

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ ONKOLOĞİ SERVİS ŞEFLİĞİ

**MEME KANSERİNDE MİKRORNA-21 EKSPRESYONU VE
KLİNİKOPATOLOĞİK ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

M. Alpaslan ÖZGÜN
Tbp.Bnb.

İSTANBUL
2010

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ ONKOLOJİ SERVİS ŞEFLİĞİ

**MEME KANSERİNDE MİKRORNA-21 EKSPRESYONU
VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER İLE İLİŞKİSİ**

M. Alpaslan ÖZGÜN
Tbp.Bnb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Onkoloji Servisi'nin
Yandal Uzmanlık Eđitimi için öngördüĐü
YANDAL UZMANLIK TEZİ olarak hazırlanmıŐtır

TEZ DANIŞMANI
E. Gökhan KANDEMİR
Prof.Tbp.Kd.Alb.

İSTANBUL
2010

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

“Meme Kanserinde mikroRNA-21 Ekspresyonu ve Klinikopatolojik Özellikleri ile İlişkisi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Onkoloji Yandal Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Tbp.Kd.Alb. E. Gökhan KANDEMİR İmza

Üye : Prof.Tbp.Kd.Alb. Fikret ARPACI İmza

Üye : Yrd.Doç.Tbp.Yb. Bülent KARAGÖZ İmza

ONAY:

Tbp.Bnb. M. Alpaslan ÖZGÜN'ün 02.07.2010 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR
Prof.Tbp.Tümgeneral
GATA As. Tıp Fak. Dekanı

TEŞEKKÜR

Bu tez konusu, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Onkoloji Servis Şefliği'nin 15.10.2007 gün ve T.Onk.Srv.:3000-15/10 sayılı emri ile verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, meme kanserinde mikroRNA-21 ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi araştırılmıştır.

Yandal uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım İç Hastalıkları Servis Şefi Prof.Dr. Levent DEMİRTÜRK'e saygılarımı ve teşekkürlerimi arz ederim. Uzmanlık eğitimimde ve yandal uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, aynı zamanda tez danışmanım olarak çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren ve yetişmemde büyük emeği olan değerli hocam Tıbbi Onkoloji Servis Şefi Prof.Dr. E. Gökhan KANDEMİR'e saygılarımı ve teşekkürlerimi arz ederim. Çalışmam sırasında, moleküler patoloji ile ilgili bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve bana moleküler patoloji laboratuvarında bu çalışmayı yapma imkanını sağlayan Patoloji Servis Şefi Prof.Dr. Hüseyin BALOĞLU'na teşekkürlerimi arz ederim.

Aynı klinikte birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve yandal uzmanlık eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli ağabeylerim Yrd.Doç.Dr. Bülent KARAGÖZ'e, Yrd.Doç.Dr. Oğuz BİLGİ'ye ve değerli kardeşim Dr. Tolga TUNCEL'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmam sırasında bana yardım eden biyolog Bahtınur AKKOYUN'a ve moleküler biyolog Haluk CAMCI'ya teşekkürlerimi sunarım. Yandal uzmanlık eğitimim boyunca yardımını ve desteğini gördüğüm iç hastalıkları kliniğinin asistanlarına, kliniğimiz hemşirelerine ve hastabakıcılarına teşekkür ederim.

Yetişmemde en büyük payı olan ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan anneme ve babama teşekkür ederim. Bu tezi yazarken kendilerine yeteri kadar vakit ayıramadığım halde beni anlayışla karşılayan fedakar eşim Emine'ye ve biricik kızım Zeynep'e teşekkür ederim.

Dr. M. Alpaslan ÖZGÜN

ÖZET

Meme Kanserinde mikroRNA-21 Ekspresyonu ve Klinikopatolojik Özellikleri ile İlişkisi

MikroRNA (miRNA), yeni bulunan bir RNA molekülü olup, kanser ile ilişkisi gösterildikten sonra önemi daha da artmıştır. miRNA'lar kanser gelişiminde onkogen veya tümör süpresör gen olarak görev yapmaktadır.

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanserdir ve yeni tedavi seçenekleri bulmak amacıyla moleküler biyolojisi halen araştırılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı miRNA'ların meme kanseri oluşumundaki rolü gösterilmiştir. MikroRNA-21 (miR-21), meme kanseri ile ilişkili miRNA'lar içinde ayrı bir yere sahiptir. miR-21, meme kanserinde en yüksek ekspresyon düzeyine sahip olan miRNA'dır ve meme kanserinde onkogen olarak görev yapmaktadır.

Bizim çalışmamızda meme kanserinde miR-21 ekspresyonu araştırılmış ve hastaların klinikopatolojik özellikleri ile ilişkisi incelenmiştir. Sonuçta, meme kanserinde miR-21 ekspresyonu gösterilmiş, ancak klinikopatolojik özelliklere göre incelendiğinde miR-21 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,637$).

miRNA'ların gelecekte kanser tanı ve tedavisinde çok daha önemli rol oynayacağı beklenmektedir. miRNA konusunda deneysel bir pilot çalışma olarak yapılan bu çalışmamız, literatür taramalarından edindiğimiz bilgiye göre, ülkemizde miRNA ile ilgili yapılmış olan ilk klinik çalışmadır ve ülkemizde gelecekte bu konuda yapılacak olan klinik çalışmalara da ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler : mikroRNA, mikroRNA-21, meme kanseri

SUMMARY

Investigation of MicroRNA-21 Expression and its Relation to Clinicopathologic Features in Breast Cancer

MicroRNAs (miRNAs) were newly discovered molecules and they have clinical significance because of their relationship to cancer. Former studies indicate that miRNAs act as an oncogene or a tumour suppressor gene in cancer pathogenesis.

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Molecular biology of breast cancer is being investigated to find a new anticancer therapy agent. It was demonstrated that there is an association miRNA and breast cancer. miR-21 shows the highest expression level among all of the miRNAs in breast cancer, thus miR-21 is considered as an oncogene in breast cancer.

We investigated miR-21 expression and its relation to clinicopathologic features in breast cancer. We found high expression level of miR-21 in breast cancer but there is no difference among miR-21 expression levels with regard to clinicopathologic features ($p=0,637$).

It is predicted that miRNA will play more significant role for cancer diagnosis and therapy in the future. Our clinical trial is an experimental pilot trial regarding miRNA and it is the first clinical trial regarding miRNA in our country. This trial is valuable because of it is an initial clinical trial regarding miRNA in our country and so that it will guide clinical trials in the future in our country.

Keywords : microRNA, microRNA-21, breast cancer

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xi
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. MikroRNA.....	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2 Tarihçe.....	2
2.1.3. Fonksiyonu.....	3
2.1.4. Yapısı ve Oluşumu.....	3
2.1.5. RISC yapısı	5
2.1.6. miRNA'nın çalışma mekanizması	6
2.1.7. Translasyonel Represyon.....	7
2.1.8. RNA İnterferans.....	8
2.2. MikroRNA ve KANSER.....	10
2.2.1 Onkogen ve tümör süpresör gen olarak miRNA	12
2.2.2. miRNA ve Kanser Tedavisi.....	14
2.3. MEME KANSERİ.....	15
2.3.1. Epidemiyoloji.....	15
2.3.2. Etyoloji.....	16
2.3.3. Risk faktörleri.....	18
2.3.4. Histolojik sınıflama.....	19
2.3.5. Moleküler sınıflama.....	20
2.3.6. Prognostik faktörler.....	21

2.3.7. Tanı.....	22
2.3.8. Evreleme.....	23
2.3.9. Tedavi.....	27
2.4. MikroRNA ve MEME KANSERİ.....	28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. HASTALARIN SEÇİMİ.....	31
3.2. ÇALIŞMA PLANI.....	32
3.2.1. Çalışma planının oluşturulması.....	32
3.2.2. Çalışmaya alınacak örneklerin belirlenmesi.....	32
3.2.3. Hastaların patoloji preparatlarının çıkarılması.....	32
3.2.4. Tümör dokusu ve normal dokunun ayrılması.....	33
3.2.5. Parafin bloklardan kesit alınması.....	33
3.2.6. Deparafinizasyon.....	33
3.2.7. Proteinaz K ile inkübasyon.....	34
3.2.8. Total RNA ekstraksiyonu.....	35
3.2.9. PolyA reaksiyonu.....	36
3.2.10 c-DNA oluşumu	37
3.2.11. RT-PCR.....	38
3.2.12. RT-PCR sonuçlarının sayısal analizi.....	38
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	39
BULGULAR.....	40
4.1. HASTALARIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	40
4.2. TOTAL RNA EKSTRAKSİYONU SONUCU.....	41
4.3. c-DNA SONUCU	41
4.4. RT-PCR SONUCU.....	42
TARTIŞMA.....	48
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

miRNA	: mikroRNA
miR-21	: mikroRNA-21
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: messenger RNA
siRNA	: small interfering RNA
RISC	: RNA induced silencing complex
UTR	: Untranslated region
dsRNA	: çift zincirli RNA
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
GBM	: Glioblastome Multiforme
HCC	: Hepatoselüler karsinoma
ER	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
c-DNA	: komplementer DNA
RT-PCR	: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 pre-miRNA'nın sap-ilmik yapısı.....	4
Şekil 2.2 miRNA oluşumu.....	5
Şekil 2.3 RISC yapısı ve miRNA'nın çalışma mekanizması.....	7
Şekil 2.4 Translasyonel represyon ve mRNA degradasyonu.....	8
Şekil 2.5 RNA interferans.....	9
Şekil 2.6 Bazı kanser tipleri ve patogeneizde rol alan miRNA'lar.....	12
Şekil 2.7 Kanser ile ilişkili bazı miRNA'lar ve görevleri.....	14
Şekil 2.8 Yaşa göre meme kanseri insidansı.....	16
Şekil 2.9 Meme kanseri insidansının ülkelere göre dağılımı.....	17
Şekil 2.10 Meme kanseri gelişiminde rol oynayan miRNA'lar.....	29
Şekil 4.1 Agaroz Jel Elektroforezinde görüntülenen total RNA bandı.....	41
Şekil 4.2 Agaroz Jel Elektroforezinde görüntülenen c-DNA bantları.....	42
Şekil 4.3 Tümör dokusunda gözlenen miR-21 RT-PCR eğrisi.....	43
Şekil 4.4 Agaroz Jel Elektroforezinde görüntülenen miR-21 bantları.....	44

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>sayfa</u>
Tablo 2.1 Meme kanserinin histolojik sınıflaması.....	19
Tablo 4.1 Hastaların genel özellikleri.....	40
Tablo 4.2: RT-PCR ile ölçülen RFU değerleri.....	45
Tablo 4.3: Doku tipine göre miR-21 ekspresyon düzeyleri.....	45
Tablo 4.4: Klinikopatolojik özelliklere göre miR-21 ekspresyon düzeyleri.....	47

I- GİRİŞ

MikroRNA (miRNA), 1993 yılında bulunmuş, ancak önemi birkaç yıl önce anlaşılmış bir moleküldür. miRNA ile kanser arasındaki ilişki 2002 yılında fark edilmiş, miRNA'nın çalışma mekanizmasını açıklayan RNA interferansın keşfine ise 2006 yılında Nobel Tıp Ödülü verilmiştir.

miRNA ile kanser oluşumu arasındaki ilişkinin gösterilmesiyle birlikte, bu alandaki çalışmalar hız kazanmış ve yapılan çalışmalar sonucunda birçok miRNA'nın farklı kanser türlerinin oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. miRNA'ların gelecekte kanser tanı ve tedavisinde daha da önem kazanacağı düşünülmektedir.

Meme kanseri, halen ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanserdir. Meme kanserinin tedavisinde son yıllarda hedefe yönelik tedavi ajanlarının da kullanılmasıyla çok büyük ilerleme kaydedilmiştir. Erken tanı ve uygun tedavi ile tamamen tedavi edilebilen meme kanseri, ileri evrede tanı konduğunda dahi sağkalımı uzatılabilen bir hastalık olmuştur.

miRNA'lar ile yapılan çalışmalar, bazı miRNA'ların meme kanseri oluşumunda önemli rol oynadığını göstermiştir. Bu miRNA'ların en önemlisi mikroRNA-21 (miR-21)'dir.

Bu çalışmanın amacı, meme kanserinde miR-21 ekspresyon düzeyi ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

I- GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA :

2.1.1. Tanımı :

MikroRNA (miRNA), yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda, tek iplikçikli bir RNA molekülüdür. Gen ifadesinin (gen ekspresyonunun) düzenlenmesinde rol oynar. miRNA'lar kodlamayan RNA'lardandır, yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. miRNA'lar, hücrenin proliferasyon, diferansiasyon ve apoptozis gibi biyolojik fonksiyonlarını kontrol eden genler üzerinde etkilidirler. miRNA'lar bu genlerin regülasyonunu negatif yönde düzenleyerek etkili olurlar (1).

2.1.2. Tarihçesi :

miRNA'lar 1993 yılında Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiştir (2), ancak miRNA terimi ilk defa 2001 yılında kullanıma girmiştir (3).

1993 yılında Lee ve arkadaşlarının nematod grubundan bir solucan olan *Caenorhabditis elegans* üzerinde yaptıkları bir genetik çalışma sırasında ilk miRNA bulunmuştur ve bu miRNA'ya lin-4 adı verilmiştir (2). O dönemde, bulunan bu yeni RNA türünün nematodlara özgü bir RNA olduğu düşünülmüş ve üzerinde durulmamıştır. Ancak, daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların sadece nematodlarda değil, aynı zamanda insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve virüslerde de bulunduğu ve gen ekspresyonunu

düzenlediği gösterilmiştir (4). 2001 yılında Ruvkun, yayınladığı makalede miRNA terimini ilk kullanan kişi olmuştur (3).

miRNA ve kanser arasındaki ilişki, ilk olarak, 2002 yılında Calin ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Andy Fire ve Craig Mello, 1998 yılında yayınladıkları miRNA'nın çalışma prensiplerini ortaya koyan RNA interferans çalışması ile 2006 yılında Nobel tıp ödülünü kazanmıştır (5). Şu ana kadar insanda keşfedilmiş olan yaklaşık 1000 farklı miRNA mevcuttur (6).

2.1.3. Fonksiyonu :

miRNA, gen ekspresyonunu düzenleyen bir RNA molekülüdür. Hücrede bir genin kodladığı proteinin sentezi iki aşamada gerçekleşir. Bunların ilki transkripsiyon aşamasıdır. Bu aşamada DNA'dan messenger RNA (mRNA) sentezlenir. Bundan sonraki aşama ise translasyon aşamasıdır. Bu aşamada da mRNA'dan protein sentezi yapılır. miRNA, translasyon aşamasında etkisini gösteren bir moleküldür.

