjuvan tedavi stratejileri ile mortalite oranı azalmaya başlamıştır [49]. Kötü prognoza sahip alt türü HR ve HER2 reseptörleri açısından negatif olmasından dolayı tedavi seçenekleri kısıtlıdır; bu sebeple de yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır [50]. Bu duruma bağlı olarak kanser hücrelerinin çoğalmasına katkıda bulunan biyolojik süreç ve sinyal yollarının, bu süreçte yer alan moleküllerin etkinliğinin tanımlanmasında önem arz etmektedir. Bu çalışmada hücre döngüsünde önemli bir role sahip olan CCNE1 geni aşırı ifadesinin varlığının farklı alt tiplere ait hücre hatları üzerinde incelenerek TNMK' daki yüksek oranı gözlenmiştir. İncelenen farklı araştırmalarda sph53 ile insan meme epitel hücrelerinden (HMECs) farklı onkojenik yolların farklı epigenetik değişikliklere yol açıp açmayacağı belirlenmesi için bir deney dizaynı yapılmıştır. Bu strateji dahilinde onkojenlerin erken aktivasyonunun, hücre soy kökeniyle birlikte meme kanseri moleküler alt tiplerinin oluşturulmasında önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir. İnsan meme epitel hücrelerinin farklı onkojenik yolları aktive ettiği düşünülen 3 onkojen WNT, CCNE1 ve HRASV12 retroviral transdüksiyonlarının aşırı eksprese edildiği bulgusuna varılmıştır (NCBI-GEO GSE114848[51]). Kanser hücrelerinin azaltılmasını sağlayabilmek için hücre çoğalmasının önüne geçilmelidir. Bunun için de kanser yollarını destekleyen moleküllerin ve sinyal yollarının etkinliğinin tanımlanması önemlidir.

CCNE1 normal bir hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde rol almaktadır. CDK inhibitörü ve p16INK4a proteinini kodlamaktadır. Bu protein ise Rb fosforilasyonunu etkilemektedir [52].

Hücre döngüsü kontrolü için kritik olan genlerdeki polimorfizmler, yumurtalık kanseri riski için önemli bulunmuş ve çok sayıda gen, farklı etiketlemeler ile tek nükleotid polimorfizm (SNP) setleri olarak sorgulanmıştır. CDKN2A-CDKN2B, CCND1, CDK2 ve CCNE1 sinyallerinin yumurtalık kanserinde tutarlı olduğu ve CCNE1 geninin aşırı ekspresyonu yumurtalık kanserinde önemli bir anlam ifade ettiği bulgusuna varılmıştır [53]. Yapılan başka bir çalışmada da homolog rekombinasyon eksikliği (HRD), tümör BRCA1 / 2 mutasyonları ve CCNE1 amplifikasyonunun yokluğunun, yumurtalık kanserinin sağ kalımında iyileşme ile ilişkili olduğu düşünülerek CCNE1 geninin aşırı ekspresyonu önemsenmiştir [54]. Literatüre benzer şekilde, biz de çalışmamızda özellikle

TNMK hücre hatlarında hem protein hem RNA seviyesinde CCNE1 gen/ protein arttığını gösterdik. Bu çalışmaya benzer olarak Metiltransferaz 3 (METTL3)' ün, kolorektal kanser (CRC) dokularında regülasyonunun yüksek olduğu ve zayıf sağ kalma ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. CCNE1 'i hedefleyerek CRC hücre çoğaltılmıştır. Sonrasında bütiratın, METTL3 ve ilgili CCNE1'in ekspresyonu azaltılarak CRC gelişimi inhibe edilmiştir [55]. Literatür taramalarında benzer gastirik [56], akciğer [57] veya TNMK [58] yayınlarında da CCNE1 geninin aşırı ekspresyonu önemsenmiştir.

