

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAMOXİFEN VE TRASTUZUMAB'A DUYARLI MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE TAMOXİFEN VE TRASTUZUMAB'A CEVAP VEREN
MikroRNA (miRNA) PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Senem NOYAN

Danışman Öğretim Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

OCAK

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Senem Noyan

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU danışmanlığında, Senem NOYAN tarafından hazırlanan bu çalışma 27/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tamoxifen ve Trastuzumab’a Duyarlı Meme Kanseri Hücrelerinde Tamoxifen ve Trastuzumab’a Cevap Veren MikroRNA (miRNA) Profillerinin Araştırılması

Senem Noyan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Meme kanseri, klinik davranış ve genetik çeşitliliğe bağlı terapatik müdahaleye verdiği cevap açısından heterojen bir hastalıktır. Östrojen ve östrojen reseptörü meme kanserinin dörtte üçünde ifade gösterir ve meme kanserinin büyüme ve ilerlemesinde rol alır. HER2 (ErbB2) gen amplifikasyonu ve aşırı ifadesi ile ilişkili olarak artan protein seviyesi meme kanseri içerisinde %30 civarında görülür ve genellikle kötü prognoz ile koreledir. Monoklonal antikor ve endokrin terapi, meme kanseri tedavisinde moleküler değişiklikleri temel alan terapatik uygulamalardan ikisidir. MikroRNA’lar (miRNA) 20-25 nt uzunluğunda protein kodlamayan RNA molekülüdür. miRNA’lar pekçok organizmada evrimsel olarak korunan diziler olup post-transkripsiyonel olarak gen ifadesini baskırlar. Yapılan pekçok çalışma mikroRNA’ların meme kanserinde bilinen mekanizmaları etkileyebildiğini göstermekte ve bu düzenleyici RNA moleküllerinin tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef molekül olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, iki farklı meme kanseri alt-tipine uygulanan iki farklı ilacın ortak moleküler etki mekanizmalarını miRNA boyutunda açıklamayı hedefleyen ilk çalışmadır. Tez kapsamında üç farklı meme kanseri hücre hattında iki farklı ilaç muamelesi yapılmış ve ilaca duyarlı miRNA profilleri belirlenmiştir. miRNA’lara ait hedef genler ve rol aldıkları yollar veritabanları aracılığıyla belirlenmiştir. İlaç ve iki farklı meme kanseri alt-tipinden bağımsız olarak ortak olan ve anlamlı farklılık gösteren üç miRNA varlığı tespit edilmiştir. Bu üç miRNA meme kanseri tedavisinde hücre tipi ve terapiden bağımsız ortak miRNA imzası için aday hedef miRNA’lar olarak belirlenmiştir. Bu miRNA’ların olası hedeflerinin kullanılan ilaçların etki mekanizmalarındaki sinyal iletim yollarında yer alması ve kanserde varlığı bilinen ER-HER karşılıklı etkileşiminde aktif rol alan reseptörleri hedefleyerek kanserli hücrelerinin kaçış yollarını dururabileceği dikkat çekmektedir.

2015, 105 sayfa

Anahtar kelimeler: mikroRNA (miRNA), meme kanseri, HER2, östrojen reseptörü (ER), trastuzumab, tamoxifen, terapatik uygulamalar.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

The Investigation of Tamoxifen and Trastuzumab Responsive miRNAs in Tamoxifen and Trastuzumab Sensitive Breast Cancer Cell Lines

Senem Noyan

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assist. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Breast cancer is a heterogeneous disease in which clinical behavior and responses to therapeutic interventions depend on multiple genetic alterations. Oestrogens and oestrogen receptor (ER) play fundamental roles in the development and progression of more than three-quarters of breast cancers (BC). The HER2 (ErbB2) gene encodes an epidermal growth factor reseptor related tyrosine kinase that is overexpressed in 30 % of invasive breast cancers. For the treatment of breast cancer, therapeutic approaches have been developed based on particular molecular alterations. These include monoclonal antibodies and endocrine therapy. MicroRNAs (miRNA) are non-protein coding RNA sequences that have length of about 20-25 nucleotides (nt). miRNAs are evolutionary conserved in many organisms and have important regulatory functions. Studies support the crucial roles played by dysregulation of specific microRNAs in breast cancer progression. The potential of candidate microRNAs for clinical diagnosis and prognosis was revealed, and treatments involving microRNA achieved some amazing curative effects in cancer disease models.

This is the first study that identifies the global expression profiles of miRNAs in tamoxifen and trastuzumab sensitive breast cancer cell lines. In this thesis study, the putative roles of miRNAs in relation to trastuzumab and tamoxifen response was investigated. miRNA qRT arrays were used to search for differentially expressed genes between three different breast cancer cell lines. At the end of analysis 3 common miRNAs were found to be significantly differentially expressed. The identification of predicted target genes of these miRNAs and the pathway enrichment analysis was performed by databases. The data obtained in this study emphasizes the potential targets of three miRNAs in the molecular regulation of drug mechanism, which explains the blocking of crosstalk between ER and ErbB family.

2015, 105 pages

Keywords: micro RNA Breast cancer, HER2, Estrogen receptor (ER), trastuzumab, tamoxifen, Therapeutic Approaches

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, bundan sonraki çalışmalarım boyunca da bilgi, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, sabrı ve bana olan güveni için değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimimde sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB),

Deneylerimde kullandığım materyallerden biri olan MCF7 hücre hattı için Yrd. Doç. Dr. Arzu Atalay'a ve çalışmamın temel unsurlarından biri olan trastuzumab ilacı için Prof. Dr. Hakan Gürdal'a

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 13B4143001 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir. Destek için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne

Birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum, yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan ekip arkadaşlarım Alp Aydos ve Yasemin Öztemur'a

Deneylerimdeki yardımları ve arkadaşlıkları için, Emine Ezel Çilek'e ve Blm. Uzm. Funda Kaya Demirsoy'a

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine,

Bu zorlu süreçte desteğiyle yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek Aktaş ve Prof. Dr. Mehmet Alikaşifoğlu'na

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni her konuda destekleyen canım aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Senem NOYAN

Ocak, 2015

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ONAY SAYFASI	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Kanser Gelişimi	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.2.1. Memenin anatomisi	4
2.2.2. Meme kanserinin histopatolojisi	5
2.2.3. Meme kanserinde tedavi yöntemleri	6
2.3. mikroRNA	16
2.3.1. miRNA biyogenezi.....	17
2.3.2. miRNA ve kanser	18
2.3.3. Tedavide hedef olarak miRNA'lar	22
2.4. Yüksek İşlem Kapasiteli Sistemler	24
2.4.1. Mikrodizin.....	25
2.4.2. Eş-zamanlı PZR dizin yöntemi (qRT-PCR array).....	25
3. GEREKÇE VE AMAÇ	27
4. MATERYAL VE YÖNTEM	29
4.1. Materyal	29
4.1.1. Meme kanseri hücre hatları	29
4.1.2. Kullanılan kitler.....	29
4.2. Yöntem	31
4.2.1. Hücre kültürü kurulması ve idamesi	32
4.2.2. Hücrelerin ilaçlara olan hassasiyetinin WST-1 üreme protokolü ile belirlenmesi ve ilaç dozlarının ayarlanması	32
4.2.3. RNA eldesi ve kalite kontrolü.....	36
4.2.4. miRNA eş-zamanlı PZR dizin çalışmasının gerçekleştirilmesi	37

4.2.5. Veri analizi	39
5. <u>ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	41
5.1. WST-1 Sonuçları	41
5.2. RNA Kalite Kontrolü	47
5.3. Eş-zamanlı PZR Dizin Sonuçları	48
5.3.1. Trastuzumab'a duyarlı miRNA'ların belirlenmesi.....	49
5.3.2. Tamoxifen'e duyarlı miRNA'ların belirlenmesi.....	54
5.4. Ortak Hedef Genler	60
5.5. Ortak Hedef Genlerin Yolak Analizi.....	62
6. <u>TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	69
6.1. Tartışma	69
6.2. Sonuç	76
7. <u>KAYNAKLAR</u>.....	78
8. <u>EKLER</u>.....	89
9. <u>ÖZGEÇMİŞ</u>.....	102
10. <u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>.....	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karsinogenez modellemesi (Cazzaniga ve ark.'dan alınmıştır.) (9)	4
Şekil 2.2. Meme dokusunun yapısı (Sharma ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (5)	5
Şekil 2.3. Meme kanseri kemoprevensiyonunun tarihçesi (Tirona ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (15).....	7
Şekil 2.4. Meme kanserinde ET ile kullanılan monoklonal antikor, küçük moleküller ve bu terapatik uygulamaların hedeflerinin özeti. (Palmieri ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (17).....	9
Şekil 2.5. Trastuzumab'ın etki mekanizması (Nahta ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (23)..	12
Şekil 2.6. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması (Esquela ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (43)	18
Şekil 2.7. Kanserde miRNA aktivitesi (Tong ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (48).....	19
Şekil 2.8. Tümör baskılayıcı ve onkogen olarak miRNA'lar (Esquela ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (43)	20
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması ve deney tasarımı	31
Şekil 4.2. Trastuzumab ve tamoxifen için yapılan WST-1 uygulamasının 96 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği.....	33
Şekil 4.3. Doğrusal olmayan regresyon eğrisi	34
Şekil 5.1. Spektrofotometrik ölçümün temsili görüntüsü. B, C ve D satırı ilaç uygulanan kuyuları, E, F ve G satırları ilaç çözücüsü olarak kullnailan EtOH ve PBS uygulanan kuyuları göstermektedir.	41
Şekil 5.2. SK-BR-3 hücrelerinin 72 saat boyunca trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları.....	42
Şekil 5.3. SK-BR-3 hücrelerinin 144 saat ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları	42
Şekil 5.4. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları	43

Şekil 5.5. BT474 hücrelerinin 144 saat boyunca ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları	43
Şekil 5.6. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları	44
Şekil 5.7. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca ilgili tamoxifen doz uygulaması (1-100 uM) sonucu elde edilen yeni doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları	45
Şekil 5.8. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca ilişkili tamoxifen muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları.....	46
Şekil 5.9. İzole edilen total RNA'ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. %1'lik agaroz jelde 90 V'da 30 dakika yürütülmüşlerdir.	47
Şekil 5.10. Roche Light Cycler480 cihazı ile PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen temsili C _T değerleri görüntüsü.....	49
Şekil 5.11. Trastuzumab ile muamele edilmiş SK-BR-3 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.	50
Şekil 5.12. Trastuzumab ile muamele edilmiş BT474 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.	52
Şekil 5.13. SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde trastuzumaba ortak yanıt veren miRNA'ların listesi. Azalan 50 miRNA'dan temsili 8 adet miRNA ve 3 adet ortak artış gösteren miRNA listelenmiştir.	54
Şekil 5.14. Tamoxifen ile muamele edilmiş BT474 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.	55
Şekil 5.15. Tamoxifen ile muamele edilmiş MCF7 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.	57
Şekil 5.16. Tamoxifen duyarlı MCF7 ve BT474 hücrelerinde ortak farklılık gösteren miRNA'lar. 14 tane miRNA'nın azaldığı, hsa-miR-770-5p'nin arttığı gözlenmektedir. ...	59
Şekil 5.17. Trastuzumab duyarlı hücre hatlarında ortak miRNA'ların miRWalk 'dan elde edilen tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayılarını gösteren grafik.	60