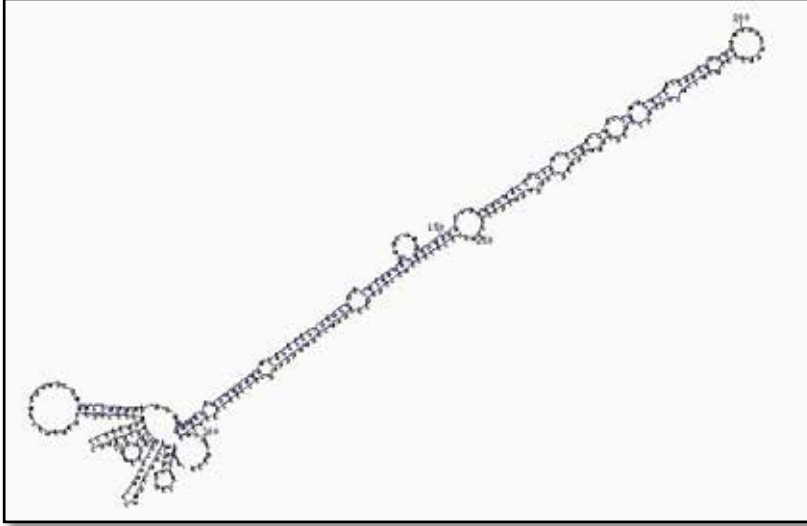
miRNA, mRNA'ya bağlanarak mRNA'dan protein sentezini, yani translasyonu engeller. Böylece translasyon evresini baskılamış, yani translasyonel represyon yapmış olur ki, buna "Gen Susturulması" (*Gen Silencing*) da denir. Bu şekilde etki eden miRNA, postranskripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenlemiş olur.

2.1.4. Yapısı ve oluşumu :

miRNA'lar önce pri-miRNA olarak sentezlenir. Pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA'dan da olgun miRNA ortaya çıkar. Olgun (Matür) miRNA, fonksiyonel olan miRNA'dır. Olgun miRNA, bir veya daha fazla mRNA ile etkileşime girer ve mRNA'nın translasyonunu engeller. Böylece gen ekspresyonunu negatif yönde düzenlemiş olur.

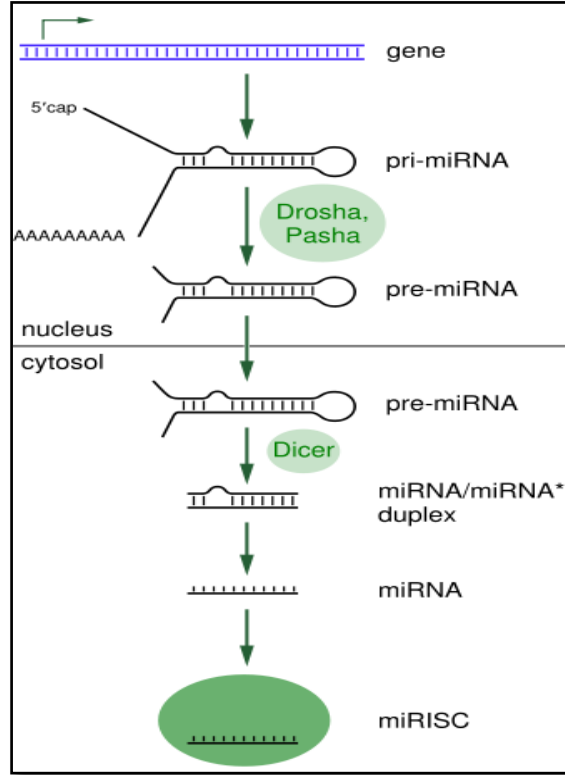
miRNA geni RNA Polimeraz II enziminin etkisiyle transkripsiyona uğrar ve sonuçta hücre nükleusunda pri-miRNA adı verilen primer transkript oluşur. pri-miRNA, yaklaşık 200 nükleotitten oluşan, bir başlığı ve poli-A kuyruğu olan bir moleküldür.

pri-miRNA, hücre çekirdeğinde, yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda, sap-ilmik veya saç tokası (*hairpin*) şeklinde, prekürsör (öncül) bir moleküle dönüşür ki, bu moleküle pre-miRNA denir (Şekil 2.1). Pre-miRNA oluşumu, Mikroişlemci Kompleks (*Microprocessor complex*) adlı bir protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Mikroişlemci komplekste Drosha adlı bir nükleaz ve Pasha adlı çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein bulunur.



Şekil 2.1: pre-miRNA'nın sap-ilmik yapısı

pre-miRNA, Exportin-5 adlı taşıyıcı protein aracılığı ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. pre-miRNA, sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz aracılığı ile olgun miRNA'ya dönüşür. Dicer aynı zamanda RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (*RNA induced silencing complex: RISC*) (RISC yapısı) oluşumunu başlatır. RISC yapısı, miRNA ifadesi ve RNA interferanstan kaynaklanan gen susturulmasından sorumludur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: miRNA oluşumu

2.1.5. RISC yapısı :

Olgun miRNA, RISC yapısının bir parçasıdır. RISC yapısı, mRNA'ya kısmi (inkomplet) veya tam (komplet) bir şekilde bağlanarak mRNA'dan protein sentezini engeller.

Pre-miRNA, sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz ile etkileşerek olgun miRNA'ya dönüşür. Dicer aynı zamanda RISC yapısı oluşumunu başlatır. RISC yapısı, miRNA'nın asıl fonksiyonlarından sorumludur. Olgun miRNA, RISC yapısının bir parçasıdır ve bu yapıya katılırken tek zincir haline geçer (Şekil 2.3).

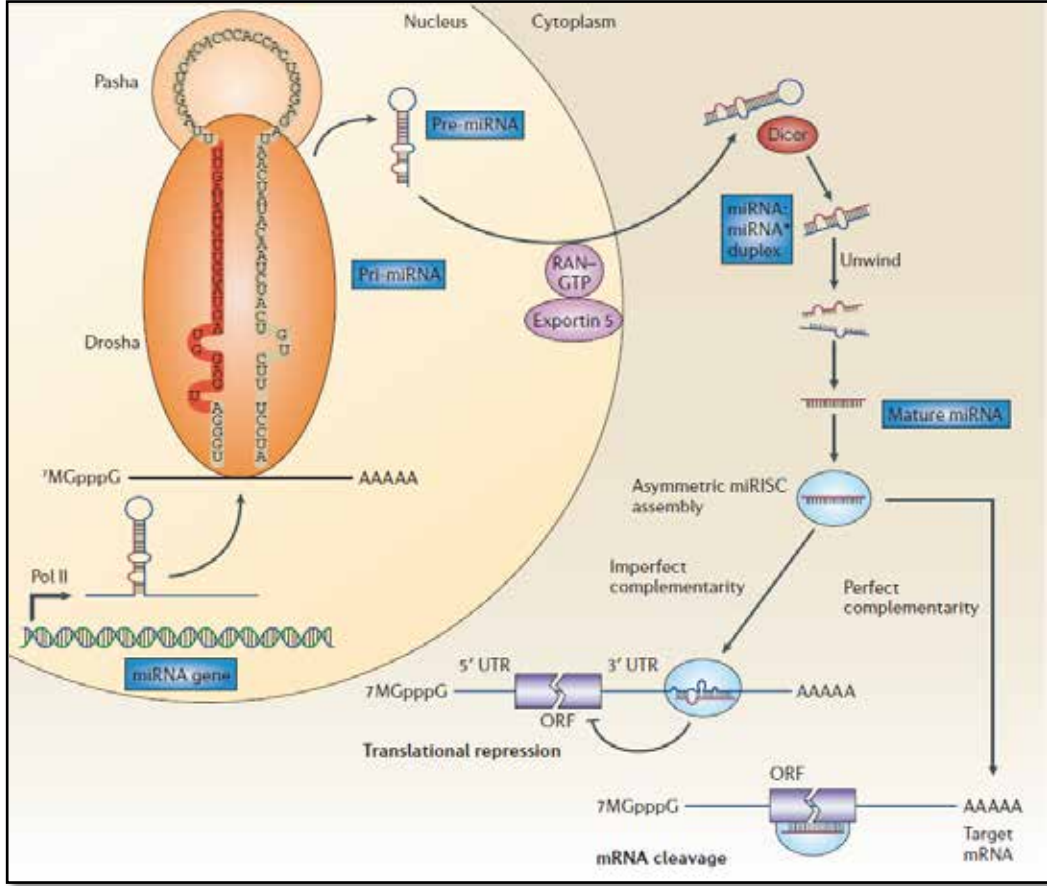
Olgun miRNA, işlevini gerçekleştirebilmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyar. Bu proteinler RISC yapısı içinde bulunur. Bu yapıdaki tanımlanmış proteinler Argonaute ailesi proteinleridir. Yapılan çalışmalar,

Argonaute proteinlerinin hedefi kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir.

Aslında miRNA'lar sadece hedefi bulan ve RISC yapısını hedefe yönlendiren moleküllerdir. Translasyonun durmasını sağlayan ise RISC yapısını oluşturan diğer proteinlerdir.

2.1.6. miRNA'nın çalışma mekanizması :

miRNA'lar posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerdir. Bu düzenleme iki şekilde olur: Ya RISC yapısı içine dahil olan olgun miRNA, hedef mRNA'ya komplet bir şekilde bağlanarak mRNA'yı parçalar; ya da miRNA mRNA'ya inkomplet bir şekilde bağlanarak mRNA'dan protein sentezini, yani translasyonu engeller. İnsan ve hayvan miRNA'ları hedef mRNA'nın *3' Untranslated Region (3' UTR)* bölgesine bağlanır. Bu bağlanma inkomplet bir şekilde olur. Bu bağlanma sonucu miRNA, hedef mRNA'yı translasyonel düzeyde baskılar. Bitki miRNA'ları ise hedef mRNA'nın protein kodlayıcı kısmına komplet bir şekilde bağlanır ve mRNA'nın parçalanmasına (degradasyonuna) neden olur (Şekil 2.3).

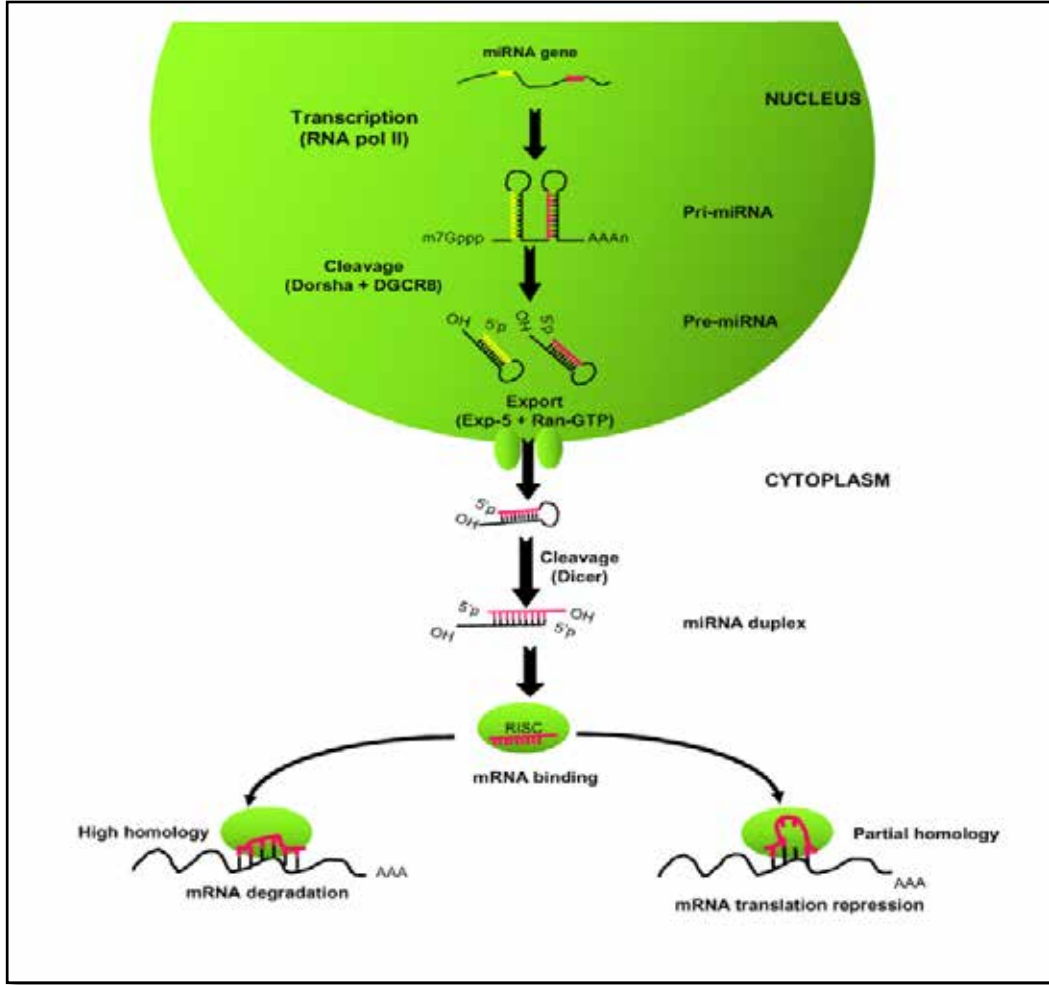


Şekil 2.3: RISC yapısı ve miRNA'nın çalışma mekanizması

2.1.7. Translasyonel represyon :

RISC yapısı içindeki miRNA, insanlarda ve hayvanlarda hedef mRNA'nın 3' UTR ucuna inkomplet bir şekilde bağlanır. Bu şekilde mRNA'yı bloke ederek mRNA'dan protein sentezini engeller. Böylece translasyon basamağını engellemiş, yani "Translasyonel Represyon" yapmış olur. Bu duruma "Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması" (*Posttranscriptional Gene Silencing*) veya "RNA interferans" (*RNA interference*) da denir. miRNA'nın çalışma prensiplerini ortaya koyan bu mekanizmayı keşfeden Andy Fire ve Craig Mello, bu çalışmalarını nedeniyle 2006 yılında Nobel ödülü almıştır (5).

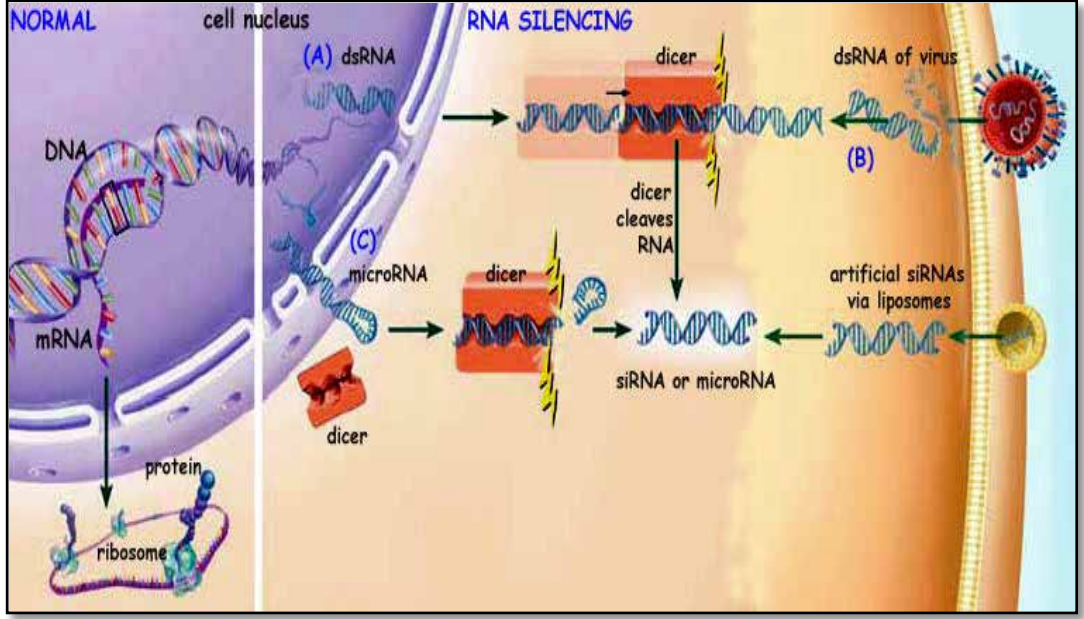
miRNA'lar translasyonel represyon aracılığı ile gen ekspresyonunu negatif yönde düzenler (genin down regülasyonunu sağlar) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Translasyonel represyon

2.1.8. RNA interferans :

RNA interferans, çift zincirli RNA (dsRNA)'nın hücreye girdiği zaman komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır (7). RNA interferansta görev alan iki küçük RNA molekülü vardır. Bunlar miRNA ve siRNA (*small interfering RNA*)'dır. Bu moleküller Dicer enzimi aracılığı ile RISC yapısına katılır ve RNA interferansı başlatır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: RNA interferans

dsRNA ile etkileşime giren RISC yapısı, komplementer hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu engelleyebilir (translasyonel represyon) veya hedef mRNA'nın direkt parçalanmasına yol açabilir. Bu şekilde transkripsiyon sonrası gen susturulması (*posttranscriptional gene silencing*) yapılmış olur. Bu olaylar zincirine RNA interferans adı verilir.