Hasta verileriyle yapmış olduğumuz biyoinformatik analizlerde bazal benzeri meme kanserinin, HER2, luminal A, luminal B ve normal benzeri alt tipleriyle kıyaslandığında CCNE1 gen ekspresyonunun arttığı ve hastalık aşamaları ilerledikçe ilk seviyesine göre artışının $p^{**} < 0,001$ anlamlılığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak ER (+) (MCF12A, T47D, ZR-75-1), HER2 (MDA.MB.453, BT 474) , TNMK (HCC38, Cal51, HCC1143, MDA.MB.231, MDA.MB.468,MDA.MB.157, MDA.MB.436) alt gruplarını belirtilen üye hücre hatlarıyla çalışarak, transkripsiyonel modifikasyonlardan etkilenmeden mRNA seviyesinde CCNE1 gen ekspresyonunun artışı incelenmiştir. TNMK alt türündeki ifadenin, diğer alt türlere kıyasla daha fazla olduğunu mevcut bulgulara bakılarak belirtilebiliriz. mRNA seviyesinde gözlemlediklerimizi, protein seviyesinde incelediğimizde de TNBC alt tür üyelerinin, diğer üyelere kıyasla CCNE1 artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Gen ekspresyonunun yüksek olması ve western bulgularının doğrulaması, CCNE1'in bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu genin, genomik seviyede siRNA'lar ile hedeflenerek, TNMK hücre hatlarının susturulması ve sonrasında detaylı yolak analizleri ile hangi yolaklar üzerinden etki ettiği veya potansiyel metastazla ile ilişkisinin ne olduğu araştırılabilir. Çalışmamız biyoinformatik analizlerle in-vitro olarak yürütülmüştür. Ancak çalışma doğrultusunda elde edilen veriler in-vivo verileriyle ve doğrudan hastalardan tümörlü dokuların analizleri ile desteklenmelidir. CCNE1 proteinini hedefleyen başarılı spesifik bir inhibitör geliştirilerek fare deneylerinde tümör büyümesine olan etkisi incelenmelidir. Ayrıca hasta materyalleri IHC metodu ile incelenip CCNE1 mRNA ve protein seviyeleri belirlenebilir.

Bu çalışma ile CCNE1 geni potansiyel özellikle TNMK hastaları için hastalığın prognozunun tespit edilmesinde ve alternatif hedef tedavi moleküllerinin tespitine yönelik önemli bir biyobelirteç olarak sunulmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Caffarel, M.M., et al., Molecular Biology of Breast Cancer, in eLS. 2016. p. 1-9.
2. Grabher, B.J., Breast Cancer: Evaluating Tumor Estrogen Receptor Status with Molecular Imaging to Increase Response to Therapy and Improve Patient Outcomes. Journal of Nuclear Medicine Technology, 2020.
3. Müdürlüğü, S.B.H.S.G., Türkiye Kanser İstatistikleri. 2016, 2019.
4. Devrim, T., et al., Retrospective Evaluation of the Breast Cancer Cases. Kafkas Journal of Medical Sciences, 2020. 10(1): p. 51-55.
5. S-J Dawson, N.M., F M Blows, K E Driver, E Provenzano, J Le Quesne, L Baglietto, G Severi, G G Giles, C A McLean, G Callagy, A R Green, I Ellis, K Gelmon, G Turashvili, S Leung, S Aparicio, D Huntsman, C Caldas & P Pharoah BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. British Journal of Cancer, 2010.
6. Xiaofeng Dai, T.L.,¹ Zhonghu Bai,¹ Yankun Yang,¹ Xiuxia Liu,¹ Jinling Zhan,¹ and Bozhi Shi², American Journal of Cancer Research, 2015.
7. Dominique J. P. van Uden, M.C.v.M., Peter Bult, Luc J. A. Strobbe, J. J. M. van der Hoeven, Charlotte F. J. M. Blanken-Peters, Sabine Siesling & Johannes H. W. de Wilt Pathologic complete response and overall survival in breast cancer subtypes in stage III inflammatory breast cancer. Springer, 2019.
8. Gautam K. Malhotra, X.Z., Hamid Band & Vimla Band, Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biology & Therapy, 2010.
9. Charles M. Perou*², T.S., Michael B. Eisen*, et al., Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2000.

