



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**MEME KANSERİ METASTAZINDA
EKSOZOMAL RNA'LARIN ROLÜ**

Banu Candan YILMAZ

**Ağustos 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ METASTAZINDA
EKSOZOMAL RNA'LARIN ROLÜ**

**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

Banu Candan YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU

Denizli, 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Banu Candan YILMAZ

İmza :

YAYIN BEYAN SAYFASI

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Özet metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-2. Yasin Durkal, Kubilay İnci, Onur Tokgun, Ugur Yilmaz, **Banu Candan Yilmaz(2024)** Integrative analysis of ex vivo studies and microarray reveals the novel inhibitor effects of trehalose on the pathogenesis of pterygium. Chem Biol Drug Des. 2024 Jul;104(1):e14571. doi: 10.1111/cbdd.14571

ÖZET

MEME KANSERİ METASTAZINDA EKSOZOMAL RNA'LARIN ROLÜ

Banu Candan Yılmaz

Doktora Tezi, Kanser Moleküler Biyolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU

Ağustos 2024, 84 Sayfa

Meme kanseri, dünyada ve Türkiye’de kadınlarda en sık görülen ve en sık ölüm nedeni olan kanserdir. Bu verilerin nedenleri; değişen yaşam koşullarıyla beraber obezite, geç yaşta doğumlar, kısa laktasyon süreleri, erken menarş, geç menapoz, uzun süreli hormon tedavileri, nüfusun giderek yaşlanması, gelişen sağlık sistemi ve preventif onkoloji alanında çalışmalar ile toplumsal sağlık okuryazarlığının artması nedeniyle tanı sayılarının artışı olarak sayılabilir. Hücrelerimiz tarafından salınan küçük hücre dışı veziküller (sEV); hücreler arası iletişimde, tümör invazyonu ve metastaz geliştirmek için tümör mikroçevresini yeniden şekillendirmek suretiyle kanserleşme sürecine katkı sağlayabilirler. Yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinden salınan eksozomlar tümör progresyonunu, metastazı ve anjiogenezi düzenlenme, yönlendirme potansiyeline sahip oldukları saptanmıştır. Yapılan tez çalışmamızda kan örneği toplanan hastalarımızın kanından eksozomal RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA örneklerinden literatür araştırması sonucu belirlediğimiz lncRNA’ların ifadelerindeki değişim eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR) ile valide edilmeden önce cDNA’ya çevrildi. Ayrıca MCF-10A hücre dizilerinde metastazlara değişime bağlı olarak salınan eksozomların hücre migrasyonuna olan etkisini gözlemlemek amacıyla yara kapanma (wound healing) ve proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. ELISA yöntemi ile eksozomal CD63 bakıldı. Nonmetastatik meme kanseri ve farklı organ metastazları olan meme kanseri tanılu hasta gruplarımız arasındaki karşılaştırmalı analizler için GraphpadPrism 8.0.1 ve SPSS 22.0 programları kullanılarak One Way ANOVA, paired ve unpaired Student t-testleri uygulanarak gerçekleştirildi. Seçilen lncRNA’lar için farklı organ metastazı olan hasta gruplarımızda nonmetastatik hasta grubuna göre değişen oranlarda artış olduğu görüldü. Kodlamayan RNA’lar (ncRNA’lar), meme kanseri tümör oluşumunun farklı aşamalarında, hücre ölümü, metabolizma, epitelyal - mezenkimal geçiş (EMT), metastaz ve ilaç direncini etkileyen önemli oyuncular olarak büyük potansiyel göstermektedir. lncRNA’lar, transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonlarını ve fonksiyonlarını düzenleyerek farklı moleküler mekanizmalarda yer alır. Yapılan tez çalışmasında daha önce yapılan çalışmalara katkı sağlayacak olan metastaza sahip hastalarda ifadeleri artan lncRNA’ların biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı, tropizme katkısının olup olmadığı, sağkalımı artırmaya yönelik yeni bilgiler verip veremeyeceği ve tedaviye katkı sağlayıp sağlamayacağı konularında sonuçlar elde etmeyi hedefledik.

Anahtar Kelimeler: Eksozom; Karsinogenez; lncRNA; Meme Kanseri

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE022)

ABSTRACT

ROLE OF EXOSOMAL RNA's IN BREAST CANCER METASTASIS

YILMAZ, Banu Candan

PhD Thesis in Cancer Molecular Biology

Supervisor: Prof. Gamze GÖKÖZ DOĞU

August 2024, 84 Pages

Breast cancer is the most common cancer and the most common cause of death in women all over the world and also in Turkey. The reasons for this data ; along with changing living conditions, obesity, late births, short lactation periods, early menarche, late menopause, long-term hormone treatments, aging of the population, developing health system and studies in the field of preventive oncology can be counted as the increase in the number of diagnoses due to the increase in social health literacy. Small extracellular vesicles (sEV) released by our cells; In intercellular communication, they can contribute to the cancerization process by shaping the tumor microenvironment to develop tumor invasion and metastasis. Studies have shown that exosomes released from tumor cells have the potential to regulate and direct tumor progression, metastasis and angiogenesis. In our thesis study, exosomal RNA was isolated from the blood of our patients. The changes in the expression of lncRNAs, which we identified from the total RNA samples as a result of literature research, were converted into cDNA before being validated by real-time PCR. Additionally, a wound healing experiment was performed to observe the effect of exosomes released due to change in metastases on cell migration in MCF-10A cell lines. For comparative analyzes between our patient groups diagnosed with nonmetastatic breast cancer and breast cancer with different organ metastases, Onewayanova, paired and unpaired Student t-tests were applied using GraphpadPrism 8.0.1 and SPSS 22.0 programs. For the selected lncRNAs, it was observed that there was an increase in varying rates in our patient groups with different organ metastases compared to the non-metastatic patient group. Non-coding RNAs (ncRNAs) show great potential as important players at different stages of breast cancer tumorigenesis, affecting cell death, metabolism, epithelial-mesenchymal transition (EMT), metastasis and drug resistance. LncRNAs are involved in different molecular mechanisms by regulating gene expressions and functions at transcriptional, translational and post-translational levels. In our study, we aimed to obtain results on whether lncRNAs, whose expressions are increased in patients with metastases, can be used as biomarkers, whether they contribute to tropism, whether they can provide new information to increase survival, and whether they will contribute to treatment, which will contribute to previous studies.

Keywords: Breast cancer; Exosome; Carcinogenesis; LncRNA.

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number2022SABE022.

TEŞEKKÜR

Kanser Moleküler Biyolojisi doktora eğitimim boyunca bilgi ve engin tecrübeleriyle her zaman yanımda olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU' ya,

Tez çalışma sürecimde yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar çalışma aşamalarındaki süreç yönetimi için her koşulda elinden geleni yapan hocam Sayın Doç. Dr. Onur TOKGÜN'e,

Bu alandaki bilgi, tecrübelerini gerek ders gerekse tez izleme sürecindeki anlatım ve yönlendirmeleri ile yön veren hocalarım, Sayın Prof. Dr. Hakan AKÇA, Sayın Prof. Dr. Bünyamin AKGÜL, Sayın Prof. Dr. Arzu YAREN, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nedim KARAGENÇ, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aydın DEMİRAY, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Derya KARAER'e,

Çalışmamız boyunca desteğini esirgemeyen ve kıymetli katkılar sağlayan Sayın Uzm. Dr. Özden ÖZER'e,

Tez laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile sürece değerli katkıları olan hocalarım Doç. Dr. Pervin Elvan TOKGÜN, Uzm. Dr. Samet TÜREL'e ve kıymetli çalışma arkadaşlarım Kubilay İNCİ, Büşra ÇELİKKAYA'ya,

Bu meşakkatli yolda beni her zaman destekleyen sevgili eşim Uğur YILMAZ, çocuklarım, ailem ve çalışma arkadaşlarıma,

Çalışma hastalarımı toplamama yardımcı olan başta Gamze DURAL olmak üzere tüm Tıbbi Onkoloji Kemoterapi Ünitesi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaçlar	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri	3
2.1.2.1. Daha önce meme kanseri ve aile hikayesi	4
2.1.2.2. Yaş ve cinsiyet.....	4
2.1.2.3. Kilo ve fiziksel aktivite.....	4
2.1.2.4. Hormonal tedavi ve hormon içerikli kontraseptifler.....	4
2.1.2.5. Gebelik.....	5
2.1.2.6. Genetik.....	5
2.1.2.6.1. BRCA gen mutasyonu	5
2.1.2.6.2. PALB2 gen mutasyonu.....	5
2.1.2.6.3. ATM gen mutasyonu	6
2.1.2.6.4. CHEK2 gen mutasyonu	6
2.1.3. Meme kanseri moleküler sınıflandırması	6
2.1.3.1. Luminal alt tip.....	7
2.1.3.2. HER2 zenginleştirilmiş alt tip	7
2.1.3.3. Bazal benzeri alt tip	7
2.1.4. Histolojik alt tipler.....	8
2.1.4.1. İnvaziv lobüler karsinom	8
2.1.4.2. Tübüler karsinom.....	8
2.1.4.3. Müsinöz karsinom	9
2.1.4.4. İnvaziv mikropapiller karsinom.....	9
2.1.4.5. Metaplastik karsinom.....	9
2.1.4.6. Nadir tükrük bezi benzeri tümörler.....	9
2.1.4.7. Adenoid kistik karsinom.....	10
2.1.4.8. Sekretuar karsinom	10
2.1.5. Meme kanseri evrelemesi	10
2.1.6. Meme kanserinde tedavi	14
2.1.6.1. Duktal karsinoma in situ (DKİS)	14
2.1.6.2. Erken evre meme kanseri tedavisi	14
2.1.6.3. Metastatik meme kanseri tedavisi.....	14
2.2. Ekstraselüler Veziküller.....	15
2.3. Eksozomlar	15
2.3.1. Eksozom Oluşumu.....	16
2.3.2. Eksozom görevleri.....	17
2.3.3. Eksozom izolasyonu	17

2.3.4. Eksozom biyolojik fonksiyonları.....	17
2.3.5. Eksozom-kanser ilişkisi	18
2.3.6. Metastatik meme kanserinde eksozomların rolü	18
2.3.6.1. Eksozomların Metastaz Sürecinde Önemi ve Mekanizmaları.....	18
2.3.6.2. Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkisi ve Bağışıklık Baskılanması	20
2.3.6.3. Eksozomların Metastatik Nişlerde Anjiyogenezi Desteklemesi.....	20
2.3.6.4. Tanısal ve Terapötik Uygulama Potansiyeli.....	20
2.4. Uzun Kodlanmayan RNA'lar	21
2.4.1. Uzun kodlanmayan RNA'ların hücre içinde gen ekspresyonunu düzenleyici rolü	22
2.4.2 Uzun kodlanmayan RNA-kanser ilişkisi	23
2.4.3. Uzun kodlanmayan RNA-meme kanseri ilişkisi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
3.1. Gereçler.....	25
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Hasta seçimi ve numunelerin alınması	27
3.2.2. Hasta örneklerinden eksozomal RNA izolasyonu	27
3.2.3. RNA miktarının spektrofotometrik ölçümü.....	28
3.2.4 Total RNA'nın cDNA'ya dönüşümü.....	29
3.2.5. Total RNA örneklerinden kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ekspresyon analizleri	30
3.2.6. Plazmadan eksozom izolasyonu	31
3.2.6.1. Eksozom izolasyonu	31
3.2.7. Hücre kültürü	31
3.2.7.1. Hücrelerin dondurulması	32
3.2.7.2. Hücrelerin çözülmesi	32
3.2.8 Kültüre edilen hücrelerin eksozom ile muamele edilmesi.....	32
3.2.9. Yara iyileşmesi deneyi (Wound healing).....	33
3.2.10. Proliferasyon.....	33
3.2.3. Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hastalarından köken alan eksozom örneklerinden ELIZA yöntemi ile CD63 protein analizi	33
3.2.4. Çalışmada kullanılan istatistiksel analizler	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. qRT-PCR Analizleri Sonucunda Eksozomal LncRNA'ların Metastaz Yerine Göre İfade Düzeylerinin Analizi.....	36
4.2. qRT-PCR Analizleri Sonucunda Tüm Metastatik Meme Kanseri Hasta Eksozomal LncRNA'larının Nonmetastatik Meme Kanseri Hastalara Göre İfade Düzeylerinin Analizi	42
4.3. Meme Kanseri Hastalarından Köken Alan Eksozomların Normal Epitelyal Meme hücre Dizisi MCF-10A Hücrelerinin Wound Healing Analiz	47
4.4. Metastatik ve Metastatik Olmayan Meme Kanseri Hastalarından Köken Alan Eksozom Örneklerinden ELIZA Yöntemi ile CD63 Protein Analizi Edilmesi	49
4.3. Meme Kanseri Metastazında Potansiyel Rollerini Araştırılan LncRNA'ların KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), GO (Gene Ontology enrichment analysis) analizlerinin yapılması.....	50
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ.....	65
8. ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER.....	
Ek-1.	
Ek-2.	

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Eksozom biyogenezi ve salınımı (Lai ve ark., 2013).	16
Şekil 2.2. LncRNA Hücre İçinde Gen Ekspresyonunu Düzenleyici Rolü (Kolenda ve ark., 2017).	22
Şekil 4.1. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	36
Şekil 4.2. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	39
Şekil 4.3. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	42
Şekil 4.4. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	45
Şekil 4.5. Eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin Heatmap analizi.	47
Şekil 4.6. MCF-10A hücrelerinin eksozom muamelesi sonrasında yara kapanma durumları.	48
Şekil 4.7. MCF-10A hücrelerinin eksozom muamelesi sonrasında yara kapanma durumları ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	48
Şekil 4.8. Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hastalarından köken alan eksozom örneklerinden ELIZA yöntemi ile CD63 protein analizinin sonucu.	49
Şekil 4.9. Çalışmamız kapsamında araştırılan lncRNA'ların Cancer_Hallmark Analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	50
Şekil 4.10. Kanser sürecinde rol oynayan biyolojik süreçlerin eksozomal lncRNA'lar ile ilişkisinin analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	51
Şekil 4.11. Farklı kanser türlerinin fenotipleri ile eksozomal RNA'ların olası ilişkilerinin biyoinformatik analizi ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	52
Şekil 4.12. exoRBase veri tabanında lncRNA'ların farklı kanser türlerinde tümör-kökenli eksozomlarda ifadelerinin biyoinformatik analizi ($p<0,05$).	53
Şekil 4.12. Eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2 ile ilişkili miRNA'ların yolak analizleri ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).	54

TABLOLAR

Tablo 2.1. Meme kanseri moleküler alt tipleri.	8
Tablo 2.2. Primer Tümör(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).	10
Tablo 2.3. Klinik bölgesel lenf nodu(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).	11
Tablo 2.4. Patolojik Bölgesel Lenf Nodu (pN)(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).	12
Tablo 2.5. Metastaz(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).	13
Tablo 2.6. TNM sınıflamasına göre meme kanseri evrelemesi(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).	13
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.	25
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kitler.	25
Tablo 3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmasında kullanılan primerler.	26
Tablo 3.4. cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları.	29
Tablo 3.5. Reaksiyon bileşenleri.	30
Tablo 3.6. Reaksiyon koşulları.	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

ncRNA	Kodlamayan RNA'lar
EMT	Epitelyal-Mezenşimal transformasyon
BRCA1	Meme kanseri 1
BRCA2	Meme kanseri 2
DKİS	Duktal Karsinoma İn Situ
ER	Östrojen Reseptör
ERBB2	Reseptör Protein Tirozin Kinaz 2
ESCRT	Endozomal Sıralama Kompleksi
EV	Ekstraselüler veziküller
GPV	Germ patolojik varyantları
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2
HSP	Isı Şoku Proteinleri
İDK	İnvaziv duktal karsinom
İLK	İnvaziv lobuler karsinom
İLV	İntraluminal veziküller
LncRNA	Uzun kodlanmayan RNA
miRNA	MikroRNA
MV	Mikrovezikül
MVC	Mikroveziküler cisimcikler
PR	Progesteron Reseptör
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı PZR
TNMK	Triple negatif meme kanseri
VEGF	Vaskulo Endotelyal Büyüme Faktörü

VKİ	Vücut-kitle indeksi
Mg	Mikrogram
µl	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye’de kadınlarda en sık görülen ve en sık ölüm nedeni olan kanser meme kanseridir. Türkiye için meme kanseri sıklığı ise 50/100.000’in üzerindedir. Bu veriler toplum sağlığını korumak için meme kanseri için tarama, erken tanı, tedavinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), meme kanseri tümör oluşumunun farklı aşamalarında, hücre ölümü, metabolizma, epitelyal - mezenkimal geçiş (EMT), metastaz ve ilaç direncini etkileyen önemli oyuncular olarak büyük potansiyel göstermiştir. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), spesifik olarak 200 nükleotitten daha uzun olan ve ayrıca meme kanseri patogeneğinde onkojenik veya tümör baskılayıcı roller oynadığı gösterilen bir RNA transkriptleri sınıfıdır. LncRNA'lar, transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonlarını ve fonksiyonlarını düzenleyerek farklı moleküler mekanizmalarda yer alır.

Yapılan bu tez çalışmasında gelecek için daha da yaygın kullanımı söz konusu olacak likit biyopsi aracılığı ile izole edeceğimiz ezsozomal RNA içeriğini araştırarak, gönüllü sağlam kişiler, meme kanseri tanısı olan metastazı olmayan gönüllü hasta grupları ve farklı organ metastazları olan meme kanseri hastalarından aldığımız örneklerden katkı sağlayacağını düşündüğümüz çıkarımlar yapmaya çalışacağız. Çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalara katkı sağlayacak olan farklı organ ve beyin metastazı olan hastalarda saptayacağımız RNA içeriklerinin biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı, tropizme katkısının olup olmadığı, sağkalım artırmaya yönelik yeni bilgiler verip veremeyeceği ve tedaviye katkı sağlayıp sağlamayacağı konularında sonuçlar elde etmeyi hedeflemekteyiz.

1.1. Amaçlar

Meme kanseri metastazlı hastalarda lncRNA'ların kanser hücre büyümesi ve çoğalmasını modüle etmedeki kritik rolleri göz önüne alındığında lncRNA'ların ekspresyonuna müdahale etmek ilerleyen yıllarda tanı alan hastalarda sağkalım süresinin uzaması tedaviler için yeni seçenekler geliştirmek, takipte anlamlı olabilecek biyobelirteç belirlenmesi açılarından yararlı olabilecektir.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

Kadınlarda meme kanseri yeni teşhis edilen kanserler arasında ilk sırada yer alır(Bray ve ark., 2024). Yılda yaklaşık 2.3 milyon vaka ile tüm kanserlerin % 11.6'sını oluşturur(Bray ve ark., 2024). Kansere bağlı ölüm oranı açısından kadınlarda akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı alır(Siegel ve ark., 2021). 2022 yılında 665684 kadın meme kanseri nedeniyle ölmüştür(Bray ve ark., 2024). Bu yönü ile meme kanseri önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri görülme sıklığı ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre kendi kendine muayene ve mamografi gibi tarama yöntemlerinin kullanımı ile ilişkili olarak değişmektedir(Bray ve ark., 2004)(DeSantis ve ark., 2019)(Heer ve ark., 2020)(Joko-Fru ve ark., 2020). Meme kanseri insidansı ülkelerin gelişmişlik düzeyi ile doğru orantılı olarak artmaktadır(Sung ve ark., 2021). Ülkelerin gelişmişlik düzeyi arttıkça meme kanseri insidansı azalmaktadır.

2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri

Meme kanseri gelişiminde birçok faktör etkili olabilir. Yaş, genetik, beslenme, iyonize radyasyon, sigara kullanımı, hormonal düzey, düzensiz yaşam tarzı, sosyo-ekonomik düzeyi, çevresel etki bunlardan birkaçıdır. Ayrıca memede atipik duktal hiperplazi ya da lobuler karsinoma in situ gibi premalign lezyonlar varsa kanser gelişim riski artar(Colditz and Bohlke, 2014).

2.1.2.1. Daha önce meme kanseri ve aile hikayesi

Daha öncesinde meme kanseri hikayesi varsa aynı meme ya da karşı meme dokusunda kanser gelişim riski artırır(Buist ve ark., 2018). Ailede daha önce meme kanseri hikayesi olması da meme kanseri gelişim riskini arttırır. Bu durum rastlantısal olarak da gelişmiş ya da genetik geçişli ya da ikisinin de etkisi sonucunda olabilir.

2.1.2.2. Yaş ve cinsiyet

Yaş meme kanseri gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. İnsidansı her yıl %0.6 oranında artar(American Cancer Society, 2022). Ülkemizde de uygulandığı gibi 40 yaş sonrasında 2 yılda bir mamografi ile meme kontrolü yapılması tarama, erken tanı için değerli görünmektedir.

2.1.2.3. Kilo ve fiziksel aktivite

Postmenapozal kadınlarda vücut kitle indeksi (VKİ) arttıkça hastalarda meme kanseri gelişimi artar(Bernstein ve ark., 2005). Post menapozal kilo alımı olan hastaların VKİ’de her 5kg/m² azalma kanser gelişim riskini %8 oranında azaltır(Bernstein ve ark., 2005). Düzenli fiziksel aktivite de kanser gelişim riskini azaltır. Minimum haftada 4 kez en az 30 dakika yürümek kanser gelişim riskini %20 oranında azaltır(Bernstein ve ark., 2005).

2.1.2.4. Hormonal tedavi ve hormon içerikli kontraseptifler

Postmenapozal dönemde sadece östrojen içeren hormon replasman tedavileri meme kanseri gelişim riskini arttırır. Bu risk özellikle 5 yıl süreyle kullanım sonrasında başlar ve 20 yıllık kullanım sonunda anlamlı olarak artar(Chen ve ark., 2006). Progesteron içeren hormon replasman tedavilerinde risk minimaldir. Hormon içerikli oral kontraseptiflerin meme kanseri gelişimini hafif arttırdığı saptanmış(Cerhan, 2006).

2.1.2.5. Gebelik

Gebelik ile meme kanseri arasındaki ilişki yaşa bağımlı gibi görünmektedir. 25 yaşından önce gebelik meme kanseri gelişimi riskini azaltırken, 30 yaş üstü gebeliklerde meme kanseri riski artar. Ayrıca doğum yapmayan kadınlarda meme kanseri riski doğum yapan kadınların 2 katıdır(Marmot ve ark., 2007). Bu yüzden meme kanseri riski olan hastalara genç yaşta gebe kalmaları önerilir.

2.1.2.6. Genetik

Meme kanseri gelişimi için risk oluşturan genetik mutasyonlardan en bilinenleri BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CHEK2 mutasyonlarıdır(Daly ve ark., 2021).

2.1.2.6.1. BRCA gen mutasyonu

Meme kanserlerinin %5-10 arasında genetik mutasyon vardır(Lacroix and Leclercq, 2005). Bunlardan en bilineni sırasıyla 13. ve 17. kromozomda yer alan BRCA1 ve BRCA2 geni mutasyonudur. BRCA mutasyonu genetik geçişli meme ve over kanserlerinin %30 unu oluşturur(Valencia ve ark., 2017). BRCA geni aslında tümör baskılayıcı gendir. Tümör gelişimini engeller. Bu gende gelişen bir mutasyon, genin işlevini yapamaması sonucu kanser gelişimine neden olur. BRCA gen mutasyonu bulunan kadınlarda tüm hayat boyunca meme kanseri gelişim riski çok yüksektir. Ayrıca erken yaşlarda ve/veya bilateral kanser gelişim riski de artar(Daly ve ark., 2021).

2.1.2.6.2. PALB2 gen mutasyonu

BRCA1 ve BRCA2/RAD51 arasındaki homolog rekombinasyon yolağında önemli bir mediatör görevi gören tümör baskılayıcı gendir. DNA hasarı olan bölgeye BRCA genlerinin kümelenmesi için iskelet görevi görür. PALB2 monoallel kaybı meme kanseri, bilateral kaybı Fanconi anemisi nedenidir. Meme kanserleri için PALB2 germ patolojik varyantları(GPV) %0.5 oranında görülür. PALB2 GPV taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişim riski %30 dur(Hu ve ark., 2021) ("Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women," 2021).

2.1.2.6.3. ATM gen mutasyonu

ATM geni DNA çift sarmal hasarına cevap olarak hücre siklusunu durduran ve hücreyi apoptoza yönlendiren bir protein kinazı kodlar(Athma ve ark., 1996)(Savitsky ve ark., 1995). ATM gene mutasyonu taşıyan insanlar taşımayanlara oranla meme kanseri geliştirme riski daha yüksektir(Hu ve ark., 2021) (“Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women,” 2021).

2.1.2.6.4. CHEK2 gen mutasyonu

CHEK2 geni serin/treonin kinaz kodlayan bir tümör süpresör gendir(Bell ve ark., 1999). CHEK2 geni DNA hasarı sonucunda hücreyi G1 fazında durdurarak hücre bölünmesini düzenleyen proteini kodlar. CHEK2 mutasyonları nadirdir fakat mutasyon geliştiğinde meme kanseri gelişimi riski artar. Bu risk eğer bu genden etkilenmiş aile bireyleri varsa daha da artar(Apostolou and Papasotiriou, 2017). Taşıyıcılar açısından bakıldığında ailede bu genden etkilenen kimse yoksa meme kanseri gelişim riski %20 iken, etkilenen varsa %44’ e kadar çıkar(Cybulski ve ark., 2011).

2.1.3. Meme kanseri moleküler sınıflandırması

Meme kanseri morfolojik olarak oluşturduğu doku görünümüne göre invaziv duktal karsinom, lobuler karsinom ve diğerleri olarak gruplandırılır(Roy ve ark., 2023). Histolojik olarak en iyi bilinen sınıflandırma Nottingham sınıflandırmasıdır. Histolojik derecelendirme gerek kanser spesifik gerekse kanser bağımsız tüm ameliyat edilebilen meme kanserlerinde sağ kalım açısından önemli bir prognostik faktördür(Rakha ve ark., 2008). Dereceleri eşit olan tümörler hormon ve HER2 reseptör yoğunluğu açısından farklılık gösterebilir. Tersine, farklı morfolojiye sahip olmalarına rağmen aynı evre invaziv duktal karsinom (İDK) ve invaziv lobuler karsinom (İLK) benzer hastalıklı ve hastalıksız sağ kalım oranlarına sahip olabilir(Mersin ve ark., 2003)(Molland ve ark., 2004). Bu fark aynı histolojik dereceye sahip tümörlerin farklı seyir gösterebilmesini açıklar. Son yıllarda invaziv meme kanserinin seyrini tahmin etmek için kullanılacak ve verilecek en uygun tedavinin seçilmesinde yardımcı olacak tümörün yüzey reseptörlerini ve genetik özelliklerini de kullanan bir sınıflama oluşturmanın gereği duyuldu. Bu yüzden ilk moleküler sınıflandırma 2000 yılında Prou ve ark. tarafından yapıldı (Perou

ve ark., 2000). Burada luminal A, luminal B, erythroblastic oncogene B (ERBB2), basal-like ve normal-breast-like olara 5 grupta sınıflandırıldı. Sonrasında 2012 yılında, The Cancer Genome Atlas Network bahsettiğimiz tümör özelliklerini kullanarak bir sınıflandırma oluşturdu ve meme kanserlerini fenotipik luminal A, luminal B, ERBB2/HER2-enriched (HER2E), and basal-like olarak 4 gruba ayırdı(Koboldt ve ark., 2012).