Araştırmacılar RNA interferansı son yılların en heyecan verici keşfi olarak tanımlamışlardır (8). RNA interferans, Science dergisi tarafından 2001'de "yılın molekülü" ve "2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi" seçilmiştir (9). Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello adlı araştırmacılar RNA interferans ile ilgili yaptıkları çalışmalarıyla 2006 yılında tıp alanında Nobel ödülü almıştır (5).

2.2. MikroRNA ve KANSER :

miRNA, 1993 yılında keşfedildiği zaman, bilim dünyasında bir heyecan uyandırmamıştır. Çünkü, ilk bulunan miRNA olan lin-4, *Caenorhabditis elegans* adlı toprak solucanında keşfedilmiştir ve o dönemde bu yeni RNA türünün sadece solucanlarda bulunan farklı bir RNA türü olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, o dönemde miRNA'lar üzerinde fazla durulmamıştır.

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların sadece bir solucan türünde değil; insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve virüslerde de bulunduğunu göstermiştir (10). Bunun üzerine, 2000'li yılların başından itibaren, miRNA'lar ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Birbiri ardına yapılan çalışmalar sonunda yüzlerce farklı tipte miRNA olduğu ve miRNA'ların gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.

Ayrıca, farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalar sonucu, miRNA ekspresyon profilindeki anormalliklerin bazı hastalıklar ile ilişkisi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalara göre, bozulmuş miRNA ekspresyon düzeyi, birçok hastalığın oluşumu ile ilişkilidir. Yapılan araştırmalar sonucu, bazı kardiyak hastalıklarda, bazı nörolojik hastalıklarda ve bazı kanser türlerinde bozulmuş miRNA ekspresyonu olduğu görülmüştür.

Tümör dokusu ile normal doku arasındaki miRNA ekspresyon profillerinin farklı olduğunun gösterilmesi, miRNA ile kanser arasında doğrudan bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür (11). Ayrıca, yapılan çalışmalarda miRNA genlerinin % 50'den fazlasının lokalizasyonunun kanser ile ilişkili gen bölgelerinde olduğu gösterilmiştir (12). Bunun üzerine, miRNA ve kanser arasındaki ilişki, kapsamlı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır.

miRNA ve kanser arasındaki ilişki, ilk olarak, 2002 yılında Calin ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada, B hücreli Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarının yarısından çoğunda 13. kromozomda bulunan mikroRNA-15a (miR-15a) ve mikroRNA-16a (miR-16a) genlerinin silinmiş olduğu görülmüştür (13). Bundan sonra gelen ikinci çalışma ise, miR-

143 ve miR-145'in ekspresyon düzeyinin kolorektal kanserlerde azaldığını gösteren çalışma olmuştur (14).

Ciafre ve arkadaşları tarafından Glioblastome Multiforme (GBM) hastalarında 245 farklı miRNA üzerinde microarray analiz yöntemi ile yapılan bir çalışmada, GBM'de normal beyin dokusuna kıyasla mir-221'in güçlü bir şekilde upregüle olduğu, miR-181a, miR-181b ve miR-181c'nin ise downregüle olduğu gösterilmiştir (15).

Burkitt Lenfoma da dahil olmak üzere, birçok B hücreli NonHodgkin Lenfoma'da miR-155 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. miR-155 gen lokalizasyonunun, Non-Hodgkin Lenfoma gelişiminde rol oynayan bir onkogen olan BIC geninin lokalizasyonuna yakın olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, miR-155'in BIC geninin aktivasyonu ile ilişkisi olduğu düşünülmüştür (16).

Tiroid Papiller Karsinomunda miR-221, miR-222 ve miR-14'ün overekspresyonu gösterilmiştir (17). miR-372 ve miR-373'ün Testis Germ Hücreli Tümörde birer onkogen gibi görev yaptığı bulunmuştur (18).

Hepatoselüler karsinoma (HCC) hastalarında yapılan bir çalışmada, tümörlü dokudaki ve tümörlü dokuya bitişik normal dokudaki miRNA ekspresyon profiline bakılmıştır. Sonuçta, HCC'de miR-18 ve miR-224 ekspresyonu yüksek; miR-199a, miR-195, miR-199a, miR-200a ve miR-125a ekspresyonu ise düşük bulunmuştur (19).

Bu çalışmalar göstermiştir ki, miRNA ile kanser patogenezi arasında yakın bir ilişki vardır ve birçok kanser tipinde bozulmuş miRNA ekspresyonu görülmektedir (Şekil 2.6).

Cancer	miRNAs involved ^a	miRNA-targeted genes
Brain cancer	miR-21↑, miR-221↑, miR-181↓	
Breast cancer	miR-125b↓, miR-145↓, miR-21↓, miR-155↓	
Chronic lymphocytic leukemia	miR-15↓, miR-16↓	BCL2
Colorectal neoplasia	miR-143↓, miR-145↓	
Hepatocellular carcinoma	miR-18↑, miR-224↑, miR-199↓, miR-195↓, miR-200↓, miR-125↓	
Lung cancer	let-7↓, miR-17-92↑	RAS, MYC
Lymphomas	miR-155↑, miR-17-92↑	BIC
Papillary thyroid carcinoma	miR-221↑, miR-222↑, miR-146↑, miR-181↑	KIT
Testicular germ cell tumors	miR-372↑, miR-373↑	LAST2

Şekil 2.6: Bazı kanser tipleri ve patogeneizde rol alan miRNA'lar

2.2.1. Onkogen ve tümör süpresör gen olarak miRNA :

miRNA ekspresyon profili, kanser oluşumu ile yakın ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, miRNA ekspresyon düzeyindeki artma veya azalmanın kanser oluşumunda önemli rol oynadığını göstermiştir.

Bazı miRNA'ların ekspresyon düzeyinin bazı kanser türlerinde arttığı görülmüştür. Bu tip miRNA'ların onkogen olarak görev yaptığı kabul edilmiştir. Bu nedenle bu tip miRNA'lara "Onkomir" adı verilmiştir. Bazı miRNA'ların ise, ekspresyon düzeyinin bazı kanser türlerinde azaldığı, ekspresyon düzeyinin kaybolduğu, hatta bu miRNA'lara ait genlerin bu

kanser türlerinde tamamen silinmiş olduğu görülmüştür. Bu tip miRNA'ların da tümör süpresör gen olarak görev yaptığı kabul edilmiştir

Onkogen olarak görev yapan miRNA'ya örnek, miR-17-92 miRNA grubudur. 13. kromozomda yer alan bu miRNA grubunun B hücreli Nonhodgkin Lenfoma'da artmış ekspresyonu gösterilmiş ve bu nedenle bir onkogen olarak kabul edilmiştir (20). miR-17-92, onkogen olarak görev yapan miRNA'lar içinde ilk bulunan ve üzerinde en çok çalışılan miRNA'dır. miR 17-92, "OncomiR-1" olarak da adlandırılır. miR-17-92, PTEN ve RB2 tümör süpresör genlerine etki ederek bu tümör süpresör genlerin down regülasyonuna neden olmaktadır. Böylece B hücreli Nonhodgkin Lenfoma oluşumunda rol oynamaktadır (21). Ayrıca, miR-17-92 ile c-myc onkogeni arasında da yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir (22).

mir17-92'nin B hücreli Nonhodgkin Lenfomadan başka, akciğer kanserinde, özellikle de küçük hücreli akciğer kanserinde de ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. mir17-92, akciğer kanserinde de PTEN ve RB2 adlı tümör süpresör genleri üzerinden etki eden bir onkogen gibi davranır (23).

miRNA'ların büyük bir kısmı, hedef gende down regülasyona neden olur. Bu tip miRNA'lar, onkogenlere ait mRNA'lara etki ederek translasyonel represyona neden olur. Böylece hücrenin malign transformasyona girmesini engellemiş olur. Bu şekilde fonksiyon gören miRNA'ların bazı kanser türlerinde ekspresyon düzeyinin azaldığı, hatta kaybolduğu, hatta bu miRNA'lara ait genlerin bu kanser türlerinde tamamen silinmiş olduğu görülmüştür. Bu nedenle, bu tip miRNA'ların organizmada tümör süpresör gen olarak görev yaptığı kabul edilir (11). Bu tip miRNA'lara örnek, miR-15a, Mir-16a ve let-7'dir (13,24).

KLL hastalarının yarısından fazlasında 13. kromozomda bulunan miR-15a ve mi-16a genlerinin silinmiş olduğu görülmüştür (13). Yapılan bir çalışmada miR-15a ve miR-16a'nın hedef geninin BCL2 geni olduğu gösterilmiştir (25). BCL2, apoptozisi önleyen, bu nedenle de antiapoptotik gen olarak bilinen bir onkogendir. miR-15a ve miR-16a, BCL2 onkogenini postranskripsiyonel düzeyde baskılayarak etkisini gösterir. Bu onkogeni

baskıladığı için de miR-15a ve miR-16a'nın tümör süpresör gen gibi görev yaptığı kabul edilir.

Akciğer kanserinde miRNA let-7'nin ekspresyon düzeyinin belirgin bir biçimde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, yine bu hastalarda let-7 ekspresyon düzeyinin azalması, evreden bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda let-7'nin hedef genlerinin RAS ve MYC onkogenleri olduğu ve let-7'nin bu genlerin negatif regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Böylece let-7'nin de bir tümör süpresör gen gibi görev yaptığı kanıtlanmıştır (24). Son yıllarda kanser araştırmaları sırasında onkogen veya tümör süpresör gen olarak görev yapan birçok miRNA bulunmuştur (Şekil 2.7).

miRNA	Gene loci	Cancer association	Function
miR-15a, miR-16-1	Chromosome 13q14	Frequently deleted or downregulated in B-cell chronic lymphocytic leukemia; negatively regulates the anti-apoptotic gene <i>BCL2</i>	TS
miR-143, miR-145	Chromosome 5q32-33	Decreased abundance in colorectal cancer; downregulated in breast, prostate, cervical and lymphoid cancer cell lines; miR-145 is decreased in breast cancer	TS
miR-21	Chromosome 17q23.2	Anti-apoptotic factor; upregulated in glioblastomas and breast cancer	OG
let-7 family members	Multiple loci	Negatively regulate the Ras oncogenes; direct cell proliferation and differentiation; decreased abundance in lung cancer	TS
miR-142	Chromosome 17q22	A t(8;17) translocation that places the MYC oncogene downstream of the miR-142 hairpin, resulting in an aggressive B-cell leukemia that is due to MYC overexpression	N/A
BIC/miR- 155	Chromosome 21q21	Upregulated in paediatric Burkitt, Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large-B-cell lymphomas; upregulated in human breast cancer	OG
miR-17- 19b cluster	Chromosome 13q31-32	Upregulated by MYC; negatively modulates the <i>E2F1</i> oncogene; loss of heterozygosity of this cluster is found in hepatocellular carcinoma; overexpressed in B-cell lymphomas	TS/OG

N/A, not applicable; OG, oncogene; TS, tumour suppressor.

Şekil 2.7: Kanser ile ilişkili bazı miRNA'lar ve görevleri

2.2.2. miRNA ve Kanser Tedavisi :

miRNA'nın kanser patogenezindeki rolü, bu moleküllerin tedavide de kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu düşünceden hareketle, onkogen olarak görev yapan miRNA'yı hedef olarak tanıyıp buna bağlanan anti-miRNA oligonukleotidleri sentezlenmiştir ki, bunlara "antagomir" de denir. Antagomir, hedef miRNA'ya bağlanıp onu bloke ederek onkojenik aktiviteyi durdurur.

Ayrıca, tümör süpresör gen olarak görev yapan bazı miRNA'ların sentetik analogları yapılmıştır. Bunlarla hücrenin transfeksiyonu sonucu da onkojenik aktivite baskılanmış olur.

miRNA ve RNA interferans ile ilgili başka bir tedavi yöntemi de antisense oligonükleotidlerdir. Bunlar, onkogene ait mRNA'ya komplet bir şekilde bağlanıp onu bloke ederek mRNA'dan protein sentezini engeller ve dolayısı ile o onkogeni susturmuş olurlar. Bu şekilde etki eden antisense oligonükleotid ilaçlara örnek; Oblimersen ve Fomivirsen'dir.

miRNA'ların gelecekte kanser tedavisinde daha büyük bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

2.3. MEME KANSERİ :

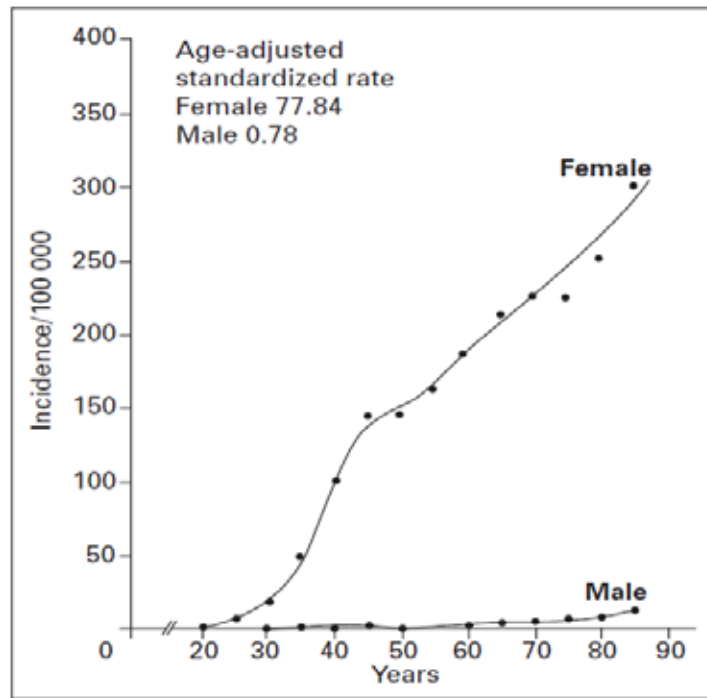
2.3.1. Epidemiyoloji :

Meme kanseri, ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda akciğer kanserinden sonra en sık ölüme neden olan

kanserdir. Ayrıca, 45-55 yaşları arasındaki kadınlarda en sık ölüme neden olan kanserdir (26).