10. Pierre-Emmanuel Colombo, F.M., Britta Weigelt & Jorge S Reis-Filho
Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Journal*, 2011.
11. Therese Sorlie, R.T., Joel Parker, Trevor Hastie, J. S. Marron, Andrew Nobel, Shibing Deng, Hilde Johnsen, Robert Pesich, Stephanie Geisler, Janos Demeter, Charles M. Perou, Per E. Lonning, Patrick O. Brown, Anne-Lise Børresen-Dale, and David Botstein, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 2003.
12. M.C. Kriegmair* , R.M. Wirtz† ,1, T.S. Worst* ,1, J. Breyer‡ ,1, M. Ritter*, B. Keck§,1, C. Boehmer*, W. Otto‡,1, M. Eckstein¶,1, C.A. Weis#, A. Hartmann¶,1, C. Bolenz**,1 and P. Erben*,1, Prognostic Value of Molecular Breast Cancer Subtypes based on Her2, ESR1, PGR and Ki67 mRNA Expression in Muscle Invasive Bladder Cancer. *Trasnlational Oncology*, 2018. 11.
13. David G. Hicks, M., Sarah M. Short, BS, Nichole L. Prescott, BS, Shannon M. Tarr, BS, Kara A. Coleman, BS, Brian J. Yoder, DO, PhD, Joseph P. Crowe, MD, Toni K. Choueiri, MD, Andrea E. Dawson, MD, G. Thomas Budd, MD, Raymond R. Tubbs, DO, Graham Casey, PhD, and Robert J. Weil, MDz, Breast Cancers With Brain Metastases are More Likely to be Estrogen Receptor Negative, Express the Basal Cytokeratin CK5/6, and Overexpress HER2 or EGFR. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2006.
14. Xuanwen Bao, R.S., Tianyu Zhao, Yanfang Wang, Natasa Anastasov, Michael Rosemann & Weijia Fang Integrated analysis of single-cell RNA-seq and bulk RNA-seq unravels tumour heterogeneity plus M2-like tumour-associated macrophage infiltration and aggressiveness in TNBC. *Springer*, 2020.

15. Francois Bertucci^{1, 3*}, Pascal Finetti¹, Nathalie Cervera¹, Benjamin Esterni⁴, Fabienne Hermitte⁵, Patrice Viens^{2,3} and Daniel Birnbaum¹, How basal are triple-negative breast cancers? *Int J. Cancer*, 2008.
16. Melissa Quintero¹, D.A., ³, Larissa Menezes dos Reis^{1,3}, Carolline Fernanda Rodrigues Ascensão^{1,3}, Krishina Ratna Sousa de Oliveira^{1,3}, Kaliandra de Almeida Gonçalves¹, Marília Meira Dias¹, Marcelo Falsarella Carazzolle² and Sandra Martha Gomes Dias^{1*}, Guanylate-binding protein-1 is a potential new therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Bio Med Central Cancer*, 2017.
17. MD, T.G.L., Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. Springer Link, 2019.
18. Matsen, C.B. and L.A. Neumayer, Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surg*, 2013. 148(10): p. 971-9.
19. Bernard Fisher, M.D., Stewart Anderson, Ph.D., John Bryant, Ph.D., Richard G. Margolese, M.D., Melvin Deutsch, M.D., Edwin R. Fisher, M.D., Jong-Hyeon Jeong, Ph.D., and Norman Wolmark, M.D., Twenty- Year Follow up of a Randomize Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy Plus Irradiation for The Treatment of Invasive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2002.
20. Nuket Eliyatkin¹, E.Y., Baha Zengel³, Safiye Aktaş⁴, Enver Vardar¹, Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J. Breast Health*, 2015.
21. Sacks, Primary management of carcinoma of the breast. *The Lancet*, 1993.
22. Society, A.C. Treatment of Triple-negative Breast Cancer. 2020; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html#:~:text=Advanced%20TNBC%20that%20makes%20the,in%20about%2020%25%20of%20TNBC>.

23. N Lynn Henry ¹, D.F.H., Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 2012.

24. Douglas F. Easton, D.F., ¹ D. Timothy Bishop,² and the Breast Cancer Linkage Consortium* and I.o.C.R. 'Section of Epidemiology, Section of Epidemiology, Belmont, Surrey, England; and ²Imperial Cancer Research Fund, Genetic Epidemiology, Laboratory, St. James's Hospital, Leeds, Breast and Ovarian Cancer Incidence in BRCA I -Mutation Carriers. *Elsevier Journal*, 1995.

25. Kenneth Lin, M.R.L., MD, MPH; Therese Miller, DrPH; and Supriya Janakiraman, MD, MPH, Benefits and Harms of Prostate-Specific Antigen Screening for Prostate Cancer: An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 2008.

26. Valsamo K. Anagnostou¹, A.W.W., Jennifer M. Giltnane¹, Summar Siddiqui¹, Camil Liceaga¹, Mark Gustavson⁴, Konstantinos N. Syrigos², Jill L. Reiter³, and David L. Rimm, Analytic Variability in Immunohistochemistry Biomarker Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Focus: Biomarker and Biospecimens*, 2010.

27. Soonmyung Paik, M.D., Steven Shak, M.D., Gong Tang, Ph.D., Chungyeul Kim, M.D., Joffre Baker, Ph.D., Maureen Cronin, Ph.D., Frederick L. Baehner, M.D., Michael G. Walker, Ph.D., Drew Watson, Ph.D., Taesung Park, Ph.D., William Hiller, H.T., Edwin R. Fisher, M.D., D. Lawrence Wickerham, M.D., John Bryant, Ph.D., and Norman Wolmark, M.D., A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2004.