2.1.3.1. Luminal alt tip

En sık görülen moleküler alt tiptir. Ayrıca en çeşitli gen ifadesi, mutasyon spektrumu, kopya sayısı değişiklikleri ve klinik sonuçlar dizisine sahip en yaygın alt tiptir. ESR1, GATA3, FOXA1, XBP1 ve MYB gen ifadeleri ile ilişkilidir. Çoklu gen analizinin maliyeti yüksek olduğundan dolayı luminal A ve B alt tipini ayırmak için immünohistokimyasal analizler kullanılır. Luminal A da östrojen reseptörü(ER) pozitif, HER2 negatif ve Ki-67 oranı %14 ün altındadır. Lüminal B de ise ER pozitif, HER2 negatifliği ile Ki-67 oranının %14 ten büyük veya HER2 pozitifliği bulunur(Cheang ve ark., 2009).

2.1.3.2. HER2 zenginleştirilmiş alt tip

ERBB2 ve HER2 17 q12 deki amplikon gen ifadeleri ile ilişkilidir. Yüksek anöploidi ve en yüksek mutasyon oranının bulunduğu ve FGFR, EGFR, CDK4 ve CCND1 gibi genleri artmış ifadesi le karakterize alt tiptir. HER2 + tümörlerin hepsi bu gruba girmez, bir kısmı da Luminal B grubuna girer(Schettini ve ark., 2020).

2.1.3.3. Bazal benzeri alt tip

İsmi bazal miyoepitelyal hücreler kaynaklı gen ifadelerinden alır. Bazal benzeri alt tipin diğer adı triple negatif'tir. Östrojen reseptör(ER), progesteron reseptör(PR) ve HER2 'nin üçü de negatiftir. TP53 mutasyonu, RB1 gen kaybı, BRCA1 inaktivasyonu, PIK3CA mutasyonu, ATM mutasyonu ve Siklin E1 çoğaltılması ile karakterizedir (Koboldt ve ark., 2012)(Weisman ve ark., 2016)(Carey ve ark., 2006).

Tablo 2.1. Meme kanseri moleküler alt tipleri (Carey ve ark., 2006).

Luminal A	Luminal B	HER2 Zenginleştirilmiş	Bazal Benzeri
İyi prognoz	Kötü prognoz	HER2 +	HER2 -
ER/PR yüksek+	ER/PR düşük+	Hormon reseptör+/-	ER- , PR-
Çoğalma oranı düşük	Çoğalma oranı yüksek	Çoğalma oranı yüksek	Çoğalma oranı yüksek
Grade 1/2	Grade 2/3	Grade 2/3	Grade 3
Kemoterapiye duyarlı	Kemoterapiye duyarlı		

2.1.4. Histolojik alt tipler

2.1.4.1. İnvaziv lobuler karsinom

İnvaziv lobuler karsinom meme kanserleri içinde invaziv duktal karsinomdan sonra en sık görülen histolojik meme kanseri alt tipidir. Tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur(Li ve ark., 2003). Tanı alma yaşı daha yüksektir ve tanı alındığında çoğunlukla hastalığın evresinin yüksek olduğu görülür(Barroso-Sousa and Metzger-Filho, 2016). İnvaziv lobuler karsinomda çoğunlukla ER pozitifliği ve epidermal büyüme faktörü(HER2) negatiftir. İDK ile karşılaştırıldığında İLK'da 10 yıl içinde nüks riski daha fazladır. Ayrıca tanı anında ve sonrasında diğer memede de kanser gelişim riski vardır. Mamografinin invaziv duktal karsinomda olduğu kadar duyarlılığı yüksek değildir. İLK tespitinde ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) daha duyarlıdır. Kemoterapi ilaçları İLK tedavisinde İDK tedavisinde olduğu kadar etkili değildir. Bunda İLK'da tümör hızının nispeten daha yavaş olmasına bağlı olabilir. ER pozitifliği çoğunlukla olduğundan dolayı ER üzerinden etki eden ilaçlara duyarlılığı fazladır.

2.1.4.2. Tübüler karsinom

Tümörün büyük çoğunluğunu lümeni açık tübüllerden oluşur. Tüm meme kanserlerinin %1.6'sını oluşturur (Rakha ve ark., 2008). Küçük boyutta olması ve ileri

yaşıta tanı almasının yanında prognozu iyidir. Gen ifadelerine göre Luminal A grubu içine girer. ER, PR pozitif, HER2 negatiftir (Weigelt ve ark., 2008).

2.1.4.3. Müsinöz karsinom

Yoğun müsin içinde kanser hücrelerinden oluşan meme kanseri alt tipidir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %2 'sini oluşturur. Müsinöz Karsinom, düşük tekrar oranı ile 5 yıllık sağ kalımı yüksek iyi huylu bir meme kanseri alt tipidir (de Andrade Natal ve ark., 2017).

2.1.4.4. İnvaziv mikropapiller karsinom

İnvaziv Mikropapiller Karsinom tüm meme kanserlerinin %2'sinden azını oluşturur. Tümör çevresinde lenfovasküler doku birikimi ile karakterizedir. Bunun sonucunda tanı anında aksiller lenf nodu tutulum oranı yüksektir(Chen ve ark., 2013)(Walsh and Bleiweiss, 2001). Moleküler sınıflandırmada Luminal A ve B grubuna girer. ER, PR ve HER2 pozitifdir (Weigelt ve ark., 2008).

2.1.4.5. Metaplastik karsinom

Tüm meme kanserleri içinde %1'in altında görülür. Tümör hücresinin skuamoz ve/veya mezenşimal değişimi ile karakterize heterojen bir meme kanseri grubudur. Prognozu reseptör negatif invaziv kanser gibidir. Tanı anında kitlenin büyük olması nedeniyle ele gelen bir kitle şeklinde fark edilebilir ve görüntüleme yöntemleri ile kolayca saptanabilir(Langlands ve ark., 2016). Moleküler sınıflandırmada çoğunlukla bazal benzeri gruba girer. Standart kemateröpatik ajanlara diğer kanser türleri kadar cevap vermez ve sonuçta prognozu kötüdür. İmmünoterapinin bu kanser alt tipinde etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (Schmid ve ark., 2022)(Schmid ve ark., 2020).

2.1.4.6. Nadir tükrük bezi benzeri tümörler

Normalde meme dokusu ve tükrük bezleri benzer morfolojik özellikler sergilerler. Luminal epitel ve onu çevreleyen miyoepitelyal yapı ana çatıyı oluşturur. Benzer hormon reseptör ve düşük moleküler sitokeratin gibi ortak immün profillere sahiptir (Weigelt ve ark., 2008).

2.1.4.7. Adenoid kistik karsinom

Daha çok ileri yaş bayanlarda ele gelen büyük kitle olarak saptanır. Yüksek grade tümörlerin prognozu kötüdür (Weigelt ve ark., 2008).

2.1.4.8. Sekretuar karsinom

Sekretuar karsinom çoğunlukla kadınlarda görülse de erkekler de ve çocuklarda da görülebilir. Retroareolar bölgede ağrısız, mobil bir kitle olarak başlar. Mamografik özellikler fibroadenoma benzer. Tümörün ömrü yavaştır ve sağ kalım oranı yüksektir(Weigelt ve ark., 2008).

2.1.5. Meme kanseri evrelemesi

Tablo 2.2. Primer Tümör(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).

Tx	Primer tümör belirlenememiştir.
T0	Primer tümöre ait kanıt yok.
Tis	Karsinoma in situ
Tis(DCIS)	Duktal karsinoma in situ
Tis (Paget)	Meme başının invaziv karsinom ve/veya krsinoma in situ ile ilişkili olmayan meme başı Paget Hastalığı
T1	Tümörün en büyük boyutu ≤ 20 mm
T1mic	Tümörün en büyük boyutu ≤ 1 mm
T1a	Tümörün en büyük boyutu boyutu >1 ve ≤ 5 mm
T1b	Tümörün en büyük boyutu boyutu >5 ve ≤ 10 mm
T1c	Tümörün en büyük boyutu boyutu >10 ve ≤ 20 mm
T2	Tümörün en büyük boyutu boyutu >20 ama ≤ 50 mm
T3	Tümörün en büyük boyutu boyutu >50 mm
T4	Herhangi bir boyutta göğüs duvarına cilde direkt yayılan tümör
T4a	Pektoral kasa invaze olmamış göğüs duvarına invaze tümör
T4b	Deride inflamatuvar karsinom kriterlerini karşılamayan ülserasyon, ve/veya ipsilateral satelit nodül ve/veya ödem
T4c	T4a ve T4b birlikteliği
T4d	İnflamatuvar Karsinom

Tablo 2.3. Klinik bölgesel lenf nodu(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).

cNX	Lenf nodu belirlenemedi(örneğin daha önce çıkarılmış)
cN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
cN1	İpsilateral mobil lenf nodu metastazı
cNmi	Mikrometastaz (yaklaşık 200 hücre, 0.2-2.0 mm arası)
cN2	Birbirlerine veya çevre yapılara fiks ipsilateral derece I,II aksiller lenf nodlarında metastaz Klinik olarak aksiller level I,II lenf nodu metastazı olmadan sadece klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarına metastaz
cN2a	
cN2b	
cN3	Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın;
cN3a	İpsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı
cN3b	İpsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ve aksiller lenf nodu metastazı
cN3c	İnternal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı

Tablo 2.4. Patolojik Bölgesel Lenf Nodu (pN)(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).

pNx	Bölgesel lenf nodları belirlenemedi (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)
pN0	Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı yok, izole tümör hücreleri(İTH) için ek inceleme yok
pN(i)	Bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif immünohistokimya(İHK)
pN0(i+)	İTH sadece bölgesel lenf nod(lar)ında
pN0(mol-)	Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular(RT PCR)
pN0(mol+)	Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı var(RT PCR), İTH yok
pN1	Mikrometastaz, 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya klinik olarak negatif internal mamaryal nodlarda metastaz mikro metastaz veya sentinel lenf nodunda makrometastaz
pN1mi	Mikrometastaz(yaklaşık 200 hücre, 0.2-2.0 mm arası)
pN1a	1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz, en az bir tanesi 2.0 mm den geniş
pN1b	İpsilateral internal mamaryal sentinel lenf nodu metastazı, İTH hariç
pN1c	pN1a ve pN1b birlikte
pN2	
pN2a	4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm den büyük en az bir tümör odağı)
pN2b	Negatif patoloji negatif Aksiller lenf nodu metastazı, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz
pN3	≥ 10 aksiller lenf nodunda metastaz
pN3a	2.0 mm den büyük en az bir tümör odağı veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz
pN3b	cN2b ile birlikte pN1a veya pN2a (internal mamaryal lenf nodu pozitifliği); veya pN1b ile birlikte pN2a
pN3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Tablo 2.5. Metastaz(“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).

M0	Klinik veya radyografik uzak metastaz yok
M(i+)	Metastaz bulguları olmayan bir hastada kanda, kemik iliğinde veya bölgesel olmayan nodal dokularda 0.2 mm den küçük moleküler veya mikroskopik olarak algılanan tümör hücrelerinin birikmesi
M1	Klinik ve radyografik yöntemlerle belirlenen ve / veya histolojik olarak 0,2 mm'den daha büyük olduğu kanıtlanmış uzak metastazlar

Tablo 2.6. TNM sınıflamasına göre meme kanseri evrelemesi (“AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web,” n.d.).

EVRE 0	TİS	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1Mİ	M0
	T1	N1Mİ	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Herhangi T	N3	M0
IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.1.6. Meme kanserinde tedavi

2.1.6.1. Duktal karsinoma in situ (DKİS)

DKİS neoplastik değişimin epitelde sınırlı kaldığı tiptir. DKİS tedavisindeki ana amaç lokal rekürrensi önlemektir. Sadece mastektomi uygulanan hastalarda %1-2 oranında kanser tekrarlar. Meme koruyucu cerrahi üzerine radyoterapi DKİS tedavisinde önerilen tedavidir(Ernster ve ark., 2000). Cerrahi sırasında da aksiller ve sentinel lenf nodu metastazını araştırmak açısından biopsi alınabilir. Sonrasında ER + hastalarda tamoksifen tedavisinin lokal lokal tekrarı %32 karşı meme de hastalık gelişimini %53 oranında azalttığı saptanmış(Wapnir ve ark., 2011).

2.1.6.2. Erken evre meme kanseri tedavisi

Erken evre meme kanserleri, metastaz gelişmemiş evre 1, 2 ve 3. evre meme kanserlerini kapsar. Bu hastalarda tedavideki ana amaç metastaz ve hastalık gelişimini önlemektir. Bu amaçla cerrahiye ek olarak kemoterapi ve radyoterapi verilebilir. Radyoterapi, kemoterapi tamamlandıktan sonra uygulanır. Kemoterapi de operasyon öncesi (Neoadjuvan) ya da operasyon sonrası (Adjuvan) verilebilir. Özellikle Triple-Negatif Meme Kanserlerinde (TNMK) ve HER2 pozitif kanserlerde neoadjuvan tedavi ile hastalık tekrarı belirgin derecede önlenebilmektedir(Cortazar ve ark., 2014). Bölgesel lenf nodlarına radyoterapi 3 veya daha fazla sayıda lenf nodu tutulumu varsa ya da 1-3 arası lenf nodu tutulumu olan ve ek risk faktörlerine sahip hastalarda uygulanır.

2.1.6.3. Metastatik meme kanseri tedavisi

Metastatik meme kanserinde hastaya verilecek sistemik tedavi, tümörün özelliği, hastalık yükü, hastanın performansı, eşlik eden hastalığı, visseral organlarının işlevine ve önceki tedavilere bağlı olarak değişir(Cardoso ve ark., 2012)(Giordano ve ark., 2018). Metastatik meme kanserindeki amaç hastalığın ilerlemesini yavaşlatarak hastanın yaşam süresini uzatmak, yaşam kalitesini arttırmaktır. Tedaviden önce kanser yayılımı hakkında bilgi sahibi olmalıyız. Meme kanseri ilk metastazları çoğunlukla kemik, karaciğer, akciğer olduğu için kemik taramaları ve bilgisayarlı tomografi ile ilgili organların

incelenmesi gerekir. Beyin metastazları açısından MR incelesi bize faydalı bilgiler verir. Ayrıca CA 15-3, karsinoembriyonik antijen gibi tümör markerlarındaki yükselmeler metastaz habercisi olabilir. Hormon reseptör pozitif metastatik meme kanserlerinde ilk basamak tedavi hormonal tedavidir. Premenopozal kadınlarda hormon tedavisinin yanında overlerin baskılanması tedavi başarısını artırır(Klijn ve ark., 2001). Hormon reseptör negatifliği, yaygın hastalık varlığı, hormon tedavisinde direnç durumlarında sistemik kemoterapi ve immünoterapi verilmelidir. Verilecek kemoterapide tümörün duyarlı olduğu tek ajan daha uygundur. Cevap alındıktan sonra ilacın toksisitesinden hastanın arındırılması için tedaviye ara verilir sonrasında tekrar başlanır. Kombine tedaviler, yan etkilerinin çok olması ve uzun süre sürdürülememesi nedeniyle tercih edilmez(Harbeck ve Gnant, 2017).

2.2. Ekstraselüler Veziküller

Hücre dışı veziküller (EV'ler), hücre dışı boşluğa hücreler tarafından salgılanan lipide bağlı veziküllerdir. EV' ler; üç alt tipte incelenebilir. Bunlar mikroveziküller (MV'ler) 50 ila 10.000 nm arasında, eksozomlar 30 ila 150 nm arasında ve apoptotik cisimciklerdir. Apoptozun geç evresinde hücre parçalanması üzerine apoptotik cisimler salınır. Çapları 50 ila 5000 nm arasında değişmektedir. EV'ler biyogenezlerine, salınım yollarına, boyutlarına, içeriklerine ve işlevlerine göre farklılaşmaktadır(Abels ve Breakefield, 2016). EV'ler plazma zarının dışı tomurcuklanması, plazma zarından uzanan nanotubuler yapılardan salınabilirler(Doyle ve Wang, 2019). EV içerikleri lipidlerden, nükleik asitlerden ve proteinlerden, özellikle de plazma membranı, sitozol ve lipid metabolizmasında yer alan proteinlerden oluşur(Abels ve Breakefield, 2016). EV'lerin lipid çift katmanı, bu molekülleri hücre dışı ortamda bozulmaya karşı korur ve böylece hedef hücreye "güvenli" bir şekilde ulaşmalarına olanak tanır(Szatanek ve ark., 2017).

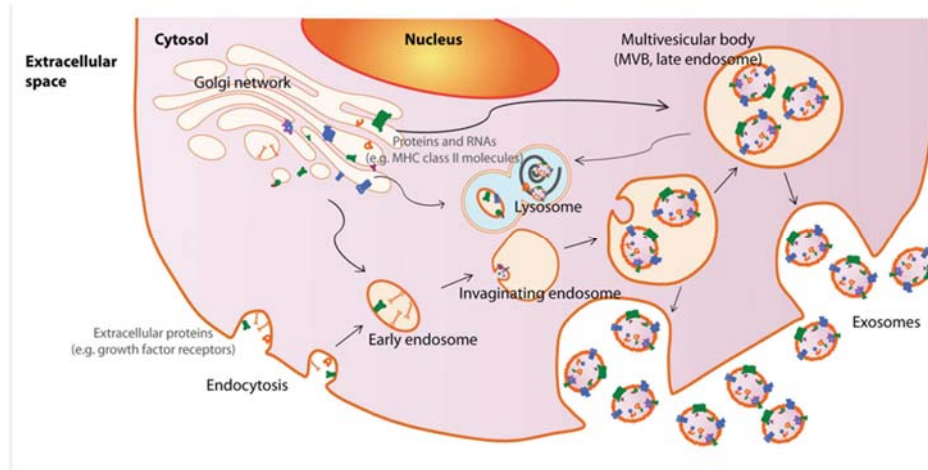
2.3. Eksozomlar

Eksozom terimi, ilk kez 1970 yılında Rose Johnstone ve arkadaşları tarafından kullanıldı. O zamanlarda daha çok hücre içi istenmeyen moleküllerin hücre dışına atılmasında görevli oldukları üzerinde duruluyordu. Eksozomlar 40-100 nm boyutlarında vücudumuzdaki tüm hücrelerden salınan kanda, idrarda, BOS sıvısında, anne sütünde,

eklem sıvısında ve benzer bütün vücut sıvılarında bulunan çift katmanlı zara sahip yapılardır(Simons ve Raposo, 2009). Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda hücreler arası iletişim, hücre genetik yapısının aktarımı, hücreler arası sinyal iletimi ve immünolojik süreçlerin düzenlenmesinde pek çok rolü olduğu görülmüştür(Johnstone, 2005). Eksozomların bu işlevlerinin keşfi, bu nano veziküllerin farklı kullanım alanlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır (Chen ve ark., 2024).

2.3.1. Eksozom oluşumu

Eksozomlar üç aşamadan oluşurlar. İlk aşamada plazma zarından endositik veziküller oluşur. Bu aşamada erken endozom olarak adlandırılır. İkinci aşamada intraluminal veziküllerden(İLV) oluşan multiveziküler cisimcikler(MVC) oluşur ve endozomal vezikül membranında içe doğru tomurcuklanmalar meydana gelir. Bu aşama geç endozom aşamasıdır. İLV tetraspanin proteinlerinden oluşur. Yüzeyinde ESCRT proteinleri bulunur. ESCRT-0 ubiquitin proteinlerinin birikmesine ESCRT-1 ve ESCRT-2membran tomurcuklanmasına ESCRT-3 ise ayrılmayı sağlar(Février ve Raposo, 2004)(Raiborg ve ark., 2003)(Colombo ve ark., 2013)(Hoshino ve ark., 2013). Son aşamada MVC'ler plazma zarı ile birleşerek içeriğini hücre dışına salar ve bu şekilde eksozomlar vücut sıvılarına yayılır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Eksozom biyogenezi ve salınımı (Lai ve ark., 2013).

2.3.2. Eksozom görevleri

Eksozomlar hücrelerden salınarak hücreler arası iletişimde hücre olgunlaşma sürecinde gereksiz proteinlerin uzaklaştırılmasında vücudun bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde hücreler arası protein, lipid ve genetik materyal aktarımında rol aldığı bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir(Johnstone ve ark., 1991)(Johnstone ve ark., 1987). Eksozomlar köken aldıkları hücre yapısına göre içerikleri de değişebileceğinden farklı süreçlerde de rol oynayabilirler.

2.3.3. Eksozom izolasyonu

Eksozomların en yaygın izolasyon tekniği diferansiyel santrifüjlemedir. Bu teknik eksozomların saf elde edilmesi için uygun değildir. Zaman açısından dezavantajlı olup süreç için özel ekipman gerektirir(Denzer ve ark., 2000)(Vlassov ve ark., 2012). Diğer bir izolasyon eksozom izolasyon tekniği monoklonal antikor ilişkili metoddur. Rab5CD molekülleri epitelyal hücre adezyon molekülleri gibi eksozom ilişkili antijenlere karşı hareketsiz antikorlar kullanılır. Bu yöntem de saf eksozom elde edilmesi için yeterince başarılı olmayabilir(Vlassov ve ark., 2012). Ultrafiltrasyon metodunda eksozomlar boyut farklılıklarına göre izole edilebilir. Bu yöntemde ultrasantrifüjlemeye kıyasla daha az zaman yeterlidir ve özel ekipmana ihtiyaç yoktur. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde eksozomlar yüksek oranda saflaştırılmıştır ancak pahalı ekipman gerekir.

2.3.4. Eksozom biyolojik fonksiyonları

Eksozomların protein, lipid ve nükleik asit yapıda içerikleri mevcuttur. Örneğin sfingomiyelin, fosfotidilserin, fosfodietiletanolamin, fosfotidilinozitol gibi lipidleri hsp(heat shock proteins)70, hsp90, membran transport ve füzyon proteinleri, integrinler, trombospondin gibi proteinleri mikroRNA, DNA, mRNA, ncRNA gibi nükleik asit yapılarını içerebilir. Normal biyolojik süreçler dışında pek çok süreçte de görev alırlar. Taşıdıkları genetik materyaller(mRNA, miRNA, ncRNA) sayesinde anjiyogenezi uyarıcı tümör mikroçevresini indüklediği, hücre çoğalmasını artırıcı etkileri olduğu yapılan

bilimsel çalışmalarla görülmüştür(Skog ve ark., 2008)(Kucharzewska ve ark., 2013). İlaç taşıma sistemik olarak kullanım çalışmaları mevcuttur. Eksozomlar uzun süreli dolaşımında bulunmaları hedef hücreye ulaşma yetenekleri ve bulundukları vücutta toksik etki oluşturma potansiyelleri olmadığından ilaç uygulamaları için elverişli bir yol olarak düşünülmektedir. Ayrıca merkezi sinir sistemi ilaçları çok büyük oranda kan-beyin bariyerini geçemezken eksozomlar vücudun savunma sistemini kolaylıkla atlatarak kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen yapılardır(Pardridge, 2012)(Peng ve ark., 2013).

2.3.5. Eksozom-kanser ilişkisi

Eksozomlar vücutta kanser hücreleri dahil olmak üzere bulunan bütün hücrelerden salınır. Tümör gelişimi ve metastazında önemli yere sahip olan fibrogenezi artırır. Anjiojenik protein içeren eksozomlar anjiogenezi uyarır. Yüzeyindeki antijenler immün sistem tarafından yabancı olarak algılanmaz. Böylelikle immün yanıtı kaçar. miRNA'ların tümör gelişimine olan katkısında aracılık eder(Stefańska ve ark., 2023).

2.3.6. Metastatik meme kanserinde eksozomların rolü

Eksozomlar, metastatik meme kanseri sürecinde tümör hücrelerinin diğer hücrelerle iletişim kurmasını ve metastatik davranışlar geliştirmesini sağlayan temel yapı taşlarıdır. Bu küçük, çift katmanlı lipid zarla çevrili veziküller, tümör mikroçevresindeki hücrelerle etkileşime geçerek, kanser hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştırır. Ayrıca, metastatik tümör hücrelerinin belirli organlara göç etmesini destekleyen sinyaller taşıyarak, metastaz süreçlerinde kritik rol oynar(S. Huang ve ark., 2022).

2.3.6.1. Eksozomların metastaz sürecinde önemi ve mekanizmaları

Metastaz, kanser hücrelerinin birincil tümörden ayrılarak kan veya lenf dolaşımı yoluyla uzak organlara yayılması ve bu organlarda yeni tümör kolonileri oluşturmalarıdır. Bu süreç, oldukça karmaşık ve çok aşamalı bir mekanizma olup, hücreler arası iletişimin ve

moleküler değişimlerin etkin bir şekilde koordine edilmesini gerektirir. Eksozomlar, bu süreçte metastatik hücrelerin yayılmasını kolaylaştıran biyomoleküller (örn. miRNA, proteinler ve DNA) taşıyarak metastaz sürecini yönetir. Eksozomların bu rolü, üç ana mekanizma ile gerçekleşir:

1-Pre-Metastatik Niş Oluşumu: Eksozomlar, metastazın hedef organlarında pre-metastatik nişler (metastatik tümör hücrelerinin yerleşmesi için uygun ortam) oluşturur. Tümör hücrelerinden salınan eksozomlar, belirli uzak organlara taşınarak bu organlardaki hücrelerin fenotiplerini değiştirir ve bu hücrelerin kanser hücreleri için daha alıcı hale gelmesini sağlar. Örneğin, meme kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, endotel hücrelerinin işlevlerini bozarak bu hücrelerin kan damarlarındaki bariyer görevini zayıflatır ve tümör hücrelerinin bu organlara göç etmesini kolaylaştırır(S. Huang ve ark., 2022).

2- Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Hücreyel Göç: Eksozomlar, meme kanseri hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi (EMT) tetikleyerek hücrelerin invaziv (saldırgan) özellikler kazanmasını sağlar. EMT, kanser hücrelerinin epitel fenotipinden daha hareketli ve saldırgan olan mezenkimal fenotipe geçmesiyle karakterizedir. Bu değişim, kanser hücrelerinin çevre dokulara ve kan dolaşımına yayılmasını kolaylaştırır. Eksozomlar aracılığıyla taşınan miR-105 ve miR-200 gibi miRNA'lar, EMT'yi düzenleyerek hücrelerin metastatik potansiyelini artırır (Tran ve Bedard, 2011).

3- Hedef Organ Spesifik Metastaz (Organotropizm): Metastatik meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, belirli organlara özel hedefleme (organotropizm) yeteneğine sahiptir. Bu süreç, eksozomlarda bulunan integrinler ve yüzey proteinleri tarafından düzenlenir. Örneğin, eksozomlarda bulunan belirli integrin proteinleri (örn. $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha v \beta 5$) eksozomların akciğer ve karaciğer gibi organlara yönelmesini sağlar ve bu organlarda metastatik tümör oluşumunu destekler. Bu spesifik hedefleme, eksozomların belirli organ hücreleriyle (örn. akciğer fibroblastları veya karaciğer Kupffer hücreleri) etkileşime girip, bu hücrelerin tümör hücrelerini destekleyen fenotipik değişimler geçirmesine neden olur(Wong ve ark., 2020).

2.3.6.2. Bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi ve bağışıklık baskılanması

Eksozomlar, metastatik meme kanserinde bağışıklık yanıtlarını baskılayarak tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olur. Tümör kaynaklı eksozomlar (TDE'ler), bağışıklık hücreleri (T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar) üzerindeki baskılayıcı proteinler (örn. PD-L1, FasL) taşıyarak bağışıklık hücrelerinin antitümör aktivitelerini azaltır. Örneğin, TDE'ler, CD8+ T hücrelerinin tümör hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneğini baskılayarak tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına katkıda bulunur. Ayrıca, bu eksozomlar, makrofajların tümör destekleyici fenotipe (M2 fenotipi) dönüşmesini tetikleyebilir ve bu hücrelerin bağışıklık baskılayıcı sitokinler (örn. IL-10) salgılamasını artırabilir(Han ve ark., 2021).

2.3.6.3. Eksozomların metastatik nişlerde anjiyogenezi desteklemesi

Metastatik meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, hedef organlardaki anjiyogenezi süreçlerini destekleyerek, tümör hücrelerine yeterli besin ve oksijen sağlayan kan damarlarının oluşumunu teşvik eder. Eksozomlar, VEGF ve pro-anjiyogenik miRNA'lar (örn. miR-210) gibi faktörler içererek, endotel hücrelerini aktive eder ve yeni kan damarlarının oluşumunu başlatır. Bu durum, tümör hücrelerinin hızlı büyümesini ve yayılmasını sağlar(Harris ve ark., 2015).

2.3.6.4. Tanısal ve terapötik uygulama potansiyeli

Eksozomlar, metastatik meme kanseri için tanısal biyobelirteçler ve tedavi ajanları olarak kullanılabilir. Eksozomlardaki miRNA, lncRNA ve proteinlerin ifade seviyeleri, hastalığın erken teşhisi için kullanılabilir ve bu moleküller, hastalığın ilerleme durumu hakkında bilgi verebilir. Eksozomlar, aynı zamanda terapötik ajanlarla (örn. antitümör ilaçlar, siRNA) yüklenecek hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri olarak da kullanılabilir. Bu sayede, metastatik meme kanserinde eksozom temelli tedavi yaklaşımları, kemoterapi ve immünoterapi gibi mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırabilir ve tedaviye direnç gelişimini önleyebilir(Tran ve Bedard, 2011).

2.4. Uzun kodlanmayan RNA'lar

Hücrel ribonükleik asitler (RNA), iki ana kategoriye ayrılır: haberci RNA (mRNA) ve kodlamayan RNA (ncRNA). mRNA, DNA'dan ribozomlara protein sentezi için genetik bilgiyi ileten en iyi bilinen RNA türü olmasına rağmen, insan genomunun kodlama bölgelerinin yalnızca %2'sini oluşturur. Buna karşılık, transkriptomun çok daha büyük bir bölümünü oluşturan ncRNA'lar, farklı işlevlere sahip olan ve henüz tam anlamıyla keşfedilmemiş bir alanı temsil eder. Bu ncRNA'lar, yapısal ve düzenleyici olmak üzere iki işlevsel gruba daha ayrılabilir. Yapısal ncRNA'lar, transfer RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA), küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) ve küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) gibi temel molekülleri içerir ve genellikle "temel işlev RNA'ları" olarak adlandırılır. Bu moleküller, ribozom yapısı ve işlevi ile çeşitli RNA işleme süreçlerinde kritik roller üstlenir. Düzenleyici ncRNA'lar ise daha geniş bir işlev yelpazesine sahiptir ve genellikle uzunluklarına göre sınıflandırılır, bu kategoride kısa ve uzun ncRNA'lar bulunur. Kısa ncRNA örnekleri arasında piwi-etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar), dairesel RNA'lar (circRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve kısa müdahale eden RNA'lar (siRNA'lar) yer alır. Bu kısa ncRNA'ların, gen regülasyonu, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve kromatin yeniden şekillendirilmesi gibi süreçlerde önemli roller oynadığı bilinmektedir(Bhogireddy ve ark., 2021).

İnsan genomunun yaklaşık %3'lük kısmı kodlanmayan mRNA'ya aktarılır(Kimura, 2020). miRNA, lncRNA, dairesel RNA (circRNA) ve PIWI ile etkileşen RNA (piRNA) olmak üzere kanserlerde farklı işlevlere sahip dört ana ncRNA tipi bulunmaktadır(Yan ve Bu, 2021). ncRNA'lar içinde sadece lncRNA'lar ve circRNA'lar 200 nükleotidden uzundur. LncRNA düz, circRNA dairesel yapıya sahiptir. İntergenik lncRNA'lar, genomun genler arası bölgelerinden transkripsiyona uğrarken, doğal antisense transkriptRNA'lar protein kodlayan genlerin karşısındaki iplikten transkripsiyona uğrar(Katayama ve ark., 2005). lincRNA'lar 10.000'den fazla çeşidi ile en büyük lncRNA grubunu oluşturur. mRNA'lar ile lincRNA'lar arasındaki en belirgin fark fazla protein kodlama yeteneklerinin olmayışıdır(Cabili ve ark., 2011).

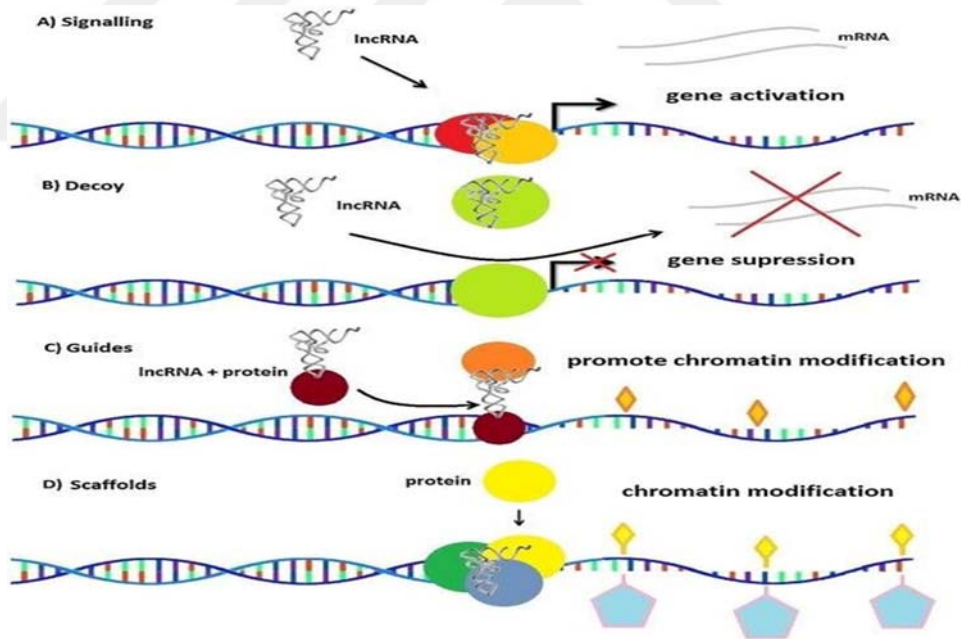
2.4.1. Uzun kodlanmayan RNA'ların hücre içinde gen ekspresyonunu düzenleyici rolü

Sinyal-lncRNA'lar: Sinyal lncRNA'lar, hücresel stres gibi spesifik biyolojik olaylara yanıt olarak moleküler sinyaller şeklinde hareket eder ve belirli genlerin transkripsiyon aktivasyonuna yol açar.

Decoy-lncRNA'lar: Bu lncRNA türü, transkripsiyon faktörleri veya kromatin düzenleyicileri gibi protein faktörlerine bağlanarak onların işlevlerini baskılar ve bu durum, hedef genlerin ekspresyonunun baskılanmasına yol açar.

Kılavuz-lncRNA'lar: Kılavuz-lncRNA'lar, ribonükleoprotein kompleksleri için rehberlik yapar ve bu komplekslerin hedef genlerin kromatin modifikasyonlarını gerçekleştirmesine yardımcı olur.

İskelet-lncRNA'lar: İskelet lncRNA'lar, var olan ribonükleoprotein komplekslerinin modifikasyonunu düzenleyerek transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanmasına neden olur. (Kolenda ve ark., 2017)(Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. LncRNA Hücre İçinde Gen Ekspresyonunu Düzenleyici Rolü (Kolenda ve ark., 2017).

2.4.2 Uzun kodlanmayan RNA-kanser ilişkisi

LncRNA'lar gen ifadesini birden fazla mekanizma ile etkileyebilirler. Transkripsiyon faktörleri promotör etkileşimini düzenleyebilir ve hedef gen ifadesini değiştirebilir(Tang ve ark., 2013)(Medeiros ve Allan, 2019)(Cao ve ark., 2021a). İlgili yollarda sinyal akışlarını ve protein etkileşimlerini düzenleyen bir iskelet görevi görür. Ayrıca kromatin epigenetik modülasyonunu etkileyerek gen ifadesini değiştirebilir. LncRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı gen gibi davranarak tümör genetiği üzerinden direkt etki edebildiği gibi tümörün kemoterapi ilaçlarına cevaplarını değiştirecek hastalık gidişatı üzerine de etki edebilir(Cao ve ark., 2021b).

Gen Regülasyonu ve Kromatin Modifikasyonu: LncRNAlar, gen ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı yollarla düzenler. Bu düzenleme, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları veya kromatin yapısındaki değişiklikler yoluyla gerçekleşir. Örneğin, HOTAIR (Hox Transcription Antisense Intergenic RNA), PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) ile etkileşime girer ve histon metilasyonu yoluyla HOXD lokusundaki gen ekspresyonunu baskılar. Bu durum, özellikle meme ve kolorektal kanser gibi tümörlerde metastaz yapma potansiyelini artırır. HOTAIR'in aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinde invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir(Geng ve ark., 2011).

Moleküler Sünger (ceRNA) Olarak Görev Yapma: LncRNAlar, miRNA'larla rekabet ederek (sponge etkisi) onların doğal hedeflerine bağlanmasını engelleyebilir ve bu şekilde gen ekspresyonunu değiştirebilir. Örneğin, MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1), miR-9'u bağlayarak EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş) ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırır ve hücre göçünü teşvik eder(Dong ve ark., 2015). Aynı zamanda, H19 lncRNA'sı da miR-200 ailesine bağlanarak EMT geçişini artırır ve bu durum metastaz ile sonuçlanır(Zhang ve ark., 2022).

Protein Stabilitesi ve Kompleks Oluşumu: Bazı LncRNAlar, protein-protein etkileşimlerini düzenleyerek hücre içi sinyal yolağı aktivitesini değiştirir. Örneğin, NEAT1 lncRNA'sı, paraspeckle proteinleri için bir iskele görevi görür ve bu şekilde hücre çekirdeğindeki protein organizasyonunu ve RNA metabolizmasını düzenler(Taiana ve ark., 2020). GAS5 lncRNA'sı ise nükleer reseptörlere bağlanarak glukokortikoid reseptörünün aktivitesini baskılar ve bu, anti-apoptotik sinyallerin azalmasına yol açar.

Kanser Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz Kontrolü: LncRNAlar, hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmalarını doğrudan etkileyerek tümör oluşumuna

katkıda bulunur. ANRIL (Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus), p16INK4a/p14ARF tümör baskılayıcı genlerinin ekspresyonunu baskılayarak hücre siklusunun kontrolsüz şekilde ilerlemesine neden olur(Sanchez ve ark., 2023). Bu durum, hücre proliferasyonunu teşvik eder ve apoptozun önlenmesine yol açar.

Metastaz ve Hücre Göçü: LncRNAların hücre göçü ve invazyon üzerindeki etkileri, genellikle EMT'yi (epitelyal-mezenkimal geçiş) düzenlemeleri yoluyla gerçekleşir. MALAT1 ve H19 gibi lncRNAlar, E-cadherin ve N-cadherin gibi EMT belirteçlerini düzenleyerek hücrelerin mezenkimal özellikler kazanmasını ve metastatik potansiyelin artmasını sağlar(Hussein ve ark., 2024).

Kemoterapi Direnci: LncRNAlar, kanser hücrelerinde kemoterapiye olan direnci düzenler. Örneğin, PVT1 lncRNA'sı, kemoterapiye dirençli hücrelerde MYC onkogenini hedef alır ve hücrelerin ilaç tedavisine karşı direnç geliştirmesine neden olur. H19 ve MALAT1 de ilaç direncinde önemli roller oynar ve bu moleküllerin baskılanması, kanser tedavisinde kemorezistansın önlenmesine yardımcı olabilir(Hou ve ark., 2023).

2.4.3. Uzun kodlanmayan RNA-meme kanseri ilişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanser hücrelerinin oluşumu, gelişimi, metastaz ve ilaç dirençlerin gelişiminde lncRNA'ların rollerini daha iyi anlamamızı sağladı(Ma ve ark., 2022)(Iacoangeli ve ark., 2004a)(Gökmen-Polar ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka / Model
Real Time PCR Cihazı	CFX96 BIORAD
NanoDrop 2000	Thermo
Mikroskop	NikonTS100
Hücre Sayım Cihazı	Cell Countes Thermo
Florasan Özellikli Mikroskop	OlympusCKX-41
Florasan, Absorbans ve Luminometrik Ölçüm Cihazı	Promega Glomax

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kitler.

Kit	Firma Adı
miRCURY Exosome Cell/Urine/CSF	Qiagen
cDNA Reverse Transkripsiyon	ABM
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen
exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit	Qiagen
Mouse CD63 Antigen Elisa Kit	BT LAB

Tablo 3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmasında kullanılan primerler.

Lnc RNA	3'-5'
ANRIL Forward	GCCTCATTCTGATTCAACA
ANRIL Reverse	TAGAAAGCAGTACTGACTCGG
MALAT1 Forward	GCTCTGTGGTGTGGGATTGA
MALAT1 Reverse	GTGGCAAAATGGCGGACTTT
HOTAIR Forward	CAGTGGGGAACCTCTGACTCG
HOTAIR Reverse	GTGCCTGGTGCTCTCTTACC
SNHG5 Forward	CGAGTAGCCAGTGAAGATAATG
SNHG5 Reverse	CACACAACAGTCAAGTAAACC
HULC Forward	ACTCTGAAGTAAAGGCCGGAA
HULC Reverse	GCCAGGAACTTCTTGCTTGA
BCYRN1 Forward	GCCTGTAATCCCAGCTCTCA
BCYRN1 Reverse	GCTTTGAGGGAAGTTACGCT
TWIST Forward	GCAAGATCCAGACGCTCAAGCT
TWIST Reverse	ACACGGAGAAGGCGTAGCTGAG
LINCH01638 Forward	CTGTCACCCATGAACCTGCT
LINCH01638 Reverse	TACAGGGAGGTAGGCCAGTC
XIST Forward	GTAGGTGTGCTGATAACCAAGGC
XIST Reverse	GGGAAAGGAAGATTGAGGGTGG
ST6GALNAC5 Forward	GGATCCCAATCACCTTCAG
ST6GALNAC5 Reverse	TAGCAAGTGATTCTGGTTTCCA
SCUBE2 Forward	GTGTGCTGTCAACAATGGAGGC
SCUBE2 Reverse	ATTGCGGGTCTGGCACTCATCA

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hasta seçimi ve numunelerin alınması

Mevcut tez çalışmamızda Helsinki Bildirgesine uygun hareket edildi (09.02.2022 tarihli 167450 sayılı Pamukkale Üniversitesi Etik kurulunda onayı alınmıştır.). Alınan hasta numuneleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Polikliniği ve Denizli Devlet Hastanesi Onkoloji polikliniğinden sağlandı. Numune alınan tüm hasta gönüllülerin onayı alındı ve gerekli bilgilendirmeler yapıldı. Deneysel çalışmalar, Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Genetik AD moleküler laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmaya 15-80 yaş aralığındaki, kronik hastalığı olmayan, meme kanseri tanısı almış hastalar ile meme kanseri olan ve farklı organ metastazları olan gönüllü hastalar dahil edildi. Kişilerden EDTA'lı mor kapaklı tüplere 5ml-10ml hacimde kan alındı.

3.2.2. Hasta örneklerinden eksozomal RNA izolasyonu

Hastalardan alınan kan örnekleri (5 ml-10 ml) 3000 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serum 15 ml'lik falkon içerisinde oda sıcaklığında 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilirdi. Santrifüjün ardından elde edilen plazma şırınga ile alınıp 0,22 mikrometrelik filtreden geçirilerek eksozom dışındaki diğer hücresel veziküllerin eliminasyonu sağlandı. Bu aşamanın ardından filtre edilen örneklerden miRNeasy kiti kullanılarak eksozomal RNA izolasyonu yapıldı.

- 1 hacim örnek üzerine 1 hacim XBP Tamponu eklenip tüp 5 kez ters çevrilerek karıştırıldı. Karışım exoEasy santrifüj kolonuna eklendi ve 500 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki sıvı atılıp aynı kolon ile devam edildi.

-3,5 ml XWP Tamponu eklenip 5000 x g'de 5 dakika santrifüj yapıldı.

-kolon yeni bir toplama tüpüne transfer edildi.

-Membrana 700 µl QIAzol eklendi. 5000 x g'de 5 dakika santrifüj yapılarak lizat 2 ml'lik bir tüpe alındı.

-Lizatı vortekslenip ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

-Lizat içeren tüpe 90 µl kloroform eklendi 15 saniye vorteks yapıldı.

- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildikten sonra 12,000 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından oluşan üstteki su faz yeni bir ependorfa alınıp örnek hacminin 2 katı 100% etanol eklenip (örneğin, 400 µl su fazı için 800 µl etanol ekleyin) birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonuna 700 µl örnek alınıp 15 saniye boyunca $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) kuvvetle oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Alt kısımda kalan sıvıyı atıldı. Kalan örnek ile Bu işlem bir kez daha gerçekleştirildi.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonuna 700 µl RWT Tamponu eklenip 15 saniye boyunca $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonuna 500 µl RPE Tamponu eklenip 15 saniye boyunca $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonuna 500 µl RPE Tamponu eklendi 2 dakika boyunca $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, RNeasy MinElute santrifüj kolonunu toplama tüpünden dikkatlice çıkarıldı.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonunu yeni bir 2 ml ependorfa alındı. Kolonunun kapağı açık olacak şekilde membranı kurutmak için 5 dakika tam hızda santrifüj yapıldı.
- RNeasy MinElute santrifüj kolonu yeni bir 1.5 ml ependorf tüpe alındı. Kolon membranının merkezine 20 µl RNase-free su eklenip, kolon 1 dakika bekletildikten sonra RNA'yı elüt etmek için tam hızda 1 dakika santrifüj yapıldı.
- İzole edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.2.3. RNA miktarının spektrofotometrik ölçümü

Eksozomal total RNA izolasyonu ile elde ettiğimiz RNA örnekleri Nanodrop cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları alındı. Elde edilen sonuçlarla A260/A280 değerleri göz önünde bulundurularak RNA örneklerinin saflık seviyeleri tespit edildi.

3.2.4 Total RNA'nın cDNA'ya dönüşümü

Total RNA örneklerinden literatür araştırması sonucu belirlediğimiz lncRNA 'ların ifadelerindeki değişim eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR) ile valide edilmeden önce cDNA'ya çevrildi. RNA örneklerini cDNA'ya dönüşümünü gerçekleştirmek için ABM marka OneScript® Plus cDNA sentez kit(ABM, cat.,no; G236) aracılığıyla gerçekleştirildi.

- 1 µl RNA, 1 µl random primer ve 1 µl dinükleotidtrifosfat (dNTP) aynı tüpte karıştırıldı.
- Üzerine RNaz içermeyen su ile 14,5 µl'ye tamamlanarak karışım 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işleminin ardından karışı buzda 1 dk bekletildi.
- Ayrı bir tüp içine 1 µl Reverse Transkriptaz, 0,5 µl RNase OFF, 4 µl 5X RT Buffer, 5,5 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.4. cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları.

Bileşen	Hacim
5X RT solüsyonu	4 µl
dNTP	1 µl
Primer	1 µl
OneScript® Plus RTase	1 µl
Total RNA (1 µg)	2-4 µl
dH ₂ O	11-9 µl

-Reaksiyon için hazırlanan karışım thermal cyclers cihazında 25°C 'de 10 dk, 50°C 'de 50 dk ve 85 °C 'de 5 dk olacak şekilde reaksiyona bırakıldı. cDNA'ya dönüşümü tamamlanan örnekler - 20 °C 'de saklandı.

3.2.5. Total RNA örneklerinden kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ekspresyon analizleri

Belirlediğimiz lncRNA ifadelerindeki değişimi araştırmak amacı ile eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. İşlem Biorad CFX96 cihazında İTaq Universal SybrGreen solüsyonu protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. Metastatik ve nonmetastatik meme kanserli hasta grupları arasında genlerin ifadelerindeki kat değişimi için yapılan analizlerde β -aktin geni iç kontrol geni olarak kullanıldı.

Tablo 3.5. Reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Hacim
SybrGreen solüsyonu	5 μ l
İleri primer(F)	0,5 μ l
Geri Primer (R)	0,5 μ l
dH ₂ O	3 μ l
cDNA miktarı	1 μ l
Toplam	10 μl

Reaksiyon süreci aşağıdaki tabloda her örnek için iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. Reaksiyon koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	30 saniye	1 döngü
95°C	5 saniye	40 döngü
60°C	30 saniye	

3.2.6. Plazmadan eksozom izolasyonu

- Hasta kriterlerimize uygun olarak seçilen beyin, karaciğer, kemik ve non metastatik meme kanserli hasta gruplarından 5 mL EDTA'lı tüpe kanlar alındı.
- Toplanan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilen serum 15 ml'lik falkon içerisinde oda sıcaklığında 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından elde edilen plazma şırınga ile alınıp 0,22 mikrometrelik filtreden geçirilerek eksozom dışındaki diğer hücresel veziküllerin eliminasyonu sağlandı.
- Filtreden geçirdiğimiz serum örneklerimizden miRCURY Exosome Cell/Urine/CSF(qiagen) kiti kullanarak serumdan eksozom izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.6.1. Eksozom izolasyonu

- Falkon tüplerin her birinin içerisine total hacmin dörtte biri kadar Precipitation Buffer B yavaşça eklendi ve 5 sn vorteks yapıldı.
- 4 °C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- 20 °C 'de 30 dk 3200xg'de santrüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım ayrıldı. 4 °C 'de saklandı. Pellet 5 sn 3200xg'de santrüjlendi.
- Santrifüj sonunda pellet 100 µl Resuspension Buffer tamponu ile çözüldü ve 15 sn vortekslendi.
- Saflaştırılmış eksozom örneği -20 °C 'de saklandı

3.2.7. Hücre kültürü

MCF-10A hücreleri %1 Penisilin, L-glutamin, %5 ısıyla inaktive edilmiş at FBS(Fötal Bovin Serum)(GIBCO, Amerika), 20ng/ml EGF (Miltenyi Biotec, Almanya), 10ug/ml insülin (GIBCO, Amerika), 0,5 ug/ml hidrokortizon (Sigma, Almanya) içeren

DMEM/F12 (Sigma, Almanya) besiyeri içerisinde 37°C'deki, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında inkübe edildi.

3.2.7.1. Hücrelerin dondurulması

-MCF-10A hücreleri için %10 dimetilsülfoksit, %70 besiyeri, %20 horse FBS içeren DMEMF12 besiyeri hazırlandı.

-Hücreler dondurma prosedürü için 15 ml' lik falkona alındı ve 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.

-Süpernatant atıldıktan sonra falkon içerisine dondurma amacıyla hazırlanan besiyerleri eklendi ve yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edilip hücre kültürü için kullanılan özel cryo tüplere aktarıldı.

-Dondurulan hücreler -80 °C 'de muhafaza edildi.

3.2.7.2. Hücrelerin çözülmesi

-80°C' den alınan cryo tüpler 50 ml'lik falkon alındı.

-37 °C'deki su banyosu içerisinde çözüldü. Çözünen hücreler sonra 15 ml'lik falkon içerisine alınıp üzerlerine 5 ml besiyeri eklendi.

-Sonrasında hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

-Kalan pellet üzerine besiyeri eklenip hücreler homojen hale getirildi.

-Total hacim 7 ml olacak şekilde T25 flasklara alınarak kültüre edildi.

3.2.8. Kültüre edilen hücrelerin eksozom ile muamele edilmesi

Kültüre etmiş olduğumuz MCF-10A hücrelerini fonksiyonel çalışmaları gerçekleştirmek için ekimlerini yaptıktan sonra hücrelere 40 µl izole etmiş olduğumuz eksozom örneklerinden verildi.

3.2.9. Yara iyileşmesi deneyi (Wound healing)

- Kültüre edilen MCF-10A hücreleri 12 kuyucuklu platelere 5×10^5 hücre/ml hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı.
- Bir gece 37°C 'de CO_2 ve %95 nemli hava ortamında inkübe edildi. Ertesi gün besiyerleri değiştirildi.
- 10 μl 'lik tip ile kuyuların tam ortasından çizilerek yara oluşturuldu.
- Kuyulara sırasıyla 40 μg kemik, karaciğer, beyin ve non metastazlı hastaların eksozomları verildi. 0. ve 24. Saatte görüntüleri alınarak analizleri gerçekleştirildi.