Meme kanseri insidansı son elli yılda artış göstermiştir. Bunda toplumun bilinçlenmesi ve tanı yöntemlerinin ilerlemesinin payı büyüktür. Meme kanserinde mortalite oranı, erken tanı ve tedavideki ilerlemeler nedeniyle giderek azalmaktadır.

Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artar (Şekil 2.8).

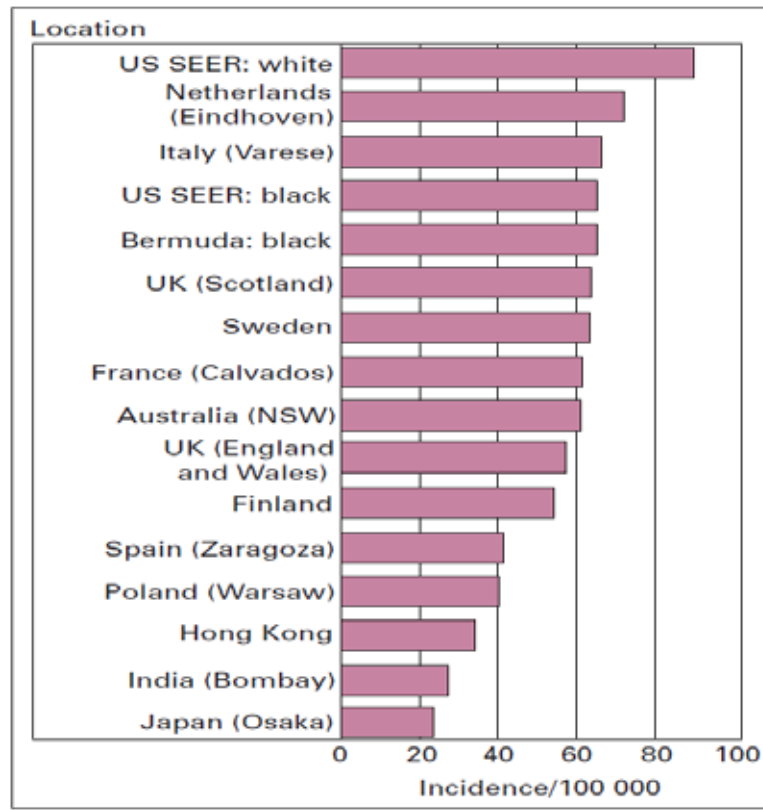


Şekil 2.8: Yaşa göre meme kanseri insidansı

Meme kanseri dağılımı dünya üzerinde coğrafik yönden farklılık gösterir. Gelişmiş batılı ülkelerde, gelişmekte olan doğu ülkelerine göre nispeten daha fazla görülmektedir (şekil 2.9).

2.3.2. Etyoloji :

Meme kanseri, genetik, çevresel ve diyetle ilgili bir çok faktörün etyolojide rol oynadığı heterojen bir hastalıktır. Genetik faktörler genellikle kalıtsal gen mutasyonları şeklinde görülürken; çevresel faktörler östrojene maruziyet, obezite, alkol alımı gibi çok farklı nedenlerle karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 2.9: Meme kanseri insidansının ülkelere göre dağılımı

Kalıtsal meme kanseri, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 10'unu oluşturur (27). Bu hastalardaki genetik bozukluk, tümör süpresör genlerde görülen germline mutasyonlardır. Bunların içinde de en sık görülen mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarıdır.

BRCA-1 geni 17. kromozomda, BRCA-2 geni ise 13. kromozomda bulunan tümör süpresör genlerdir. Bu genlerde görülen mutasyonlar, ailesel meme kanserlerinin önemli bir kısmını oluşturur. Ayrıca, p53 ve PTEN tümör süpresör genlerindeki mutasyonların da meme kanseri oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir.

Sporadik olarak görülen meme kanserinin etyolojisinde ise, uzun süreli östrojene maruz kalma, yağlı ve yüksek kalorili diyetle beslenme, obezite ve alkol tüketimi gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

2.3.3. Risk faktörleri :

Yaş : Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Meme kanserli hastaların %75'ine postmenopozal dönemde tanı konmaktadır. Meme kanseri gelişme riski 25 yaşında 1/19608, 55 yaşında 1/33, 75 yaşında 1/11, 80 yaşında 1/8'dir.

Genetik Faktörler : BRCA1 (17q21), BRCA2 (13q14), P53 ve PTEN gen mutasyonlarının varlığı ile meme kanseri riski artmaktadır. Ailevi meme kanseri olgularının çoğunda BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları saptanmıştır. P53 ve PTEN mutasyonları ise ailevi meme kanseri olgularının %1'inden daha az kısmından sorumludur (28).

Hormonal Faktörler : Uzun süre endojen veya eksojen östrojen hormonuna maruz kalınması meme kanseri görülme riskini artırır. Endojen östrojene maruz kalma nedenleri; hiç doğum yapmamış olmak, geç yaşta doğum yapmış olmak, erken menarş ve geç menapozdur. Bu durumlarda meme kanseri riski artar. Örneğin, ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapmış bir kadında meme kanseri gelişme riski, ilk doğumunu 18 yaşından önce yapmış bir kadına göre 2-5 kat daha fazladır. Ekstrojen östrojen kullanımının en önemli nedeni Hormon Replasman Tedavisi ve Oral Kontraseptif kullanımıdır. Postmenopozal dönemde hormon tedavisi alanlarda meme kanseri riski artmaktadır. Özellikle ailede meme kanseri öyküsü olan

kadınlarda oral kontraseptif kullanımı, meme kanseri riskini arttırmaktadır (29).

Diyet : Yüksek kalorili diyetle beslenmenin meme kanseri riskini arttırdığı düşünülmektedir. Sebze tüketiminin meme kanserine karşı hafif bir koruyucu etkisi vardır. Alkol kullanımı ile meme kanseri riski arasında anlamlı bir pozitif ilişki vardır (30).

Radyasyon : 40 yaşından önce medikal tanı veya tedavi amaçlı iyonize radyasyon maruziyeti ile meme kanseri riski artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri olgularının yaklaşık %1'inin tanı amaçlı mammografiye bağlı geliştiği düşünülmektedir (31). Hodgkin lenfoma tanısı ile 15 yaşından önce kemoterapi ile kombine olarak mantle radyoterapi uygulanan genç kızlarda meme kanseri riski belirgin olarak artmaktadır ve bu nedenle sıkı takip gerekmektedir (32).

2.3.4. Histolojik sınıflama :

Meme tümörlerinin %90'ı invaziv duktal adenokarsinom ya da invaziv lobuler karsinomdan oluşur. İnvaziv duktal adenokarsinom; tubuler, mikropapiller, medüller gibi alt tiplere ayrılır. Bununla birlikte, duktal adenokarsinomların %80'i hiç bir alt tipe uymayan "*not otherwise specified-NOS*" olarak isimlendirilen tipten oluşur.

Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization: WHO*) 2003 Sınıflaması'na göre epitelyal meme kanserlerinin histolojik sınıflaması Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Meme kanserinin histolojik sınıflaması :

· Duktal karsinoma :
İnvaziv, NOS
İnvaziv, predominant intraduktal komponentli
İntraduktal (in situ)
Komedo
İnflamuar
Medüller
Müsinöz (kolloid)
Papiller
Skirröz
Tubuler
Diğerleri
· Lobuler karsinoma :
İnvaziv
İnvaziv, predominant in situ komponentli
İn situ

Duktal adenokarsinom, en sık görülen meme kanseri tipidir. Tüm meme kanserleri içinde % 70-80 oranında görülür. Lobüler karsinoma % 10-15 oranında görülür. Papiller, tubuler, medüller ve müsinöz meme kanserleri iyi prognozlu özel tip meme kanserleridir. İnflamatuvar meme kanseri yaklaşık % 1 oranında görülür ve en agresif meme kanseri tipidir.

2.3.5. Moleküler sınıflama :

Son yıllarda meme kanserinde hastanın genetik ekspresyon profiline göre yeni bir sınıflama kullanılmaya başlanmıştır ki, bu sınıflandırmaya moleküler sınıflama adı verilir (33). Meme kanseri, moleküler sınıflamaya göre 5 alt grupta incelenir :

Luminal A: Sitokeratin 8 ve 18 eksprese eden tümörlerdir. En yüksek düzeyde östrojen reseptörü de bu tümör tipinde görülür. Düşük gradlı olmaya

eğilimlidir. Endokrin tedaviye iyi yanıt verir. Prognozu en iyi olan tümör tipidir. Kemoterapiye daha az yanıt verir.

Luminal B: Luminal epitel kaynaklı tümörlerdir. Ancak gen ekspresyon paterni Luminal A'dan farklıdır. Prognozu da Luminal A'ya göre daha kötüdür.

Normal meme benzeri: Bu tümör tipinin gen ekspresyon profili normal meme epiteline benzer. Prognozu da Luminal B'ye benzer.

HER-2 pozitif: 17. Kromozomda bulunan HER2 geninde amplifikasyon görülen tümör tipidir. Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü ekspresyonu düşük, Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) reseptör ekspresyonu yüksektir. Prognozu kötüdür. Ancak, Trastuzumab tedavisinden fayda gören hasta grubudur.

Bazal: Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 negatif olan tümör tipidir. "Triple negatif" olarak da adlandırılır. Sitokeratin 5,6,17, Vimentin, p63 , CD10, düz kas aktini ve Epidermal Growth Faktör Reseptörü (EGFR) eksprese eder. Yüksek gradlı olmaya eğilimlidir. BRCA1 mutasyonu olan hastalar bu gruba girer. Kemoterapiden fayda görmesine rağmen, prognozu en kötü olan gruptur.

2.3.6. Prognostik faktörler :

Tümör çapı: Tümör çapı arttıkça sağkalım azalmaktadır. Tümör çapı ve sağkalım arasında ters bir ilişki vardır (34). Tümör çapı, tutulan aksiller lenf nodu sayısı ile korelasyon göstermekle birlikte, bağımsız olarak da önemli bir prognostik faktördür (35). Nod negatif hastalık alt grubunda en güçlü ve tutarlı prognoz belirleyici tümör büyüklüğüdür.

Aksiller lenf nodu tutulumu: Aksiller lenf nodu tutulumu, meme kanserinde bilinen en güçlü prognostik faktörlerden biridir. Klinik olarak tespit edilebilen meme kanserli hastaların %50'sinde aksiller nod tutulumu saptanır. Tutulan aksiller lenf nodu sayısı arttıkça evre ilerler, prognoz kötüleşir, sağkalım süresi kısalır. (36).

Uzak organ metastazı: Uzak organ metastazı olması sağkalım süresini kısaltan önemli bir kötü prognostik faktördür.

Tümör gradı: Nükleer grad, tümörün çekirdek özelliklerini ve atipi derecesini yansıtır. Histolojik grad, hücresel ve dokuyla ilişkili kriterlere dayanır. Grad I iyi, grad II orta ve grad III kötü derecede diferansiye olmuş tümörleri tanımlar. Yüksek tümör gradı, kötü prognoz göstergesidir (37).

Lenfovasküler ve perinöral invazyon: Meme tümörlerinin üçte birinde lenfatik invazyon mevcuttur. Lenfatik invazyon kötü bir prognostik faktördür. Birçok çalışmada lenfatik invazyon, lenf nodu pozitifliğini arttırıcı bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (38). Kan damarı invazyonu, 4 veya daha fazla lenf nodu tutulanlarda veya lenfatik invazyon olanlarda daha sık görülür. Perinöral invazyon da çoğunlukla lenfatik invazyonla birlikte bulunur (39).

Östrojen ve progesteron reseptör durumu: Östrojen reseptör (ER) durumu pozitif hastalarda hastalısız sağkalımın ER durumu negatif hastalara göre daha uzun olduğu gösterilmiş olup, *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)* verilerine göre hastalısız sağkalım avantajı 5 yılda %10'dur (40). Progesteron reseptörü (PR) teorik olarak östrojen uyarılması ile oluştuğu için PR, ER işleme yolunun sağlam olduğunun bir göstergesidir. Çok değişkenli analizlerde ER veya PR klinik seyirle ilişkili bulunmaktadır. Hem ER, hem de PR düzeyleri proliferasyon ölçümleri ile ters ilişkilidir. ER düzeyleri yaş ile doğrusal olarak artar; PR düzeyleri ise daha çok menopoz durumu ile ilişkilidir (41).

HER-2 durumu: HER-2, normal meme epitelyal ve miyoepitelyal dokusunda %15-20 oranında eksprese olur. Diğer prognostik faktörlerden bağımsız olarak olumsuz bir prognostik faktördür. Tümör proliferasyonu, metastaz yeteneği ve ilaç direnci ile ilişkilidir (42,43).

Proliferasyon indeksi: Büyüme fraksiyonu ya da yüksek proliferasyon yeteneği gösteren mitotik indeks, timidin işaretleme indeksi ve yüksek Ki67 indeksi oranları meme kanserinde olumsuz prognostik faktörlerdir. Ek olarak diploid tümörler, anaploid DNA dağılımına sahip tümörlerden daha iyi prognoza sahiptirler (44).

Genç yaş: Otuz beş yaş altındaki olguların prognozu kötü seyretmektedir. Bu durumun, hastanın yaşı ile ilişkili olmadığı, bu yaşta görülen tümörlerin hızlı büyüyen, bölünme hızı yüksek tümörler olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Doğal seyirleri zaten saldırgan olan bu tümörlerin klinik olarak belirgin hale gelmesi daha çabuk olmakta ve bu nedenle tanı daha genç yaşta konulmaktadır (45).

Etnik özellikler: Siyah ırkta ve Latin Amerikalılarda meme kanseri tanısından sonra sağkalım beyaz ırktan daha kötüdür (46).

2.3.7. Tanı :

Meme kanserinin en önemli klinik bulgusu, memede ele gelen kitledir. Genellikle hastalar, memede yeni ortaya çıkan bir kitle fark ettikleri için doktora başvurur. Kitlenin fizik muayenesinde sert, düzensiz sınırlı, çevre dokulara fikse ve ağrısız olduğu görülür.

Tanıda meme ultrasonografisi yol göstericidir. Solid, sınırları net olarak ayırt edilemeyen kitleler malignite lehine düşünülür. Meme ultrasonografisi aynı zamanda şüpheli kitlelere tanı koyma amacı ile yapılan biyopsiler için de yol gösterici rol oynar.

Mammografi, ultrasonografiye göre daha sensitif ve spesifiktir. Ancak meme dokusu uygun olmadığı için 40 yaşın altındaki kadınlarda önerilmez. Mammografide düzensiz sınırlı kitleler, şüpheli kalsifikasyonlar, spiküler yayılım malignite lehine yorumlanır.

Magnetik rezonans görüntüleme de tanıda kullanılan görüntüleme yöntemlerindedir. Rutin pratikte kullanılmamakla birlikte, şüpheli durumlarda yol göstericidir.