28. Gershon Y. Locker, S.H., Jules Harris, John M. Jessup, Nancy Kemeny, John S. Macdonald, Mark R. Somerfield, Daniel F. Hayes, and Robert C. Bast Jr, ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. 24.

29. Laura J Esserman ¹, I.M.T.J., Brian Reid, Over diagnosis and over treatment in cancer: an opportunity for improvement. JAMA, 2013.
30. The Doctors' Dilemma Steven J. Katz, M., MPH¹; and Monica Morrow, MD², Addressing Over Treatment in Breast Cancer. JAMA, 2013.
31. Laure J. van't Veer, H.D., Marc J. van de Vijver, Yudong D. He, Augustinus A. M. Hart, Mao Mao, Haans L. Peterse, Karin vander Kooy, Matthew J. Marton, Anke T. Witteveen, George J. Schreiber, Ron M. Kerkhoven, Chris Roberts, Peter S. Linsley, Rene Bernards & Stephen H. Friend, Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer. Nature, 2002. 415.
32. Yixin Wang, J.G.M.K., Yi Zhang, Anieta M Sieuwerts, Maxime P Look, Fei Yang, Dmitri Talantov, Mieke Timmermans, Marion E Meijer-van Gelder, Jack Yu, Tim Jatkoe, Els M J J Berns, David Atkins, John A Foekens, Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. The Lancet, 2005.
33. By Serena Bertozzi, A.P.L., Luca Seriau, Roberta Di Vora, Carla Cedolini and Laura Mariuzzi, Biomarkers in Breast Cancer. 2018.
34. V Y Shin¹, J.M.S., I Cheuk¹, E K O Ng¹ and A Kwong^{*,1,2} and t.U.o.H.K. ¹Department of Surgery, Hong Kong SAR, China and ²The Hong Kong Hereditary Breast Cancer Family Registry, Hong Kong SAR, China, Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. British Journal of Cancer, 2015.
35. Adrian M. Senderowicz, E.A.S., Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators. Journal of National Cancer Institute, 2000.
36. Anil K. Tyagi, R.P.S., Chapla Agarwal, Daniel C. F. Chan, and Rajesh Agarwal² and S.o.P.A.K.T. Department of Pharmaceutical Sciences, R. P. S., C. A., R. A.], Division of Medical Oncology, Department of Medicine [D. C. F. C.], and

University of Colorado Cancer Center [D. C. F. C., R. A.], University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado 80262, Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Growth Inhibition, G2-M Arrest, and Apoptosis¹. *Clinical Cancer Research*, 2002. 8.

37. C H Golias¹, A.C., K Charalabopoulos, Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 2004.
38. David Joyce^a, C.A.^b, Jay Steer^a, Maofu Fu^b, Boumediene Bouzahzah^b, Richard G. Pestell^{b,*} and T.U.e.o.W.A.^a ^a Department of Pharmacology, Nedlands, WA 6907, Australia ^b Department of Medicine and Department of De6elopmental and Molecular Biology, The Albert Einstein Cancer Center, Albert Einstein College of Medicine, Chanin 302, 1300 Morris Park A6enue, Bronx, NY 10461, USA, NF-kB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Elsevier Journal*, 2001.
39. Sherr, C.J., The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research*, 2000.
40. Kierszenbaum AL, T.L.e., *Histology and Cell Biology*. 2006, New York.
41. Gil, J., & Peters, G, Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Moleculer Cell Biology/ Nature Review*, 2006. 7.
42. Sun*, Y., *p53 and Its Downstream Proteins as Molecular Targets of Cancer*. 2006: Wiley Inter Scicence.
43. Yuichi Hirose, M.S.B., and Russell O. Pieper², Abrogation of the Chk₁-mediated G₂ Checkpoint Pathway Potentiates Temozolomide-induced Toxicity in a p53-independent Manner in Human Glioblastoma Cells¹. *Cancer Research*. 61.
44. Aijin Wang, N.Y., Masumi Suzui, Akiji Yamauchi, Makoto Tarao & Hideki Mori Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1996.