3.2.10. Proliferasyon Deneyi

Kültüre edilen MCF-10A hücreleri her kuyuda 50.000 hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekilerek bir gece 37°C 'de CO_2 ve %95 nemli hava ortamında inkübe edildi. 24 saat sonra besiyeri değiştirildi. 48 saat sonraki kontrolde jelöz bir yapıda olduğu görüldüğünden sayım gerçekleştirilemedi.

3.2.3. Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hastalarından köken alan eksozom örneklerinden ELIZA yöntemi ile CD63 protein analizi

- Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler hazırlandı. Tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Kullanılacak stripler çerçevelere yerleştirilir.
- Standart kuyucuklarına 50 μl standart çözeltisi eklendi.
- Numune kuyucuklarına 40 μl numune eklendi, ardından numune kuyucuklarına 10 μl Mouse CD63 antikoru eklendi, sonrasında numune ve standart kuyucuklarına (Boş kontrol kuyucuğu hariç) 50 μl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırıldı. Plaka bir kapatıcı ile kapatıldı. 37°C 'de 60 dakika inkübe edin.

-Kapatıcı çıkarıldı ve plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkamada kuyucuklar 300 µl yıkama tamponu ile 30 saniye ile 1 dakika bekletildi. 5 kez yıkandı. Plaka kurumaya bırakıldı.

-Her kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A eklendi, ardından her kuyuya 50 µl substrat çözeltisi B eklendi. Plaka kapatıcı ile kaplayarak 37°C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.

-Her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi.

-450 nm'de ölçüm yapıldı.

3.2.4. Çalışmada kullanılan istatistiksel analizler

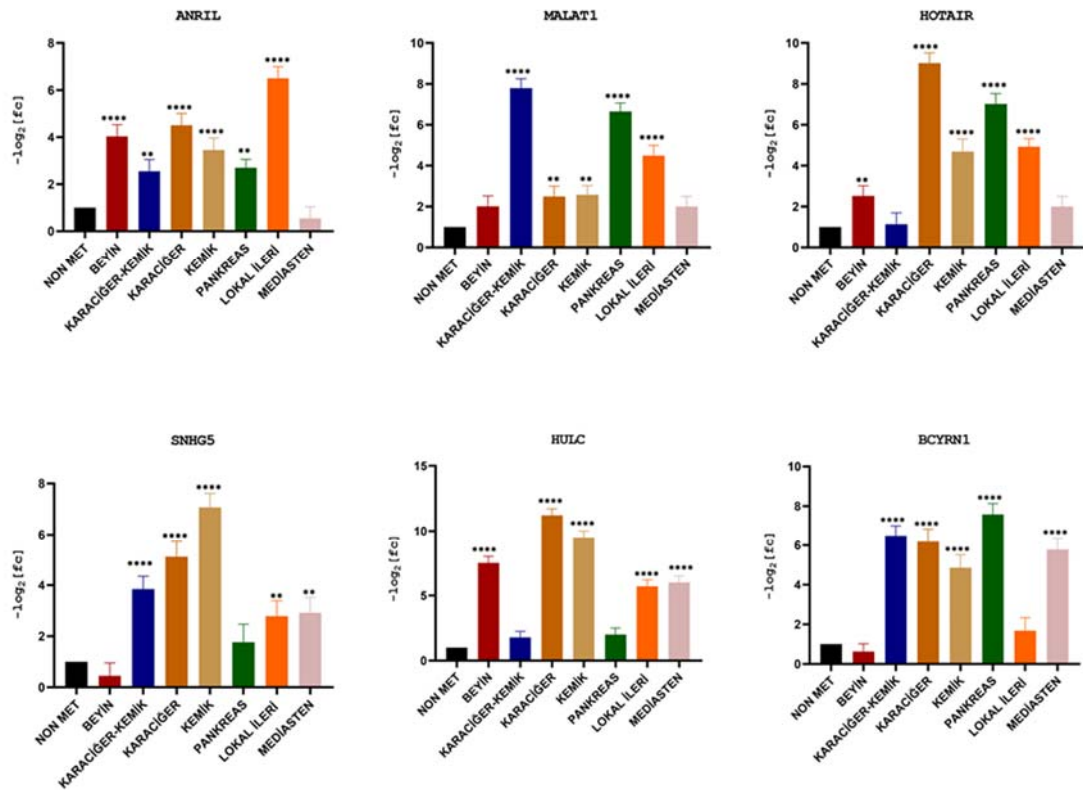
Gruplar arasındaki karşılaştırmalı analizler için Graphpad Prism 8.0.1 ve SPSS 22.0 programları kullanılarak Onewayanova, paired ve unpaired Student t-testleri uygulanarak gerçekleştirildi. P değerlerinin anlamlılık seviyeleri; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$ olarak belirlendi. Eş-zamanlı PCR sonuçlarını analizleri gerçekleştirilirken $\log_2[2^{-\Delta\Delta C_t}]$ formülü kullanılarak incelenen genler arasındaki kat değişimi analiz edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 50 hastadan numune alındı. Çalışmamıza dahil olan hastalarımız luminal B meme kanseri olan non metastatik ve farklı organ metastazları olan gönüllü kişilerden oluştu. Bu hastaların 21'i nonmetastatik grup, 5'i beyin metastazı mevcut grup, 4'ü karaciğer ve kemik metastazı olan grup, 3'ü yalnız karaciğer metastazı olan grup, 3'ü yalnız kemik metastazı olan grup, 7'si lokal ileri evre yayılımı olan grup, 3'ü mediasten tutulumu olan grup ve 4'ü diğer bölge tutulumları olan grup olarak kabul edildi. Çalışmamız hasta gruplarında hasta sayısı en az 3 olacak şekilde analizler gerçekleştirildi. Saydığımız gruplar dışında metastaz alanı mevcut hastalar diğer metastatik hastalar olarak gruplandırıldı.

4.1. qRT-PCR Analizleri Sonucunda Eksozomal LncRNA'ların Metastaz Yerine Göre İfade Düzeylerinin Analizi

Eksozomal lncRNA ANRIL için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,08 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,64 kat arttığı ($p < 0,01$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,52 kat arttığı ($p < 0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,35 kat arttığı ($p < 0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,79 kat arttığı ($p < 0,01$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,50 kat arttığı ($p < 0,0001$), mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,62 kat arttığı görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

Eksozomal lncRNA MALAT1 Eksozomal lncRNA ANRIL için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,05 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,88 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,49 kat arttığı ($p < 0,01$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,61 kat arttığı ($p < 0,01$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,76 kat arttığı ($p < 0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,46 kat arttığı ($p < 0,0001$), mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,01 kat arttığı görüldü (Şekil 4.1.).

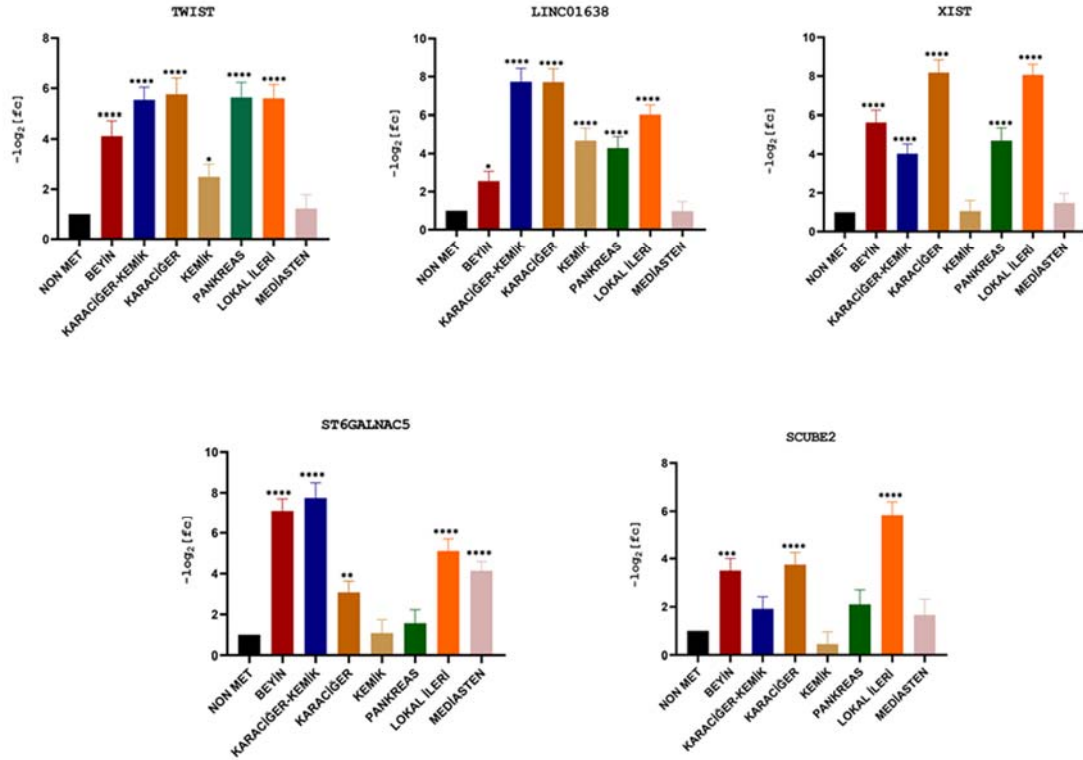
Eksozomal lncRNA HOTAIR için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,56 kat arttığı ($p < 0,01$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,12 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 9,05 kat arttığı ($p < 0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,87 kat arttığı ($p < 0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,06 kat arttığı ($p < 0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,97 kat arttığı ($p < 0,0001$), mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,0 kat arttığı görüldü (Şekil 4.1.).

Eksozomal lncRNA SNHG5 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,34 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,91 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,13 kat arttığı ($p < 0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,09 kat arttığı

($p<0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,70 kat arttığı , lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,76 kat arttığı, mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,94 kat arttığı görüldü (Şekil 4.1.).

Eksozomal lncRNA HULC için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,54 kat arttığı ($p<0,0001$) , karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,86 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 11,23 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 9,51 kat arttığı ($p<0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,01 kat arttığı, lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,72 kat arttığı($p<0,0001$) , mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,01 kat arttığı ($p<0,0001$) görüldü (Şekil 4.1.).

Eksozomal lncRNA BCYRN için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,66 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,52 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,27 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,89 kat arttığı ($p<0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,64 kat arttığı ($p<0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,74 kat arttığı, mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,74 ($p<0,0001$) kat arttığı görüldü.



Şekil 4.2. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

Eksozomal lncRNA TWIST için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,15 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,61 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,78 kat arttığı ($p < 0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,49 kat arttığı, pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,69 kat arttığı ($p < 0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,68 kat arttığı ($p < 0,0001$), mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,17 kat arttığı görüldü (Şekil 4.2.).

Eksozomal lncRNA LINC01638 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,68 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda

nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,81 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,75 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,75 kat arttığı ($p<0,0001$), pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,27 kat arttığı ($p<0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,52 kat arttığı ($p<0,0001$) , mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,94 kat arttığı görüldü (Şekil 4.2.).

Eksozomal lncRNA XIST için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,72 kat arttığı ($p<0,0001$) , karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,06 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 8,25 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,06 kat arttığı, pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,80 kat arttığı ($p<0,0001$), lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 8,08 kat arttığı ($p<0,0001$) , mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,43 kat arttığı görüldü (Şekil 4.2.).

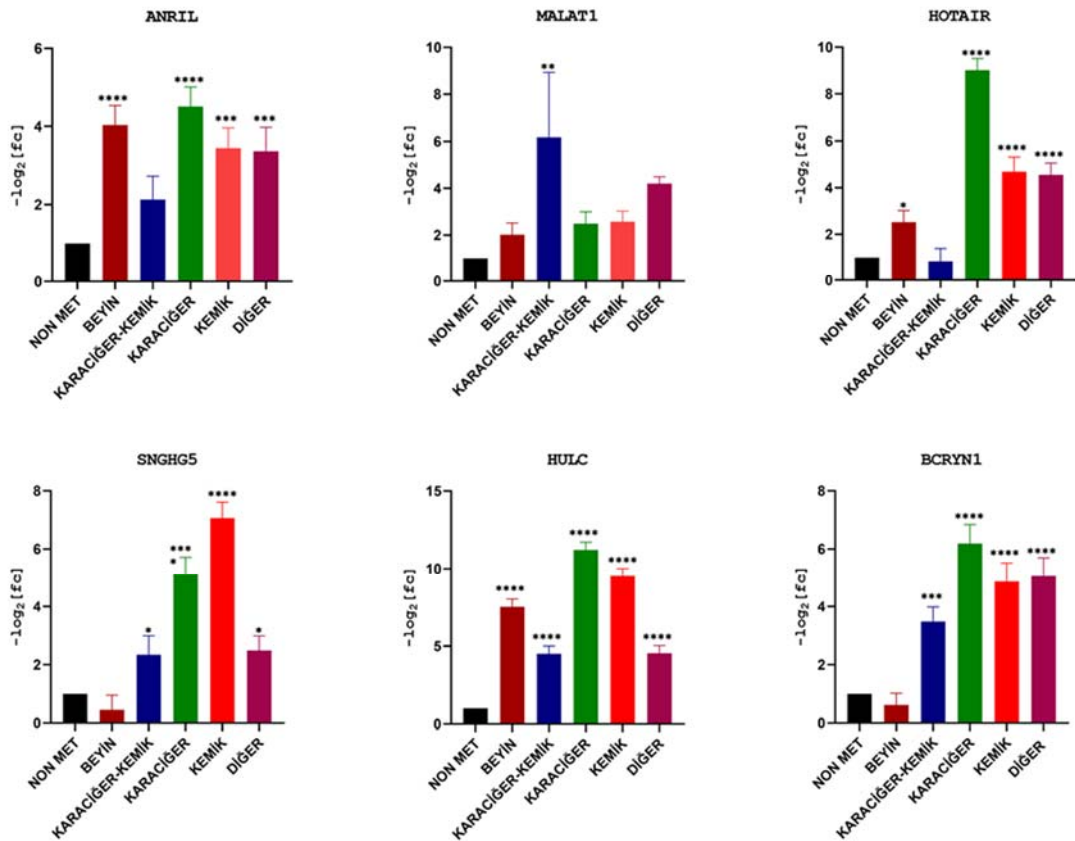
Eksozomal lncRNA ST6GALNAC5 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,12 kat arttığı ($p<0,0001$) , karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,74 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,14 kat arttığı, kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,97 kat arttığı , pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,41 kat arttığı , lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen

ifadesinin 5,12 kat arttığı ($p<0,0001$) , mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,13 ($p<0,0001$) kat arttığı görüldü (Şekil 4.2.).

Eksozomal lncRNA SCUBE2 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,50 kat arttığı ($p<0,0001$) , karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,95 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,83 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,37 kat arttığı, pankreas metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,10 kat arttığı, lokal ileri metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,81 kat arttığı ($p<0,0001$) , mediasten metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,68 kat arttığı görüldü (Şekil 4.2.).

4.2. qRT-PCR Analizleri Sonucunda Tüm Metastatik Meme Kanseri Hasta Eksozomal lncRNA'larının Nonmetastatik Meme Kanseri Hastalara Göre İfade Düzeylerinin Analizi

Eksozomal lncRNA ANRIL için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,0 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,18 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,50 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,32 kat arttığı ($p<0,001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,30 kat arttığı ($p<0,001$) görüldü.



Şekil 4.3. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$).

Eksozomal lncRNA MALAT1 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,05 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,05 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,49 kat arttığı, kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,60 kat arttığı, beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,41 kat arttığı görüldü (Şekil 4.3.).

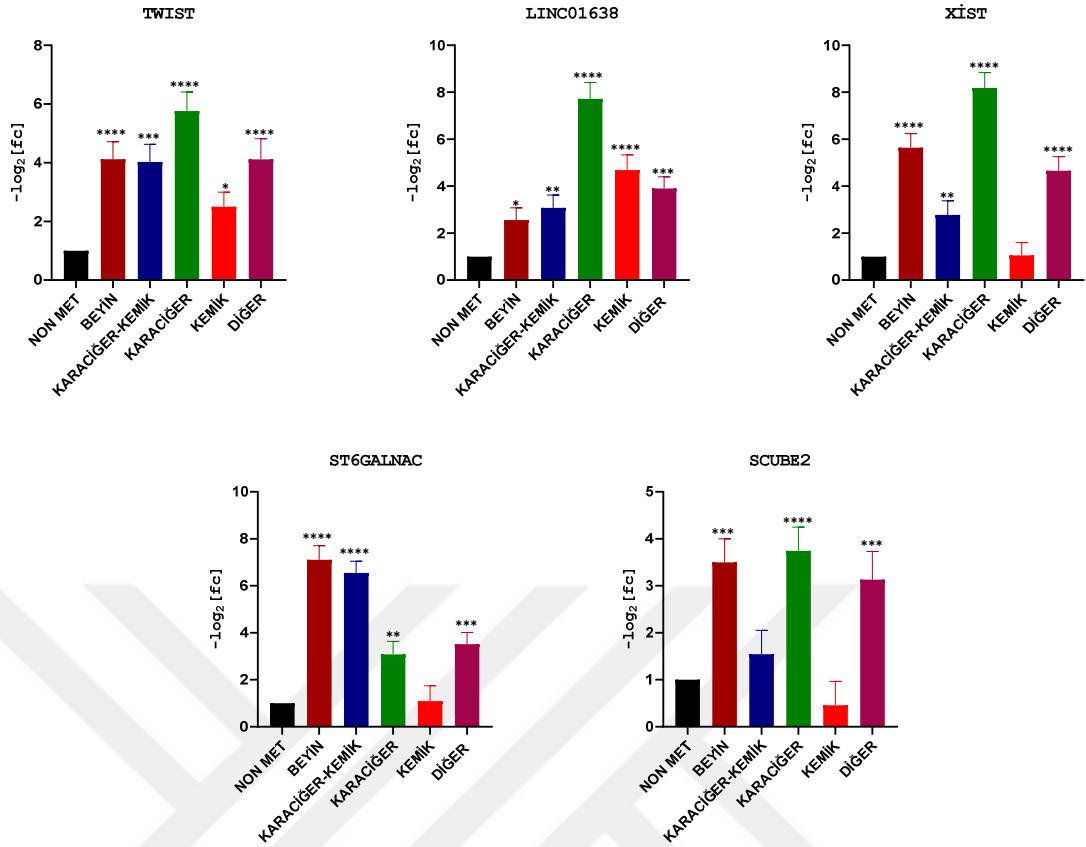
Eksozomal lncRNA HOTAIR için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,56 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,81 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 9,05 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,87 kat arttığı ($p<0,0001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,65 kat arttığı ($p<0,0001$) görüldü (Şekil 4.3.).

Eksozomal lncRNA SNHG5 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,34 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,33 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,13 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,09 kat arttığı ($p<0,0001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,46 kat arttığı ($p<0,05$) görüldü (Şekil 4.3.).

Eksozomal lncRNA HULC için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,54 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda

nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,50 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 11,2 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 9,51 kat arttığı ($p<0,0001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,58 kat arttığı ($p<0,0001$) görüldü (Şekil 4.3.).

Eksozomal lncRNA BCYRN1 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,66 kat arttığı, karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,45 kat arttığı ($p<0,001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,27 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,89 kat arttığı ($p<0,0001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,04 kat arttığı ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.3.).



Şekil 4.4. qRT-PCR analizleri sonucunda eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin analizi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

Eksozomal lncRNA TWIST için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,15 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,08 kat arttığı ($p < 0,001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,78 kat arttığı ($p < 0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,49 kat arttığı ($p < 0,05$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,15 kat arttığı ($p < 0,0001$) görüldü (Şekil 4.4.).

Eksozomal lncRNA LINC01638 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,0 kat arttığı ($p < 0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda

nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,18 kat arttığı ($p<0,05$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,50 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,32 kat arttığı ($p<0,001$), beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,30 kat arttığı ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.4.).

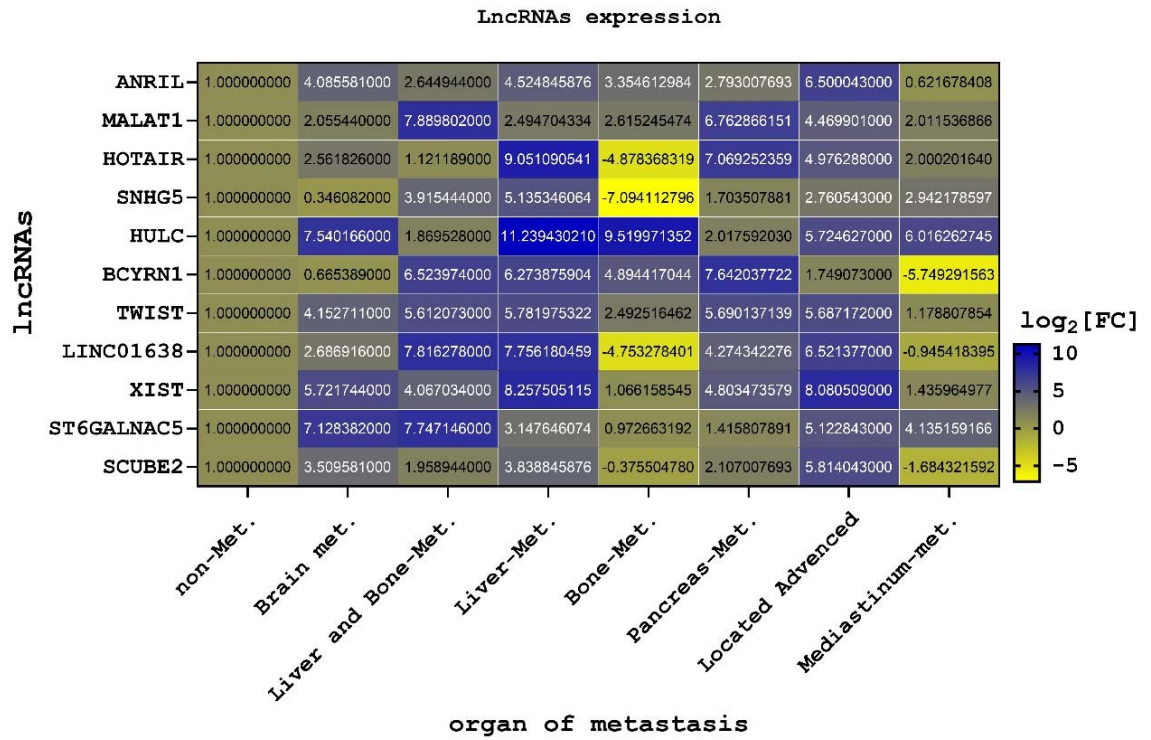
Eksozomal lncRNA XIST için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 5,72 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 2,72 kat arttığı ($p<0,01$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 8,25 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,06 kat arttığı, beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 4,77 kat arttığı ($p<0,0001$) görüldü (Şekil 4.4.).

Eksozomal lncRNA ST6GALNAC5 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 7,12 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 6,64 kat arttığı ($p<0,0001$), karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,15 kat arttığı ($p<0,01$), kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,97 kat arttığı, beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,55 kat arttığı ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.4.).

Eksozomal lncRNA SCUBE2 için bakıldığında beyin metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,50 kat arttığı ($p<0,001$), karaciğer + kemik metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 1,64 kat arttığı, karaciğer metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,83 kat arttığı ($p<0,0001$), kemik metastazı olan meme

kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 0,37 kat arttığı, beyin, karaciğer, kemik metastazı dışındaki bölgelere metastazı olan meme kanseri hasta grubunda nonmetastatik meme kanseri hasta grubuna göre gen ifadesinin 3,19 kat arttığı ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.4.).

Farklı metastatik bulgularasahip meme kanseri hastalarından elde edilen eksozomal RNA örneklerinden elde edilen qRT-PCR analizleri sonucunda total olarak sonuçlar heatmap analizi ile Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

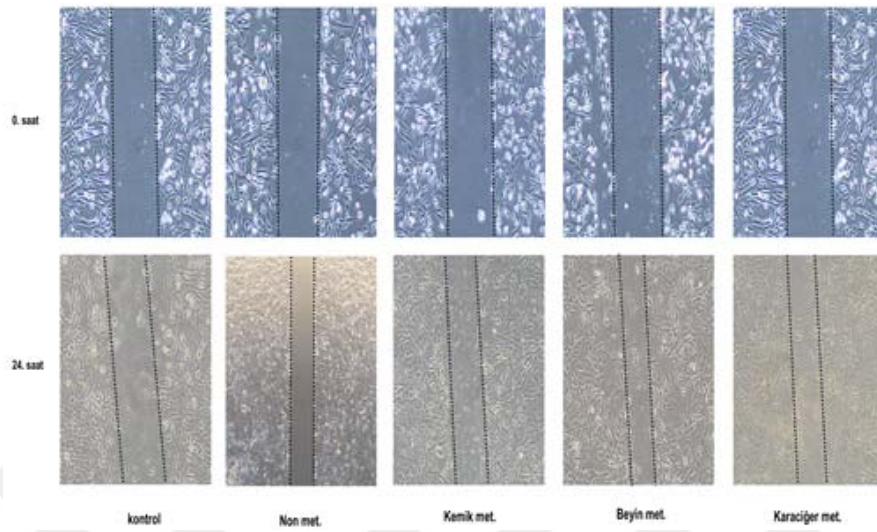


Şekil 4.5. Eksozomal lncRNA'ların ifade düzeylerinin Heatmap analizi.