Meme kanserinde kesin tanı biyopsi ile konur. Şüpheli kitleden ultrasonografi eşliğinde ince iğne aspirasyon biyopsisi veya tru-cut biyopsi yapılabilir. Tümörün histolojik tipini ve reseptör durumunu aydınlatmak amacıyla genellikle tru-cut biyopsi tercih edilmektedir.

2.3.8. Evreleme :

Tedavinin planlanması ve prognozun belirlenmesi için evreleme çok önemlidir. Meme kanserinde TNM evreleme sistemi kullanılır. T tümör çapını, N tutulan lenf nodu sayısını, M metastaz durumunu gösterir. Meme kanserinde halen kullanılan en son evreleme, 2002 yılında Amerikan Birleşik Kanser Komitesi tarafından yayınlanan TNM evreleme sistemi (*AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition, 2002*)'dir :

Primer Tümör (T) :

TX: Primer tümör saptanamamaktadır

T0: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma in situ

T1: Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az

T1mic: En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon

T1a: En büyük boyutu 0.1 cm'den büyük olan ancak 0.5 cm'yi geçmeyen tümör

T1b: En büyük boyutu 0.5 cm'den büyük olan ancak 1 cm'yi geçmeyen tümör

T1c: En büyük boyutu 1 cm'den büyük olan ancak 2 cm'yi geçmeyen tümör

T2: En büyük boyutu 2 cm'den büyük olan ancak 5 cm'yi geçmeyen tümör

T3: En büyük boyutu 5 cm'den büyük olan tümör

T4: Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım

T4a: Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı

T4b: Meme cildinde ödem veya ülserasyon veya aynı memede satelit deri nodülleri

T4c: T4a ve T4b birlikte

T4d: İnflamatuvar karsinom

Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu (N) Klinik sınıflandırma:

NX: Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır

NO: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: İpsilateral lenf nodlarına metastaz (fikse değil)

N2: Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak

belirgin aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda, klinik olarak belirgin

ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz

N2a: Fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz

N2b: Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığında, klinik olarak

belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz

N3: Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nodları

metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodları

metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiler ya

da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nodlarında metastaz

N3a: İpsilateral infraklavikular lenf nodlarında metastaz

N3b: İpsilateral internal mammaryal lenf nodlarında veya aksiller lenf nodlarında

metastaz

N3c: İpsilateral supraklavikular lenf nodlarında metastaz

Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu (N) Patolojik sınıflandırma :

pNX: Bölgesel lenf nodları saptanamamakta

pN0: Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı yok, izole tümör hücreleri için ek

inceleme yok

Not: İmmunohistokimyasal ya da moleküler yöntemlerle saptanabilen, 0.2 mm'den

daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya küçük hücre kümeleri izole tümör

hücreleri olarak tanımlanır. İzole tümör hücreleri proliferasyon veya stromal reaksiyon

gibi malign aktivite kanıtlarını genellikle göstermez.

pN0(i-): Bölgesel lenf nodu metastazı yok, immunhistokimya negatif

pN0(i+): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, İmmunohistokimyasal yöntemle pozitif <0.2 mm tümör varlığı

pN0(mol-): Lenf nodu metastazı yok, negatif polimeraz zincir reaksiyonu

pN0(mol+): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif polimeraz zincir reaksiyonu

pN1: 1–3 arası aksiller lenf nodlarında ve/veya internal mammaryal nodlarda sentinel

lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz

pN1mi: Mikrometastaz (0.2 mm'den geniş, 2.0 mm'den geniş değil)

pN1a: 1–3 adet aksiller lenf nodunda metastaz

pN1b: Sentinel lenf nodunda internal mammaryal nodlarda mikroskopik metastaz

pN1c: 1–3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz

pN2: 4–9 aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN2a: 4–9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm'den büyük en az bir tümör odağı)

pN2b: Aksiller lenf nodu metastazı yok iken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN3: 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya infraklavikular lenf nodlarında

veya bir ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin

ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz veya internal mammaryal lenf nodlarda klinik olarak negatif mikroskopik metastaz ile birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz veya ipsilateral supraklavikular lenf nodlarında metastaz

pN3a: 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm'den büyük en az bir tümör odağı) veya infraklavikular lenf nodlarına metastaz

pN3b: Bir veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında ipsilateral internal mammaryal lenf nodu metastazı veya sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan mikroskopik hastalıkla birlikte üç veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz

pN3c: İpsilateral supraklavikular lenf nodlarında metastaz

Uzak metastaz (M):

MX: Uzak metastaz bulunamıyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Evreleme :

Evre 0 : Tis N0 M0

Evre I : T1 N0 M0

Evre IIA : T0 N1 M0, T1 N1 M0, T2 N0 M0

Evre IIB : T2 N1 M0, T3 N0 M0

Evre IIIA : T0 N2 M0, T1 N2 M0, T2 N2 M0, T3 N1 M0, T3 N2 M0

Evre IIIB : T4, herhangi N M0. Herhangi T N3 M0

Evre IV : T ve N ne olursa olsun M1 içeren tüm hastalar

2.3.9. Tedavi :

Tedavi hastalık evresine göre planlanır. Tedavi planlaması yapılırken hastanın yaşı, menapoz durumu, ER, PR, HER2 durumları da dikkate alınır. Tedavide cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonoterapi ve hedefe yönelik tedaviden oluşan multidisipliner bir tedavi yaklaşımı uygulanır.

Cerrahi tedavi, küratif veya palyatif amaçlarla yapılır. Küratif cerrahide modifiye radikal mastektomi veya meme koruyucu cerrahiye ilave olarak, sentinal lenf nodu diseksiyonu veya aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılır. Metastatik meme kanserinde de semptomatik amaçla palyatif cerrahi girişimler uygulanabilir.

Kemoterapi; adjuvan kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi veya metastatik hastalıkta uygulanan kemoterapi şeklinde verilebilir. Erken evre meme kanserinde operasyon sonrası adjuvan kemoterapi uygulanır. Kullanılan kemoterapi rejimlerine örnek olarak CMF (Siklofosfamid, Metotreksat, 5-Fluorourasil), AC (Doxorubisin, Siklofosfamid), FAC (5-Fluorourasil, Doxorubisin, Siklofosfamid), FEC (5-Fluorourasil, Epirubisin, Siklofosfamid), TAC (Doksetaksel, Doxorubisin, Siklofosfamid) rejimleri verilebilir.

Radyoterapi, adjuvan veya palyatif amaçlarla uygulanabilir. Meme koruyucu cerrahi yapılmış olan hastalarda radyoterapi, tedavinin bir parçasıdır. Operasyon sonrası lenf nodu pozitif olan hastalarda önerilmektedir. Metastatik evrede radyoterapi, özellikle kemik ve beyin metastazı olan hastalarda palyatif amaçla yapılır.

Hormonoterapide ilaç seçimi hastanın ER, PR durumuna ve menapoz durumuna göre yapılır. Tedavide Tamoksifen gibi östrojen antagonistleri, Anastrozol, Letrozol gibi aromataz inhibitörleri ve Leuprolid, Goserelin gibi LH-RH analogları kullanılabilir.

Meme kanserinin tedavisinde son yıllarda hedefe yönelik tedavi de kullanıma girmiştir. Trastuzumab ve Panitumomab, HER2 pozitif meme kanserinde hedef yönelik tedavide kullanılan monoklonal antikorlardır.

2.4. MikroRNA ve MEME KANSERİ :

MikroRNA ve kanser arasındaki ilişki, 2002 yılında KLL hastalarında gösterildikten sonra, birçok kanser türünde miRNA'lar ile ilgili çalışmalar yapılmış, miRNA'ların diğer kanserlerin oluşumundaki rolleri araştırılmıştır.

Meme kanseri ve miRNA arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışma, 2005 yılında Iorio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (11). Bu çalışmada, 245 farklı miRNA, meme kanseri ve normal dokuda mikroarray yöntemi ile incelenmiş, sonuçta meme kanserinde miR-10b, miR-125b ve miR-145'in ekspresyon düzeyinin düşük; miR-21 ve miR-155'in ekspresyon düzeyinin ise yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışma göstermiştir ki, meme kanserinde miR-10b, miR-125b ve miR-145 birer tümör süpresör gen; miR-21 ve miR-155 ise birer onkogen olarak görev yapmaktadır (11).

miR-10b'nin meme kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-10b, meme kanserinde klinik progresyon ve metastaz ile ilişkili bulunmuştur (47).

Meme kanseri ile ilişkili miRNA'lardan birisi de miR-27a'dır. miR-27a, ZBTB10 adlı transkripsiyon faktörü üzerinden etki gösteren, onkogenik potansiyele sahip bir miRNA'dır (48).

miR-125a ve miR125-b, meme kanserinde tümör süpresör gen olarak görev yapan miRNA'lardır. Bu miRNA'lar, HER2 ve HER3 adlı tirozin kinaz reseptörlerinin ekspresyonunu baskılayarak etkilerini gösterirler (49).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, meme kanserinde onkogen veya tümör süpresör gen olarak görev yapan birçok miRNA bulunmuştur (Şekil 2.10).

MicroRNA	Targets	Aberrant expression and roles
MiR-21	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN	Overexpressed and play oncogenic role
MiR-10b	Homeobox D10	Down modulated, but associated with metastatic potential
MiR-27a	ZBTB10	Oncogenic role in breast cancer cells
MiR-206	ER α	Overexpressed
MiR-17-5p	AIB1	Oncosuppressor in breast cell lines
MiR-125a, miR-125b	ERBB2, ERBB3	Down modulated and act as oncosuppressor
Let-7	RAS, HMGA2	Down modulated and reduced in BT-ICs
MiR-205	HER3	Down modulated

Şekil 2.10: Meme kanseri gelişiminde rol oynayan miRNA'lar

Yan ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, meme kanserinde miR-21 ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada, artmış miR-21 ekspresyon düzeyi; ileri evre, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (50). miR-21'in hedef genlerinden birisi Bcl-2 genidir. miR-21 ile ilgili invitro ve invivo yapılan çalışmalarda, miR-21 süpresyonunun, antiapoptotik bir gen olan Bcl-2 downregülasyonuna ve apoptozisin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (51).

miR-21'in meme kanserinde başka bir hedef geni Tropomyosin 1 (TPM1)'dir (52). Bu gen, mikroflamanların bağlanması gibi önemli antionkojenik fonksiyonları olan bir genidir. miR-21'in meme kanserinde PTEN ve protein programmed cell death 4 (PDCD4) adlı başka hedef genleri de vardır (53). miR-21 ile ilgili yapılan tüm bu çalışmalar, sonuçta, miR-21'in meme kanseri gelişiminde bir onkogen gibi davrandığını ve bu nedenle meme kanserinde miR-21 ekspresyon düzeyinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Bizim çalışmamızda, meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiş olan miR-21'in ekspresyon düzeyi ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

III- GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, retrospektif bir çalışmadır. Bu çalışma için, meme kanseri nedeniyle hastanemizde opere olmuş meme kanseri hastalarının hastanemiz patoloji laboratuvarında mevcut olan patoloji preparatları miR-21 ekspresyon düzeyi yönünden geriye dönük olarak incelenmiş ve tümör dokusundaki miR-21 ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Bu çalışma için yerel etik kurul onayı alınmıştır. İstanbul 3 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30.12.2009 tarih ve 2009-KK-063 sayılı yazısı ile bu çalışmanın etik kurul onayı alınmıştır.

3.1. HASTALARIN SEÇİMİ :

Bu çalışmaya GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde 2006-2009 yılları arasında meme kanseri tanısı konmuş 15 kadın hasta alındı. Çalışmaya alınan hastalar, meme kanseri nedeniyle opere olmuş hastalar idi. Evreleme sistemi olarak 2002 yılında Amerikan Birleşik Kanser Komitesi tarafından yayınlanan ve halen geçerliliğini koruyan TNM Evreleme Sistemi (*AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition, 2002*) kullanıldı.

Operasyon sonrası sonuçlanan ayrıntılı patoloji raporlarına göre, hastaların tümör çapı, tutulan lenf nodu sayısı, evresi, östrojen reseptör durumu, progesteron reseptör durumu ve c-ERB-B2 (HER-2) durumu belirlendi.

3.2. ÇALIŞMA PLANI :

3.2.1. Çalışma planının oluşturulması :

Bu çalışma için öncelikle bir çalışma planı oluşturuldu. Bu çalışma, sırasıyla şu basamaklardan oluşacak şekilde planlandı :

- Çalışmaya alınacak hastaların dokularının çıkarılması
- Dokudan total RNA ekstraksiyonu
- Total RNA'dan komplementer DNA (c-DNA) oluşturulması
- c-DNA'dan Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction: RT-PCR*) ile miR-21 sekansının amplifikasyonu
- miR-21 ekspresyon düzeyinin sayısal analizi ve miR-21 ekspresyon düzeyi ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişkinin incelenmesi

3.2.2. Çalışmaya alınacak örneklerin belirlenmesi :

Bu çalışmaya meme kanseri nedeniyle opere olmuş kadın hastalar alındı. Çalışmaya alınan hastalar, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji Laboratuvarı arşiv kayıtlarından seçildi. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde 2006-2009 yılları arasında meme kanseri nedeniyle opere olmuş kadın hastalardan 15 tanesi rastgele seçilerek bu çalışmaya alındı.

3.2.3. Hastaların patoloji preperatlarının çıkarılması :

Çalışmaya alınan hastaların patolojide mevcut olan, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (*formalin-fixed and paraffin-embedded: FFPE*) dokuları (parafin blokları), patoloji arşivinden çıkarıldı.

3.2.4. Tümör dokusu ve normal dokunun ayrılması :

miR21'in tümör dokusundaki ekspresyon düzeyini karşılaştırmak için kontrol grubu olarak yine aynı hastanın normal meme dokusu alındı. Bunun için, her bir hastanın parafin bloklarına ait, kesit alınmış ve Hematoxilen-Eozin ile boyanmış lamaları ışık mikroskopunda incelendi. Buna göre, her hasta için, kesit yüzeyinde tümör dokusu mevcut olan bir adet parafin blok ve kesit yüzeyinde normal doku mevcut olan bir adet parafin blok seçildi.

3.2.5. Parafin bloklardan kesit alınması :

Mikrotom ile tümörden dokusuna ait parafin bloktan ve normal dokuya ait parafin bloktan her biri 10 mikron kalınlığında ikişer kesit alındı. Tümör dokusunun kesitleri ve normal dokunun kesitleri iki ayrı eparandorf tüpüne yerleştirildi.

3.2.6. Deparafinizasyon :

Parafine gömülmüş dokunun icelenebilmesi için öncelikle dokunun parafinden arındırma işlemi (deparafinizasyon) yapıldı.

Bu çalışmada total RNA ekstraksiyonu için *Absolutely RNA FFPE Kit* (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA) kullanıldı. Deparafinizasyon işlemi için ise, bu kite ait bir deparafinizasyon solüsyonu olan *d-limonene* adlı solüsyon kullanıldı.

Deparafinizasyon için öncelikle, içinde parafin bloktan doku alınmış her bir eparandorf tüpüne 1 mililitre d-limonene solüsyonu kondu. Sonra tüpler 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Sonra 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. 10 dakika boyunca iki defa 10'ar saniye vorteks ile karıştırıldı.