Şekil 5.18. Tamoxifen duyarlı hücre hatlarında ortak miRNA'ların miRWalk'dan elde edilen tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayılarını gösteren grafik.	61
Şekil 5.19. Trastuzumab hedefi olarak bilinen ErbB sinyal yolağında, EGF, HB-EGF, ErbB1, ve ErbB4 gibi genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.	63
Şekil 5.20. Trastuzumab duyarlı hücrelerde azalan miRNA'ların kanser yolaklarını tekrar aktifleştirdiğini gösteren KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.	64
Şekil 5.21. Tamoxifen duyarlı hücrelerde MAPK sinyal yolağında, TNF, TGFRB, ERK, ve AKT gibi genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.	65
Şekil 5.22. hsa-miR-770-5p'nin ErbB sinyal yolağında, EGF, NRG2, ve JNKK genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.	67
Şekil 6.1. Trastuzumab varlığında hsa-miR-770-5p ile ER/HER karşılıklı etkileşiminin kapatılabileceğini gösteren temsili grafik. Solda yer alan (A) bölüm normal koşullarda HER reseptörünün aktifleşerek büyüme ve invazyonu sağladığını göstermektedir. B kısmı ise trastuzumab varlığında ER'nin aktif olduğu ve hsa-miR-770-5p'nin ER 'yi baskılayarak hücre çoğalmasını baskılayabileceğini gösterilmektedir.	73
Şekil 6.2. Tamoxifen varlığında hsa-miR-770-5p ile ER/HER karşılıklı etkileşiminin kapatılabileceğini gösteren temsili grafik. Sağda yer alan (A) kısımda normal koşullarda ER reseptörünün aktifleşerek büyüme ve invazyonu sağladığını göstermektedir. B kısmı ise tamoxifen varlığında HER'nün aktif olduğu ve hsa-miR-770-5p'nin HER 'yi baskılayarak hücrenin devamlılığını engelleyebileceği fikrini gösterilmektedir.	74
Şekil 6.3. ER/HER-IGFR arasındaki karşılıklı etkileşim ve bu iletim sisteminde rol alan ortak miRNA'ları gösteren temsili grafik. hsa-miR-770-5p'nin ifade artışına rağmen hücrenin büyümesinin tamamen durdurulamama nedeni açıklamaktadır.	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatları, patolojik bilgileri ve kullanılan ilaca cevap durumu.....	29
Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyonu	38
Çizelge 4.3. Eş-zamanlı PZR reaksiyonu	39
Çizelge 5.1. Kullanılan her hücre hattı ve ilaç için belirlenen IC ₅₀ ve IC ₇₀ dozları	46
Çizelge 5.2. RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm değerleri	48
Çizelge 5.3. miScript PZR Kontrollerinin temsili C _T değerleri.....	49
Çizelge 5.4. SK-BR-3 hücrelerinde trastuzumab'a duyarlı 1,5 kat ve üzeri (p<0,05) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların listesi	51
Çizelge 5.5. BT474 hücrelerinde trastuzumab'a duyarlı 1,5 kat ve üzeri (p<0,05) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların temsili listesi	53
Çizelge 5.6. BT474 hücrelerinde tamoxifene duyarlı 1,5 kat ve üzeri (p<0,05) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların listesi	56
Çizelge 5.7. MCF7 hücrelerinde tamoxifene duyarlı 1,5 kat ve üzeri (p<0,05) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar.....	58
Çizelge 5.8. Trastuzumab duyarlı ortak miRNA tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayıları	60
Çizelge 5.9. Tamoxifen duyarlı ortak miRNA tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayıları	61
Çizelge 5.10. SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde ifadesi artan hsa-miR-770-5p, hsa-miR-1248 ve hsa-miR-1290'a ait hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	62
Çizelge 5.11. Tamoxifen duyarlı MCF7 ve BT474 hücrelerinde ifadesi artan miRNA'lara ait hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	65
Çizelge 5.12. Trastuzumab ve tamoxifen duyarlı hücrelerde ifadesi artan hsa-miR-770-5p'ye ait hedeflerin yolak analizi sonuçları	66

Çizelge 5.13. Tüm hücre hatlarında ilaç bağımsız olarak HER2 profilini gösteren miRNA'lar	68
Çizelge 8.1. SK-BR-3 hücrelerinin 72 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorban değerleri	89
Çizelge 8.2. SK-BR-3 hücrelerinin 144 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorban değerleri	89
Çizelge 8.3. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorban değerleri	90
Çizelge 8.4. BT474 hücrelerinin 144 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorban değerleri	90
Çizelge 8.5. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrası elde edilen absorban değerleri	90
Çizelge 8.6. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrasında elde edilen yeni absorban değerleri	91
Çizelge 8.7. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrası elde edilen absorban değerleri	91

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
ADCC	Antikor bağımlı hücresel sitotoksiste
AGO	Argonat
AMO	Anti-miRNA oligonükleotid
ASO	Antisense oligonükleotid
AI	Aromataz inhibitörü
C _T	Eşik değeri
DCIS	Duktal karsinoma in situ
E2	Östradiol
ER	Östrojen reseptörü
Erα	Östrojen reseptör alfa
ERE	Östrojen yanıt elementleri
ER+	Östrojen reseptörü pozitif
ET	Endokrin terapi
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HER2	HER reseptör ailesi üyesi (ErBB2)
HER2+	HER2 reseptörü pozitif
HR+	Hormon reseptörü pozitif
LCIS	Lobular karsinoma in situ
LBD	Ligand bağlayıcı domain
LH	Lüteinleştirici hormon
IDC	İnvaziv duktal karsinom
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
ng	Nanogram
PR	Progesteron reseptörü
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNAi	RNA interferans
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi

TKI	Tirozin kinaz inhibitörleri
OD	Optik dansite
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
qRT-PZR	Eş zamanlı PZR

1. GİRİŞ

Çok-sebepli, kompleks bir genetik hastalık olan meme kanseri moleküler düzeyde detaylı bir şekilde çalışılmıştır ve yüksek işlem hacimli mikrodizin çalışmaları sayesinde moleküler alt tiplere (Luminal A, Luminal B, HER2 ifade eden, normal-benzeri ve bazal-benzeri (üçlü-negatif: ER-, PR-, HER2-) meme kanserleri) ve reseptör ifade varlıklarına göre de patolojik alt-tiplere ayrılmaktadır (ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2-). Hem moleküler sınıflandırmalar hem de patolojik sınıflandırmalar meme kanseri hastalarının tedavi sürecine karar verme açısından büyük önem taşımaktadır.

HER2'nin aşırı ifade edilmesi (HER2+), meme kanseri hastalarının %20-%30'unda görülen bir durumdur ve HER2+ tümörlerin tamoxifen ve standart kemoterapiye direnç gösterdiği bilinmektedir. Her ne kadar HER2+ hastaların tedavisinde en çok kullanılan trastuzumab'ın etki mekanizmaları bilinse de hastaların çoğu tedavinin ilk yılında ilaca karşı direnç geliştirmektedir ve bu durum tedaviyi olumsuz olarak etkilemektedir. Bunun için trastuzumab tedavisinin moleküler mekanizmalarının açığa çıkartılması HER2+ hastaların tedavisine sağlayacağı katkılar göz önüne alındığında büyük önem taşımaktadır.

Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i östrojen pozitifdir (ER+) ve östrojen hormonuna yanıt olarak gelişim gösterirler. Bu tümörler hormon pozitif olarak kabul edilirler ve hormonal tedavi yöntemlerine cevap verebilen tümörler sınıfında değerlendirilirler. ER+ meme kanserlerinde 5 yıllık tamoxifen terapisi meme kanseri tekrarlama riskini 10 yıla çıkartırken, ortalama yaşam süresini 15 yıla kadar uzatabilmektedir. Ancak halen hastaların büyük bir kısmı tamoxifen'e karşı direnç geliştirmektedir ki bu durum hastaların tedavi sürecindeki başarıyı düşürmektedir. Her ne kadar tamoxifen tedavisinde öne çıkan moleküler mekanizmaların bir kısmı ortaya konmuş olsa da kanser gelişiminde büyük rolleri olduğu bilinen ve hücrede düzenleyici moleküller oldukları pek çok çalışma ile gösterilmiş miRNA'ların tamoxifen ile ilişkisini aydınlatacak sayılı çalışma bulunmaktadır.

MikroRNA'lar küçük ve protein kodlamayan endojen RNA molekülleridir. miRNA'ların düzenleyici rolleri üzerine yapılan deneyler bu molekülerin başkalaşım, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi farklı hücresel işlemlerde önemli roller aldığını göstermiştir. Bu

işlemelerin genellikle kanserde düzensiz olduğunun bilinmesi miRNA'ların kanserle olabilecek ilişkilerine dikkat çekmektedir.