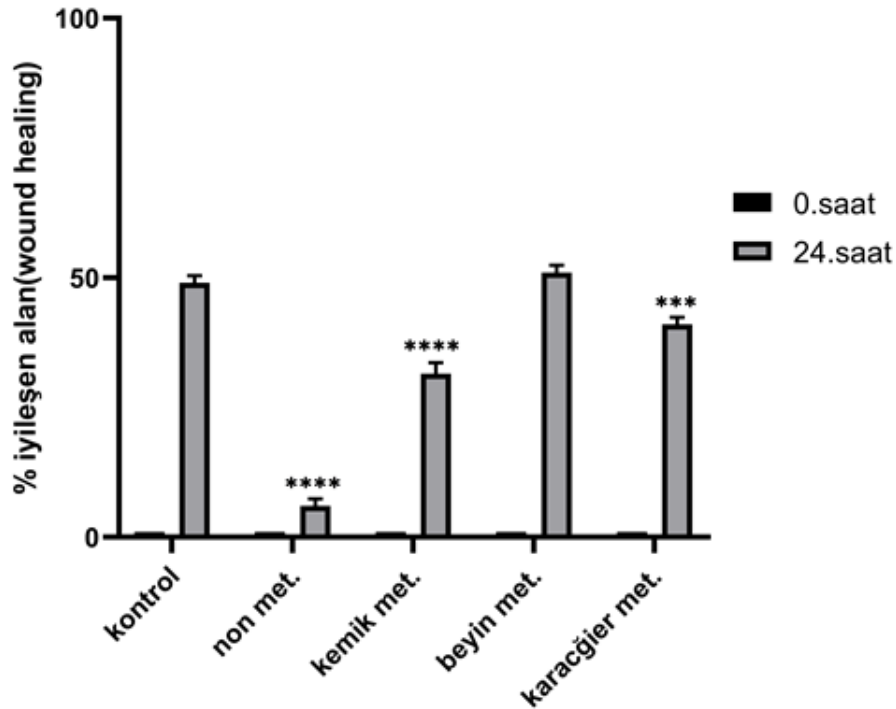
4.3. Meme Kanseri Hastalarından Köken Alan Eksozomların Normal Epitelyal Meme hücre Dizisi MCF-10A Hücrelerinin Wound Healing Analiz

MCF-10A hücre dizilerinde metastazlara değişime bağlı olarak salınan eksozomların hücre migrasyonuna olan etkisini gözlemlemek amacıyla yara kapanma (wound healing/ scratch assay) deneyi materyal metod bölümünde belirtildiği şekilde

gerçekleştirildi. Deney gruplarının 0. ve 24. saatlerdeki mikroskop görüntüleri görüntülenip yara kapanma yüzdeleri hesaplandı.



Şekil 4.6. MCF-10A hücrelerinin eksozom muamelesi sonrasında yara kapanma durumları.

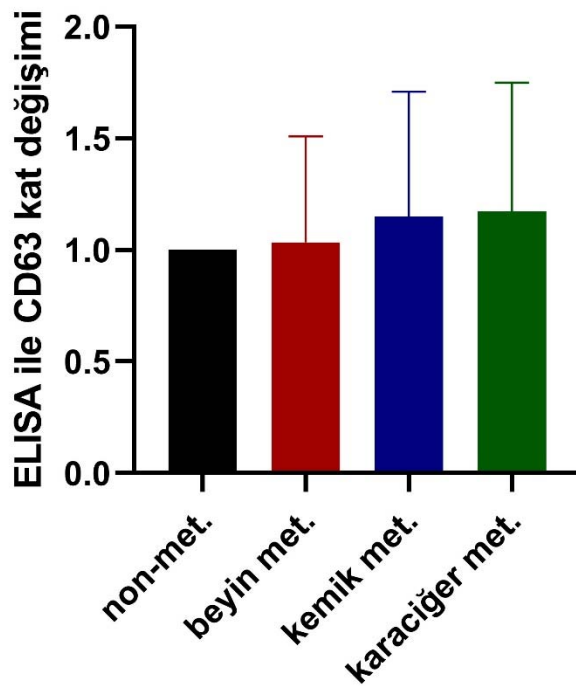


Şekil 4.7. MCF-10A hücrelerinin eksozom muamelesi sonrasında yara kapanma durumları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

Yapılan analizlerin sonucunda; kontrol MCF-10A hücrelerinin 24 saat sonraki yara kapanmasının yaklaşık %5, sırasıyla non metastaz hasta gruplarına ait eksozom ile

muamele edilen MCF-10A hücrelerinin 24 saat sonraki yara kapanması yaklaşık %50; kemik metastaz hasta gruplarına ait eksozom ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin 24 saat sonraki yara kapanmasının yaklaşık %33; beyin metastaz hasta gruplarına ait eksozom ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin 24 saat sonraki yara kapanması yaklaşık %52; ve karaciğer metastazlı hastaların eksozomu ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin yara kapanmalarının ise, %42 olduğu gözlemlenmiştir($p<0,0001$).

4.4. Metastatik ve Metastatik Olmayan Meme Kanseri Hastalarından Köken Alan Eksozom Örneklerinden ELIZA Yöntemi ile CD63 Protein Analizi Edilmesi

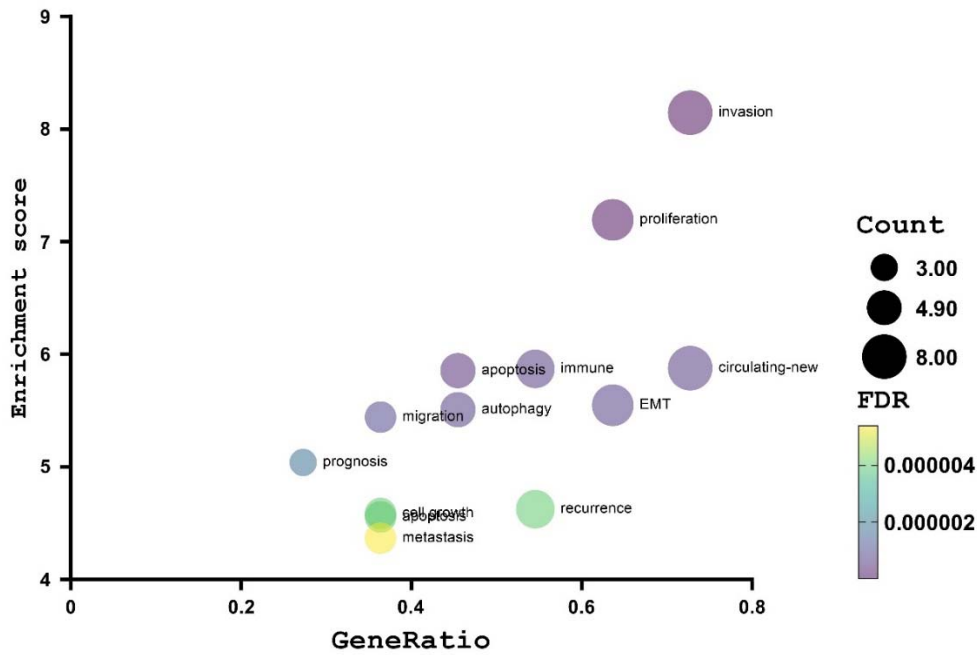


Şekil 4.8. Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hastalarından köken alan eksozom örneklerinden ELIZA yöntemi ile CD63 protein analizinin sonucu.

Hasta örneklerinden elde ettiğimiz eksozomlardan Mouse Cd63 Antigen, CD63 ELISA Kit kullanarak elisa testini gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde beyin metastaz hasta grubunda non metastaz hasta grubuna kıyasla 1,05 kat; kemik metastaz ve karaciğer metastaz hasta gruplarında 1,12 kat değişimi gözlenmiştir.

4.3. Meme Kanseri Metastazında Potansiyel Rollerini Araştırılan lncRNA'ların KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), GO (Gene Ontology enrichment analysis) analizlerinin yapılması

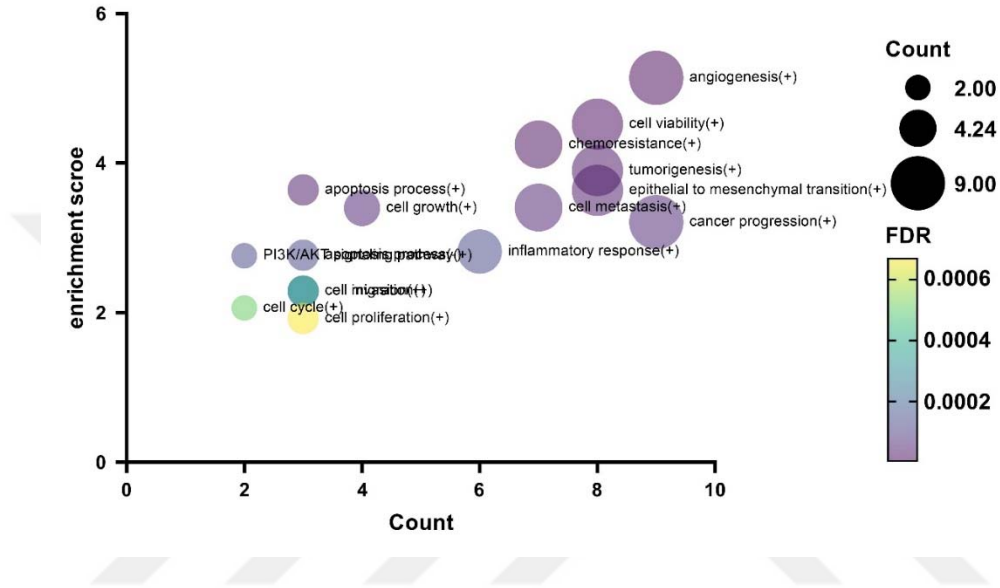
Çalışmamızın amacı doğrultusunda Meme Kanseri farklı organlara metastazlarında olası rollerini araştırılan eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin CancerSEA veri tabanından karsinogeneze rol alan moleküler süreçler ile ilişkileri analiz edildi. Yapılan analizlerde eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin invazyon, proliferasyon, kanser immünitesi prognostik, migrasyon, otofaji, metastaz ve kanser nüksü ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) ilişkili olduğu tespit edildi (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Çalışmamız kapsamında araştırılan lncRNA'ların Cancer_Hallmark Analizi ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$).

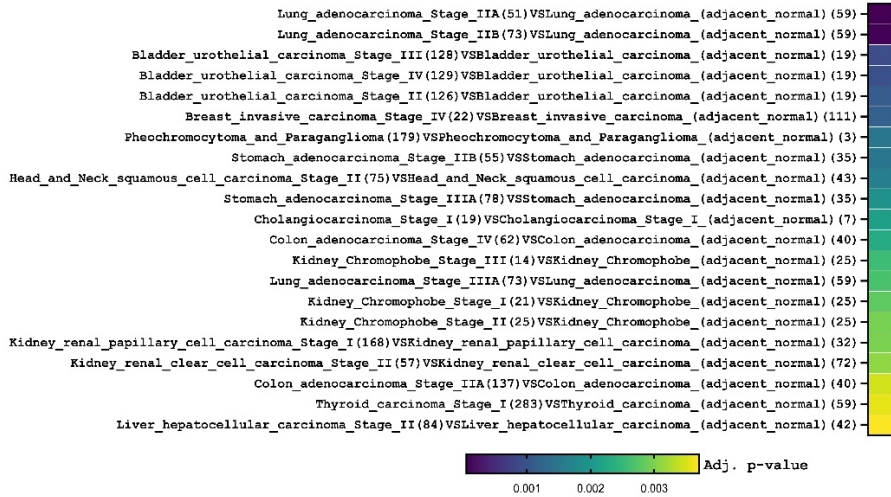
Projemizin amacı doğrultusunda LncSEA 2.0 platformundan eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin karsinogenezin biyolojik süreçleri ile analizleri gerçekleştirildi. Yapmış olduğumuz analizlerde hücre büyümesi, proliferasyon,

anjiyogenez, EMT, metastaz, karsinogenez, ilaç dirençliliği, hücre döngüsüne positif katkı gibi progresyonu ile ilişkili biyolojik süreçler ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.10.).



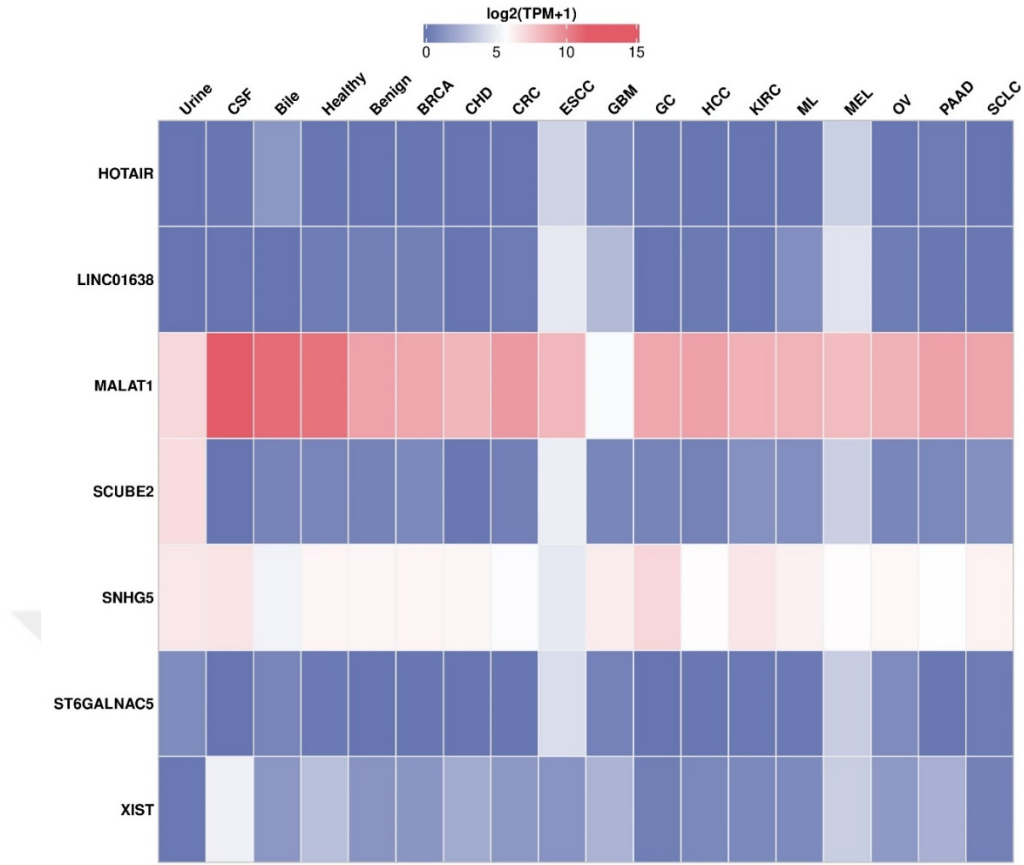
Şekil 4.10. Kanser sürecinde rol oynayan biyolojik süreçlerin eksozomal lncRNA'lar ile ilişkisinin analizi (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$).

Analizlerin ardından lncSEA 2.0 platformundan eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin farklı kanser türlerinin fenotipi ile olası ilişkisi biyoinformatik olarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda, eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin başta akciğer kanseri ileri evre ve invazif meme kanseri olmak üzere Şekil 4.11.'de detaylı olarak gösterildiği şekilde farklı kanser türlerinin fenotipi ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili olduğu saptandı (Şekil 4.11.).



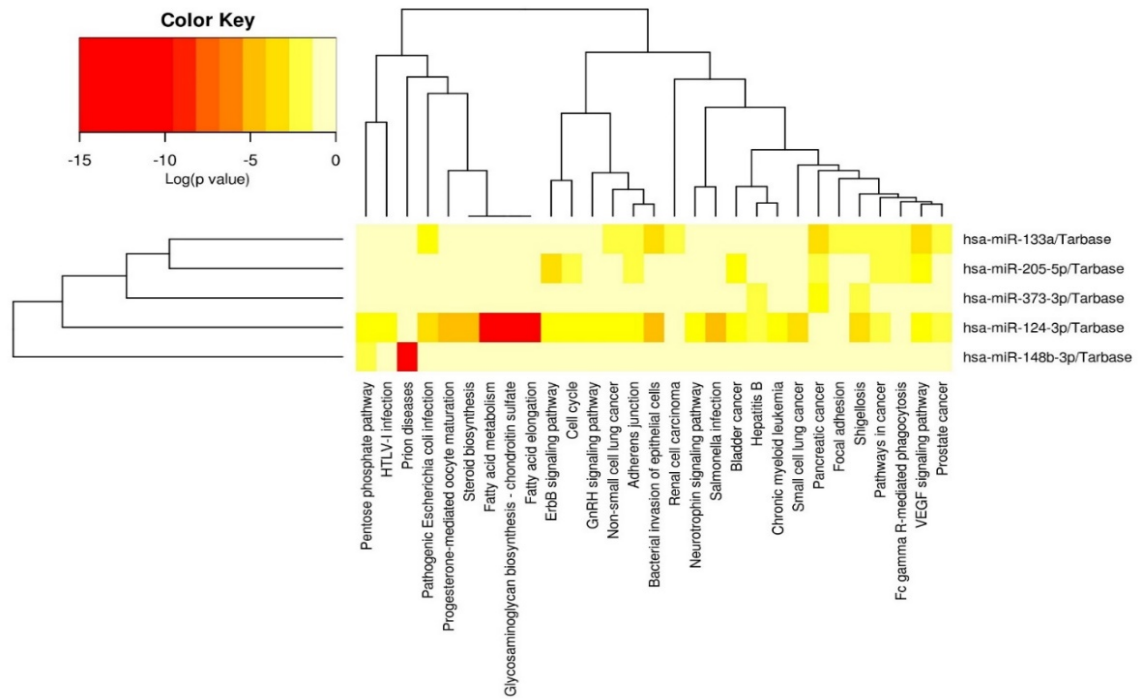
Şekil 4.11. Farklı kanser türlerinin fenotipleri ile eksozomal RNA'ların olası ilişkilerinin biyoinformatik analizi ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$).

Çalışmamız kapsamında araştırılan eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin daha önceki çalışmalardan elde edilen veriler ile oluşturulmuş exoRBase veri tabanında meme kanseri ve diğer kanser türlerinde kanser hücrelerinden salgılanan eksozomlardaki ifade durumu analiz edildi. Yapılan analizlerde çalışmamız kapsamında araştırılan lncRNA'ların Şekil 4.11.'de gösterildiği gibi farklı kanser türlerinde kanser hücrelerinden salgılanan eksozomlarda ifadelerinin yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. exoRBase veri tabanında lncRNA'ların farklı kanser türlerinde tümör-kökenli eksozomlarda ifadelerinin biyoinformatik analizi ($p < 0,05$).

Çalışmamızın amacı doğrultusunda lncSEA 2.0 platformundan yapılan biyoinformatik analizlerde eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2'nin hsa-mir-133a, hsa-mir-205-5p, hsa-mir-373-3p, hsa-mir-124-3p, hsa-mir-148b-3p ile ilişkili olduğu saptandı. Bu doğrultuda miRNA veri tabanı mirPATH 3.0 platformu kullanılarak ilişkili miRNA'ların rol aldığı biyolojik süreçlerin analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.'de detaylı olarak gösterildi.



Şekil 4.12. Eksozomal lncRNA ANRIL, MALAT1, HOTAIR, SNHG5, HULC, BCYRN1, TWIST, LINC01638, XIST, ST6GALNAC5, SCUBE2 ile ilişkili miRNA'ların yolak analizleri ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$).

5. TARTIŞMA

Luminal B meme kanserinde, eksozomlar tümör mikroçevresinde bulunan fibroblastlar, bağışıklık hücreleri (örneğin, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK)), endotel hücreleri gibi hücrelerle etkileşime girerek bu hücrelerin aktivitesini değiştirebilir ve kanser hücreleri lehine bir mikroçevre oluşturabilir. Bu etkileşim, bağışıklık hücrelerinin tümör hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneğini azaltırken, fibroblastların ve endotel hücrelerinin kanser hücrelerinin büyümesini destekleyen faktörler (örn. VEGF) salgılamasını artırabilir. Ayrıca Luminal B meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, bağışıklık hücrelerini baskılayıcı moleküller içerir. Bu moleküller, bağışıklık hücreleri üzerindeki PD-1/PD-L1 ve FasL gibi proteinleri taşıyarak, bağışıklık hücrelerinin aktivitesini baskılar ve anti-tümör yanıtlarını zayıflatır. Örneğin, T-reg (düzenleyici T hücreleri) hücrelerinin aktivitesini artırarak ve NK hücrelerinin tümör öldürücü aktivitelerini engelleyerek bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine karşı etkinliğini azaltabilirler(Luminal B meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, bu yolla bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarını etkin bir şekilde kullanır (Tran ve Bedard, 2011).

Eksozomlar, immün sistemi etkilemenin yanında gen ifade değişimleri üzerinden de tümör gelişim ve metastazına katkı sağlayabilir. Hücrelerin genetik materyallerini (miRNA, lncRNA, mRNA) taşıyarak gen ekspresyonunu düzenler. Özellikle Luminal B meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, çevredeki hücrelere miRNA ve lncRNA'lar taşıyarak, bu hücrelerdeki gen ifadesini değiştirebilir. Bu durum, tümör hücrelerinin büyümesini, metastaz potansiyelini ve ilaç direncini artıran genlerin aktivasyonuna yol açabilir. Örneğin, miR-21 ve miR-155 gibi miRNA'lar, tümör baskılayıcı genlerin ifadesini baskılayarak tümör hücrelerinin büyümesini hızlandırır ve metastatik kapasitesini artırır (S. Huang ve ark., 2022).

Eksozomlar, Luminal B meme kanseri hücrelerinin metastaz yapmasını destekleyen önemli biyolojik araçlardır. Metastatik tümör hücrelerinden salınan

eksozomlar, uzak organlarda (örn. kemik, akciğer, karaciğer) pre-metastatik nişler oluşturur ve bu organlarda tümör hücrelerinin tutunması için uygun bir mikroçevre yaratır. Eksozomlar, bu nişleri oluşturan endotel hücreleri ve bağışıklık hücrelerini hedef alarak, hücre göçü ve anjiyogenez süreçlerini destekler. Örneğin, Luminal B meme kanserinden salınan eksozomlar, kemik ve akciğer gibi uzak organlara giderek metastaz sürecini hızlandırabilir ve kanser hücrelerinin bu organlara yerleşmesini kolaylaştırabilir (Tran ve Bedard, 2011). Eksozomlar, Luminal B meme kanserinde tanısal biyobelirteç ve tedavi aracı olarak umut vaat eder görünmektedir. Kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, hastalığın erken teşhisinde kullanılabilecek belirli biyomoleküller (örn. miRNA, lncRNA) içerir. Örneğin, Luminal B meme kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomlardaki miR-21 ve miR-155 gibi miRNA'lar, hastalığın erken teşhisi ve tedaviye yanıtın öngörülmesinde kullanılabilir. Aynı zamanda, eksozomlar tedavi edici moleküller ile yüklenecek, hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılabilir ve bu sayede tedavi etkinliğini artırırken yan etkiler azaltılabilir (Santoro ve ark., 2023).

Kemoterapi, immünoterapi ve hedef tedavilerdeki tüm güncel gelişmelere rağmen halen birçok kanser çeşidinde tedavi başarısızlığı görülmekte ve hastanın hayat kalitesini bozmakta ve sağkalım oranını azaltmaktadır. Günümüzde artık hücrelerin artık daha çok çevresiyle iletişime giren kodlanmayan protein yapısındaki RNA üreten yapılar olduğu üzerinde duruluyor. İnsan genomundaki en kalabalık gen sınıfı protein kodlama kapasitesi olmayan >500 nükleotid transkriptlerinden oluşan, heterojen yapıdaki uzun kodlamayan RNA'lardır (Mattick ve ark., 2023). LncRNA'ların tümör hücrelerindeki patojenik durumların yönettiğini gösteren kanıtlar vardır (Slack ve Chinnaiyan, 2019). Çeşitli modellerde yapılan klinik öncesi çalışmalar sonucunda, bunların hastalığı değiştiren hedefler olabileceklerini ve hastalık seyrini değiştirebilecekleri düşünülmektedir (Winkle ve ark., 2021).

Protein kodlayan genlere benzer şekilde, lncRNA'larının işlevi çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerle değiştirilebilir. Onkogen gibi davranabilir ve tümör supresor genlerin aktivitelerini etkileyerek kanser gelişimi, invazyon ve metastaza katkıda bulunabilir. Günümüzde kanser hücreleri üzerinde lncRNA'ların daha iyi anlaşılması üzerine bu genleri modifiye ederek kanser üzerindeki etki daha net bir şekilde anlaşılabilir ve bu bize gelecekte normal sağlıklı hücreleri etkilemeden lncRNA'lar üzerinde kanser hücresine spesifik hedef tedaviler geliştirme imkanı sağlayacak. Bir başka deyişle likit biyopsi yöntemi kullanılarak tümör tipiyle ilişkili lncRNA'ları tespit

ederek bu lncRNA'lar üzerinden hastaların kişiye özel tedavi seçenekleri sunulabileceğini düşünmekteyiz.

ANRIL, LINE, SINE ve LTR sekanslarından türemiş tekrarlayan elementlerden oluşan 9p21 lokusundaki çeşitli düz ve dairesel bileşik varyantlardan transkripte edilir. Aşırı ifadesi kanser, kalp-damar hastalığı ve Tip2 DM ile ilişkilidir (Razeghian-Jahromi ve ark., 2022)(Kong ve ark., 2018). ANRIL, posttranskripsiyonel süreçte ceRNA, miRNA'lar ve proteinler gibi davranarak gen ifadelerini değiştirebilir (Zhang ve ark., 2018)(Holdt ve ark., 2016). ANRIL ayrıca HEK293 ve HUVEC hücrelerinin birleşmesini engellediği çalışmalarda gösterilmiş (Alfeghaly ve ark., 2021)(Wufuer ve ark., 2023). ANRIL geni tüm bu etkiler sonucunda kanser gelişiminde önemli etkileri olan genlerin aktivitelerini değiştirerek hücre çoğalması, invazyon, metastaz gibi süreçlerde önemli etkide bulunur. ANRIL, transvers kolon, ince bağırsak ve hipofiz bezinde daha çok ifade edilir(Ardlie ve ark., 2015). ANRIL ekspresyonu, akciğer, farenks ve karaciğer kanserlerinde sırasıyla onkogenik transkripsiyon faktörleri c-MYC, SOX2 ve SP1 tarafından da regüle edilir (Lu ve ark., 2016)(Wu ve ark., 2018)(Huang ve ark., 2015).

ANRIL izoformlarının ifadesi akciğer, mide, meme, over, serviks, kolorektal, mesane, tiroid, beyin, prostat, endometriyum, böbrek, kanserleri, osteosarkom, miyelom, lösemi ve melanomda artmıştır. Özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ANRIL ifadesinin belirgin olarak artmış olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (Lin ve ark., 2015)(Kang ve ark., 2015)(Matsunaga ve ark., 2019) .

Meme kanserinde ANRIL üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada meme kanseri ve normal meme arasında ANRIL mRNA açısından fark olup olmadığı araştırılmış ve meme kanser hücrelerinde ANRIL düzeyinin daha yüksek olduğu bulunmuş (Meseure ve ark., 2016).