45. NH Nielsen¹, C Arnerlov³, SO Emdin³ and G Landberg¹, Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to estrogen receptor status. *British Journal of Cancer*, 1996.
46. R Scuderi¹, K.A.P., K Pokrovskaja, M Björkholm, K G Wiman, P Pisa, Cyclin E Overexpression in Relapsed Adult Acute Lymphoblastic Leukemia's of B-Cell Lineage. *Blood*, 1996. 87.
47. Atlas, C.g.b.T.H.P.; Available from:
https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105173-CCNE1#gene_information.
48. Sabatier R, F.P., Cervera N, Lambaudie E, Esterni B, Mamessier E, Tallet A, Chabannon C, Extra J, Jacquemier J, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Down-Regulation of ECRG4, a Candidate Tumor Suppressor Gene, in Human Breast Cancer. *PLOS ONE*, 2011.
49. Traina, T.G.L.a.T.A., *Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer*. Springer Nature Switzerland AG 2019, 2019.
50. Mehmet Emin GÜNEŞ, G.Ç.,¹ Fadime Didem TRABULUS¹ Şefika AKSOY,¹ Emre ÖZORAN,¹ Acar AREN,¹ Zuhale GÜCİN,² Fadime BAHADIR², Üçlü (ER, PGR, HER2) Negatif 47 Meme Kanseri Hastasının Değerlendirilmesi. *İstanbul Tıp Dergisi*, 2012.
51. manoir, S.P.d., mRNA Expression data from Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) transduced with shp53, HRASV12, WNT1 and CCNE1 [mRNA expression]. 2020: NCBI-GEO.
52. C. Elizabeth Caldon, R.J.D., Robert L. Sutherland, and Elizabeth A. Musgrove*, *Journal of Cellular Biochemistry* 97:261–274 (2006) Cell Cycle Control in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010.

53. Ellen L. Goode, B.L.F., Robert A. Vierkant, Julie M. Cunningham, Catherine M. Phelan, Stephanie Anderson, David N. Rider, Kristin L. White, V. Shane Pankratz, Honglin Song, Estrid Hogdall, Susanne K. Kjaer, Alice S. Whittemore, Richard DiCioccio, Susan J. Ramus, Simon A. Gayther, Joellen M. Schildkraut, Paul P.D. Pharaoh and Thomas A. Sellers, Candidate Gene Analysis Using Imputed Genotypes: Cell Cycle Single-Nucleotide Polymorphisms and Ovarian Cancer Risk. American Association for Cancer Research, 2009.
54. Euan A Stronach ^{#1}, J.P., Kirsten M Timms ^{#3}, Elisha Hughes ³, Krystal Brown ³, Christopher Neff ³, Michael Perry ³, Alexander Gutin ³, Mona El-Bahrawy ⁴, Jennifer H Steel ¹, Xinxue Liu ¹, Liz-Anne Lewsley ², Nadeem Siddiqui ⁵, Hani Gabra ^{1,6}, Jerry S Lanchbury ³, Robert Brown ^{7,8}, Biomarker Assessment of HR Deficiency, Tumor BRCA1/2 Mutations, and CCNE1 Copy Number in Ovarian Cancer: Associations with Clinical Outcome Following Platinum Monotherapy. Molecular Cancer Research, 2018.
55. Wei, ^{W.Z.Y.S.J.X.Y.L.J.Z.W.M.C.S.S.Q.D.L.Z.J.F.}, Methyltransferase like 3 promotes colorectal cancer proliferation by stabilizing CCNE1 mRNA in an m6A-dependent manner. Wiley, 2019.
56. YohDobashiMD^d A., Gene amplification of CCNE1, CCND1, and CDK6 in gastric cancers detected by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. Human Pathology Elsevier, 2017.
57. Xin Wang¹, Qi Sun³, Chen Chen⁴, Rong Yin^{1,5}, Xing Huang^{1,2}, Xuan Wang², Run Shi^{1,2}, Lin Xu^{1,5}, Binhui Ren^{1,5}, ZYG11A serves as an oncogene in non-small cell lung cancer and influences CCNE1 expression. Oncotarget, 2016.
58. Zhao1, Z.-M., et al., CCNE1 amplification is associated with poor prognosis in patients with triple negative breast cancer. BMC Cancer, 2019.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Nigar Pelin Makas

Eğitim Bilgileri:

Lise: Etimesgut Anadolu Lisesi (Haziran,2004)

Üniversite: Eskişehir Anadolu Üniversitesi (Haziran, 2013)

Yüksek Lisans: Eskişehir Teknik Üniversitesi(Nisan, 2021)

İş Tecrübesi Bilgileri:

Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Eğitim Araştırma ve Lisans Laboratuvarları/ Biyolog ve Laboratuvar Yöneticisi (Aralık, 2015- hala)