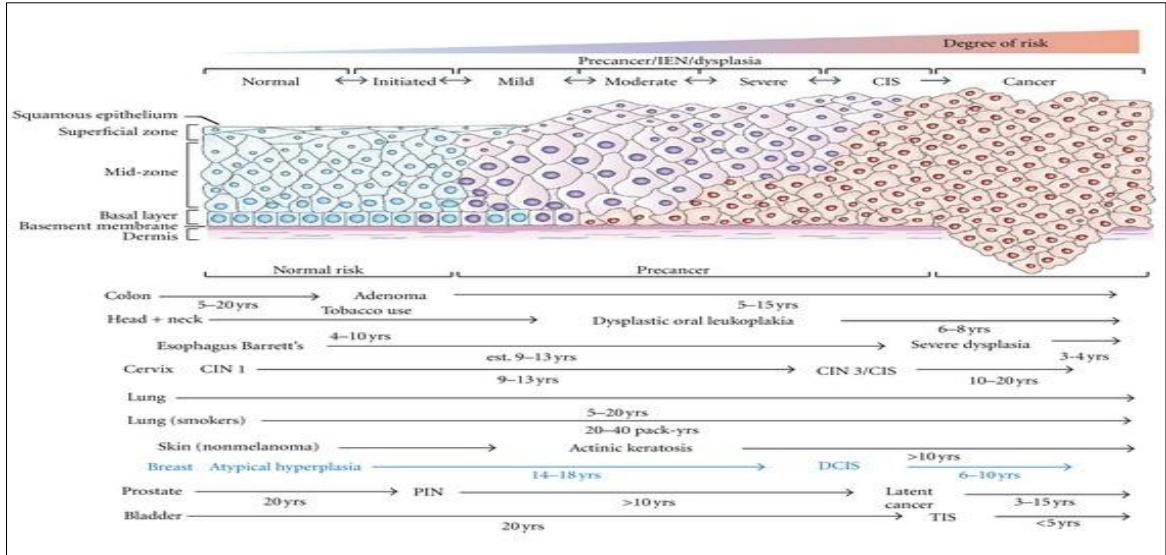
Meme kanserinde kullanılan kemoterapi, cerrahi müdahale, radyoterapi gibi geleneksel yöntemler günümüzde etkin olmasına rağmen bu yöntemlerin kaçınılmaz yan etkileri bulunmaktadır. Kanserde miRNA'nın etkin rolünün anlaşılması sonucunda mikroRNA temelli terapiler potansiyel araştırma konusu haline gelmiş ve klinik öncesi modellemede miRNA'ların kullanımı araştırılmıştır. Onkogenik olduğu bilinen miR-21'in inhibisyonunun tümör gelişimini ve metaztazı azalttığı gösterilmiştir (1). Meme kanseri hücre hatlarında miR-205'in artan ifadesinin HER3 reseptörü aracalığıyla tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılık kazandırdığı bildirilmiştir (2). p53 mutant meme kanserinde miR-34'n susturulmasının ışın hassasiyeti etkisini yarattığı tespit edilmiştir (3). Fonksiyonel miRNA bağlantı ağının ve hedeflerinin tanımlanması miRNA'ların potansiyel terapatik hedef olmasına katkı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Hücrede oluşan genetik değişiklikler sonucunda hücrenin anormal çoğalma yeteneği kazanması ve farklılaşması ile kanser ortaya çıkar. Hızla çoğalan hücrelerin oluşturduğu tümoral yapı, öncelikle yakın çevreye yayılır (lokal invazyon). Daha sonra, daha uzak organlara kan veya lenfatik yol ile yayılır (metastaz). Organizmada en fazla kanlanan organlar olan akciğer, beyin ve karaciğer en sık metastaz yapılan organlardır. Tümör çoğalırken çevre dokular ile uyuma dikkat etmez ve hızla içinde bulunduğu organizmaya ait besinleri kullanarak büyür (4). Kanser hücrelerinin organizmadaki hücreler ile çok benzer olması immün sistem tarafından tespit edilememesi sorununu getirir. Kanser hücreleri normal hücrelerin DNA ya da RNA mutasyonları ya da modifikasyonları ile şekillenir (5).

2.1. Kanser Gelişimi

Karsinogenez süreci spesifik olmayan genetik birikim ile başlar, ilerleyen displastik hücresel görünüm, genotipik ve fenotipik değişiklikler, hücre büyümesinde düzensizliklere neden olur ve sonuçta kanser meydana gelir (Şekil 2.1) (6). Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak biraraya gelmesi yer almaktadır. Kanser gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellik kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malin fenotipin oluşumuna katkıda bulunur (7). Sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır (8). Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır.



Şekil 2.1. Karsinogenez modellemesi (Cazzaniga ve ark.'dan alınmıştır.) (9)

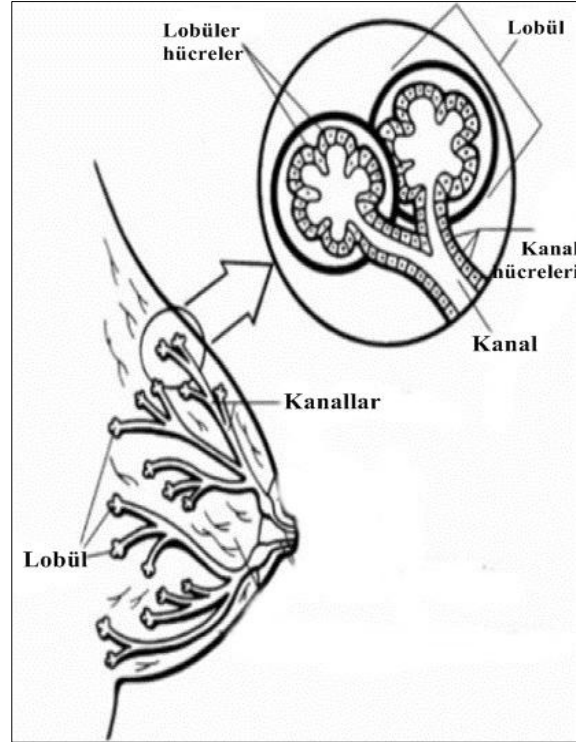
2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın malignansi olarak yerini almakta olup (10) kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dünyada meme kanseri, tüm kanser insidansının %10.4'ünü kapsamaktadır ve akciğer kanserinden sonra görülme sıklığında 2. sırada yer alır. Kanser kaynaklı ölüm sıralamasında ise 5. sırada yer almaktadır. Meme kanseri oluşumundan sorumlu birçok risk faktörü tanımlanmıştır; bunlar, coğrafi çeşitlilik, genetik ve ailesel öykü, hormonal etkiler ve diğer etkenlerdir. Meme dokusundan özellikle süt kanalları ve onu destekleyen lobüllerden köken alan meme kanserinin görülme sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüzbinde 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüzbinde 12-15 arasındadır. Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinde doğuya doğru gittikçe azalmaktadır. Görülme sıklığındaki en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır (11).

2.2.1. Memenin anatomisi

Meme dokusu iki temel doku olan glandular ve stromal dokunun kompozisyonudur. Glandular doku süt üretiminin yapıldığı kanallar (lobül) ve depolandığı duktal kısımdan

oluşurken, stromal doku meme dokusu ile ilişki içerisinde olan yağ ve fibröz dokudan oluşur (Şekil 2.2) (5).



Şekil 2.2. Meme dokusunun yapısı (Sharma ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (5)

Meme dokusunun farklı alanlarında gelişen birçok tümör tipi mevcuttur. Genelde tümör meme dokusunda kanserojen olmayan değişiklikler (benign) sonucu oluşur. Birçok meme kanseri duktal hücrelerden köken alırken bir kısmı lobular dokudan kalan bir kısmı ise diğer dokulardan köken alabilir.

2.2.2. Meme kanserinin histopatolojisi

Klasik sınıflandırma

Meme kanseri köken aldığı hücre tipi ve invaziv olma durumuna göre iki sınıfa ayrılır;

- **İnvaziv olmayan meme kanseri** hücreleri köken aldıkları hücrelerde sınırlanmıştır ve etrafındaki diğer dokuları ve yağ dokusunu istila etmezler. Duktal karsinoma in situ (DCIS) invaziv olmayan meme kanserlerinin en sık formudur (%90). Lobular karsinoma in situ (LCIS) nadir görülen formu olup artan meme kanseri riskinde biyobelirteç olarak düşünülmektedir (5).

- **İnvasiv meme kanseri** hücreleri duktal ve lobular duvarlara doğru ilerler ve etrafında yer alan yağ ve diğer meme dokularına hücum eder. Bu tip kanserler invaziv özelliktedir fakat lenf nodu ve diğer organlara metastaz özelliği göstermezler. En sık rastlanan invaziv meme kanseri türü invaziv duktal karsinomdur (IDC).

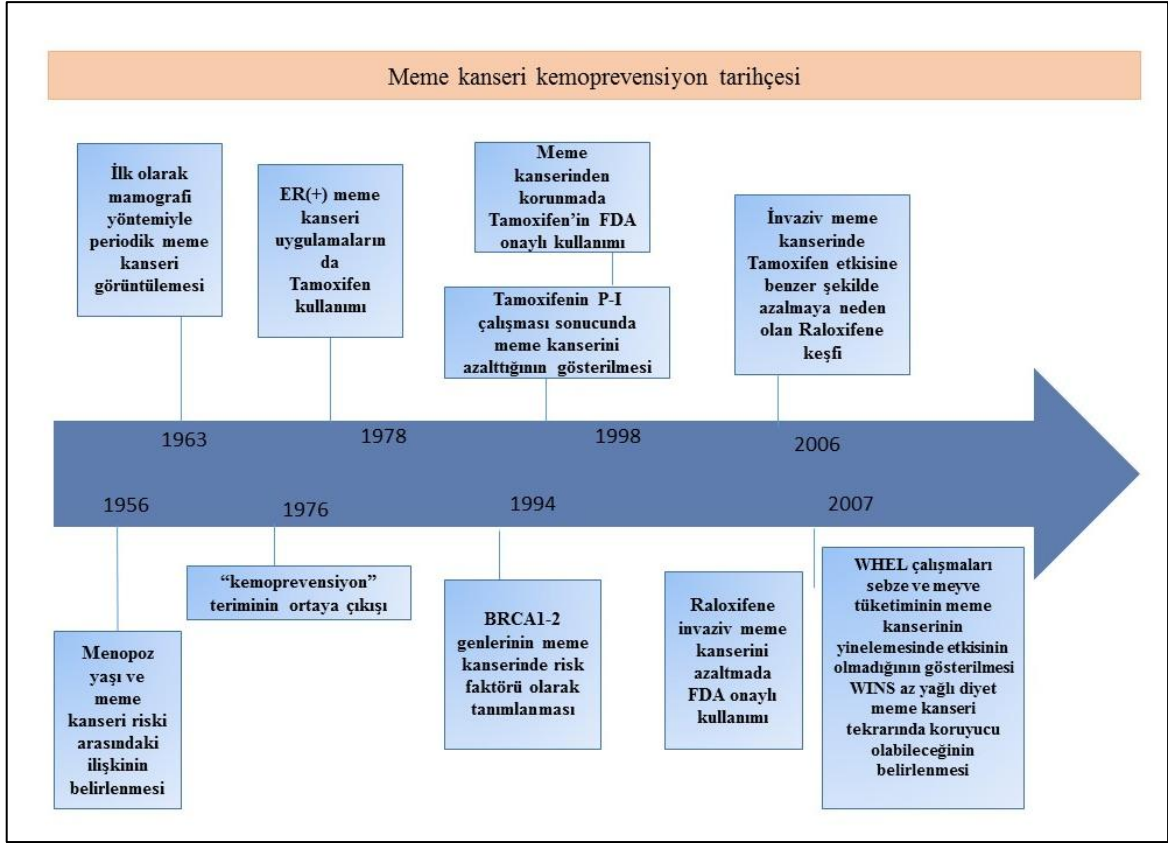
Moleküler sınıflandırma

Meme kanserinin kompleks bir hastalık olması ve meme tümörlerinin farklı özelliklere sahip heterojen tümörler olması, hastalığın regülasyonundaki mekanizmaların açıklanmasını ve bunun sonucunda da tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu eksiklik yeni biyobelirteçlerin aranmasını zorunlu kılmıştır ve mikrodizin yöntemi kullanılarak yapılan gen ifadesi çalışmaları sayesinde, klasik sınıflandırmanın yanında meme kanseri moleküler olarak da sınıflandırılmıştır.