Ma ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada ANRIL'in baskılanmasının miR-125a/ENO1 yolu ile glikolizi inhine ederek triple Negatif meme kanserinde (TNMK) ilaç direncini baskılamışlar. Tedavi seçeneğinin çok olmadığı ve ilaç direncinin tedavi başarısızlığında önemli rol oynadığı TNMK'de ANRIL baskılanmasının alternatif bir tedavi yolu oluşturabileceğini vurgulamışlar (Ma ve ark., 2022). Bir diğer çalışmada Xu ve ark (2017). çalışmalarında ANRIL'in miR-199a inhibitör ile knockdown'unun tümör çoğalmasını azalttığını ve apoptozunu arttırdığını bildirmişler (Xu ve ark., 2017).

Mehta-Mujoo ve ark. (2019) çalışmalarında ANRIL ifadesini meme kanserinde artmış bulmuşlar ve ANRIL subsellüler yerleşim yerinin kanser gelişiminde etkili

olduğunu ifade etmişler (Mehta-Mujoo ve ark., 2019). Meme kanseri tipleri arasındaki lncRNA farkını araştıran bir başka çalışmada Liu ve ark. (2017) TNMK hücrelerinde ANRIL düzeyini nonTNMK hücrelerine oranla daha fazla bulmuşlar (Liu ve ark., 2017).

Mevcut çalışmamızda tüm metastatik meme kanserlerinde ANRIL geni miktarı nonmetastatik meme kanserlerine kıyasla anlamlı olarak daha fazla bulundu. Bu yönü ile çalışmamızın sonuçları literatür ile benzerlik göstermektedir ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda meme kanseri metastazında ANRIL geninin önemli rol oynadığını düşünüyoruz.

Beyin sitoplazmik RNA 1 (BCYRN1) ilk olarak beyin dokusunda izole edilmiş. Kromozom 2p16 'da bulunur (Basile ve ark., 1998). RNA polimeraz3 tarafından nöron hücre gövdesinde sentezlenir ve daha sonra dendritik uzantılara taşınır. ATP'den enerji üretimini engeller. Ekspresyonunun fazla olması nöron dejenerasyonuna neden olarak Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlar (Mus ve ark., 2007). Deneysel bir çalışmada Özefagus skuamoz hücreli karsinomda BCYRN1 fazla ekspresyonunun hücre çoğalmasından bağımsız olarak hücre migrasyon ve innazyonunu arttırdığını bulmuşlar (Zhao ve ark., 2020).

Zai ve ark.(2019) çalışmalarında BCYRN1 lncRNA'sının mide kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon ve invazyonunda etkili olduğunu ve BCYRN1 engellenmesinin mide kanseri hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu azalttığını bildirmişler (Zhai ve Li, 2019). Li ve ark çalışmalarında BCYRN1 susturulmasının kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını etkilemeden migrasyon ve invazyonunu azalttığını bulmuşlar (Li ve ark., 2016). Iacoangeli ve ark. çalışmasında normal meme dokusunda ve fibroadenom gibi benign karakterli meme tümörlerinde anlamlı bir BCYRN1 düzeyi bulamazken invaziv meme kanser hücrelerinde BCYRN1 düzeyini belirgin derecede yüksek bulmuşlar (Iacoangeli ve ark., 2004b). Iacoangeli ve ark başka bir çalışmada daha önce tümörektomi öncesi invaziv meme kanseri ve metastatik invaziv meme kanserlerinde normal sağlıklı hastalara oranla belirgin derecede yüksek kan BCYRN1 düzeyi bulmuşlar. Tümörektomi sonrası normal sağlıklı gönüllülerle belirgin fark izlenmemiş. Bu sonuçlara dayanarak yazarlar BCYRN1 düzeyinin invaziv meme kanseri için bir indikatör olarak kullanılabileceğini öermişler (Iacoangeli ve ark., 2018).

Singh ve ark. (2016) çalışmalarında meme kanser hücrelerinde BCYRN1 düzeyini artmış olarak bulmuşlar. Ayrıca aynı çalışmada ER + meme kanserlerinde BCYRN1 düzeyinin ER- meme kanserlerine oranla daha yüksek bulmuşlar. Bu sonuçlara dayanarak özellikle ER+ meme kanserinde BCYRN1 düzeyinin prognostik faktör olarak kullanılabileceğini savunmuşlar (Singh ve ark., 2016).

Mevcut çalışmamızda BCYRN1 gen düzeyi, beyin metastazı dışındaki uzak metastazlarda nonmetastazik gruba oranla daha yüksek bulundu. beyin metastazı ile nonmetastazik grup arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Çalışmamız sonuçlarına göre BCYRN1 gen düzeyinin beyin metastazı dışındaki metastaz gelişiminde önemli rol aldığını düşünüyoruz.

İnsan (HOX transcript antisense RNA) HOTAIR lnc RNA'ları, HOXC11 ve HOXC12 lokusları arasında kalan kromozom 12q13.13'ün HOXC lokusunda yer almaktadır. HOTAIR RNA polimeraz 2 ile transkripte olur. HOTAIR, çeşitli kromatin değiştirici komplekslerle etkileşime girerek, kromatin durumunu değiştirmek ve böylece hedef genlerin ifadesini düzenlemek için moleküler bir iskele görevi görür.

HOTAIR lncRNA'lar da kanser gelişimi ile ilişkili bulunmuş. Bir çalışmada Hepatosellüler Karsinomda (HSK) tümör hücrelerinde *HOTAIR* gen miktarının normal hepatositlere oranla daha yüksek bulunmuş. İçeriğinde yüksek oranda HOTAIR geni bulunan tümör hücreleri daha fazla oranla rekürrens göstermişler. Ayrıca bu tümörlerde HOTAIR ekspresyon miktarı ile lenf nodu metastazı arasında anlamlı korelasyon bulunmuş (Geng ve ark., 2011). Önceki çalışmalarda, HOTAIR ekspresyonu ile TGF- β ve SNAIL1 ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Łuczak ve ark., 2016) (Zheng ve Min, 2016).

Kanserle ilişkili fibroblastlardan (CAF) salgılanan TGF- β , TGF- β /SMAD yolunu tetikleyerek HOTAIR transkripsiyonunu ve CDK5 yolundaki histon modifikasyonunu aktive eder ve proliferasyon, invazyon, angiogenezis ve invazyonda önemli etkiye sahiptir. HOTAIR geni tümör supresör gen aktivitesini bozarak kanser gelişimine katkıda bulunur (Koboldt ve ark., 2012) (Wu ve ark., 2013).

Meme kanseri hücrelerinde HOTAIR transkripsiyonunun karsinom ilişkili fibroblast aracılı yukarı upregülasyonu TGF- β 1 salgılanması yoluyla invazyonu ve metastazı teşvik eder. HOTAIR geni Meme kanserinde akciğer metastazı ile ilişkili bulunmuş (Ren ve ark., 2018). Gökmen ve ark. (2015) çalışmalarında ER – meme kanserlerinde HOTAIR ifade düzeyinin metastaz ve prognoz açısından belirleyici faktör olduğunu bildirmişler (Gökmen-Polar ve ark., 2015). HOTAIR'in meme kanseri

hücrelerinin hayatta kalması ve bakımı için vazgeçilmez olduğu ve östrojen tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiği bulundu. Ayrıca yapılan çalışmalarda HOTAIR aşırı ekspresyonunun apoptozu engellediği, hücre büyümesini, göçünü ve invazyonunu desteklediği ve meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını koruduğunu bildirmişler (Vardhini ve ark., 2014)(W. Zhao ve ark., 2018). Deng ve ark. (2017) çalışmalarında HOTAIR'in meme kanser kök hücrelerinde proliferasyon, koloni oluşumu, invazyon ve kendini yenileme kapasitesinin temel düzenleyicisi olduğunu ve bunun kısmen Sox2 ve p53'ün düzenlenmesi yoluyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Deng ve ark., 2017). Delphinidin antosiyanidin özelliğinde anti-kanser bir moleküldür. Delphinidin HOTAIR ekspresyonunu azaltarak meme kanserinde tümör gelişimini azaltır (Han ve ark., 2019). Collina ve ark. (2019) çalışmalarında TNMK'de HOTAIR düzeyi ile lenf nodu metastazı arasında güçlü korelasyon bulmuşlar (Collina ve ark., 2019).

HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) liganddan bağımsız olarak ER aktivitesini artırır ve meme kanserinde tamoksifen direncine katkıda bulunur (Xue ve ark., 2016).

Mevcut çalışmamızda karaciğer-kemik metastazı birlikteliği ile nonmetastatik grup arasında anlamlı ilişki saptanmazken ayrı ayrı karaciğer, kemik ve diğer metastazlarda HOTAIR gen miktarı nonmetastatik gruba göre artmıştır.

6p24.3 kromozomunda bulunan hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA (HULC) geninin, yaklaşık 1.600 nükleotidlik bir bölgeyi kaplar ve iki ekzonu vardır. Mide, pankreas kanserlerinde ve osteosarkomda HULC gen ifadesi artmış olarak bulunmuş (Zhao ve ark., 2014)(Peng ve ark., 2014)(Sun ve ark., 2015). Limin Lun ve ark.(2017) çalışmalarında HULC gen ifadesinin yüksekliğinin tüm tümörler açısından bakıldığında ortalama sağkalım ve metastaz ile ilişkili olabileceğini ve HULC geninin tümörün izlenmesi için bir prognostik faktör olabileceğini bildirmişler(Chen ve ark., 2017). Özellikle TNMK'de HULC geni çalışılmış ve aşırı ifadesi kötü prognoz, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile ilişkili bulunmuş (Shi ve ark., 2016)(S. Zhang ve ark., 2020). Zhou ve ark.(2022) deneysel çalışmalarında HULC geni ifade artışının meme kanserinde tümör metastazı ve sisplatin direnci ile ilişkili bulunmuş (Zhou ve ark., 2022). Bir başka deneysel çalışmada, Wang ve ark. HULC geni artmış ifadesinin migrasyon ve invazyonla ilişkili olduğu sonucuna varmışlar (Wang ve ark., 2019). Elhelaly ve ark. (2023) çalışmalarında meme kanseri hastaların kanlarında sağlıklı kontrollere oranla HULC geni ifadesini daha yüksek bulmuşlar (Elhelaly ve ark., 2023).

Mevcut çalışmamızda, HULC geni miktarı tüm metastatik gruplarda nonmetastatik

gruplara oranla daha yüksek bulundu. Sonuçlarımıza göre HULC geninin meme kanseri tüm metastazlarında organ gözetmeksizin önemli rol oynadığını düşünmekteyiz.

Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1), kanserin başlangıcında ve yayılmasında hayati bir rol oynar. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt), WNT/ β -katenin, Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) dahil olmak üzere çeşitli moleküler sinyal yollarını değiştirerek bu hedefe ulaşır ve bu da tümör oluşumunda, invazyonda, hücre döngüsünde, bağışıklıkta, göçte ve anjiyogeneizde değişikliklere neden olur (Dong ve ark., 2015)(Liang ve ark., 2017)(Zhao ve ark., 2016)(Yu ve ark., 2020)(Chen ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda, MALAT1'in tümör gelişim ve yayılımında etkili olduğu bulunmuş. Duan ve ark. çalışmalarında MALAT1 gen ifade artışının baş ve boyun skuamoz hücreli kanserlerinde metastaz ile ilişkili olduğunu bulmuşlar (Duan ve ark., 2023). Bir başka çalışmada Yue ve ark. (2021) meme kanser hücrelerinde MALAT1 geninin ifade artışını saptamışlar ve MALAT 1 geni susturulmasının tümörün tümörün gelişim, migrasyon ve invazyonunu azalttığını bulmuşlar (Yue ve ark., 2021). Ayrıca MALAT1'in tümör gelişiminde kilit rol oynayan anjiogeneizde etkili olduğunu ve bu genin susturulmasının osteosarkomda anjiogenezi azalttığı bildirilmiş (Vimalraj ve ark., 2021). Ou ve ark.(2019) çalışmalarında MALAT-1 ve BACH1 ekspresyonu ile tümör-nod-metastaz evresi, metastatik ilerleme, histopatolojik evre ve TNMK hastalarının sağ kalım oranları gibi kritik klinikopatolojik faktörler arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmişler (Ou ve ark., 2019).

Zheng ve ark.(2019) çalışmalarında meme kanserinde MALAT1 aşırı ifadesinin kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişler (Zheng ve ark., 2019). Turco ve ark çalışmalarında TNMK'de MALAT1 ve ID4(inhibitor of DNA-binding 4) proteinin VegfA izoformlarının miktarını arttırdığını bildirmişler. Sonuçta bu yolla anjiogenezi arttırarak tümörün invazyon ve metastaz olasılığını arttırabilirler (Turco ve ark., 2022).

Mevcut çalışmamızda MALAT1 geni miktarının da tüm metastatik gruplarda nonmetastatik gruplara oranla daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlarımıza göre MALAT geninin de meme kanseri tüm metastazlarında organ gözetmeksizin önemli rol oynadığını düşünüyoruz.

Signal Peptide-CUB-EGF Domain-Containing Protein (SCUBE) proteinleri 3 aileden oluşur. Bunlar içince SCUBE2 anjiyonezis üzerindeki etkisi ile ön plana çıkar. Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2'nin (VEGFR2) bir koreseptörü olarak

işlev görür ve bunun sonucunda VEGF sinyal iletiminde artışa ve dolayısıyla anjiyogenezin desteklenmesine neden olur(Lin ve ark., 2017).Parris ve ark. çalışmalarında oral kavite skuamöz hücreli kanserlerde SCUBE2 ifadesinin artmış olduğunu ve kanserin anjiogenezi, invazyon ve metastazında önemli rol oynadığını bildirmişler (Parris ve ark., 2014). Yang ve ark. (2018) çalışmalarında SCUBE2'nin aşırı ekspresyonunun, Sonic hedgehog sinyal yolunu baskılayarak küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KHOAK) hücre çoğalmasını ve istilasını engellediğini bulmuşlar. Bu nedenle, SCUBE2'nin KHOAK için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini savunmuşlar (Yang ve ark., 2018).

Guo ve ark. (2017) çalışmalarında glioma hücrelerinde SCUBE2 ifadesinin azamış olduğunu bulmuşlar. Ayrıca SCUBE2 aşırı ifadesinin tümör gelişim, invazyon ve metastazını engellediğini bulmuşlar (Guo ve ark., 2017). Ektopik SCUBE aşırı ifadesinin tümör süpresör etkisi olduğunu belirten yayınların (Cheng ve ark., 2009)(Lin ve ark., 2011)(Lin ve ark., 2014) aksine Chen ve ark.(2018) TNMK'de SCUBE2-aşırı ekspresyonunun, artmış ALDH aktivitesi ile gelişmiş hareketlilik ve kendini yenileme yeteneği, in vitro daha yüksek klon oluşturma yeteneği ve ayrıca in vivo artmış kendiliğinden tümör oluşturma ve metastatik potansiyel gibi meme kanseri kök hücre fenotipinin özelliklerine sahip hücrelerin oranında artışla sonuçlandığını bildirmişler. Ayrıca SCUBE2 aşırı ifadesinin tümör hücrelerinin epidermal-mezenşimal değişimini ve invazyon-metastaz yeteneğini artırarak tümör agresifliğini arttırdığını bildirmişler (Chen ve ark., 2018).

Mevcut çalışmamızda SCUBE2 gen miktarının kemik metastazı olan grup dışındaki tüm gruplarda nonmetastatik gruba oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlarımıza göre meme kanseri hastalarında kemik metastazı dışındaki metastazlarda SCUBE2 gen miktarının önemli olduğunu düşünüyoruz.

SNHG5, protein kodlama yeteneğinden yoksun 200'den fazla nükleotid birimiyle karakterize edilen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin bir çeşididir. SNHG5 çeşitli kanser gelişim ve invazyonu ile ilişkilendirilmiş. Çalışmalarında Wei ve ark.(2021) SNHG5'in özofageal kanser dokularında bol miktarda ifade edildiğini ve yüksek SNHG5 seviyelerinin özofageal skuamöz hücreli karsinom (ESCC) hücrelerinin proliferatif ve göç potansiyelini artırabileceğini, hücrel apoptozu baskılayabileceğini ve sonuç olarak ESCC'nin ilerlemesini destekleyebileceğini gösterdi (Wei ve ark., 2021). Ayrıca Kang ve ark. KHOAK'de SNHG5 aşırı ekspresyonunun tümör invazyon ve metastazını arttırdığını

ve tümör supressör etkiyi azalttığını bulmuşlar (Kang ve ark., 2023). Meme kanserinde SNHG5'in etkisini araştırmışlar ve meme kanser hücrelerinde gen ekspresyonunu artmış olarak bulmuşlar. Ayrıca genin susturulmasının meme kanser hücrelerini geriletmediğini bulmuşlar (S. L. Huang ve ark., 2022). Ayrıca SNHG5, PCNA(proliferating cell nuclear antigen) ekspresyonunu arttırmak yoluyla meme kanseri çoğalmasını ve hücre döngüsü ilerlemesini hızlandırdığı bildirilmiş (Chi ve ark., 2019). T6GALNAC5 cDNA'sı fare beyinlerinden klonlandı ve st6galnac5 geni özellikle fare beyin dokularında, özellikle ön beyin ve serebellumda ifade edildi (Ikehara ve ark., 1999). ST6GALNAC5'in meme kanseri hücrelerindeki artmış ifadesi, beyin endotel hücrelerine yapışmalarını ve kan-beyin bariyerinden geçerek beyne metastaz yapmalarını kolaylaştırır (Bos ve ark., 2009).

Mevcut çalışmamızda ise SNHG5 gen düzeyinin beyin metastazı hastalarında nonmetastatik gruba göre fark göstermediğini saptadık. Diğer tüm metastatik gruplarda ise nonmetastatik gruba oranla SNHG5 gen düzeyi daha yüksekti.

TWIST1 geninin meme kanseri ile ilişkisini araştıran bir çalışmada yazarlar TWIST1'in ana düzenleyicilerden biri olduğu epidermal-mezenşimal dönüşümün, kanser hücresi direncindeki en önemli yollardan biri olduğunu ve bu transkripsiyon faktörünün, yeni bir terapötik hedef olabileceğini bildirmişler (Cordani ve ark., 2023).

Mevcut çalışmamızda da tüm meme kanseri metastazlarında TWIST1 gen düzeyini anlamlı olarak artmış bulduk. Meme kanseri metastazlarında önemli rol aldığını düşünüyoruz ve metastazın önlenmesi için bir terapötik hedef olabileceğini düşünüyoruz.

Bir lncRNA olarak X-inaktif spesifik transkript (XIST), Xq13.2 kromozomunda bulunur ve dişi hücre gelişimi sırasında X kromozomu inaktivasyon sürecinde yer alır. Huang ve ark. çalışmalarında meme kanser hücrelerinde XIST gen ifadesindeki azalmanın hücre canlılığı arttırdığını bulmuşlar (Huang ve ark., 2016). Zhao ve ark. XIST inhibisyonunun, in vitro meme kanseri hücre büyümesini, göçünü ve invazyonunu arttırdığını saptamışlar ve tümör supresör özelliğine vurgu yapmışlar (L. Zhao ve ark., 2018). Bir başka çalışmada Zheng ve ark. XIST ekspresyonunun meme kanserinde ekspresyonunun azaldığını saptamışlar ve bu genin tümör gelişin, migrasyon ve invazyonunu azalttığını saptamışlar (Zheng ve ark., 2018). XIST geninin meme kanseri üzerine olan etkisini araştıran bir çalışmada yazarlar bu genin meme kanser gelişimini arttırdığını ve bu genin aktivitesinin azaltılmasının tümörün gelişimi, invazyon ve

metastaz kapasitesini azattığını bildirmişler (Zong ve ark., 2020). Zhang ve ark. çalışmalarında meme kanserinde doksorubisin direnci ile artmış XIST gen ifadesi arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlar (M. Zhang ve ark., 2020). Bir başka çalışmada Liu ve ark. XIST aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücre çoğalmasını, göçünü, invazyonunu zayıflattığını ve apoptozu kolaylaştırdığını ve XIST susturulmasının ise ters yönde etki gösterdiğini bildirmişler (Liu ve ark., 2021).

Mevcut çalışmamızda ise XIST geni miktarını kemik metastazı dışındaki tüm metastatik kanserlerde artmış olarak bulduk. Kemik metastazı dışındaki tüm metastazlarda önemli rol oynayabileceğini düşünüyoruz.



6. SONUÇ

Metastatik meme kanserinde eksozomlar, tümör hücrelerinin diğer hücrelerle iletişimini sağlayan ve metastatik davranışlarını destekleyen kritik araçlardır. Bu küçük veziküller, pre-metastatik niş oluşumu, EMT'nin düzenlenmesi, organotropik metastazın yönlendirilmesi ve bağışıklık yanıtlarının baskılanması gibi süreçlerde merkezi bir rol oynar. Eksozomların bu çok yönlü işlevleri, kanser biyolojisinin anlaşılmasında ve metastatik meme kanseri için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde büyük bir potansiyel sunmaktadı.

LncRNAların stabil yapıları, onları meme kanseri için potansiyel biyomarker ve terapötik hedefler haline getirir. Klinik çalışmalar, MALAT1 ve HOTAIR gibi lncRNAların non-invaziv tanı yöntemleri için kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, lncRNA tabanlı tedavi yaklaşımları, meme kanseri tedavisinde yeni bir ufuk açmaktadır. CRISPR-Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileri, belirli lncRNAların baskılanmasını veya aşırı ekspresyonunun önlenmesini sağlayarak kanser tedavisinde umut verici sonuçlar sunmaktadır.

Tez çalışmamız elde ettiğimiz sonuçlarımız göz önünde bulundurulduğunda lncRNA'ların antikanser tedavilerde, meme kanseri hastalarında progresyon ve prognozun değerlendirilmesinde önemli katkılar sağlayabilir. LncRNA'ların kanser hücrelerinin büyümesini modüle etmedeki kritik rolleri göz önüne bulundurulduğunda biyobelirteç lncRNA ekspresyonuna müdahale etmek kanserleşmenin önüne geçmek için oldukça anlamlı bir yol olarak gözükmektedir. Daha fazla hasta sayıları ile çok merkezli yapılacak çalışmalar ile gelecekte daha yaygın hale gelecek kişiselleştirilmiş tedavilere yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

- Abels, E.R., Breakefield, X.O., 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology* 36, 301–312. <https://doi.org/10.1007/S10571-016-0366-Z>
- AJCC Breast Cancer Staging 8 Edition - Breast Surgeons Web [WWW Document], n.d. URL <http://www.breastsurgeonsweb.com/noticias/ajcc-breast-cancer-staging-8-edition.html> (accessed 10.8.24).
- Alfeghaly, C., Sanchez, A., Rouget, R., Thuillier, Q., Igel-Bourguignon, V., Marchand, V., Branlant, C., Motorin, Y., Behm-Ansmant, I., Maenner, S., 2021. Implication of repeat insertion domains in the trans-activity of the long non-coding RNA ANRIL. *Nucleic acids research* 49, 4954–4970. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB245>
- American Cancer Society, 2022. Breast Cancer What is breast cancer? American Cancer Society. Cancer Facts and Figures Atlanta, Ga: American Cancer Society 1–19.
- Apostolou, P., Papasotiriou, I., 2017. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 9, 331–335. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S111394>
- Ardlie, K.G., DeLuca, D.S., Segrè, A. V., Sullivan, T.J., Young, T.R., Gelfand, E.T., Trowbridge, C.A., Maller, J.B., Tukiainen, T., Lek, M., Ward, L.D., Kheradpour, P., Iriarte, B., Meng, Y., Palmer, C.D., Esko, T., Winckler, W., Hirschhorn, J.N., Kellis, M., MacArthur, D.G., Getz, G., Shabalín, A.A., Li, G., Zhou, Y.H., Nobel, A.B., Rusyn, I., Wright, F.A., Lappalainen, T., Ferreira, P.G., Ongen, H., Rivas, M.A., Battle, A., Mostafavi, S., Monlong, J., Sammeth, M., Melé, M., Reverter, F., Goldmann, J.M., Koller, D., Guigó, R., McCarthy, M.I., Dermitzakis, E.T., Gamazon, E.R., Im, H.K., Konkashbaev, A., Nicolae, D.L., Cox, N.J., Flutre, T., Wen, X., Stephens, M., Pritchard, J.K., Tu, Z., Zhang, B., Huang, T., Long, Q., Lin, L., Yang, J., Zhu, J., Liu, J., Brown, A., Mestichelli, B., Tidwell, D., Lo, E., Salvatore, M., Shad, S., Thomas, J.A., Lonsdale, J.T., Moser, M.T., Gillard, B.M., Karasik, E., Ramsey, K., Choi, C., Foster, B.A., Syron, J., Fleming, J., Magazine, H., Hasz, R., Walters, G.D., Bridge, J.P., Miklos, M., Sullivan, S., Barker, L.K., Traino, H.M., Mosavel, M., Siminoff, L.A., Valley, D.R., Rohrer, D.C., Jewell, S.D., Branton, P.A., Sobin, L.H., Barcus, M., Qi, L., McLean, J., Hariharan, P., Um, K.S., Wu, S., Tabor, D., Shive, C., Smith, A.M., Buia, S.A., Undale, A.H., Robinson, K.L., Roche, N., Valentino, K.M., Britton, A., Burges, R., Bradbury, D., Hambright, K.W., Seleski, J., Korzeniewski, G.E., Erickson, K., Marcus, Y., Tejada, J., Taherian, M., Lu, C., Basile, M., Mash, D.C., Volpi, S., Struewing, J.P., Temple, G.F., Boyer, J., Colantuoni, D., Little, R., Koester, S., Carithers, L.J.,