İnkübasyonu takiben tüpler 15 Santigrad derece ısıda 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı bir pipetle dışarı

alındı. Sonra tekrar 1 mililitre d-limonene solüsyonu eklenerek, yukarıda belirtildiği gibi vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi ve yukarıda belirtildiği gibi 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üstte kalan sıvı bir pipetle dışarı alındı.

Deparafinizasyon solüsyonunu dokudan uzaklaştırmak için alkol ile muamele işlemleri yapıldı. Bunun için önce her bir tüpe 1 mililitre % 100 etanol kondu. Sonra 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Sonra 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üstte kalan sıvı bir pipetle dışarı alındı. Sonra 1 mililitre % 90 etanol kondu. Sonra 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Sonra 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üstte kalan sıvı bir pipetle dışarı alındı. Sonra 1 mililitre % 70 etanol kondu. Sonra 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Sonra 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üstte kalan sıvı bir pipetle dışarı alındı. Tüplerde sıvı kalmaması için tekrar 1 dakika santrifüj edildi. Sonra üstte kalan sıvı olduysa bu sıvı da bir pipetle dışarı alındı. Sonra tüpler 5 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı.

3.2.7. Proteinaz K ile inkübasyon :

Deparafinize edilen dokunun tamamen parçalanması ve doku içindeki nükleik asitlerin açığa çıkması için, dokular Proteinaz K ile parçalama işlemine tabi tutuldu. Bunun için, *Absolutely RNA FFPE Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA)* içeriğinde bulunan Proteinaz K Digestion Buffer ve Proteinaz K kullanıldı. Her bir örneğe 100 mikrolitre Proteinaz K Digestion Buffer ve 10 mikrolitre Proteinaz K eklendi. Sonra örnekler 55 Santigrad derecede 18 saat inkübe edildi.

3.2.8. Total RNA ekstraksiyonu :

Total RNA ekstraksiyon kiti olarak *Absolutely RNA FFPE Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA)* kullanıldı.

Proteinaz-K işleminden sonra her bir örneğe 0,875 mikrolitre Beta-Merkaptoetanol ve 125 mikrolitre RNA Binding Buffer eklendi. Örnekler vorteksle karıştırıldı.

Bu aşamadan sonra, her bir örneğin tüpü değiştirildi ve her bir örnek, nükleik asit harici hücre elemanlarının ayrıştırılması için özel filtreli tüplere alındı. Bu tüplere alınan örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Nükleik asit harici hücre elemanlarını tutan filtreler bu aşamadan sonra atıldı. Tüpte biriken filtrata her bir filtrata eşit miktarda olacak şekilde %90 Sülfolan eklendi (Bu işlem için, normalde oda ısısında katı halde bulunan %100 Sülfolan, 37 Santigrad derecede su banyosunda bir gece inkübe edilerek sıvı hale getirildi. Daha sonra dilüe edilerek % 90 Sülfolan haline getirildi.).

Sülfolan eklenmiş örnekler 5 saniye vorteks ile karıştırıldı. Bu aşamadan sonra yine her bir örneğin tüpü değiştirildi ve her bir örnek, RNA bağlayan özel filtreli tüplere alındı. Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. RNA bağlayan özel filtreler alındı, tüpte biriken filtrat uzaklaştırıldı.

Her bir örneğe 600 mikrolitre Low Salt Wash Buffer eklendi (Bu işlemden önce Low Salt Wash Buffer'a 68 mililitre %100 etanol eklenerek aktif Low Salt Wash Buffer oluşturuldu ve oda ısısında muhafaza edildi.). Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. RNA bağlayan özel filtreler alındı, tüpte biriken filtrat uzaklaştırıldı. Sonra filtre fiber matriksinin kuruması için örnekler 14000 devirde 2 dakika santrifüj edildi.

Bu aşamadan sonra, örneklerdeki nükleik asit içeriğinden DNA'yı uzaklaştırmak için RNase-free DNase I ve DNase Digestion Buffer kullanıldı (Bu işlemden önce RNase-free DNase I'e 290 mikrolitre DNase Reconstiton Buffer eklenerek aktif RNase-free DNase I oluşturuldu ve -20 Santigrad derecede muhafaza edildi.). Her bir örneğe 5 mikrolitre RNase-free DNase I ve 25 mikrolitre DNase Digestion Buffer eklendi. Sonra 37 Santigrad derecede 15 dakika inkübe edildi.

DNA'sı uzaklaştırılan örneklere 500 mikrolitre High Salt Wash Buffer eklendi (Bu işlemden önce High Salt Wash Buffer'a 16 mililitre %100 etanol eklenerek aktif High Salt Wash Buffer oluşturuldu ve oda ısısında muhafaza

edildi.). Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. RNA bağlayan özel filtreler alındı, tüpte biriken filtrat uzaklaştırıldı.

Her bir örneğe 600 mikrolitre Low Salt Wash Buffer eklendi. Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. RNA bağlayan özel filtreler alındı, tüpte biriken filtrat uzaklaştırıldı. Sonra her bir örneğe 300 mikrolitre Low Salt Wash Buffer eklendi. Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. RNA bağlayan özel filtreler alındı, tüpte biriken filtrat uzaklaştırıldı. Sonra filtre fiber matriksinin kuruması için örnekler 14000 devirde 2 dakika santrifüj edildi.

Bu aşamadan sonra, her bir örneğin tüpü değiştirildi ve her bir örnek, total RNA'nın filtrat şeklinde tüp içinde birikmesi için ayrı tüplere alındı. Bu aşamada, total RNA'nın RNA bağlayıcı filtereden ayrılıp alttaki tüpe filtrat olarak geçmesi için Elution Buffer kullanıldı (Bu işlemde önce Elution Buffer 75 Santigrad derecede ısıtıldı.). 75 Santigrad derecede ısıtılmış olan Elution Buffer solüsyonundan her bir örneğe 30 mikrolitre eklendi. Örnekler 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası total RNA tüpte toplandı. RNA bağlayan özel filtreler atıldı.

Total RNA miktarı, Optik Yoğunluk Ölçüm Cihazı (Nanodrop) ile 260 nanometre dalga boyunda ölçüldü. Ayrıca total RNA, Etidyum Bromid ile yapılan Agaroz Jel Elektroforezi ile de görüntülendi. Total RNA'lar -20 Santigrad derecede muhafaza edildi.

3.2.9. PolyA reaksiyonu :

miRNA, kısa zincire sahip bir RNA molekülü olduğu için, standart RT-PCR ile ölçümü zor olmaktadır. Bu nedenle de yanıltıcı sonuçlar çıkabilmektedir.

Bunun için, miRNA'nın ucuna eklenen PolyA adındaki küçük bir nükleotid dizisi ile miRNA uzatılmaktadır. PolyA oluşturmak için, total RNA, *E. coli poly A polymerase* enzimine tabi tutulmaktadır. Oluşan PolyA, total RNA içinde bulunan miRNA'nın ucuna bağlanarak c-DNA oluşumu sırasında hedef miRNA dizisini uzatmaktadır. Böylece miRNA ölçüm sonuçlarının daha

güvenli bir şekilde çıkması sağlanmaktadır. Bu nedenle, bu aşamada, PolyA reaksiyonu ile hedef miRNA dizisi uzatıldı.

PolyA reaksiyonu için *miRNA QRT-PCR Master Mix Detection Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA)* kullanıldı.

PolyA reaksiyonunda, her bir örnek için, 0,5 mililitrelik bir mikrosantrifüj tüpüne 250 nanogram total RNA, 4 mikrolitre poly A polymerase buffer, 1 mikrolitre rATP ve tüm karışımı total 20 mikrolitreye tamamlayacak şekilde RNaz içermeyen su kondu. Son olarak, örnekler 1'er mikrolitre E. coli poly A polymerase eklendi. Karışım vorteks yapılmadan nazikçe karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Sonra örnekler 37 Santigrad derecede yarım saat inkübe edildi. Sonra da 95 Santigrad derecede 5 dakika bekletildi. Böylece RNA'ya polyA eklenmiş oldu. PolyA eklenmiş RNA'lar -20 Santigrad derecede muhafaza edildi.

3.2.10. c-DNA oluşumu :

RNA'dan PCR yapılacağı için öncelikle c-DNA oluşturuldu. C-DNA oluşumu için *miRNA QRT-PCR Master Mix Detection Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA)* kullanıldı.

c-DNA oluşumu işleminde her bir örnek için, 0,5 mililitrelik bir mikrosantrifüj tüpüne 10 mikrolitre polyA yapılmış RNA, 2 mikrolitre AffinityScript RT buffer, 0.8 mikrolitre dNTP mix, 1 mikrolitre RT adaptor primer, 1 mikrolitre AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture ve tüm karışımı total 20 mikrolitreye tamamlayacak şekilde RNaz içermeyen su kondu. Karışım vorteks yapılmadan nazikçe karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Örnekler 55 Santigrad derecede 5 dakika, 25 Santigrad derecede 15 dakika, , 42 Santigrad derecede 30 dakika ve 95 Santigrad derecede 5 dakika inkübe edildi. Sonra her bir örneğe 280 mikrolitre RNaz içermeyen su kondu. Böylece c-DNA oluşturulmuş oldu.

c-DNA, Etidyum Bromid ile yapılan Agaroz Jel Elektroforezi ile görüntülendi. c-DNA'lar, -20 Santigrad derecede muhafaza edildi.

3.2.11. RT-PCR :

RT-PCR için *miRNA QRT-PCR Master Mix Detection Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products, La Jolla, CA, USA)* kullanıldı. miR-21 primer'ı olarak da, miR-21 baz dizilişine göre hazırlanmış olan (5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3) 22 bazlık RNA oligonükleotid primer'ı (*Integrated DNA Technologies Inc. Iowa, USA*) kullanıldı.

RT-PCR hazırlanırken, her bir örnek için, 0,5 mililitrelik bir mikrosantrifüj tüpüne 1 mikrolitre c-DNA, 2,5 mikrolitre core PCR buffer, 2,75 mikrolitre MgCl₂, 1 mikrolitre dNTP mix, 1,25 mikrolitre EvaGreen dye, 1 mikrolitre universal reverse primer, 1 mikrolitre miR-21 spesifik forward primer ve 0,5 mikrolitre High-Specificity PCR enzyme blend kondu. Karışım vorteks yapılmadan nazikçe karıştırıldı.

RT-PCR için *Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany)* Real Time PCR cihazı kullanıldı. 95 Santigrad derecede 10 dakika bir siklus, 95 Santigrad derecede 10 saniyede kırk siklus, 60 Santigrad derecede 15 saniyede kırk siklus ve 72 Santigrad derecede 20 saniyede kırk siklus olacak şekilde Real Time PCR cihazı programlandı. Sonuçlar cihazın kendi yazılımı ile değerlendirildi. Ayrıca, miR-21 RT-PCR örnekleri, Etidyum Bromid ile yapılan Agaroz Jel Elektroforezi ile de görüntülendi.

3.2.12. RT-PCR sonuçlarının sayısal analizi :

miR-21 ekspresyon düzeyinin sayısal (kantitatif) analizi için, aynı siklus içinde alınan rölatif floresan ünitesi (*Relative fluorescence unit. RFU*) değerleri kullanıldı. Buna göre, tüm örnekler için RT-PCR'ın 24. siklusundaki RFU değerleri ölçüldü. Her bir örnek için alınan RFU değeri kantitatif analizde sayısal değer olarak kullanıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Değerlendirmeye alınan hasta sayısının 20'den küçük olması nedeniyle, grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığını saptamak için Mann-Whitney U testi yapıldı. Sonuçlar, % 95 güven aralığı içinde, $p < 0,05$ bulunduğu anda anlamlı olacak şekilde yorumlandı. Tüm istatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı kullanıldı.

IV- BULGULAR

4.1. HASTALARIN GENEL ÖZELLİKLERİ :

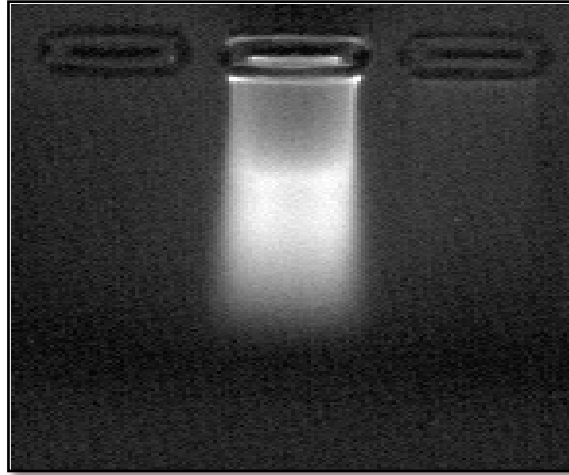
Çalışmaya meme kanseri nedeniyle opere olmuş 15 kadın hasta alındı. Hastaların yaşı 42 ile 85 arasında, ortalama yaş 59,3 idi (Tablo 4.1)

Tablo 4.1: Hastaların genel özellikleri :

Özellikler	sayı	Özellikler	sayı
<u>Yaş (yıl)</u>		<u>Histopatoloji</u>	
En küçük	42	İnv. duktal kars.	10
En büyük	85	İnv. lobüler kars.	2
Ortalama	59,3	İnflamatuvar	1
Ortanca	55	Mikst	1
<u>Cinsiyet</u>		<u>Tümör çapı (cm)</u>	
Kadın	15	T ₁	1
Erkek	0	T ₂	12
<u>Evre</u>		T ₃	2
Evre I	1	T ₄	0
Evre II	8	<u>ER ,PR, HER2 durumu</u>	
Evre III	6	ER(-), PR (-), HER2 (-)	1
Evre IV	0	ER(+), PR (+), HER2 (-)	9
<u>Lenf nodu</u>		ER(-), PR (-), HER2 (+)	5
N ₀	6		
N ₁	3		
N ₂	6		
N ₃	0		

4.2. TOTAL RNA EKSTRAKSİYONU SONUCU :

Parafin dokudan ekstrakte edilen total RNA, Agaroz Jel Elektroforezinde yürütülmüş ve burada total RNA bandı görülmüştür (Şekil 4.1). Ayrıca, total RNA miktarı, Optik Yoğunluk Ölçüm Cihazı (Nanodrop) ile de ölçülmüştür. Nanodrop ile 260 nanometre dalga boyunda ölçülen Total RNA miktarları beklenen düzeyde bulunmuştur (Örneklerdeki total RNA miktarları 18 nanogram/mikrolitre ile 423 nanogram/mikrolitre arasında bulunmuştur). Buna göre, çalışmamızdaki total RNA ekstraksiyonu işleminin başarılı olduğu görülmüştür.