Meme kanseri, Perou ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan kapsamlı gen ifade analizi çalışmasıyla önce luminal hücre benzeri, bazal hücre benzeri, normal epitel benzeri ve HER2+ grup olarak 4'e ayrılmıştır (12). Daha sonra ise luminal tipin de kendi arasında luminal A ve luminal B olarak gruplanması ile 5 alt tipe ayrılmıştır (13). 2007 yılında yapılan çalışma ile bu alt tiplere, sıkı bağlantı proteinleri claudin 3, 4 ve 7 ve bir Ca bağımlı hücre-hücre adezyon glikoproteini olan E-cadherin'in düşük gen ifadeleri ile karakterize "claudin low" eklenmiştir. Böylece moleküler olarak meme kanseri 6 alt tipe ayrılmıştır (14).

2.2.3. Meme kanserinde tedavi yöntemleri

Meme kanserinden korunma fikri geçmişe dayanır (Şekil 2.3). Kanser gelişim mekanizmalarının temelinde yatanları anlamaya yönelik çeşitli ilerlemeler gerçekleşmiş ve günümüzde bazı ilaçlar bu hastalıktan korunma uygulamalarında onaylanmıştır. Bu yüzden asıl düşünülmesi gereken bu korunma yollarının meme kanseri kontrolünde yüksek oranda gerçekleştirilebilir uygulamalar olup olmadığıdır. Kadınların riskini arttıran ve değiştirilemez yaş, ailesel öykü gibi birçok faktör olmasına karşın, alkol alımı, şişmanlık ve postmenopozal dönemde obezite gibi düzeltilebilir risk faktörleri ve hormonal düzenlemeler de tanımlanmış ve bu nedenler meme kanserinden korunmada güçlü ve ilgi çekici olmuştur (15).



Şekil 2.3. Meme kanseri kemoprevensiyonunun tarihçesi (Tirona ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (15)

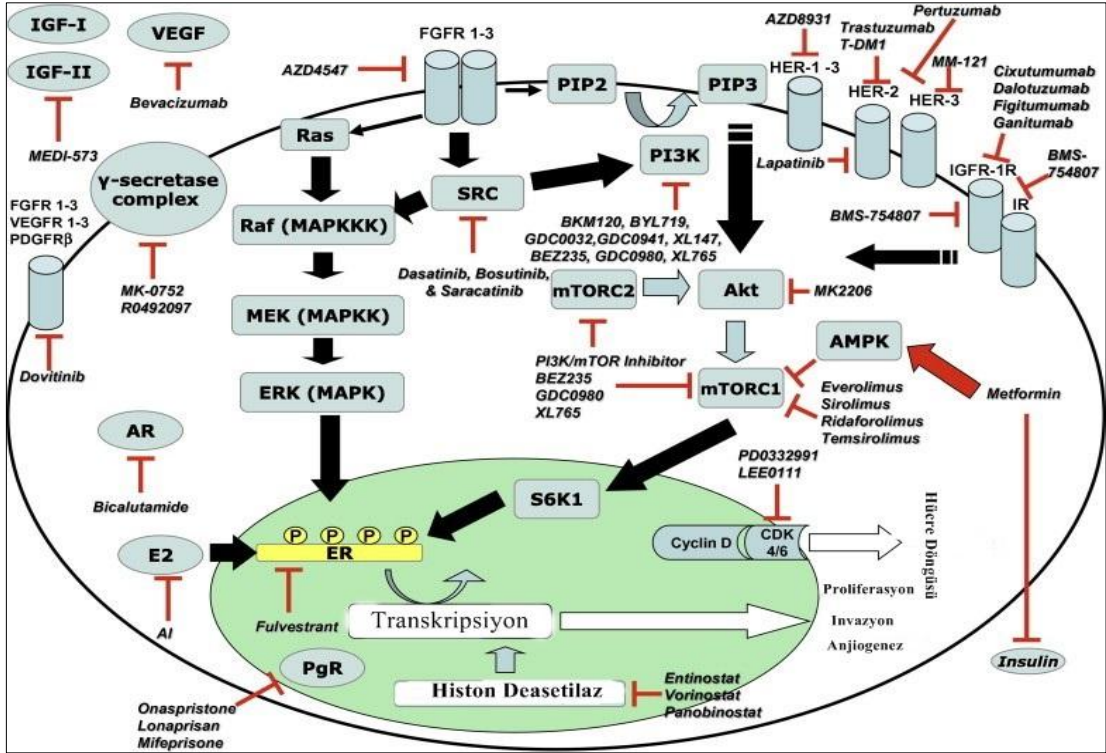
Endokrin terapi

Meme kanseri, klinik davranış ve genetik çeşitliliğe bağlı terapatik müdahaleye verdiği cevap açısından heterojen bir hastalıktır (12,16). Meme kanseri tedavisi için moleküler değişiklikleri temel alan terapatik uygulamalar geliştirilmiştir. Bunlar monoklonal antikor ve endokrin terapi. Monoklonal antikor örneklerinden biri olan trastuzumab HER2 protein reseptörünü hedef alır ve HER2 protein ekspresyonu olan hastalarda kullanılır. Endokrin terapi (ET) ise ER ve PR ya da her ikisinin de ekspresyonunun varlığında uygulanır. Bu iki terapi yöntemine direnç geliştiren hasta grubuna uygun terapatik uygulama ise sitotoksik kemoterapidir.

Endokrin terapi, ER+ meme kanserinde anahtar tedavi yöntemidir ve ameliyat öncesi, operasyon sonrası ve metastatik hastalıkta kullanılabilir. Tarihsel olarak, bu terpi yöntemi meme kanseri tedavisinde kullanılan en eski sistemik terapidir ve ilk hedef odaklı terapidir. (17). Östrojen reseptör blokajı için farklı terapatik prosedürler uygulanabilir. Tamoxifen

ER+ meme karsinomalı kadınlarda tedavide altın standart iken günümüzde aromataz inhibitörleri de metastazda etkin aktivite göstermektedir (18).

Günümüzde ET östrojen üretim sürecinin ya da tümörde var olan ER fonksiyonunun yıkımı gibi tedavilerden oluşmaktadır. Menopoz dönemi öncesinde kadınlarda asıl östrojen üretimi yumurta hücrelerinden sağlanır. Bu süreç LH (Luteinize hormon) ve FSH (Folikül stimüle hormon) salgılayan hipofizin kontrolü altındadır. LH androjen sentezini düzenleyen teka hücrelerini etkilerken, FSH testesteron ve androstenedionu estradiol ve esteron'a dönüştüren aromataz enziminin üretimini düzenleyen granulosa hücreleri üzerinde rol alır. Hipofiz ürünü olan LH ve FSH sırasıyla GnRH (Gonodotropin salgılatıcı hormon) ve hipotalamusda salgılanan LHRH (Luteinize salgılatıcı hormon) kontrolü altındadır. Menopoz sonrasında östrojen üretimi periferel aromatisasyon ağırlıklı olarak karaciğer, adrenal bezler ve adipoz dokuya bağımlıdır. Östrojen, hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde ER'a bağlanarak etki gösterir. ET, LH/FSH üretimini bloklayarak, ER reseptörünü kapatarak (tamoxifen) ya da yıkımını sağlayarak (fulvestrant) ya da aromataz inhibitörler ile östrojenin periferel üretimini inhibe ederek bahsedilen bu süreçleri yavaşlatmayı veya yıkmayı amaçlar. Fosfatilinositol, siklin bağımlı kinaz (CDK 4/6), EGFR ailesi, FGFR , histon deasetilaz, IGF ve IGF-1R, insülin reseptör sinyal yolağı günümüzde devam eden ET ile kombine kullanılan terapatik hedeflerdir. (Şekil 2.4) (17).



Şekil 2.4. Meme kanserinde ET ile kullanılan monoklonal antikor, küçük moleküller ve bu terapatik uygulamaların hedeflerinin özeti. (Palmieri ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (17)

Tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın, halen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır. Kişilerin kanserden korunması, erken tanı ve kişiye özel terapi yaklaşımları bu hastalığı kontrol edilebilir boyuta taşımak için atılan adımlardır.

Tamoxifen

Östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$), meme kanserinin dörtte üçünde ifade göstermektedir. Östrojen tümör başlangıcında ve ilerlemesinde temel hormon ve aynı zamanda ligandır. Hormon temelli çalışmalarda ilk anlaşılır kanıt Beatson'ın iki vakada ooforektomiye takiben metastatik hastalıkta geçici gerilemeyi göstermesi ile gerçekleşmiştir. $ER\alpha$ biyolojisindeki anlaşılır gelişme akılcı tasarımların ve kadınlarda farklı klinik seyir izleyen ve $ER\alpha$ ifadesi olan tümörlerde östrojenik sinyalleri çeşitli düzeylerde durdurabilen farmakolojik ajanların oluşmasına katkı sağlamıştır.

Östrojen sinyal yolağının klasik modellemesi sirküle östrojenin özellikle $ER\alpha$ 'ya bağlanarak hedef hücreye alınmasını içerir. Bu etkileşim $ER\alpha$ 'nın şaperon proteininin yer değiştirmesi, reseptör dimerizasyonu ve ko-aktivatör molekül kuvvetlendirmesi ile oluşan transkripsiyonel kompleks ile başlar. Bu konformasyonel değişim sonucunda $ER\alpha$ ve

östrojen düzenleyen genlerin upstream ucunda bulunan promotör bölgesi “oestrogen-response elements- EREs” olarak bilinen hedef DNA sekansı arasındaki etkileşim kolaylaştırır.

ER α , amino-terminal bölgesinde ve karboksi-terminal bölgesinde aktivasyon fonksiyonu olan ve AF1 ve AF2 olarak adlandırılan iki farklı transaktivasyon domaini içerir. Bunlar transkripsiyon aktivasyonu için bağımsız ya da birlikte fonksiyon gösterebilirler. AF2 içeren ligand bağlayıcı domain (LBD) bağlanır ve östrojen regüle edilir. AF1 büyüme faktörü reseptörü ile ilişkili olan kinazlar tarafından fosforile edilir.

Meme kanserine neden olan kesin mekanizma tam olarak tespit edilmemesine rağmen hormonların vakaların %70’inde belirleyici rolü olduğu kabul edilmiştir (19) ve şu anki kemoprevensiyon stratejileri meme kanserinde hormon cevaplarını hedef almaktadır. Östrojen meme dokusunda normal ve malignant hücrelerin proliferasyonunda hücre bölünmesini düzenleyici olarak belirlenmiştir (20). Antiöstrojenik ilaçlarda iki temel sınıf olan SERMs (seçici östrojen reseptör modülatörü) ve AIs (Aromataz inhibitörü) günümüzde meme kanseri korumasında kullanılmaktadır.

Tamoxifen (TAM) sitrat ilk geliştirilen SERMs olup östrojen reseptörüne (ER) bağlanan östrojen ile yarışır (21). TAM 30 yılı aşkın bir süredir klinikte meme kanseri tedavisinde tekrarlama ve kontralateral neoplazide riski azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Invaziv ve non-invaziv meme kanserlerinde görülen risk azalması tamoxifen’in 1998 yılında “US Food and Drug Administration (FDA)” kurumu onayı ile sonuçlanmıştır.