- Moore, H.M., Guan, P., Compton, C., Sawyer, S.J., Demchok, J.P., Vaught, J.B., Rabiner, C.A., Lockhart, 2015. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* (New York, N.Y.) 348, 648–660. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1262110>
- Athma, P., Rappaport, R., Swift, M., 1996. Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 92, 130–134. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(96\)00328-7](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(96)00328-7)
- Barroso-Sousa, R., Metzger-Filho, O., 2016. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. *Therapeutic advances in medical oncology* 8, 261–266. <https://doi.org/10.1177/1758834016644156>
- Basile, V., Vicente, A., Martignetti, J.A., Skryabin, B. V., Brosius, J., Kennedy, J.L., 1998. Assignment of the human BC200 RNA gene (BCYRN1) to chromosome 2p16 by radiation hybrid mapping. *Cytogenetics and cell genetics* 82, 271–272. <https://doi.org/10.1159/000015117>
- Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C.R., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., Birch, J.M., Li, F.P., Garber, J.E., Haber, D.A., 1999. Heterozygous Germ Line hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science* 286, 2528–2531. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.286.5449.2528>
- Bernstein, L., Patel, A. V., Ursin, G., Sullivan-Halley, J., Press, M.F., Deapen, D., Berlin, J.A., Daling, J.R., McDonald, J.A., Norman, S.A., Malone, K.E., Strom, B.L., Liff, J., Folger, S.G., Simon, M.S., Burkman, R.T., Marchbanks, P.A., Weiss, L.K., Spirtas, R., 2005. Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 1671–1679. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJI374>
- Bhogireddy, S., Mangrauthia, S.K., Kumar, R., Pandey, A.K., Singh, S., Jain, A., Budak, H., Varshney, R.K., Kudapa, H., 2021. Regulatory non-coding RNAs: a new frontier in regulation of plant biology. *Functional & Integrative Genomics* 21, 313. <https://doi.org/10.1007/S10142-021-00787-8>
- Bos, P.D., Zhang, X.H.F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., Van De Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., Massagué, J., 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:7249 459, 1005–1009. <https://doi.org/10.1038/nature08021>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A., 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74, 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bray, F., McCarron, P., Parkin, D.M., 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Research* 6, 229–239. <https://doi.org/10.1186/BCR932/FIGURES/8>
- Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women, 2021. . *New England Journal of Medicine* 384, 428–439. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1913948/SUPPL_FILE/NEJMOA1913948_DISCLOSURES.PDF

- Buist, D.S.M., Abraham, L., Lee, C.I., Lee, J.M., Lehman, C., O'Meara, E.S., Stout, N.K., Henderson, L.M., Hill, D., Wernli, K.J., Haas, J.S., Tosteson, A.N.A., Kerlikowske, K., Onega, T., Avins, A., Benefield, T., Bowles, E.A., Bowman, M., Burian, D., Butler, M., Chiapello, E., Chicoine, R., Dabbous, F., De Bie, E., Dodd, T., Dolecek, T., Eliassen, S., Filocamo, K., Frawley, P., Gao, H., Gard, C., Geller, B., Goodrich, M., Greenwood-Hickman, M.A., Groseclose, C., Herschorn, S., Hofmann, M., Hughes, A., Hubbard, R., Hoots, T., Howe, K., Ichikawa, L., Joe, B., Kane, D., Knop, G., Luce, C., Ma, L., Macarol, T., Mace, J., Maeser, J., Malvin, K., Marsh, K., Miglioretti, D., Murphy, A.M., Pelkey, T., Quick, D., Rabelhofer, M., Rauscher, G., Richmire, K.R., Savioli, S., Seger, D., Sprague, B., Tossas-Milligan, K., Vu, L., Weaver, D., Weiss, J., Yankaskas, B., Zhu, W., 2018. Breast Biopsy Intensity and Findings Following Breast Cancer Screening in Women With and Without a Personal History of Breast Cancer. *JAMA internal medicine* 178, 458–468. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2017.8549>
- Cabili, M., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., Rinn, J.L., 2011. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & development* 25, 1915–1927. <https://doi.org/10.1101/GAD.17446611>
- Cao, J., Zhang, M., Wang, B., Zhang, L., Fang, M., Zhou, F., 2021a. Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. *Frontiers in oncology* 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.658552>
- Cao, J., Zhang, M., Wang, B., Zhang, L., Fang, M., Zhou, F., 2021b. Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. *Frontiers in Oncology* 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.658552>
- Cardoso, F., Harbeck, N., Fallowfield, L., Kyriakides, S., Senkus, E., 2012. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 Suppl 7. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDS232>
- Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Chiu, K.T., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C.U., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C., 2006. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295, 2492–2502. <https://doi.org/10.1001/JAMA.295.21.2492>
- Cerhan, J.R., 2006. Oral contraceptive use and breast cancer risk: Current status. *Mayo Clinic Proceedings* 81, 1287–1289. <https://doi.org/10.4065/81.10.1287>
- Cheang, M.C.U., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., Perou, C.M., Ellis, M.J., Nielsen, T.O., 2009. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 101, 736–750. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJP082>
- Chen, A.C., Paulino, A.C., Schwartz, M.R., Rodriguez, A.A., Bass, B.L., Chang, J.C., Teh, B.S., 2013. Prognostic markers for invasive micropapillary carcinoma of the breast: a population-based analysis. *Clinical breast cancer* 13, 133–139. <https://doi.org/10.1016/J.CLBC.2012.10.001>
- Chen, J.H., Kuo, K.T., Bamodu, O.A., Lin, Y.C., Yang, R.B., Yeh, C.T., Chao, T.Y.,

2018. Upregulated SCUBE2 expression in breast cancer stem cells enhances triple negative breast cancer aggression through modulation of notch signaling and epithelial-to-mesenchymal transition. *Experimental cell research* 370, 444–453. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.07.008>
- Chen, L., Feng, P., Zhu, X., He, S., Duan, J., Zhou, D., 2016. Long non-coding RNA Malat1 promotes neurite outgrowth through activation of ERK/MAPK signalling pathway in N2a cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20, 2102. <https://doi.org/10.1111/JCMM.12904>
- Chen, W.Y., Manson, J.E., Hankinson, S.E., Rosner, B., Holmes, M.D., Willett, W.C., Colditz, G.A., 2006. Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Archives of internal medicine* 166, 1027. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.166.9.1027>
- Chen, X., Lun, L., Hou, H., Tian, R., Zhang, H., Zhang, Y., 2017. The Value of lncRNA HULC as a Prognostic Factor for Survival of Cancer Outcome: A Meta-Analysis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 41, 1424–1434. <https://doi.org/10.1159/000468005>
- Chen, Y.F., Luh, F., Ho, Y.S., Yen, Y., 2024. Exosomes: a review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials. *Journal of Biomedical Science* 31, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01055-0>
- Cheng, C.J., Lin, Y.C., Tsai, M.T., Chen, C.S., Hsieh, M.C., Chen, C.L., Yang, R.B., 2009. SCUBE2 suppresses breast tumor cell proliferation and confers a favorable prognosis in invasive breast cancer. *Cancer research* 69, 3634–3641. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3615>
- Chi, J.R., Yu, Z.H., Liu, B.W., Zhang, D., Ge, J., Yu, Y., Cao, X.C., 2019. SNHG5 Promotes Breast Cancer Proliferation by Sponging the miR-154-5p/PCNA Axis. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 17, 138. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2019.05.013>
- Colditz, G.A., Bohlke, K., 2014. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64, 186–194. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21225>
- Collina, F., Aquino, G., Brogna, M., Cipolletta, S., Buonfanti, G., De Laurentiis, M., Bonito, M. Di, Cantile, M., Botti, G., 2019. LncRNA HOTAIR up-regulation is strongly related with lymph nodes metastasis and LAR subtype of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer* 10, 2018. <https://doi.org/10.7150/JCA.29670>
- Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C., Raposo, G., 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science* 126, 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/JCS.128868>
- Cordani, N., Mologni, L., Piazza, R., Tettamanti, P., Cogliati, V., Mauri, M., Villa, M., Malighetti, F., Di Bella, C., Jaconi, M., Cerrito, M.G., Cavaletti, G., Lavitrano, M., Cazzaniga, M.E., 2023. TWIST1 Upregulation Is a Potential Target for Reversing Resistance to the CDK4/6 Inhibitor in Metastatic Luminal Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 24. <https://doi.org/10.3390/IJMS242216294>

- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J.P., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., Gianni, L., Valagussa, P., Swain, S.M., Prowell, T., Loibl, S., Wickerham, D.L., Bogaerts, J., Baselga, J., Perou, C., Blumenthal, G., Blohmer, J., Mamounas, E.P., Bergh, J., Semiglazov, V., Justice, R., Eidtmann, H., Paik, S., Piccart, M., Sridhara, R., Fasching, P.A., Slaets, L., Tang, S., Gerber, B., Geyer, C.E., Pazdur, R., Ditsch, N., Rastogi, P., Eiermann, W., Von Minckwitz, G., 2014. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet (London, England)* 384, 164–172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8)
- Cybulski, C., Wokołorczyk, D., Jakubowska, A., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Masojć, B., Dębniak, T., Górski, B., Blecharz, P., Narod, S.A., Lubiński, J., 2011. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 3747–3752. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.0778>
- Daly, M.B., Pal, T., Berry, M.P., Buys, S.S., Dickson, P., Domchek, S.M., Elkhanany, A., Friedman, S., Goggins, M., Hutton, M.L., Karlan, B.Y., Khan, S., Klein, C., Kohlmann, W., Kurian, A.W., Laronga, C., Litton, J.K., Mak, J.S., Menendez, C.S., Merajver, S.D., Norquist, B.S., Offit, K., Pederson, H.J., Reiser, G., Senter-Jamieson, L., Shannon, K.M., Shatsky, R., Visvanathan, K., Weitzel, J.N., Wick, M.J., Wisinski, K.B., Yurgelun, M.B., Darlow, S.D., Dwyer, M.A., 2021. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 19, 77–102. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2021.0001>
- de Andrade Natal, R., Derchain, S.F., Pavanello, M., Paiva, G.R., Sarian, L.O., Vassallo, J., 2017. Expression of unusual immunohistochemical markers in mucinous breast carcinoma. *Acta histochemica* 119, 327–336. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2017.03.002>
- Deng, J., Yang, M., Jiang, R., An, N., Wang, X., Liu, B., 2017. Long Non-Coding RNA HOTAIR Regulates the Proliferation, Self-Renewal Capacity, Tumor Formation and Migration of the Cancer Stem-Like Cell (CSC) Subpopulation Enriched from Breast Cancer Cells. *PloS one* 12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0170860>
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F.G., Stoorvogel, W., Geuze, H.J., 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science* 113, 3365–3374. <https://doi.org/10.1242/JCS.113.19.3365>
- DeSantis, C.E., Ma, J., Gaudet, M.M., Newman, L.A., Miller, K.D., Sauer, A.G., Jemal, A., Siegel, R.L., 2019. Breast cancer statistics, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians 69, 438–451. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21583>
- Dong, Y., Liang, G., Yuan, B., Yang, C., Gao, R., Zhou, X., 2015. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2631-4>
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin,

- Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 727 8, 727. <https://doi.org/10.3390/CELLS8070727>
- Duan, Y., Yue, K., Ye, B., Chen, P., Zhang, J., He, Q., Wu, Yue, Lai, Q., Li, H., Wu, Yansheng, Jing, C., Wang, X., 2023. LncRNA MALAT1 promotes growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by repressing VHL through a non-canonical function of EZH2. *Cell death & disease* 14. <https://doi.org/10.1038/S41419-023-05667-6>
- Elhelaly, M., Shaker, O.G., Ayeldeen, G., Elsergany, A.R., Mostafa, N., 2023. Breast cancer risk is associated with the HULC rs7763881, MTMR3 rs12537 polymorphisms, and serum levels of HULC and MTMR3 in Egyptian patients. *Molecular biology reports* 50, 10073–10081. <https://doi.org/10.1007/S11033-023-08897-1>
- Ernster, V.L., Barclay, J., Kerlikowske, K., Wilkie, H., Ballard-Barbash, R., 2000. Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the population-based surveillance, epidemiology and end results program. *Archives of internal medicine* 160, 953–958. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.160.7.953>
- Février, B., Raposo, G., 2004. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.003>
- Geng, Y.J., Xie, S.L., Li, Q., Ma, J., Wang, G.Y., 2011. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *The Journal of international medical research* 39, 2119–2128. <https://doi.org/10.1177/147323001103900608>
- Giordano, S.H., Temin, S., Chandarlapaty, S., Crews, J.R., Esteva, F.J., Kirshner, J.J., Krop, I.E., Levinson, J., Lin, N.U., Modi, S., Patt, D.A., Perlmutter, J., Ramakrishna, N., Winer, E.P., Davidson, N.E., 2018. Systemic Therapy for Patients With Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36, 2736–2740. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.79.2697>
- Gökmen-Polar, Y., Vladislav, I.T., Neelamraju, Y., Janga, S.C., Badve, S., 2015. Prognostic Impact of HOTAIR Expression is Restricted to ER-Negative Breast Cancers. *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/SREP08765>
- Guo, E., Liu, H., Liu, X., 2017. Overexpression of SCUBE2 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion in Glioma Cells. *Oncology research* 25, 437–444. <https://doi.org/10.3727/096504016X14747335734344>
- Han, B., Peng, X., Cheng, D., Zhu, Y., Du, J., Li, J., Yu, X., 2019. Delphinidin suppresses breast carcinogenesis through the HOTAIR/microRNA-34a axis. *Cancer science* 110, 3089–3097. <https://doi.org/10.1111/CAS.14133>
- Han, C., Zhang, C., Wang, H., Zhao, L., 2021. Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment. *OncolImmunology* 10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1887552>
- Harbeck, N., Gnant, M., 2017. Breast cancer. *Lancet (London, England)* 389, 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)

- Harris, D.A., Patel, S.H., Gucek, M., Hendrix, A., Westbroek, W., Taraska, J.W., 2015. Exosomes Released from Breast Cancer Carcinomas Stimulate Cell Movement. *PLOS ONE* 10, e0117495. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117495>
- Heer, E., Harper, A., Escandor, N., Sung, H., McCormack, V., Fidler-Benaoudia, M.M., 2020. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet Global Health* 8, e1027–e1037. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30215-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30215-1)
- Holdt, L.M., Stahringer, A., Sass, K., Pichler, G., Kulak, N.A., Wilfert, W., Kohlmaier, A., Herbst, A., Northoff, B.H., Nicolaou, A., Gäbel, G., Beutner, F., Scholz, M., Thiery, J., Musunuru, K., Krohn, K., Mann, M., Teupser, D., 2016. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nature communications* 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12429>
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J., Weaver, A.M., 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell reports* 5, 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.10.050>
- Hou, J., Zhang, G., Wang, X., Wang, Y., Wang, K., 2023. Functions and mechanisms of lncRNA MALAT1 in cancer chemotherapy resistance. *Biomarker Research* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S40364-023-00467-8/TABLES/4>
- Hu, C., Hart, S.N., Gnanaolivu, R., Huang, H., Lee, K.Y., Na, J., Gao, C., Lilyquist, J., Yadav, S., Boddicker, N.J., Samara, R., Klebba, J., Ambrosone, C.B., Anton-Culver, H., Auer, P., Bandera, E. V., Bernstein, L., Bertrand, K.A., Burnside, E.S., Carter, B.D., Eliassen, H., Gapstur, S.M., Gaudet, M., Haiman, C., Hodge, J.M., Hunter, D.J., Jacobs, E.J., John, E.M., Kooperberg, C., Kurian, A.W., Le Marchand, L., Lindstroem, S., Lindstrom, T., Ma, H., Neuhausen, S., Newcomb, P.A., O'Brien, K.M., Olson, J.E., Ong, I.M., Pal, T., Palmer, J.R., Patel, A. V., Reid, S., Rosenberg, L., Sandler, D.P., Scott, C., Tamimi, R., Taylor, J.A., Trentham-Dietz, A., Vachon, C.M., Weinberg, C., Yao, S., Ziogas, A., Weitzel, J.N., Goldgar, D.E., Domchek, S.M., Nathanson, K.L., Kraft, P., Polley, E.C., Couch, F.J., 2021. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 384, 440–451. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2005936/SUPPL_FILE/NEJMOA2005936_DATA-SHARING.PDF
- Huang, M. De, Chen, W.M., Qi, F.Z., Xia, R., Sun, M., Xu, T.P., Yin, L., Zhang, E.B., De, W., Shu, Y.Q., 2015. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2. *Journal of hematology & oncology* 8. <https://doi.org/10.1186/S13045-015-0146-0>
- Huang, S., Dong, M., Chen, Q., 2022. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Breast Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms232213993>
- Huang, S.L., Huang, Z.C., Zhang, C.J., Xie, J., Lei, S.S., Wu, Y.Q., Fan, P.Z., 2022. LncRNA SNHG5 promotes the glycolysis and proliferation of breast cancer cell through regulating BACH1 via targeting miR-299. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 29, 65–76. <https://doi.org/10.1007/S12282-021-01281-6>
- Huang, Y.S., Chang, C.C., Lee, S.S., Jou, Y.S., Shih, H.M., 2016. Xist reduction in

- breast cancer upregulates AKT phosphorylation via HDAC3-mediated repression of PHLPP1 expression. *Oncotarget* 7, 43256–43266. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9673>
- Hussein, M.A., Valinezhad, K., Adel, E., Munirathinam, G., 2024. MALAT-1 Is a Key Regulator of Epithelial–Mesenchymal Transition in Cancer: A Potential Therapeutic Target for Metastasis. *Cancers* 16. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16010234>
- Iacoangeli, A., Adzovic, L., Chen, E.Q., Latif Cattie, R., Soff, G.A., Tiedge, H., 2018. Regulatory BC200 RNA in peripheral blood of patients with invasive breast cancer. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 66, 1055–1063. <https://doi.org/10.1136/JIM-2018-000717>
- Iacoangeli, A., Lin, Y., Morley, E.J., Muslimov, I.A., Bianchi, R., Reilly, J., Weedon, J., Diallo, R., Böcker, W., Tiedge, H., 2004a. BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer. *Carcinogenesis* 25, 2125–2133. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGH228>
- Iacoangeli, A., Lin, Y., Morley, E.J., Muslimov, I.A., Bianchi, R., Reilly, J., Weedon, J., Diallo, R., Böcker, W., Tiedge, H., 2004b. BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer. *Carcinogenesis* 25, 2125–2133. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGH228>
- Ikehara, Y., Shimizu, N., Kono, M., Nishihara, S., Nakanishi, H., Kitamura, T., Narimatsu, H., Tsuji, S., Tatematsu, M., 1999. A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1 α synthase (ST6GalNAc V). *FEBS Letters* 463, 92–96. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01605-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01605-1)
- Johnstone, R.M., 2005. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood cells, molecules & diseases* 34, 214–219. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2005.03.002>
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* 262, 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- Johnstone, R.M., Mathew, A., Mason, A.B., Teng, K., 1991. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of Cellular Physiology* 147, 27–36. <https://doi.org/10.1002/JCP.1041470105>
- Joko-Fru, W.Y., Jedy-Agba, E., Korir, A., Ogunbiyi, O., Dzamalala, C.P., Chokunonga, E., Wabinga, H., Manraj, S., Finesse, A., Somdyala, N., Liu, B., McGale, P., Jemal, A., Bray, F., Parkin, D.M., 2020. The evolving epidemic of breast cancer in sub-Saharan Africa: Results from the African Cancer Registry Network. *International Journal of Cancer* 147, 2131–2141. <https://doi.org/10.1002/IJC.33014>
- Kang, S., Ou, C., Yan, A., Zhu, K., Xue, R., Zhang, Y., Lai, J., 2023. Long Noncoding RNA SNHG5 Induces the NF- κ B Pathway by Regulating miR-181c-5p/CBX4 Axis to Promote the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Archivos de bronconeumologia* 59, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.ARBRES.2022.07.001>
- Kang, Y.H., Kim, D., Jin, E.J., 2015. Down-regulation of phospholipase D stimulates death of lung cancer cells involving up-regulation of the long ncRNA ANRIL.

Anticancer Research 35, 2795–2803.

Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K.C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D.A., Lipovich, L., Batalov, S., Engström, P.G., Mizuno, Y., Faghihi, M.A., Sandelin, A., Chalk, A.M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., Wahlestedt, C., 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* (New York, N.Y.) 309, 1564–1566.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1112009>

Kimura, T., 2020. [Non-coding Natural Antisense RNA: Mechanisms of Action in the Regulation of Target Gene Expression and Its Clinical Implications]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 140, 687–700.
<https://doi.org/10.1248/YAKUSHI.20-00002>

Klijn, J.G.M., Blamey, R.W., Boccardo, F., Tominaga, T., Duchateau, L., Sylvester, R., Beex, L.V.A.M., Mauriac, L., Van Zijl, J.A., Veyret, C., Wildiers, J., Jassem, J., Piccart, M., Burghouts, J., Becqaert, D., Seynaeve, C., Mignolet, F., Duchateau, L., Sylvester, R., Namer, M., Julien, J.P., Garcia Conde, J., Dunser, M., Margreiter, R., Tjabbes, T., Roozendaal, K.J., Van der Velden, P.C., Nortier, J.W.R., Blamey, R., Howell, A., Forbes, J., Kaufmann, M., Nordenskjöld, B., Kvinnsland, S., Wilson, R.G., Jonat, W., Kleeberg, U.R., Eiermann, W., Hilfrich, J., Weitzel, H.K., Glas, U., Rutqvist, L.E., Rudenstam, C., Sander, S., Ryden, S., Honsson, P., Lonning, P.E., Loven, L., Russell, I.S., Olweny, C., Byrne, J.J., Snyder, R.D., Coates, A.S., Lowenthal, R.M., Jeal, P.N., Dalley, D.N., Janicke, F., Kleine, W., Michel, R.T., Canobbio, L., Amoroso, D., Rubagotti, A., Bumma, C., D'Aprile, M., De Matteis, A., Di Carlo, A., Francini, G., Petrioli, R., Folco, U., Calligioni, E., Gallotti, P., Lopez, M., Mesiti, M., Pacini, P., Sassi, M., Sismondi, P., Zola, P., Ogita, M., Okazaki, M., Watanabe, T., Satomi, T., Hatazawa, C., Okuyama, N., Koyama, T., Kobayashi, M., Shimizu, T., Tabei, T., Sano, M., Makino, H., Ando, J., Kimura, M., Takeuchi, T., Aoyama, H., Koyama, H., Shin, E., Chou, G., 2001. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 343–353.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.2.343>

Koboldt, D.C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J.F., Fulton, L.L., Dooling, D.J., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y.S.N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, Andy, Chuah, E., Chun, H.J.E., Coope, R.J.N., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R.A., Lee, D., Li, H.I., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Pleasance, E., Robertson, A.G., Schein, J.E., Shafiei, A., Sipahimalani, P., Slobodan, J.R., Stoll, D., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R.J., Wye, N., Zeng, T., Zhao, Y., Birol, I., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Cherniack, A.D., Saksena, G., Onofrio, R.C., Pho, N.H., Carter, S.L., Schumacher, S.E., Tabak, B., Hernandez, B., Gentry, J., Nguyen, H., Crenshaw, A., Ardlie, K., Beroukhi, R., Winckler, W., Getz, G., Gabriel, S.B., Meyerson, M., Chin, L., Kucherlapati, R., Hoadley, K.A., Auman, J.T., Fan, C., Turman, Y.J., Shi, Y., Li, L., Topal, M.D., He, X., Chao, H.H., Prat, A., Silva, G.O., Iglesia, M.D., Zhao, W., Usary, J., Berg, J.S., Adams, M., Booker, J., Wu, J., Gulabani, A., Bodenheimer, T., Hoyle, A.P.,

Simons, J. V., Soloway, M.G., Mose, L.E., Jefferys, S.R., Balu, S., Parker, J.S., Hayes, D.N., Perou, C.M., Malik, S., Mahurkar, S., Shen, H., Weisenberger, D.J., Triche, T., Lai, P.H., Bootwalla, M.S., Maglinte, D.T., Berman, B.P., Van Den Berg, D.J., Baylin, S.B., Laird, P.W., Creighton, C.J., Donehower, L.A., Noble, M., Voet, D., Gehlenborg, N., Di Cara, D., Zhang, Juinhua, Zhang, H., Wu, C.J., Yingchun Liu, S., Lawrence, M.S., Zou, L., Sivachenko, A., Lin, P., Stojanov, P., Jing, R., Cho, J., Sinha, Raktim, Park, R.W., Nazaire, M.D., Robinson, J., Thorvaldsdottir, H., Mesirov, J., Park, P.J., Reynolds, S., Kreisberg, R.B., Bernard, B., Bressler, R., Erkkila, T., Lin, J., Thorsson, V., Zhang, W., Shmulevich, I., Ciriello, G., Weinhold, N., Schultz, N., Gao, J., Cerami, E., Gross, B., Jacobsen, A., Sinha, Rileen, Aksoy, B.A., Antipin, Y., Reva, B., Shen, R., Taylor, B.S., Ladanyi, M., Sander, C., Anur, P., Spellman, P.T., Lu, Y., Liu, W., Verhaak, R.R.G., Mills, G.B., Akbani, R., Zhang, N., Broom, B.M., Casasent, T.D., Wakefield, C., Unruh, A.K., Baggerly, K., Coombes, K., Weinstein, J.N., Haussler, D., Benz, C.C., Stuart, J.M., Benz, S.C., Zhu, J., Szeto, C.C., Scott, G.K., Yau, C., Paull, E.O., Carlin, D., Wong, C., Sokolov, A., Thusberg, J., Mooney, S., Ng, S., Goldstein, T.C., Ellrott, K., Grifford, M., Wilks, C., Ma, S., Craft, B., Yan, C., Hu, Y., Meerzaman, D., Gastier-Foster, J.M., Bowen, J., Ramirez, N.C., Black, A.D., Pyatt, R.E., White, P., Zmuda, E.J., Frick, J., Lichtenberg, T.M., Brookens, R., George, M.M., Gerken, M.A., Harper, H.A., Leraas, K.M., Wise, L.J., Tabler, T.R., McAllister, C., Barr, T., Hart-Kothari, M., Tarvin, K., Saller, C., Sandusky, G., Mitchell, C., Iacocca, M. V., Brown, J., Rabeno, B., Czerwinski, C., Petrelli, N., Dolzhansky, O., Abramov, M., Voronina, O., Potapova, O., Marks, J.R., Suchorska, W.M., Murawa, D., Kycler, W., Ibbs, M., Korski, K., Spychała, A., Murawa, P., Brzeziński, J.J., Perz, H., Łażniak, R., Teresiak, M., Tatka, H., Leporowska, E., Bogusz-Czerniewicz, M., Malicki, J., Mackiewicz, A., Wiznerowicz, M., Van Le, X., Kohl, B., Viet Tien, N., Thorp, R., Van Bang, N., Sussman, H., Phu, B.D., Hajek, R., Hung, N.P., Phuong, T.V.T., Thang, H.Q., Khan, K.Z., Penny, R., Mallery, D., Curley, E., Shelton, C., Yena, P., Ingle, J.N., Couch, F.J., Lingle, W.L., King, T.A., Gonzalez-Angulo, A.M., Dyer, M.D., Liu, S., Meng, X., Patangan, M., Waldman, F., Stöppler, H., Rathmell, W.K., Thorne, L., Huang, M., Boice, L., Hill, A., Morrison, C., Gaudioso, C., Bshara, W., Daily, K., Egea, S.C., Pegram, M.D., Gomez-Fernandez, C., Dhir, R., Bhargava, R., Brufsky, A., Shriver, C.D., Hooke, J.A., Campbell, J.L., Mural, R.J., Hu, H., Somiari, S., Larson, C., Deyarmin, B., Kvecher, L., Kovatich, A.J., Ellis, M.J., Stricker, T., White, K., Olopade, O., Luo, C., Chen, Y., Bose, R., Chang, L.W., Beck, A.H., Pihl, T., Jensen, M., Sfeir, R., Kahn, A., Chu, Anna, Kothiyal, P., Wang, Z., Snyder, E., Pontius, J., Ayala, B., Backus, M., Walton, J., Baboud, J., Berton, D., Nicholls, M., Srinivasan, D., Raman, R., Girshik, S., Kigonya, P., Alonso, S., Sanbhadti, R., Barletta, S., Pot, D., Sheth, M., Demchok, J.A., Shaw, K.R.M., Yang, L., Eley, G., Ferguson, M.L., Tarnuzzer, R.W., Zhang, Jiashan, Dillon, L.A.L., Buetow, K., Fielding, P., Ozenberger, B.A., Guyer, M.S., Sofia, H.J., Palchik, J.D., 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>