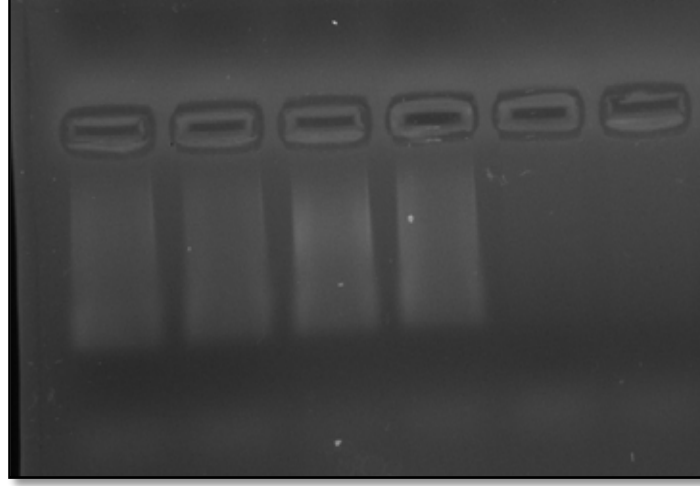


Şekil 4.1: Agaroz Jel Elektroforezinde görüntülenen total RNA bandı

4.3. c-DNA SONUCU :

Total RNA'dan polyA reaksiyonu sonrası oluşturulan c-DNA, Agaroz Jel Elektroforezinde yürütülmüş ve burada c-DNA bandı görülmüştür. Buna

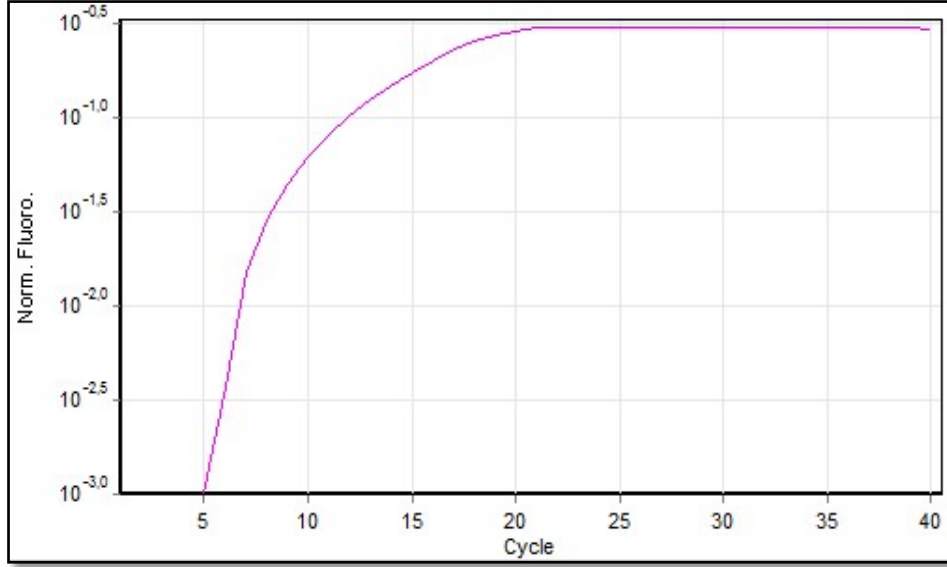
göre, çalışmamızdaki c-DNA oluşturma işleminin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Agaroz Jel Elektroforezinde görüntülenen c-DNA bantları

4.4. RT-PCR SONUCU :

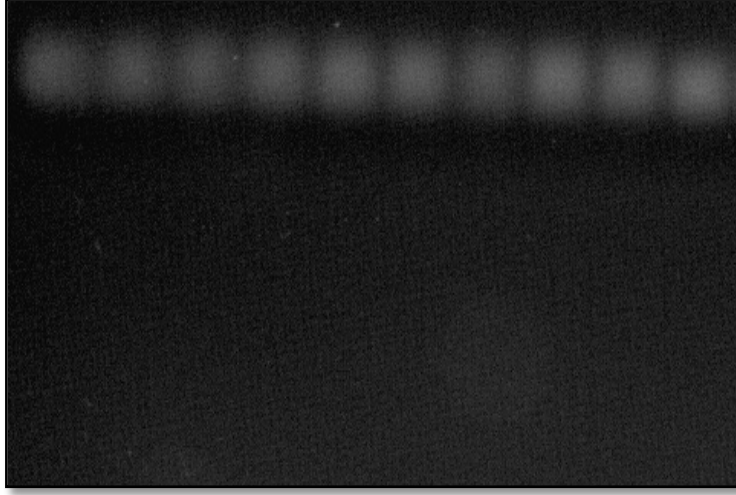
c-DNA'dan miR-21 primer ile yapılan RT-PCR sonucuna göre, tümör dokusundan alınan örneklerde belirgin miR-21 ekspresyonu görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Tümör dokusunda gözlenen miR-21 RT-PCR eğrisi

RT-PCR sonucuna göre, miR-21 ekspresyon eğrisinde 5. Sikludan itibaren pik görülmeye başlanmış, 20. Sikludan itibaren ise amplifikasyon durmuş ve eğride plato gözlenmiştir (Şekil 4.3).

miR-21 RT-PCR örnekleri ayrıca, Agaroz Jel Elektroforezinde de yürütülmüş ve burada miR-21 bantları görülmüştür. Buna göre, çalışmamızdaki miR-21 ekspresyonu ölçüm işleminin başarılı olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Agaroz Jel Elektroforezinde görümlenen miR-21 bantları

Rölatif floresan ünitesi (*Relative fluorescence unit: RFU*) değeri, Eva green boyası ile boyanan c-DNA'nın hedef sekansının amplifikasyonu ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyalini yansıtmaktadır. Bu nedenle RT-PCR sayısal (kantitatif) analizinde kullanılan güvenli bir parametredir. Bizim çalışmamızda da miR-21 ekspresyon düzeyinin kantitatif analizi için, aynı siklus içinde alınan RFU değeri kullanılmıştır. Çalışmamızda tüm örnekler için RT-PCR'ın 24. siklusundaki RFU değeri ölçülmüştür. Her bir örnek için alınan RFU değeri, kantitatif analizde sayısal değer olarak kullanılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: RT-PCR ile ölçülen RFU değerleri

Quantitative analysis of channel Cycling E.Green (RFU values)						
SAMPLE	23	24	25	26	27	28
2	0,119156	0,129398	0,139265	0,148685	0,157979	0,167380
3	0,154725	0,167696	0,180442	0,192858	0,205209	0,217774
4	0,15705	0,169819	0,182426	0,194714	0,206857	0,219087
5	0,148361	0,160625	0,173039	0,185426	0,197943	0,210625
6	0,157752	0,170539	0,183662	0,196951	0,210453	0,224149
7	0,149875	0,161832	0,173512	0,184898	0,196408	0,208364
8	0,152415	0,165286	0,177900	0,190125	0,202193	0,214320
9	0,190504	0,206309	0,222291	0,238284	0,254389	0,270744
10	0,170853	0,185641	0,200509	0,215239	0,229921	0,244672
11	0,301938	0,302608	0,303141	0,303413	0,30342	0,303213
12	0,121277	0,131377	0,141639	0,151947	0,162404	0,173051
13	0,13147	0,143019	0,154661	0,166169	0,177669	0,189261
14	0,148638	0,161107	0,173808	0,186623	0,199662	0,212987
15	0,164277	0,177556	0,191278	0,205302	0,219689	0,234522

Aynı hastaya ait tümör dokusu ile normal dokudaki miR-21 ekspresyon düzeyleri incelendiğinde tümör dokusunda normal dokuya göre hafif bir artış gözlenmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Doku tipine göre miR-21 ekspresyon düzeyleri

<u>Doku tipi</u>	<u>miR-21 için ortalama RFU değeri</u>
Tümör dokusu	0,38175812 (p=0,152)
Normal doku	0,16314950

Çalışmamızda, meme kanserindeki miR-21 ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir. İncelenen klinikopatolojik özellikler; evre, tümör çapı, tutulan lenf nodu sayısı, hormon reseptör durumu ve HER2 durumudur. Bunun için, öncelikle her klinikopatolojik özellik kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Evre, Evre I – II ve Evre III olmak üzere, tümör çapı 3 cm veya altı ve 3 cm üzeri olmak üzere, tutulan lenf nodu sayısı 3 veya altı ve 3 üzeri olmak üzere, hormon reseptör durumu ER veya PR'den en az biri pozitif ve ER, PR negatif olmak üzere ve HER2 durumu HER2 negatif ve HER2 pozitif olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Gruplar arası miR-21 ekspresyon düzeyi ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak incelenmiştir. Sonuçta, tüm klinikopatolojik özellikler için, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Klinikopatolojik özelliklere göre miR-21 ekspresyon düzeyleri

<u>Evre</u>	<u>miR-21 için ortalama RFU değeri</u>	
Evre I-II	0,16081691	(P=0,637)
Evre III	0,16294874	
<u>Tümör çapı</u>		
2 cm veya altı	0,16981874	(P=0,643)
2 cm üzeri	0,16108757	
<u>Tutulan lenf nodu</u>		
3 veya altı	0,16081691	(P=0,637)
3 üzeri	0,16294874	
<u>Hormon reseptör durumu</u>		
ER veya PR'nin en az biri pozitif	0,17529296	(P=0,083)
E ve P negatif	0,15826382	
<u>HER2 durumu</u>		
HER2 negatif	0,15755359	(P=0,178)
HER2 pozitif	0,16990176	

V- TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, tanı ve tedavisinde son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Meme kanserinin moleküler biyolojisinin aydınlatılması sonucu, meme kanserinde hedefe yönelik tedaviler bulunmuş ve bu tedaviler hastalığın prognozuna olumlu katkılar sağlamıştır.

miRNA'lar, son on yıldır üzerinde çalışmalar yapılan ve kanser ile yakın ilişkisi bulunduğundan sonra önemi her geçen gün daha da artan moleküllerdir. miRNA'ların meme kanseri patogeneğinde rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin tanı ve tedavisinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, miRNA ve meme kanseri ile ilgili çalışmalar son yıllarda daha da hız kazanmıştır. Ülkemizde ise, literatür taramalarından edindiğimiz bilgiye göre, henüz miRNA ile ilgili yapılmış klinik bir çalışma yoktur.

Meme kanserinde miRNA ile ilgili ilk çalışma, Iorio ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışma olmuştur (11). Bu çalışmada 245 farklı miRNA, tümör dokusu ve sağlam dokuda mikroarray yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, tümör dokusunda bazı miRNA'ların ekspresyon düzeyi yüksek, bazılarının ise düşük bulunmuştur. Ekspresyon düzeyi yüksek bulunan miR-21 ve miR-155'in meme kanserinde birer onkogen; ekspresyon düzeyi düşük bulunan miR-10b, miR-125b ve miR-145'in ise meme kanserinde birer tümör süpresör gen gibi görev yaptığı gösterilmiştir (11).

Bu çalışmadan sonra meme kanserinde miRNA ile ilgili çalışmalar hız kazanmış, son yıllarda bu konuda birbiri ardına çalışmalar yapılmıştır. Ma ve arkadaşları tarafından miR-10b'nin meme kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-10b, meme kanserinde klinik progresyon

ve metastaz ile ilişkili bulunmuştur (47). Yapılan başka bir çalışmada, meme kanserinde miR-27a, ZBTB10 adlı transkripsiyon faktörü üzerinden etki gösteren, onkogenik potansiyele sahip bir miRNA olarak bulunmuştur (48).

Scott ve arkadaşları, miR-125a ve miR125-b'nin meme kanserinde tümör süpresör gen olarak görev yapan miRNA'lar olduğunu göstermiştir. (49). Bu çalışmada, miR-125a ve miR125-b'nin HER2 ve HER3 adlı tirozin kinaz reseptörlerinin ekspresyonunu baskılayarak etki ettiği gösterilmiştir (49).

Yan ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, meme kanserinde miR-21 ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir (50). Yine bu çalışmada, artmış miR-21 ekspresyon düzeyi; ileri evre, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da meme kanserinde miR-21 ekspresyonu araştırılmıştır. Çünkü miR-21, miRNA'lar içinde en iyi incelenmiş miRNA'lardan birisidir ve potansiyel onkogen olarak tanımlanmıştır. Akciğer, meme, mide, prostat, kolon, beyin, baş-boyun, ösefagus ve pankreas kanseri gibi bir çok solid tümörde miR-21 ekspresyon düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir (51). Yan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada miR-21, meme kanserinde ekspresyon düzeyi en yüksek olan miRNA olarak bulunmuştur (50).

miR-21, meme kanserinden başka kanser türlerinde de önemli rol oynayan bir miRNA'dır. Chan ve arkadaşları, mikroarray ve Northern Blot analiz yöntemlerini kullanarak, miR-21'in GBM'de kuvvetli bir şekilde overeksprese olduğunu göstermiştir (54). miR-21'in bu hastalarda apoptozis ile ilişkili genleri bloke ederek etki eden bir antiapoptotik faktör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca, miR-21'in kolanjiokarsinomda da ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (55).

Yan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 435 farklı miRNA, meme kanseri ve normal dokuda mikroarray yöntemi ile incelenmiş, sonuçta 9 tane miRNA'nın meme kanserinde ekspresyon düzeyinin arttığı, 7 tane miRNA'nın ise ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (50). Bu çalışmaya göre miR-21, meme kanserinde ekspresyon düzeyi en yüksek olan miRNA'dır.

Bizim çalışmamızda da meme kanserinde miR-21 ekspresyonu gösterilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre, çalışmaya alınan tüm hastaların tümörlü dokularında miR-21 ekspresyonu olduğu görülmüştür. Tümörlü dokuların yanında, tümörlü dokunun karşılaştırılması için alınan normal dokularda da miR-21 ekspresyonu olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, operasyon materyalinden alınan parafin bloklar içinden, ışık mikroskobu ile değerlendirildikten sonra, normal doku kesiti görülen parafin bloklar seçilmiş ve bu parafin bloklardan alınan kesitler normal doku olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, normal doku olarak seçilmiş olsa dahi, içinde bir tane de olsa tümör hücresi olabileceğinden dolayı, normal kabul edilen dokularda da miR-21 ekspresyonu görüldüğü düşünülmüştür.

Yan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tümör dokusu ile normal doku arasındaki miR-21 ekspresyon düzeyinde belirgin bir farklılık bulunmuştur. Çünkü, bu çalışmada parafin blok değil, taze doku kullanılmıştır ve normal doku, tümör dokusunun en az 2 cm uzağından olacak şekilde alınmıştır. Bu yüzden normal dokuda hiçbir tümör hücresi yoktur ve bu nedenle normal dokuda miR-21 ekspresyonu belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise taze doku değil, parafin blok ile çalışılmış ve normal doku, ışık mikroskopunda normal doku kesiti görülen parafin bloklardan seçilmiştir. Bu nedenle de, normal doku olarak kabul edilmesine rağmen, çok düşük bir ihtimalle de olsa tümör hücresi içerebileceği düşünülen bu dokularda miR-21 ekspresyon düzeyi beklenenden yüksek bulunmuştur.