Meme dokusunda yüksek östrojen seviyesinin yanı sıra yüksek aromataz seviyesinin de meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle aromataz inhibisyonunun östrojen üretimi ve östrojen ilişkili meme karsinogenezinde azalma yaratması beklenir. Klinik denemelerde test edilen pek çok antiöstrojenik ajan, endokrin yolağını ve ER(+) meme kanseri gelişimini baskırlar. Bu grup ajanların tüm meme kanserinde %20-30 oranında görülen ve kötü prognoz gösteren ER(-) meme kanserinde etkileri yoktur. Bu nedenle, bu alt tipin tedavisinde ve korumada yeni yolların, biyobelirteçlerin ve ajanların belirlenmesi değerlidir.

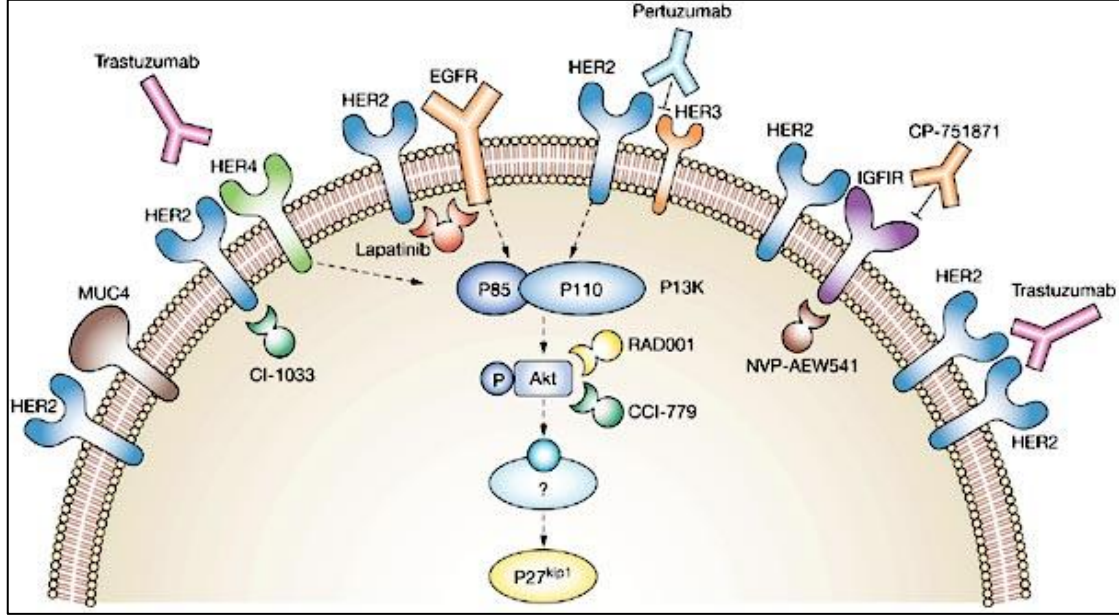
Herceptin (trastuzumab)

HER2 (ErbB2) gen amplifikasyonu ve aşırı ifadesi ile ilişkili olarak artan protein seviyesi meme kanseri içerisinde %30 civarında görülür ve genellikle HER2 negatif tümörler ile kıyaslandığında kötü prognoz ile koreledir (22). HER2 kanser yolağını hedefleyen araştırmalar ile terapilerde gelişme sağlanmıştır.

Trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc. San Francisco) HER2 proteininin ekstraselüler domainine'e karşı hazırlanan rekombinant monoklonal bir antikordur. Trastuzumab halen metastatik meme kanseri (MBC) tedavisinde HER2 odaklı terapide kullanılan FDA onaylı ilaçtır. HER2 proteini meme kanserinde birçok nedenden dolayı önemli bir terapötik hedefdir; HER2 invazif meme kanserlerinin %20-25'inde aşırı ifade olan bir gen olup, kötü prognoz ile seyrederek ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç gösterir. Genin amplifikasyonundan dolayı reseptör aşırı ifadelenir bu durum bir çalışmada HER2 kopya sayısının 25 kez artışı ile rapor edilmiştir (23). HER2'nin aşırı ifadesi immunohistokimyasal (IHC) olarak tanımlanan en yüksek (3+); reseptör seviyesi 2 milyon, orta derecede yoğunluk (2+); reseptör seviyesi yaklaşık 500.000 ve membrana bağlı HER2 normal seviyesi her hücre için 20.000 olarak raporlanmıştır (23). Kanser hücrelerinde HER2 geni amplifikasyonu normal hücrelere kıyasla fazladır. HER2 proteininin aşırı ifadesinin hem birincil tümörde hem de metastatik hücrelerde bulunması anti-HER2 tedavisinde etkin olacağını gösterebilir.

Tümörlerde HER2'nin aşırı ifadesini gerileyen trastuzumab mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da in vivo ve in vitro modellerde deneysel olarak birçok moleküler ve hücresel etkisi gözlenmiştir (23). HER2, PI3K (fosfatidilinozitol 3 kinaz), MAPK (mitojen-aktif edilmiş protein kinaz) gibi birden fazla hücresel sinyal yolağını aktive eder. Trastuzumab HER2'ye bağlanır ve p27^{Kip1} seviyesini artırarak hücre döngüsünü durdurup apoptozu tetikleyerek bahsedilen yollaklardaki sinyali azaltır (Şekil 2.5) (23). Trastuzumab'ın HER2 ekspresyonunu tam olarak azaltıp azaltmadığı açık olmamasına rağmen azalan reseptör sinyali trastuzumab aracılığıyla internalizasyon ve HER2 yıkımından kaynaklanabilir. Çünkü bazı çalışmalar reseptör seviyesinin trastuzumab uygulaması sonucunda değişmediğini göstermektedir (24,25). In vivo deneyler ve klinik denemelerden elde edilen veriler trastuzumab etkinliğinin immün sistem cevabını

başlatması ile kısmi olarak ilişkili olduğunu belirtmiştir. Trastuzumab gibi HER2 odaklı antikorların birçok meme kanseri hücre hattında antikor bağımlı hücrel sitotoksisite (ADCC) ile apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (25,26).



Şekil 2.5. Trastuzumab'ın etki mekanizması (Nahta ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (23)

HER reseptörüne bir ligandın bağlanması HER sinyal yolunda ilk basamağı oluşturmaktadır. Ligandın bağlanmasıyla HER reseptör ailesinde konformasyonel değişiklik meydana gelmektedir. Reseptördeki bu değişim dimerizasyon olarak adlandırılan başka bir HER aile reseptörü ile birleşmesi ile sonuçlanmaktadır. Daha sonra dimerize resptörlerin hücre içi tirozin kinaz domainleri transfosforilasyon ile aktive olmaktadır. Tirozin kinaz domainlerinin aktivasyonu altta birçok hücrel sinyali indüklemektedir. Reseptör aktivasyonu ile reseptör altında hücrel sinyal oluşumu birçok hücrel etki oluşturmaktadır (27).

Normal hücrelerde aktivasyon süreci sıkı şekilde kontrol edilmektedir (reseptör internalizasyonu gibi) ve böylece hücre büyümesi kontrol altında tutulmaktadır. Kanserde HER reseptörleri kontrolsüz aktive olmakta, böylece kontrol edilemeyen hücre büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımı gerçekleşmektedir. HER reseptörlerinin fazla ifade edilmesi veya hücre yüzeyinde fazla reseptörün varlığı sinyallerin artmasına neden olmaktadır. Genetik mutasyonlar da HER reseptör üretimine yol açabilir ve hatta reseptörü ligand bağlanmaksızın aktive edebilir.

Araştırma bulguları meme kanserinde büyümenin, östrojen reseptörü (ER) ve bir çok büyüme faktörü reseptör sinyal sisteminin koordinasyonu ile düzenlendiğini öne sürmektedir. ER ve büyüme faktörü reseptör sinyal iletim sistemi özellikle meme kanserinde endokrin terapiye direnç oluşum mekanizmalarından biri olan EGFR arasındaki karşılıklı etkileşim varlığı bilinmektedir (28,29). EGFR/HER2 sinyal iletim sisteminin aktivasyonu tümör hücrelerinde apoptoz inhibisyonu, hücre büyümesinin uyarımı, invazyon ve angiogenezin artırılması gibi çeşitli etkilerin oluşmasına neden olan kinaz sinyal basamaklarını başlatır. Hücre büyümesi ve hayatta kalması PI3K/Akt ve Erk1/2 MAPK iletim sistemlerinin aracılığıyla olur. Bu kinazlar fosforile olup ER'yi ya da AIB1 gibi koregülatör elementleri aktive etmesi nedeniyle bazı tümörlerde ER aktivasyonu içinde önemlidir (30,31). Steroid hormonlar ve büyüme faktörlerinin kanser hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisinin ortaya çıkması ile tirozin kinaz reseptörleri ve nükleer reseptörler arasındaki karşılıklı etkileşim önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Meme, endometrial ve uterus gibi dokular hem estradiol hemde IGF (insulin benzeri büyüme faktörü) cevabı verirler. Örneğin, MCF7 meme kanseri hücre hattında ER ve IGF-IR reseptörleri yer almaktadır. İlginç bir şekilde, her iki reseptörde aynı anda uyarıldığında IGF-IR ve ER aditif ya da sinerjistik etki gösterir. Bu durum farklı yapısal ailelerde yer alan bu reseptörler arasında karşılıklı bir etkileşim olabileceğini göstermiştir (32).

Meme kanseri biyolojisi ve hormonal ajanlar ile terapatik cevap için önemli olan HER reseptör ailesinde içinde yer aldığı diğer reseptör aileleri ve ER arasındaki karşılıklı etkileşim önemlidir (33). Meme kanseri hücrelerindeki östrojenin biyolojik etkisi $E\alpha$ ve $E\beta$ olarak bilinen iki reseptör aracılığıyla sağlanır. Östrojenin ER'a bağlanması reseptörün fosforilasyonunu başlatır. Proteinler ile reseptör dimerizasyonu tetiklenir ve reseptörün DNA promoter bölgelere bağlanması kolaylaşır (34). Aktif olan ER östrojen cevap elementlerini (ERE) ve promoter bölgelerini içeren genlerin transkripsiyonunu ayarlar (Klasik genomik sinyal iletim sistemi) (34). ER kompleksi aynı zamanda c-fos/c-Jun gibi diğer transkripsiyon faktörleri koaktivasyonu aracılığıyla gen transkripsiyonunu ayarlar (klasik olmayan sinyal iletim sistemi) (35). Genomik östrojen sinyal sistemi IGF-IR, siklin D1, IGF-II ve VEGF gibi tümör gelişiminde önemli proteinleri kodlayan genlerin ifadesini uyarır (34,35). EGFR ve HER2 içeren pek çok gen östrojen sinyali ile azalır. ER aynı zamanda membran östrojen sinyali olarak da bilinen genomik olmayan mekanizma ile hücre fonksiyonları düzenler (33). Burada ER ve büyüme faktörü reseptörleri arasında

karşılıklı etkileşim meydana geldiği görülür. ER'nin bir kısmı sitoplazma, mitokondri ve plazma membranı gibi çekirdek dışındaki yapılarda yer alır. Bu ER'ü işlevsel olarak büyüme faktörü ligandını andırır. Plazma membranı ile ilişkili ER siklik AMP gibi ikincil mesajcılarının seviyesini artırır (36) ve IGF-IR, EGFR ve HER2 gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleri aktiveleşir (37,38). ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşim çift yönlüdür. MAPK ve Akt gibi birçok kinaz ER'nün spesifik bölgelerini fosforlar ve bu durum ligand bağımsız ER aktivasyonuna sebep olur. Örneğin; MAPK ile fosforlanan AIB1 ER bağımlı transkripsiyonunu artırır (30) ve AIB1 aşırı ifadesi HER2 ile transfekte edilmiş MCF7 hücrelerinde tamoxifen bağlı ER'yi zıt etki yerine östrojen ile aynı etkiye çevirir (39). Bu bulgu ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki karşılıklı etkileşimin tamoxifen direncinde önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Genomik ve genomik olmayan mekanizmalar ile ER ve büyüme faktör reseptörleri arasındaki hücre büyümesi ve hayatta kalıma neden olan iletişim ağı HR+ ve HER2+ meme tümörlerinde tehlikeli bir döngü kurmuştur. Bu nedenle bu iki reseptör sistemi birbirini aktif hale getirme kapasitesine sahiptir ve akılcı terapi stratejisi bu iki reseptörü hedef alan kombine terapiler olabileceği düşünülebilir.