Kolenda, T., Guglas, K., Ryś, M., Bogaczyńska, M., Teresiak, A., Bliźniak, R., Łasińska, I., Mackiewicz, J., Lamperska, K.M., 2017. Biological role of long non-coding RNA in head and neck cancers. Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology 22, 378–388. <https://doi.org/10.1016/J.RPOR.2017.07.001>

- Kong, Y., Hsieh, C.H., Alonso, L.C., 2018. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Frontiers in endocrinology* 9. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00405>
- Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Welch, J.E., Svensson, K.J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., Belting, M., 2013. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7312–7317. https://doi.org/10.1073/PNAS.1220998110/SUPPL_FILE/SM01.WMV
- Lacroix, M., Leclercq, G., 2005. The “portrait” of hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 89, 297–304. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-2172-4>
- Langlands, F., Cornford, E., Rakha, E., Dall, B., Gutteridge, E., Dodwell, D., Shaaban, A.M., Sharma, N., 2016. Imaging overview of metaplastic carcinomas of the breast: a large study of 71 cases. *The British Journal of Radiology* 89. <https://doi.org/10.1259/BJR.20140644>
- Li, C.I., Anderson, B.O., Daling, J.R., Moe, R.E., 2003. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289, 1421–1424. <https://doi.org/10.1001/JAMA.289.11.1421>
- Li, P., Yang, B., Xia, S., Chen, L., Ning, N., Ma, B., Liu, Q., Yang, H., Zhang, D., Du, X., 2016. BC200 RNA is over-expressed in colorectal cancer and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 9, 1481–1486.
- Liang, J., Liang, L., Ouyang, K., Li, Z., Yi, X., 2017. MALAT1 induces tongue cancer cells' EMT and inhibits apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 46, 98–105. <https://doi.org/10.1111/JOP.12466>
- Lin, L., Gu, Z.T., Chen, W.H., Cao, K.J., 2015. Increased expression of the long non-coding RNA ANRIL promotes lung cancer cell metastasis and correlates with poor prognosis. *Diagnostic pathology* 10. <https://doi.org/10.1186/S13000-015-0247-7>
- Lin, Y.C., Chao, T.Y., Yeh, C.T., Roffler, S.R., Kannagi, R., Yang, R.B., 2017. Endothelial SCUBE2 Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37, 144–155. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308546>
- Lin, Y.C., Chen, C.C., Cheng, C.J., Yang, R.B., 2011. Domain and functional analysis of a novel breast tumor suppressor protein, SCUBE2. *The Journal of biological chemistry* 286, 27039–27047. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.244418>
- Lin, Y.C., Lee, Y.C., Li, L.H., Cheng, C.J., Yang, R.B., 2014. Tumor suppressor SCUBE2 inhibits breast-cancer cell migration and invasion through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science* 127, 85–100. <https://doi.org/10.1242/JCS.132779>
- Liu, B., Luo, C., Lin, H., Ji, X., Zhang, E., Li, X., 2021. Long Noncoding RNA XIST Acts as a ceRNA of miR-362-5p to Suppress Breast Cancer Progression. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 36, 456–466.

<https://doi.org/10.1089/GBR.2019.3481>

- Liu, M., Xing, L.Q., Liu, Y.J., 2017. A three-long noncoding RNA signature as a diagnostic biomarker for differentiating between triple-negative and non-triple-negative breast cancers. *Medicine* 96.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006222>
- Lu, Y., Zhou, X.H., Xu, L., Rong, C.H., Shen, C., Bian, W., 2016. Long noncoding RNA ANRIL could be transactivated by c-Myc and promote tumor progression of non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy* 9, 3077.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S102658>
- Łuczak, A., Supernat, A., Łapińska-Szumczyk, S., Jachimowicz, D., Majewska, H., Gulczyński, J., Żaczek, A.J., 2016. HOTAIR in relation to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in molecular subtypes of endometrial cancer. *The International journal of biological markers* 31, e245–e251.
<https://doi.org/10.5301/IBM.5000187>
- Ma, J., Zhao, W., Zhang, H., Chu, Z., Liu, H., Fang, X., Tang, D., 2022. Long non-coding RNA ANRIL promotes chemoresistance in triple-negative breast cancer via enhancing aerobic glycolysis. *Life sciences* 306.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120810>
- Marmot, M., Atinmo, T., Byers, T., Chen, J., Hirohata, T., Jackson, A., James, W., Kolonel, L., Kumanyika, S., Leitzmann, C., Mann, J., Powers, H., Reddy, K., Riboli, E., Rivera, J., Schatzkin, A., Seidell, J., Shuker, D., Uauy, R., Willett, W., Zeisel, S., 2007. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. (WCRF/AICR Expert Report). World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research: Washington DC, US. .
- Matsunaga, N., Wakasaki, T., Yasumatsu, R., Kotake, Y., 2019. Long noncoding RNA, ANRIL, regulates the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 39, 4073–4077. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13564>
- Mattick, J.S., Amaral, P.P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H.Y., Chen, L.L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M.E., Fitzgerald, K.A., Gingeras, T.R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J.B., Lee, J.T., Mendell, J.T., Mercer, T.R., Moore, K.J., Nakagawa, S., Rinn, J.L., Spector, D.L., Ulitsky, I., Wan, Y., Wilusz, J.E., Wu, M., 2023. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature reviews. Molecular cell biology* 24, 430–447. <https://doi.org/10.1038/S41580-022-00566-8>
- Medeiros, B., Allan, A.L., 2019. Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. *International journal of molecular sciences* 20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20092272>
- Mehta-Mujoo, P.M., Cunliffe, H.E., Hung, N.A., Slatter, T.L., 2019. Long Non-coding RNA ANRIL in the Nucleus Associates With Periostin Expression in Breast Cancer. *Frontiers in oncology* 9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00885>
- Mersin, H., Yildirim, E., Gülben, K., Berberoğlu, A., 2003. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 29, 390–395. <https://doi.org/10.1053/EJSO.2002.1423>
- Meseure, D., Vacher, S., Alsibai, K.D., Nicolas, A., Chemlali, W., Caly, M., Lidereau, R., Pasmant, E., Callens, C., Bieche, I., 2016. Expression of ANRIL-Polycomb

- Complexes-CDKN2A/B/ARF Genes in Breast Tumors: Identification of a Two-Gene (EZH2/CBX7) Signature with Independent Prognostic Value. *Molecular cancer research* : MCR 14, 623–633. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0418>
- Molland, J.G., Donnellan, M., Janu, N.C., Carmalt, H.L., Kennedy, C.W., Gillett, D.J., 2004. Infiltrating lobular carcinoma—a comparison of diagnosis, management and outcome with infiltrating duct carcinoma. *The Breast* 13, 389–396. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2004.03.004>
- Mus, E., Hof, P.R., Tiedge, H., 2007. Dendritic BC200 RNA in aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10679–10684. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0701532104>
- Ou, X., Gao, G., Bazhabayi, M., Zhang, K., Liu, F., Xiao, X., 2019. MALAT1 and BACH1 are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and therapeutics* 15, 1597–1602. https://doi.org/10.4103/JCRT.JCRT_282_19
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1959–1972. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2012.126/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1038_JCBFM.2012.126-FIG7.JPEG
- Parris, T.Z., Aziz, L., Kovács, A., Hajizadeh, S., Nemes, S., Semaan, M., Chen, C.Y., Karlsson, P., Helou, K., 2014. Clinical relevance of breast cancer-related genes as potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-324>
- Peng, Q., Zhang, S., Yang, Q., Zhang, T., Wei, X.Q., Jiang, L., Zhang, C.L., Chen, Q.M., Zhang, Z.R., Lin, Y.F., 2013. Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system. *Biomaterials* 34, 8521–8530. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.07.102>
- Peng, W., Gao, W., Feng, J., 2014. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Medical oncology* (Northwood, London, England) 31, 1–7. <https://doi.org/10.1007/S12032-014-0346-4>
- Perou, C.M., Sørile, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Ress, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Raiborg, C., Rusten, T.E., Stenmark, H., 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 446–455. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00080-2)
- Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A.H.S., Elston, C.W., Grainge, M.J., Hodi, Z., Blamey, R.W., Ellis, I.O., 2008. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 26, 3153–3158. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.5986>
- Razeghian-Jahromi, I., Karimi Akhormeh, A., Zibaenezhad, M.J., 2022. The Role of

- ANRIL in Atherosclerosis. *Disease Markers* 2022.
<https://doi.org/10.1155/2022/8859677>
- Ren, Y., Jia, H. huan, Xu, Y. qi, Zhou, X., Zhao, Xiao hui, Wang, Y. fei, Song, X., Zhu, Z. yan, Sun, T., Dou, Y., Tian, W. ping, Zhao, Xiu lan, Kang, C. sheng, Mei, M., 2018. Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- β 1 secretion. *Molecular cancer* 17.
<https://doi.org/10.1186/S12943-018-0758-4>
- Roy, M., Fowler, A.M., Ulaner, G.A., Mahajan, A., 2023. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics* 18, 441–458.
<https://doi.org/10.1016/j.cpet.2023.04.002>
- Sanchez, A., Lhuillier, J., Grosjean, G., Ayadi, L., Maenner, S., 2023. The Long Non-Coding RNA ANRIL in Cancers. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 4160 15, 4160.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS15164160>
- Santoro, J., Carrese, B., Peluso, M.S., Coppola, L., D’Aiuto, M., Mossetti, G., Salvatore, M., Smaldone, G., 2023. Influence of Breast Cancer Extracellular Vesicles on Immune Cell Activation: A Pilot Study. *Biology* 12.
<https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12121531>
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G.J., Taylor, A.M.R., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S., Shiloh, Y., 1995. A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase. *Science* 268, 1749–1753. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7792600>
- Schettini, F., Pascual, T., Conte, B., Chic, N., Brasó-Maristany, F., Galván, P., Martínez, O., Adamo, B., Vidal, M., Muñoz, M., Fernández-Martinez, A., Rognoni, C., Griguolo, G., Guarneri, V., Conte, P.F., Locci, M., Brase, J.C., Gonzalez-Farre, B., Villagrasa, P., De Placido, S., Schiff, R., Veeraraghavan, J., Rimawi, M.F., Osborne, C.K., Pernas, S., Perou, C.M., Carey, L.A., Prat, A., 2020. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer treatment reviews* 84. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2020.101965>
- Schmid, P., Cortes, J., Dent, R., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y.H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Untch, M., Fasching, P.A., Cardoso, F., Andersen, J., Patt, D., Danso, M., Ferreira, M., Mouret-Reynier, M.-A., Im, S.-A., Ahn, J.-H., Gion, M., Baron-Hay, S., Boileau, J.-F., Ding, Y., Tryfonidis, K., Aktan, G., Karantza, V., O’Shaughnessy, J., 2022. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 386, 556–567.
https://doi.org/10.1056/NEJMOA2112651/SUPPL_FILE/NEJMOA2112651_DATA-SHARING.PDF
- Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y.H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P.A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., O’Shaughnessy, J., 2020. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 382, 810–821.
https://doi.org/10.1056/NEJMOA1910549/SUPPL_FILE/NEJMOA1910549_DATA-SHARING.PDF

A-SHARING.PDF

- Shi, F., Xiao, F., Ding, P., Qin, H., Huang, R., 2016. Long Noncoding RNA Highly Up-regulated in Liver Cancer Predicts Unfavorable Outcome and Regulates Metastasis by MMPs in Triple-negative Breast Cancer. *Archives of medical research* 47, 446–453. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2016.11.001>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.007>
- Singh, R., Gupta, S.C., Peng, W.X., Zhou, N., Pochampally, R., Atfi, A., Watabe, K., Lu, Z., Mo, Y.Y., 2016. Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis. *Cell death & disease* 7. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2016.168>
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* 2008 10:12 10, 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Slack, F.J., Chinnaiyan, A.M., 2019. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* 179, 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.017>
- Stefańska, K., Józkwiaak, M., Angelova Volponi, A., Shibli, J.A., Golkar-Narenji, A., Antosik, P., Bukowska, D., Piotrowska-Kempisty, H., Mozdziak, P., Dzięgiel, P., Podhorska-Okółów, M., Zabel, M., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Kempisty, B., 2023. The Role of Exosomes in Human Carcinogenesis and Cancer Therapy—Recent Findings from Molecular and Clinical Research. *Cells* 12. <https://doi.org/10.3390/CELLS12030356>
- Sun, X.H., Yang, L. Bin, Geng, X.L., Wang, R., Zhang, Z.C., 2015. Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 2994.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., Baran, J., 2017. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1153 18, 1153. <https://doi.org/10.3390/IJMS18061153>
- Taiana, E., Ronchetti, D., Todoerti, K., Nobili, L., Tassone, P., Amodio, N., Neri, A., 2020. LncRNA NEAT1 in Paraspeckles: A Structural Scaffold for Cellular DNA Damage Response Systems? *Non-Coding RNA* 6. <https://doi.org/10.3390/NCRNA6030026>
- Tang, L., Zhang, W., Su, B., Yu, B., 2013. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic

- melanoma. *BioMed Research International* 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/251098>
- Tran, B., Bedard, P.L., 2011. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast cancer research : BCR* 13. <https://doi.org/10.1186/BCR2904>
- Turco, C., Esposito, G., Iaiza, A., Goeman, F., Benedetti, A., Gallo, E., Daralioti, T., Perracchio, L., Sacconi, A., Pasanisi, P., Muti, P., Pulito, C., Strano, S., Ianniello, Z., Fatica, A., Forcato, M., Fazi, F., Blandino, G., Fontemaggi, G., 2022. MALAT1-dependent hsa_circ_0076611 regulates translation rate in triple-negative breast cancer. *Communications biology* 5. <https://doi.org/10.1038/S42003-022-03539-X>
- Valencia, O.M., Samuel, S.E., Viscusi, R.K., Riall, T.S., Neumayer, L.A., Aziz, H., 2017. The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer: A Review. *JAMA Surgery* 152, 589–594. <https://doi.org/10.1001/JAMASURG.2017.0552>
- Vardhini, N. V., Rao, P.J.M., Murthy, P.B., Sudhakar, G., 2014. HOXD10 expression in human breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 10855–10860. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2324-Z>
- Vimalraj, S., Subramanian, R., Dhanasekaran, A., 2021. LncRNA MALAT1 Promotes Tumor Angiogenesis by Regulating MicroRNA-150-5p/VEGFA Signaling in Osteosarcoma: In-Vitro and In-Vivo Analyses. *Frontiers in Oncology* 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.742789/FULL>
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R., 2012. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta* 1820, 940–948. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.03.017>
- Walsh, M.M., Bleiweiss, I.J., 2001. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity. *Human pathology* 32, 583–589. <https://doi.org/10.1053/HUPA.2001.24988>
- Wang, N., Zhong, C., Fu, M., Li, L., Wang, F., Lv, P., Zhu, M., Xiong, Y., Mi, H., Gu, Y., 2019. Long Non-Coding RNA HULC Promotes the Development of Breast Cancer Through Regulating LYPD1 Expression by Sponging miR-6754-5p. *OncoTargets and therapy* 12, 10671. <https://doi.org/10.2147/OTT.S226040>
- Wapnir, I.L., Dignam, J.J., Fisher, B., Mamounas, E.P., Anderson, S.J., Julian, T.B., Land, S.R., Margoless, R.G., Swain, S.M., Costantino, J.P., Wolmark, N., 2011. Long-term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS. *Journal of the National Cancer Institute* 103, 478–488. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJR027>
- Wei, S., Sun, S., Zhou, X., Zhang, C., Li, X., Dai, S., Wang, Y., Zhao, L., Shan, B., 2021. SNHG5 inhibits the progression of EMT through the ubiquitin-degradation of MTA2 in oesophageal cancer. *Carcinogenesis* 42, 315–326. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGAA110>
- Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F.A., De Jong, D., Van De Vijver, M.J., Van't Veer, L.J., Peterse, J.L., 2008. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of

- histological special types. *The Journal of pathology* 216, 141–150.
<https://doi.org/10.1002/PATH.2407>
- Weisman, P.S., Ng, C.K.Y., Brogi, E., Eisenberg, R.E., Won, H.H., Piscuoglio, S., De Filippo, M.R., Ioris, R., Akram, M., Norton, L., Weigelt, B., Berger, M.F., Reis-Filho, J.S., Wen, H.Y., 2016. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29, 476–488. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2016.39>
- Winkle, M., El-Daly, S.M., Fabbri, M., Calin, G.A., 2021. Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:8 20, 629–651. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z>
- Wong, G.L., Jalboush, S.A., Lo, H.W., 2020. Exosomal MicroRNAs and Organotropism in Breast Cancer Metastasis. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 1827 12, 1827. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071827>
- Wu, J.H., Tang, J.M., Li, J., Li, X.W., 2018. Upregulation of SOX2-activated lncRNA ANRIL promotes nasopharyngeal carcinoma cell growth. *Scientific Reports* 2018 8:1 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21708-z>
- Wu, L., Murat, P., Matak-Vinkovic, D., Murrell, A., Balasubramanian, S., 2013. Binding interactions between long noncoding RNA HOTAIR and PRC2 proteins. *Biochemistry* 52, 9519–9527. <https://doi.org/10.1021/BI401085H>
- Wufuer, A., Luohemanjiang, X., Du, L., Lei, J., Shabier, M., Han, D.F., Ma, J., 2023. ANRIL overexpression globally induces expression and alternative splicing of genes involved in inflammation in HUVECs. *Molecular medicine reports* 27. <https://doi.org/10.3892/MMR.2022.12915>
- Xu, S.T., Xu, J.H., Zheng, Z.R., Zhao, Q.Q., Zeng, X.S., Cheng, S.X., Liang, Y.H., Hu, Q.F., 2017. Long non-coding RNA ANRIL promotes carcinogenesis via sponging miR-199a in triple-negative breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 96, 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.09.107>
- Xue, X., Yang, Y.A., Zhang, A., Fong, K.W., Kim, J., Song, B., Li, S., Zhao, J.C., Yu, J., 2016. LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogene* 35, 2746–2755. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.340>
- Yan, H., Bu, P., 2021. Non-coding RNA in cancer. *Essays in Biochemistry* 65, 625. <https://doi.org/10.1042/EBC20200032>
- Yang, B., Miao, S., Li, Y., 2018. SCUBE2 inhibits the proliferation, migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells through regulation of the sonic hedgehog signaling pathway. *Gene* 672, 143–149. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.06.012>
- Yu, L., Shao, X., Huo, L., Zhang, T., 2020. Long Non-Coding RNA (lncRNA) Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1) Promotes Cell Proliferation and Migration by Regulating miR-143-3p and MAGE Family Member A9 (MAGEA9) in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.924187>

- Yue, X., Wu, W. ying, Dong, M., Guo, M., 2021. LncRNA MALAT1 promotes breast cancer progression and doxorubicin resistance via regulating miR-570-3p. *Biomedical journal* 44, S296–S304. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2020.11.002>
- Zhai, H., Li, Y., 2019. BCYRN1 is correlated with progression and prognosis in gastric cancer. *Bioscience reports* 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20190505>
- Zhang, L.-M., Ju, H.-Y., Wu, Y.-T., Guo, W., Mao, L., Ma, H.-L., Xia, W.-Y., Hu, J.-Z., Ren, G.-X., 2018. Long non-coding RNA ANRIL promotes tumorigenesis through regulation of FGFR1 expression by sponging miR-125a-3p in head and neck squamous cell carcinoma. *American Journal of Cancer Research* 8, 2296.
- Zhang, M., Wang, F., Xiang, Z., Huang, T., Zhou, W.B., 2020. LncRNA XIST promotes chemoresistance of breast cancer cells to doxorubicin by sponging miR-200c-3p to upregulate ANLN. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 47, 1464–1472. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13307>
- Zhang, S., Ma, F., Xie, X., Shen, Y., Staeger, M.S., 2020. Prognostic value of long non-coding RNAs in triple negative breast cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine* 99, E21861. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021861>
- Zhang, X., Luo, M., Zhang, J., Guo, B., Singh, S., Lin, X., Xiong, H., Ju, S., Wang, L., Zhou, Y., Zhou, J., 2022. The role of lncRNA H19 in tumorigenesis and drug resistance of human Cancers. *Frontiers in Genetics* 13. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.1005522/FULL>
- Zhao, G., Su, Z., Song, D., Mao, Y., Mao, X., 2016. The long noncoding RNA MALAT1 regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF- κ B. *FEBS letters* 590, 2884–2895. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12315>
- Zhao, L., Zhao, Y., He, Y., Li, Q., Mao, Y., 2018. The functional pathway analysis and clinical significance of miR-20a and its related lncRNAs in breast cancer. *Cellular signalling* 51, 152–165. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2018.08.004>
- Zhao, R., Cao, X., Jin, S., Li, R., Zhong, Q., Jiang, M., Han, J., Guo, C., Zong, H., 2020. LncRNA BC200 Promotes Esophageal Squamous Cell Cancer Migration and Invasion and Can Regulate ATF4 Expression. *Frontiers in Oncology* 10, 1392. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01392>
- Zhao, W., Geng, D., Li, S., Chen, Z., Sun, M., 2018. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. *Cancer medicine* 7, 842–855. <https://doi.org/10.1002/CAM4.1353>
- Zhao, Y., Guo, Q., Chen, J., Hu, J., Wang, S., Sun, Y., 2014. Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation. *Oncology reports* 31, 358–364. <https://doi.org/10.3892/OR.2013.2850>
- Zheng, H., Min, J., 2016. Role of Long Noncoding RNA HOTAIR in the Growth and Apoptosis of Osteosarcoma Cell MG-63. *BioMed research international* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5757641>
- Zheng, L., Zhang, Y., Fu, Y., Gong, H., Guo, J., Wu, K., Jia, Q., Ding, X., 2019. Long non-coding RNA MALAT1 regulates BLCAP mRNA expression through binding to miR-339-5p and promotes poor prognosis in breast cancer. *Bioscience Reports* 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20181284>

- Zheng, R., Lin, S., Guan, L., Yuan, H., Liu, K., Liu, C., Ye, W., Liao, Y., Jia, J., Zhang, R., 2018. Long non-coding RNA XIST inhibited breast cancer cell growth, migration, and invasion via miR-155/CDX1 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498, 1002–1008.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.03.104>
- Zhou, L., Li, H., Sun, T., Wen, X., Niu, C., Li, M., Li, W., Hoffman, A.R., Hu, J.F., Cui, J., 2022. HULC targets the IGF1R-PI3K-AKT axis in trans to promote breast cancer metastasis and cisplatin resistance. *Cancer letters* 548.
<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2022.215861>
- Zong, Y., Zhang, Y., Hou, D., Xu, J., Cui, F., Qin, Y., Sun, X., 2020. The lncRNA XIST promotes the progression of breast cancer by sponging miR-125b-5p to modulate NLRC5. *American Journal of Translational Research* 12, 3501.



EKLER



Ek-1.



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-60116787-020-167450
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Prof. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU

İlgi : 02/02/2022 tarihli dilekçeniz. *192.168.162.17*
2643

9.02.2022
İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz **"Meme Kanseri Metastazında Eksozomal RNA'ların Rolü"** konulu çalışmanız **08.02.2022 tarih ve 03 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN
Başkan

Integrative analysis of ex vivo studies and microarray reveals the novel inhibitor effects of trehalose on the pathogenesis of pterygium

Yasin Durkal¹ | Kubilay İnci² | Onur Tokgun³ | Ugur Yilmaz¹ | Banu Candan Yilmaz²

¹Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

²Department of Cancer Molecular Biology, Institution of Health Sciences, Pamukkale University, Denizli, Turkey

³Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

Correspondence

Ugur Yilmaz, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20160, Turkey.

Email: uguryilmaz@pau.edu.tr

Abstract

Pterygium is a frequent eye surface condition that is characterized by a high rate of proliferation, fibrovascular development, cellular migration, corneal infiltration, and angiogenesis. We investigated that ex vivo primary pterygium and conjunctival cell cultures were generated to analyze the effect of trehalose on cellular proliferation. After trehalose treatment, we performed microarray analysis to evaluate changes in the mRNA profile. We analyzed gene ontology (GO) and KEGG pathways to identify hub genes that changed expression levels after treatment and were associated with pterygium development. We selected three genes to verify their expression levels using qRT-PCR. The study also evaluated the impact of trehalose treatment on cell migration through a wound-healing assay. Our results suggested that pterygium cell proliferation was inhibited in a dose-dependent manner by trehalose. 2354 DEG were identified in pterygium and conjunctiva cells treated with trehalose compared to untreated groups. Functional enrichment analysis showed that differentially expressed mRNAs are involved in proliferation, vasculature development, and cell migration. We identified ten hub genes including upregulated (*RANBP3L*, *SLC5A3*, *RERG*, *ANKRD1*, *DHCR7*, *RAB27B*, *GPRC5B*, *MSMO1*, *ASPN*, *DRAM1*) and downregulated (*TNC*, *PTGS2*, *GREM2*, *NPTX1*, *NR4A1*, *HMOX1*, *CXCL12*, *IL6*, *MYH2*, *TXNIP*). Microarray analysis and functional investigations suggest that trehalose affects the pathogenesis of pterygium by modifying the expression of genes involved in crucial pathways related to cell function.

KEYWORDS

inhibitor, microarray, migration, pterygium, trehalose

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2024 The Author(s). *Chemical Biology & Drug Design* published by John Wiley & Sons Ltd.