Parafin dokudan kesit alınarak yapılan ve aynı hastanın normal dokusu kontrol amacı ile kullanılan bazı miRNA çalışmalarında, tümör hücresi içermeyen normal dokunun tam olarak tespit edilebilmesi için, lazer diseksiyon (*laser-capture microdissection*) yöntemi ile ışık mikroskobu altında normal doku lazer yardımıyla kesilip çıkarılabilmektedir (56). Ancak bu yöntem, çok sayıda örnekleme yapıldığı durumlarda çok fazla zaman almaktadır. Ayrıca, miRNA kısa zincire sahip, küçük bir RNA molekülüdür ve bu nedenle ekspresyon düzeyini tespit etmek için yeterli miktarda doku gerekmektedir. Bu yüzden de lazer diseksiyonu ile alınan doku miktarı bazen

yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda lazer diseksiyon yöntemi kullanılmamıştır

Çalışmamızda miR-21 ekspresyon düzeyleri klinikopatolojik özellikler yönünden incelendiğinde, aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Yan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, meme kanserinde artmış miR-21 ekspresyon düzeyi; ileri evre, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda anlamlı bir fark bulunmamasının, örnek sayısının az olmasına ve çalışmaya alınan hasta grubunun yeterince heterojen dağılım göstermemesine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Dokudan nükleik asit izolasyon ve ölçüm işlemleri, teknik açıdan zordur ve her aşamada büyük dikkat gerektirmektedir. Nükleik asitler, DNAz ve RNAz enzimleri ile çok çabuk parçalanabilen moleküllerdir. Bu enzimler ise insan cildi dahil, doğada her yerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle DNA ve RNA, ekstraksiyon işlemleri sırasında çok kolay parçalanabilmektedir. Bunun için, işlemler DNAz ve RNAz'dan tamamen arındırılmış biyolojik güvenlik kabininde yapılmakta ve yine bu enzimlerden tamamen arındırılmış steril malzemelerle kullanılmaktadır.

RNA ekstraksiyonu, DNA ekstraksiyonuna göre daha zordur. Çünkü RNA, DNA'ya göre daha hassastır ve daha çabuk parçalanır. Ekstrakte edilen RNA'dan miRNA elde etme işlemi sırasında ise başka güçlükler yaşanmaktadır. miRNA, yaklaşık 22 nükleotidlik kısa bir zincire sahiptir ve bu nedenle klasik PCR yöntemleri ile hedef sekansın amplifikasyonu zor olmaktadır. Bu nedenle, c-DNA oluşumundan önce polyA reaksiyonu ile hedef zincir uzatılmakta ve bu şekilde PCR işlemi daha güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir.

miRNA'lar yeni bulunan moleküller olması ve miRNA elde etme işleminin bu şekilde teknik ayrıntısı çok, dikkat gerektiren, uzun ve zor işlemler olması nedeniyle dünyada sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ülkemizde ise, literatür taramalarından edindiğimiz bilgiye göre, henüz miRNA ile ilgili yapılmış klinik bir çalışma yoktur. Bu nedenle, ülkemizde bundan sonra yapılacak olan miRNA çalışmalarına da ışık tutması amacıyla,

miRNA elde etme işleminin aşamaları, çalışmamızın gereç ve yöntem bölümünde tüm ayrıntıları ile anlatılmıştır.

miRNA, taze dondurulmuş (fresh frozen) dokuda, parafin dokuda, hücre kültürlerinde ve kanda bakılabilir. RNA, DNA'ya göre daha hassas ve daha çabuk bozulan bir moleküldür. Bu nedenle, parafin bloğa alınan dokunun üzerinden belirli bir süre geçtikten sonra miRNA elde etmek çok zordur. Ancak, bu konuda yapılmış birçok çalışma, parafin dokudan elde edilen miRNA'nın da en az taze dondurulmuş dokudan elde edilen miRNA kadar güvenilir olduğunu göstermiştir. Siebolts ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, RT-PCR ile miRNA tespiti için 86 farklı hastanın parafin dokusundan RNA ekstraksiyonu yapılmıştır (57). Bu çalışmada aynı zamanda taze dondurulmuş dokudan da ekstraksiyon yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçta, 7 yıla kadar olan parafin dokulardan miRNA tespiti başarılı bir şekilde yapılmış, taze dondurulmuş doku ile karşılaştırıldığında da aralarında belirgin bir fark bulunamamıştır. 10 yıldan daha eski olan parafin dokularda ise başarı oranı düşük bulunmuştur (57).

Doleshal ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da, en eskisi 12 yıllık olmak üzere, 17 farklı kanser dokusundan alınan 65 ayrı parafin doku örneği miRNA yönünden incelenmiş ve miRNA ekspresyon düzeyleri taze dondurulmuş dokudaki düzeyler ile karşılaştırılmıştır (58). Sonuçta, parafin dokudan miRNA elde etme yönteminin gayet başarılı ve güvenilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da miRNA, parafin dokudan elde edilmiştir. Çalışmamızda en eski parafin doku 4 yıllıktır ve tüm dokulardan miRNA tespiti başarılı bir şekilde yapılmıştır.

miRNA ölçümünde kullanılan teknikler; *oligonucleotide microchip (microarray)*, *Northern blotting*, *bead-based flow-cytometry* ve RT-PCR'dır. Günümüzde miRNA çalışmaları daha çok mikroarray yöntemi ile yapılmaktadır. Mikroarray yöntemi bir gen çip teknolojisi yöntemidir. Bu yöntemde, farklı miRNA problemleri kullanılarak bir doku örneğinde aynı anda yüzlerce miRNA birden bakılabilmektedir. Sonuçta, alınan sinyal değişiklikleri farklı renkler olarak kaydedilmekte ve miRNA'nın ekspresyon düzeyi bu şekilde belirlenebilmektedir. Mikroarray ile yapılan çalışmalarda, ekspresyon

düzeyinde anlamlı farklılıklar tespit edilen miRNA'lar için doğrulamak amacı ile genellikle RT-PCR da yapılmaktadır. Mikroarray yöntemi çok pahalı bir teknik olup, henüz rutin kullanıma girmemiştir. Mikroarray yönteminin ülkemizdeki kullanımı yok denecek kadar azdır.

Bizim çalışmamızda, miRNA ölçüm yöntemi olarak RT-PCR kullanılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarının doğru ve güvenilir olması amacıyla, çalışmamızın her aşamasında, oluşturulan nükleik asit zincirleri Agaroz Jel Elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Foekens ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, östrojen reseptörü pozitif, lenf nodu negatif olan meme kanseri hastalarında mikroarray yöntemi ile 249 farklı miRNA incelenmiş ve sonuçta miR-7, miR-128a, miR-210 ve miR-516-3p agresif klinik seyir gösteren hastalık ile ilişkili bulunmuştur (59). Yine bu çalışmada miR-210, ayrıca metastaz yapma potansiyeli ile de ilişkili bulunmuştur.

Blenkiron ve arkadaşları, meme kanseri ve normal dokuda bead-based flow sitometri yöntemi ile 309 farklı miRNA'nın ekspresyon profilini incelemişlerdir (60). Sonuçta, 133 farklı miRNA'nın meme kanseri ve normal dokuda ekspresyonunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmada, miRNA ekspresyon profillerinin moleküler sınıflandırma tiplerine göre (Luminal A, Luminal B, vb.) farklılık gösterdiğini bulmuşlardır.

miRNA'ların prediktif faktör olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Gonzales ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, miR-30c'nin ileri evre östrojen reseptör pozitif meme kanserinde prediktif bir faktör olduğu gösterilmiştir (61). Bu çalışmaya göre, meme kanserinde artmış miR-30c ekspresyonu, endokrin tedaviden iyi yanıt alınacağına bir göstergesidir.

Liang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, meme kanserinde miR-326'nın *Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)* gen downregülasyonunda rol aldığı ve bu nedenle meme kanserinde kemoterapiye rezistansı önleyen bir faktör olabileceği gösterilmiştir (62).

miRNA'nın meme kanseri patogenezindeki rolünün gösterilmesinden sonra, miRNA'nın meme kanseri tedavisinde kullanımını araştıran çalışmalar hız kazanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucu, tümör süpresör

miRNA'ları taklit eden oligosense nükleotidler ve onkogen miRNA'yı bloke eden antagomirler bulunmuştur.

Si ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada antimiR-21 tedavisi ile tümör büyümesi durdurulmuştur (63). Yine bu çalışmada antimiR-21 tedavisi ile kemoterapiye yanıt arttırılmıştır.

miRNA'lar ile yapılan çalışmalar göstermektedir ki, miRNA'nın meme kanseri tedavisindeki önemi gelecekte daha da artacaktır. Bizim çalışmamız da bu noktadan hareketle, miRNA'nın gelecekteki önemine dikkat çekmek amacı ile yapılmış, pilot bir klinik çalışmadır. Çalışmamız ayrıca, literatür taramalarından edindiğimiz bilgiye göre, ülkemizde miRNA ile ilgili yapılmış olan ilk klinik çalışmadır ve bu yönden büyük önem taşımaktadır. miRNA konusuna dikkat çekmeyi amaçlayan bu çalışma, ülkemizde bundan sonra bu konuda yapılacak olan çalışmalara da ışık tutacaktır.

VI- SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) miRNA, 1993'te bulunan, ancak kanser ile ilişkisi ortaya konduktan sonra, son birkaç yıldır önemi anlaşılan bir moleküldür. Hücre içinde gen ekspresyonunu düzenleyerek kimi zaman onkogen, kimi zaman da tümör süpresör gen gibi görev yapmaktadır.
- 2) miR-21, meme kanserinde en yüksek ekspresyon düzeyine sahip olan ve meme kanserinde onkogen olarak görev yapan bir miRNA'dır.
- 3) Bizim çalışmamızda meme kanserinde miR-21 ekspresyonu araştırılmış ve sonuçta tümör dokusunda belirgin bir miR-21 ekspresyonu olduğu görülmüştür.
- 4) Çalışmamızda, meme kanserindeki miR-21 ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki de incelenmiştir. Sonuçta, tüm klinikopatolojik özellikler için, miR-21 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.
- 5) Bu çalışma, literatür taramalarından edindiğimiz bilgiye göre, ülkemizde miRNA ile ilgili yapılmış olan ilk klinik çalışmadır. Bu yönüyle, bundan sonra ülkemizde yapılacak olan miRNA çalışmalarına da ışık tutacağı beklenmektedir.
- 6) miRNA ile ilgili çalışmalar tüm dünyada hızla ilerlemekte, miRNA'nın kanser tanı ve tedavisindeki öneminin önümüzdeki yıllarda daha da artacağı düşünülmektedir.

VIII- KAYNAKLAR

1. Liu Z, Sall A, Yang D. MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *Int J Mol Sci*, 2008;9:978-99.
2. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993;75:843-54.
3. Ruvkun G, Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001;294:797-99.
4. Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004;116:281–297.
5. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998;391:806–811.
6. Homo sapiens miRNAs in the miRBase at Manchester University, 2010.
7. RNA Interference, Dharmacon Applications Handbook and Catalog. 2005;3-5.
8. Khanna D, Balgir PP, Gurlovleen K, RNA Interference: An Ancient Mechanism For Novel Therapeutics. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 2007; 2:41- 45
9. Couzin J, Breakthrough of The Year: Small RNAs Make Big Splash, *Science*. 2002;298: 2296- 2297.

10. Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004;116:281–297.
11. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M and Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7065–70.
12. Calin GA, Sevignani C, Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004b. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004;101:2999–3004.
13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002;99:15524–15529.
14. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.*, 2003;1:882–891.
15. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005;334:1351–1358.
16. Eis PS, Tam W, Sun LP, Chadburn A, Li ZD, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005;102:3627–3632.

17. He HL, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachch, S, Nagy R, Volinia S, Calin G, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005;102:19075–19080.
18. Voorhoeve PM, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*, 2003;4:311–319.
19. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006;25:2537–2545.
20. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005;435:828-833.
21. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003;115:787–798.
22. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 2005;435:839–843.
23. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T., 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17–92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.*, 2005;65:9628–9632.

24. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 2004;64:3753–3756.
25. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S.E., Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM,. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:13944–13949.
26. Jemal A, Tiwari RC Murray T et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8–29.
27. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*, 2002;20:2310.
28. Fackenthal J, Marsh DJ, Richardson AL, Cummings SA, Eng C, Robinson BG et al. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Genet*, 2001;38:159-64.
29. Grabrick DM, Hartmann LC, Cerhan JR, Vierkant RA, Therneau TM, Vachon CM, et al. Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer. *JAMA*, 2000;284:1791-8.
30. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, 2001;286:2143-51.

31. Evans JS, Wennberg JE, McNeil BJ. The influence of diagnostic radiography on the incidence of breast cancer and leukemia. *N Engl J Med.*, 1986;315:810-5.
32. Bhatia S, Yasui Y, Robison LL, Birch JM, Bogue MK, Diller L, et al. High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol.*, 2003;21:4386-94.
33. *Manual of Clinical Oncology, Sixth edition. Breast Cancer Chapter.* Editor: Dennis A. Casciato. 2009.
34. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. *Cancer*, 1991;68:2142-9.
35. Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer*, 1995;75:65-71.
36. Fisher B, Bauer M, Wickherman DL. Relation of number positive axillary lymph nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer*, 1983;52:1551-8.
37. Bath A, Craig PH, Silverstein MJ. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*, 1997;79:1918-22.
38. Fischer ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol 6): Relation of local breast recurrence to multicentricity. *Cancer*, 1986;57:1717-24.
39. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast cancer. *Cancer*, 1994;74:381-400.

40. Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary Breast cancer. *Semin Oncol.*, 1988;15:20-5.
41. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Onco.*, 1984; 2:1102-9.
42. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*, 2004;9:606-16.
43. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S, et al. The long- term prognostic significance of c-HER-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1991;63:447-50.
44. Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neuoncoprotein expression in nodepositive breast cancer: The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer*, 1994;73:2359-65.
45. Elledge RM, Clark G, Chamnes GC, Osbome C. Tumor biologic factors and Breast cancer prognosis among white women in the United States. *J Natl Cancer Inst.*, 1994;86:705-12.
46. Swanson GM, Ragheb NE, Lin C-S, Hankey BF, Miller B, Horn-Ross P, et al. Breast cancer among black and white women in the 1980's. *Cancer*, 1993;72:788-98.
47. Ma L, Teruya-Feldstein J, and Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007;449:682–688.

48. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X and Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Research*, 2007;67:11001–11011.
49. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS and Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007;282:1479–1486.
50. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX and Shao JY. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, 2008;14:2348–2360.
51. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, and Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007;26:2799–2803.
52. Zhu S, Si ML, Wu H and Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of Biological Chemistry*, 2007;282:14328–14336.
53. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A and Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008;283:1026–1033.
54. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, 2005;65:6029–6033.
55. Lu Z, Liu M, Stribinskis V et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 2008;27:4373–4379.

56. Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L and Gann PH. mRNA and microRNA expression analysis in laser-capture microdissected prostate biopsies: Valuable tool for risk assesment and prevention trials. *Experimental and Molecular Pathology*, 2010;88:45-51.
57. Siebolts U, Varnholt V, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C and Odenthal M. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol*, 2009;62:84–88.
58. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, and Szafranska AE. Evaluation and Validation of Total RNA Extraction Methods for MicroRNA Expression Analyses in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2008;10:203-211.
59. Foekens JA, Sieuwerts A, Smid M, Look MP, Weerd V, Boersma AW, Klijn JG, Wiemer EA and Martens JW. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *PNAS*, 2008;35:13021–13026.
60. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biology*, 2007;8:R214:1-16.
61. Gonzalez FG, Sieuwerts A, Marcel Smid M, Look P, Gelder M, Weerd V, Sleijfer S, Martens J and Foekens J. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2010; doi:10.1007/s10549-010-0940-x.

62. Liang Z, Wua H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, Wagar N, Yoon Y, Cho H, Scala S and Shim H. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochemical Pharmacology*, 2009; doi:10.1016/j.bcp.2009.10.017.
63. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007;26:2799-803.