Yeni nesil kemoprevansiyon ajanları

EGFR-tirozin kinaz inhibitörleri

Kanser gelişim biyolojisinde oluşan bilgi birikimiyle birçok yeni nesil kemoprevansiyon ajanı geliştirilmiş olmakla birlikte hala devam eden araştırmalar da bulunmaktadır. Bu ajanlar retinoid, tirozin kinaz inhibitörleri (TKIs), COX2 inhibitörleri, statinler, PPAR ve diğerleridir.

EGFR birbirine yakın ilişkili 4 reseptörden oluşan bir ailedir. EGFR (erbB1), HER2/neu (erbB2), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4) tirozin kinaz aktivitesini kullanarak hücre bölünmesi ve apoptoz inhibisyonu, metastaz gibi tümör büyümesini sağlayan pek çok sürece katkı sağlar. Bu özellikleri ile kanser tedavisinde ve korumasında etkili ajandır çünkü bloklanabilen ErbB sinyal yolağı meme kanseri tedavisinde ve korumada umut verici olmaktadır (22).

Özellikle anti-östrojen terapisi direnç mekanizmasının genellikle HER1 ve HER2 reseptörlerinin ekspresyonunun artması ile ilişkili olması sebebiyle EGFR-HER1 ve HER2 yolağı üzerinden sağlanabilecek tedavi yöntemleri önemli duruma gelmektedir. Tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu EGFR sinyal akışı ile alakalı olması nedeniyle ER bağımsız meme kanseri tedavi ve korumasında doğru bir yolak olabilir.

ErbB aktivitesini inhibe edebilen farklı ve birbirine bağlı iki strateji bulunmaktadır. İlki monoklonal antikor (trastuzumab) iken ikincisi tirozin kinaz inhibitörleridir. İki strateji birçok farmakolojik özellikleri açısından birbirinden farklıdır.

Protein kinazlar ve sinyal iletimi

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (40). Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır. Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK ailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır. RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. İstirahat halindeki hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homolog-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol

altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (40). Protein kinazlar, protoonkogenin retroviral transdüksiyonu, “Gain of Function (GOF)” mutasyonları ya da protein kinazın aşırı sentezlenmesi yolları ile onkojenik transformasyona uğrayabilirler. Tümör hücrelerinde, protein kinaz sentezinin artması da onkojenik transformasyonda etkili olmaktadır. Örneğin; meme kansinomalarda da HER2/neu sentezi artmaktadır. Son yıllarda ivme kazanan hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında tümör hücresi büyüme faktörü reseptörlerini bloke eden monoklonal antikorlar (örneğin, Herceptin) veya doğrudan tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden ilaçlar (örneğin, Gleevec) ile klinik çalışmalar yürütölmektedir (41).

2.3. mikroRNA

MikroRNA’lar (miRNA) 20-25 nt uzunluğunda protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA’lar pekçok organizmada evrimsel olarak korunan diziler olup post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu baskırlarlar (42). İlk olarak bazı miRNA’ların bu süreçleri tek bir hedef geni baskırlayarak düzenledikleri belirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA’nın tek başına birden fazla hedef geni baskırlayabildiği anlaşılmıştır (43,44). Hedef genleri baskırlayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar.

miRNA’ların büyük çoğunluğu protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak genler arası bölgelerde veya ekzonlarda da bulunabilirler. İnsanda bugüne kadar tanımlanmış 1881 öncül ve 2588 olgun miRNA bulunmaktadır ve protein kodlayan genlerin yaklaşık %60’ının miRNA’larca düzenlendiği tahmin edilmektedir (45). Bilinen miRNA genlerinin çoğunluğu birbirinden bağımsız ifade edilir, %15 kadarı gen kümelerinde yer alır.

1993 yılında Victor Ambros ve Gary Ruvkun *C. elegans* da ilk miRNA keşfini yapmışlardır. Gary Ruvkun ve ekibi *lin-4* geninin *C. elegans* gelişiminde önemli bir regölatör gen olduğunu fakat bu durumun protein kodlayarak değil 22 nükleotidlik küçük bir RNA molekölü ile gerçekleştiğini keşfetmiştir. *lin-14* geninin 3’ UTR bölgesinde *lin-4* RNA’ları ile komplementer bir kaç bölge olduğu farkedilmiştir. Ruvkun ve ark. bu komplementarite nedeniyle *lin-14* mRNA seviyesinde farkedilir bir değişim olmaksızın *lin-14* protein miktarının azaldığını göstermiştir (46).

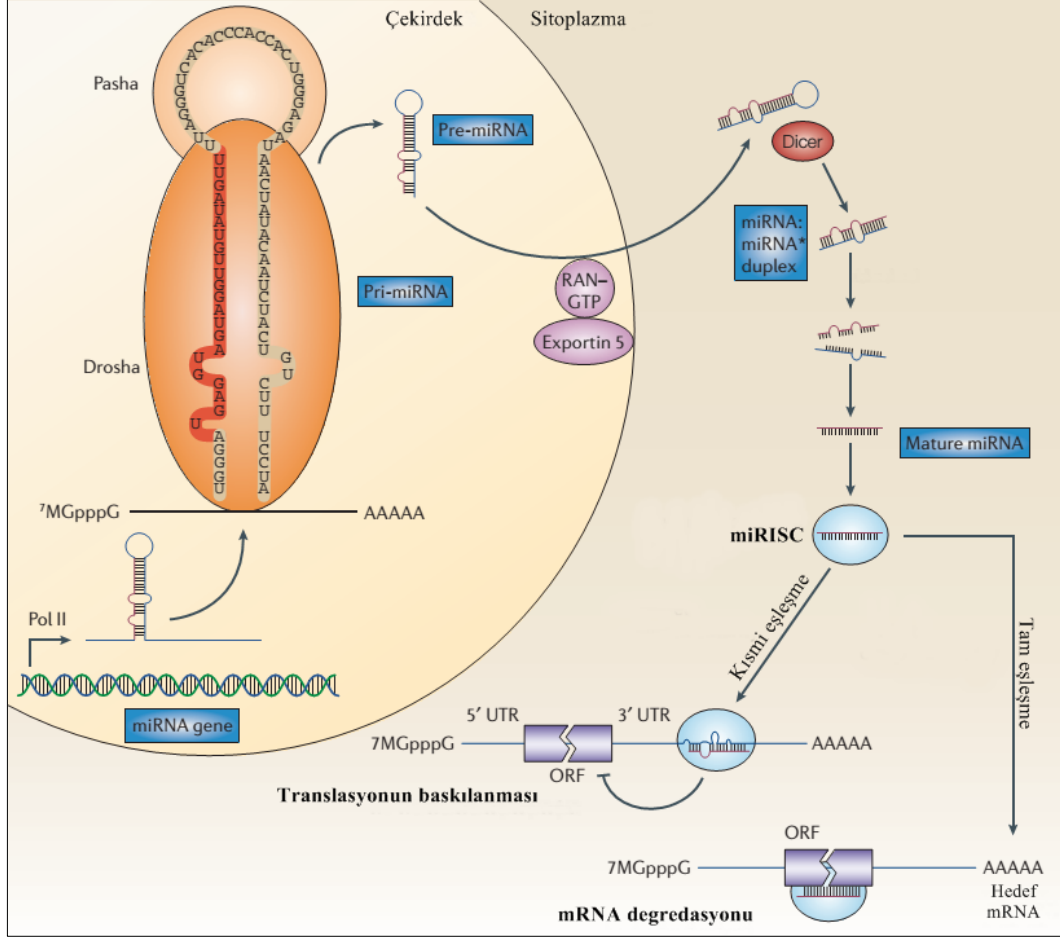
2.3.1. miRNA biyogenezi

İnsanlarda miRNA'lar pri-miRNA adı verilen diziler halinde transkribe olurlar ve 5' cap ve 3' poli A kuyrukları vardır (47,48). pri-miRNA transkriptleri iki aşamalı süreç sonrasında olgun ve işlevsel miRNA formunu alırlar. Nükleusta gerçekleşen ilk aşama RNAz III enzimlerinden biri olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DGCR8 (Pasha) tarafından gerçekleştirilir (49,50). Drosha pri-miRNA'nın her iki ipliğini keserek pre-miRNA adı verilen öncül molekülü oluşturur (50). Oluşan pre-miRNA'lar nükleer transport reseptörü eksportin ve nükleer protein Ran-GTP aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır (51). Son adımda diğer bir RNAz III enzimi olan Dicer ve RNA bağlama proteini olan TRBP-transaktive RNA binding protein tarafından kesilir (52). Sonuçta yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda çift iplikli RNA molekülü oluşur. Bu molekül daha sonra RISC (RISC-RNA indükleyici kompleks) adı verilen protein kompleksine bağlanır (53). RISC, çift ipliğin açılmasıyla aktive olur. miRNA molekülü, hedef mRNA'lara yönlendirirken, açılmış çift iplikli yapının diğer ipliği yıkılır ya da aktif olgun miRNA olarak işlev gösterir (Şekil 2.6) (54).

miRNA'lar hedef mRNA'ları ile yüksek oranda korunmuş 6-8 nükleotidlik bir bölge (çekirdek bölge) aracılığı ile etkileşirler (54). Hedef ile miRNA'nın 5' ucunun 2. ve 8. nükleotitleri arasında eşleşme olması hedefin belirlenmesi açısından önemlidir. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi veya tam eşleniklik göstererek bağlanabilirler. Hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesi ile miRNA çekirdek bölgesi arasındaki eşlenikliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler.

miRNA ve hedef mRNA arasındaki eşleniklik derecesine göre miRNA'lar hedef genlerini iki yolla negatif olarak regüle ederler (Şekil 2.6) (55). Eğer eşleniklik çok yüksek seviyede ise RISC hedef mRNA'ları yıkar. RISC'e yüklenmiş miRNA'lar aracılığı ile mRNA'ların poli-A kuyruklarının ve 5'-cap yapılarının yok edilip mRNA bozulumunun tetiklendiği belirlenmiştir (56). Poli-A kuyruklarının ve 5'cap yapılarının yok olması sonucunda kararlılıkları azalan mRNA'lar hücrel enzimler tarafından parçalanır. Bu mekanizma genellikle bitkilerde görülür. Hayvanlarda ise miRNA'ların hedef mRNA üzerinde bağlanma bölgeleri genellikle 3'UTR'dadır ve gen ifadesi baskılanır. Genellikle memelilerde görüldüğü gibi eşleniklik daha az ise, hedef mRNA'dan protein oluşumu

baskılanır (57,58). miRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelliyor olması muhtemel gözükmektedir.



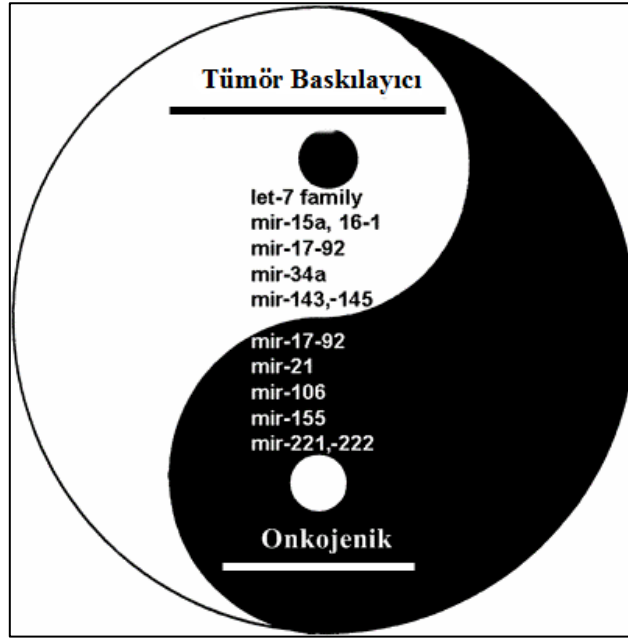
Şekil 2.6. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması (Esquela ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (55)

2.3.2. miRNA ve kanser

Tümör baskılayıcı ve onkogen olarak miRNA'lar

Birçok deneysel çalışma mikroRNA'ların yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı oluşturabileceğini göstermiştir (59). Bazı miRNA'ların ifadesi kanserli hücrelerde azaldığı ve bu miRNA'ların genel olarak tümör baskılayıcı işlev gösterdiği bildirilmiştir (Şekil 2.7) (60). Tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunu onkogenleri engelleyerek ve farklılaşmayı sağlayan genlerin aktivitesini artırarak engellerler. İlk keşfedilen miRNA olan let-7, tümör baskılayıcı işlev gösterdiği belirlenen ilk miRNA'lardandır. let-7'nin

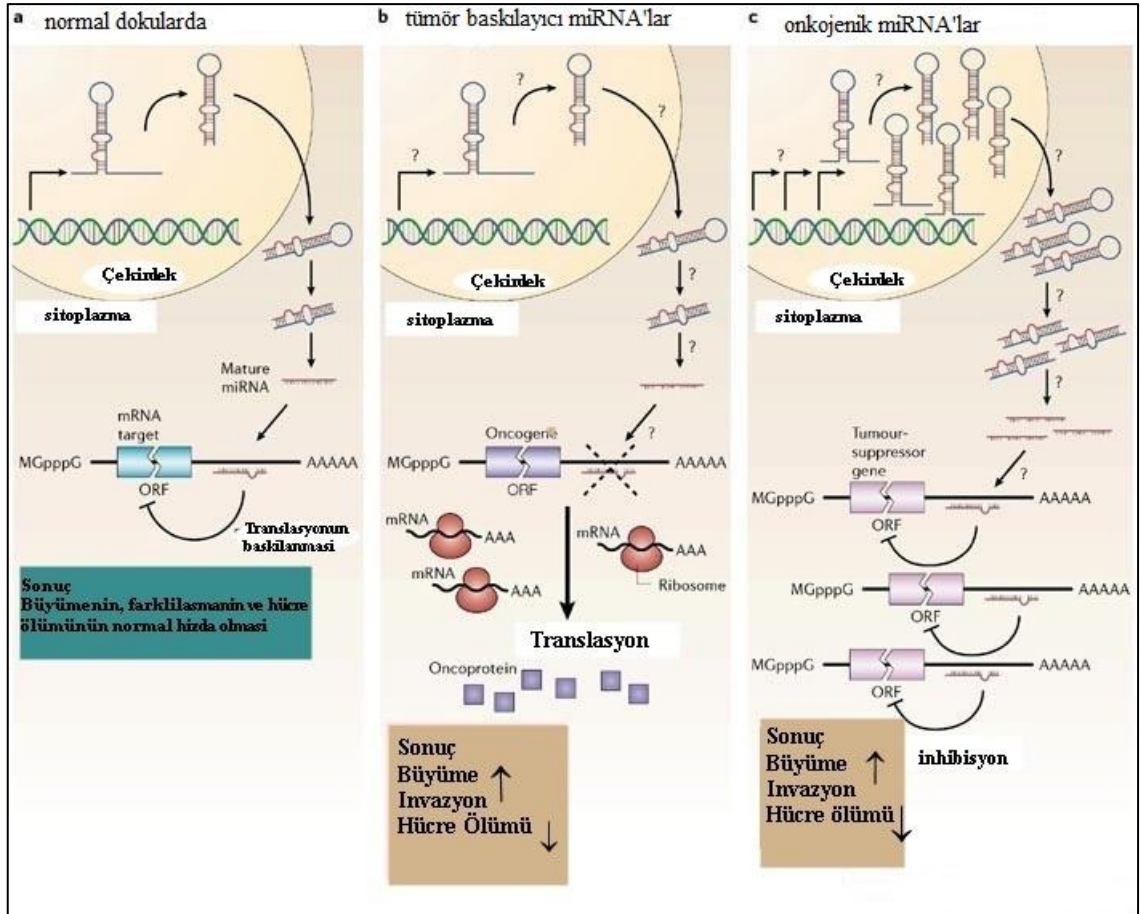
kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkojenik farklılaşma kaybına yol açtığı belirlenmesi let-7'nin tümör baskılayıcı etki gösteren bir miRNA olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren diğer miRNA'lardan miR-15a/16-1 grubunun (61) kronik lenfotik lösemide anti-apoptotik gen BCL-2'yi hedef aldığı belirlenmiştir (62).



Şekil 2.7. Kanserde miRNA aktivitesi (Tong ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (60)

Let-7 gibi bazı miRNA'lar genel olarak tümör baskılayıcı işlevi gösterirken, bazıları da tümör dokularında normal dokulara göre daha fazla ifade edilir ve tümör baskılayıcı genleri hedef alarak onkojenik işlev gösterirler (Şekil 2.8) (55).

Tümörlerde gen ifadeleri artan miRNA'lar onkogenler olarak sınıflandırılabilir. Bu onkogen miRNA'lar onkomirler olarak bilinir ve tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden genleri engelleyerek tümör oluşumunu tetiklerler. Onkogen olarak işlev gösterdiği belirlenmiş miRNA'lardan işlev mekanizması diğerlerine nazaran iyi belirlenmiş olan miR-17-92 grubuna dahil olan miRNA'lar, c-myc onkogeni aracılığı ile transaktif olurlar ve kemirgen modelleriyle gerçekleştirilen çalışmalarda lenfogenezi hızlandırdıkları belirlenmiştir (60,63,64).



Şekil 2.8. Tümör baskılayıcı ve onkogen olarak miRNA'lar (Esquela ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (55)

Kanserde miRNA profili

Normal doku ve tümör gelişiminde miRNA'ları içeren birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan gen ifade çalışmalarında ilk olarak normal meme dokusunu diğer dokulardan ayıran özgül miRNA'ların varlığı gösterilmiştir (65). Ek olarak, anormal miRNA ifadesinin meme kanseri ile bağlantılı olduğu Iorio ve ekibi tarafından belirlenmiştir. Normal ve neoplastik meme dokusu arasında meme kanserinde spesifik miRNA profili oluşturulmuştur (66). Çalışmada 76 meme kanseri ve 34 normal örnek kullanılarak miRNA ekspresyonu incelenmiş ve 29 miRNA ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Normal ve neoplastik meme dokusu arasında en fazla ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lar; miR-155, miR-21, miR-10b, miR-125b ve miR-145 . miR-10b'nin meme kanseri hücrelerinin invaziv olması ile ilişkili olduğu in-vivo ve in-vitro olarak gösterilmiştir. miR-10b kanser hücrelerinin metastatik özelliği ile bağlantısı belirlenen ilk miRNA'dır. miR-17-5p, meme kanserinde tümör oluşumunda AIB1 onkogeninin negatif regülasyonunda yer

alan diğerk miRNA'dır. AIB1 geni meme kanserinde proliferasyon yollağında yer alıp aşırı ekspresyon gösterir (67,68). miR-17-5p ekspresyonu meme tümörlerinde azalır ve bu durum AIB1 ekspresyon seviyesinin artışı ile ilişkilidir. Normalde AIB1 geninin 3 UTR bölgesinde miR-17-5p bağlanma bölgesi yer almaktadır ve miR-17-5p'nin aşırı ifadesi AIB1 protein seviyesini azaltır. miR-21 normal ve malignant meme tümörlerinde farklı eksprese olan bir diğerk miRNA'dır. Meme kanserinde miR-21 aşırı ifade olur ve fare modellerinde bu miRNA'nın inhibisyonu tümör oluşumunu apoptoz ve hücrel proliferasyonu azaltarak baskılar (69).

miRNA'ların ifade profillerinin belirlenmesi yalnızca karsinogeneizde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi açısından değıl, kanserlerin sınıflandırılması açısından da faydalıdır. Farklı dokulardan kökenlenen birçok tümör, yalnızca miRNA ifade profillerine göre sınıflandırılabilir. Bu konuda yapılan ilk pilot çalışmada 129 miRNA'nın insan kanserlerini sınıflandırabileceğı gösterilmiştir (70). Bu miRNA'ların ifadesinin kanser dokularında, normal dokulara nazaran özellikle az miktarda olduğı belirlenmiştir. Bu durum karsinogeneizde miRNA ifadesinin baskılandığına işaret eder. Ayrıca miRNA profilleri tümörlerin gelişimsel kökenlerini ve farklılaşma derecelerini göstermesi açısından da bilgilendiricidir. Bu sebeple geniş anlamda miRNA'ların hücreleri daha farklılaşmış bir aşamaya götürdükleri ve bu miRNA'ların tümörlerde görülen ifade profillerinin normal dokularla karşılaştırılmasının bu hücrelerde farklılaşmanın derecesini gösterdiği düşünölebilir.

miRNA profillerinin belirlenmesinin mRNA profillerine göre avantajı, miRNA'ların mRNA profillerinin ayırt edemediğı az farklılaşmış kanser tiplerini sınıflandırabilmesidir. Rosenfeld ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada miRNA ifade profilleri ile kanserin kökenlendiğı dokunun doğru olarak tanımlanabildiğı belirlenmiştir. Dolayısıyla miRNA profillerinin, kökenlendiğı doku bilinmeyen kanserlerin tanımlanması açısından büyük klinik önemi vardır. Rosenfeld'in çalışmasında 253 örnek miRNA mikrodizin analizi ile incelenmiş ve 22 kanser tipi 48 miRNA ile %90'dan fazla doğrulukla sınıflandırılmıştır (71).

2.3.3. Tedavide hedef olarak miRNA'lar

miRNA keşfi ve tümör oluşumundaki fonksiyonları klinik uygulamalar için bir fırsat oluşturmıştır. Teşhis ve tedavide miRNA uygulamalarının mRNA profil uygulamalarına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yakın zamanda miRNA temelli terapötik uygulamaların spesifik ve sentetik olarak dizayn edilen miRNA'lar ile in vivo koşullarda gen susturma işleminin başarılı olacağı ve miRNA ilaç hedef bölgesi alanına doğru sürükleneyeceği umulmaktadır.

Teşhiste miRNA kullanımı

Klinik tanı açısından miRNA'ların yararlı olabileceğine dair farklı görüşler bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi kanser teşhisinde miRNA'ların yer almasıdır. Birçok çalışma miRNA ekspresyon paterninin yüksek doğrulukla tümörlü dokunun farklılaştığı dokuyu tespit edebilmekte olduğunu göstermektedir. Örneğin pankreatik kanserde yapılan miRNA ekspresyon profili ile benign ve malignant formu birbirinden ayrıldığı bağımsız çalışmalarda bildirilmiştir (72,73). Son yapılan analizlerde, 65 pankreatik duktal adenokarsinoma ve 42 kronik pankreatitis vakası incelenmiş ve deregüle olan 22 miRNA'nın başarılı bir şekilde benign ve malignant formu %93 doğrulukla ayırabildiği saptanmıştır (74,75). Diğer bir uygulama ise miRNA profili ile tümörün kaynaklandığı dokuyu tespit etmektir. Son 5 yılda yapılan tümör profil çalışmaları her kanser tipinin özgün bir miRNA ekspresyon işareti olduğunu ve böylece pre-malignant lezyonların malignant olanlardan, normal dokuların neoplastik dokulardan ayırt edilebileceğini göstermektedir (72,73,76)

miRNA ifade imzaları aynı zamanda tümör alt sınıflarını ayırt etmede de yardımcı olabilir. Akut lösemide tedavi kararları farklı alt tiplerin immunohistokimyasal, hücre morfolojisi ve sitogenetik yöntemlerin birlikte kullanılarak ayırt edilebilmesine dayanır (77). Bu zamana kadar tek başına doğru taksonomiye tespit edebilen bir test bulunmamaktadır ve klasik mRNA profillemesi sınıflandırmada kısıtlamalar getirmektedir (78). Mi ve arkadaşları tarafından 72 akut lösemi vakasında miRNA ekspresyon profili oluşturulmuş ve ALL ve AML formlarında farklı ekspresyon gösteren 27 miRNA saptanmıştır. Ayrıca bunlardan sadece 4 miRNA'nın %100 duyarlılıkta ve özgünlükte ALL formunu AML

formundan ayırt edebildiği gösterilmiştir (79). Bağımsız çalışmalarda ve çok sayıda örnekle doğrulanabilirse miRNA profillemesi bu hastalık için uygulanabilir düşük fiyatlı bir uygulama olabilir.

Sonuç olarak; miRNA mRNA ile kıyaslandığında hücresel farklılaşmadaki fonksiyonları ve düzenleyici rolleri ile daha detaylı ve açıklayıcıdır. Bu güçlü özellikleri sayesinde zorlu malignitelerin tedavi kararlarında belirleyici olabilirler.

Prognozda miRNA'lar

Tümör sınıflandırmasından daha önemli olan kısım, miRNA ekspresyon paterni ile kanserlerin klinik tutumlarının tahmin edilebiliyor olmasıdır. Literatürde bu konuda ciddi çalışmalar yer almaktadır. Let-7 ailesi üyelerinin ekspresyonlarının akciğer kanserinde ameliyat sonrası hayatta kalma ile korale olduğu iki farklı yayında gösterilmiştir. Her iki çalışmada da azalan let-7 ile ameliyat sonrası hayatta kalma süresinin kısaldığı ve bu durumun hastalığın aşamasından bağımsız olduğu bildirilmiştir (80,81). miR-155'in aşırı ekspresyonu ile akciğer kanseri ameliyat sonrası hayatta kalma ilişkisinin zayıf olduğu bulunmuştur. miR-155 biyolojik olarak daha agresif tümör fenotipinde öngörücü bir rol oynayabilirken miR-200c kolorektal kanser için belirleyici bir miRNA olarak belirlenmiştir (80,81).

miRNA ekspresyon paterni teşhis ve tedavide önemli ipuçları sağlamaktadır. miRNA temelli incelemeler klasik mRNA incelemelerine göre daha avantajlıdır. miRNA'lar uzun süre in vivo koşullarda stabil kalabilirler ve FFPE dokulardan izole edilerek etkin şekilde analiz edilebilirler. miRNA'ların (binlerce) sayısı mRNA transkript sayısı (onbinlerce) ile kıyaslandığında rutin klinik uygulamalarda daha az külfetli ve uygulanabilir oldukları söylenebilir.

Terapatik hedef olarak miRNA

Başlangıçta ve ilerleyen kanserlerde terapatik yönlendirmeler ve yeni terapilerin gelişimi için miRNA'lar yeni bakış açısı yaratmıştır. Onkogenik miRNA'ların ifadesini azaltmak için anti-sense oligonüklotidler (ASO) kullanılarak öncül ya da olgun formları hedef

alınırken tümör baskılayıcı miRNA'lar anti-kanser efekti için direkt olarak upregüle edilebilirler. LNA (locked nucleic acids), AMO (anti-miRNA oligonucleotides) ve antogomir olmak üzere 3 temel sınıf anti-sense oligonüklotid geliştirilmiştir.

Bu zamana kadar miRNA ile insan kanser terapisine ait rapor olmamasına karşın, çalışmalar özel antisense oligonükleotidler ile in vitro ve daha da önemlisi in vivo koşullarda özgül patolojik miRNA'ları potansiyel hedef olarak göstermektedir. Meme kanserinde azalan migrasyon ve invazyon miR-125a ve miR-125b tarafından indüklenlerinken (82), miR-17-5p ve miR21 proliferasyonu engeller (70). Mir15a/16-1 CLL hücrelerinde apoptozu uyarır (62). Let-7'nin aşırı ekspresyonu kolon ve akciğer kanserinde proliferasyonu engeller. Son çalışmalardan biri, miRNA ile gerçekleştirilen direkt terapi ile klasik kemoterapi-radyoterapi kombinasyonunun yararlı olabileceğini göstermektedir. Akciğer kanserinde let-7'nin aşırı ifadesi ile ışın duyarlılığı sunulabilir (3). miR21 artışı hedeflenerek koloanjyokarsinomda gemcitabine adlı kemoterapötik ajana duyarlılık oluşturulabilir (2).

Etkin miRNA temelli tedavi gelişiminde kilit sorunlardan biri etkili ajanı stabil şekilde ve hedef hücrenin içine ulaştırmaktır. Bu alanda RNAi (RNA müdahalesi) teknolojisi ile belirgin bir ilerleme sağlanmıştır. Küçük RNA moleküllerinin, dizi benzerliği taşıdıkları mRNA'larla eşleşerek, onların yıkımına yol açarak veya translasyonu önleyerek gen ifadesini baskılamaları olayına RNA müdahalesi ("RNA interference") denilmektedir. Amerikalı bilim adamları Andrew Fire ve Craig C. Mello, RNA müdahalesi çalışmaları ile 2006 yılı Nobel Tıp Ödülü'nü paylaşmışlardır.

2.4. Yüksek İşlem Kapasiteli Sistemler

1869'da Friedrich Miescher'in DNA izolasyonunu gerçekleştirmesi, 1975'de Southern blotlama ve hibridizasyon ve 1985'de ise PCR teknolojisinin keşfini takiben moleküler biyolojik çalışmalar hızlı bir değişim içerisine girmiş ve qRT-PCR dizin, mikrodizin, tüm genom sekanslama gibi yüksek işlem kapasiteli sistemler gelişmiştir.

2.4.1. Mikrodizin

Cam, plastik veya silikon gibi katı bir yüzey üzerine DNA, protein gibi özgünlüğü bilinen yapıların sabitlenmesi ile elde edilen çiplerin kullanıldığı yöntem mikrodizin teknolojisi denilmektedir. Yüksek kapasiteli teknoloji olarak kabul edilen bu yöntem ile tek seferde büyük miktarda bilgi elde edilebilir. Polimorfizm (SNP) analizleri, mutasyon analizleri, hedefe özgü terapötik ilaç gelişimi, DNA metilasyon profili, gen ekspresyon profili gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Mikrodizin tekniğinin en sık kullanım alanı gen ifadesindeki farklılıkların ölçülmesidir. Genomik DNA'dan transkripsiyona uğrayan genlerin tümüne transkriptom veya gen ifade profili adı verilmektedir. Mikrodizin yöntemiyle çeşitli patolojik şartlarda gen ifade şeklindeki değişim tespit edilebilir.

Pratik bir şekilde ve kısa zamanda farklı koşullarda, farklı hücrelerde tüm gen ifade profilini karşılaştırmayı sağlaması gibi avantajlarının aksine hibridizasyona bağlı bir teknik olması nedeniyle yüksek oranda benzerlik gösteren dizilerde sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan mikrodizin analizleri sonucunda elde edilen verilerin eş-zamanlı PZR gibi altın standart olan klasik gen ifade analizleri ile doğrulanması gerekmektedir.

2.4.2. Eş-zamanlı PZR dizin yöntemi (qRT-PCR array)

Eş zamanlı PZR (qRT-PCR) RNA hedeflerinin tespiti ve miktar ölçümü için standart haline gelmiş olup araştırma teknolojilerinde temel yöntem olarak yerini almıştır. qRT-PCR çalışma prensibi basitçe şöyledir: RNA'nın RT (reverse transkripsiyon) işlemiyle cDNA dönüşümü sonrasında PZR ürününün varlığını tespit edebilen floresan boya sistemleri (SYBR Green) aracılığıyla çoğalmayı eş zamanlı olarak bilgisayar programıyla görüntüleyip miktar tayini yapabilmektedir.

qRT-PCR, mikrodizin yada RNA sekanslaması gibi yöntemlerle kıyaslandığında düşük maliyet ve yüksek duyarlılık kombinasyonu ile gen ifade tayininde altın standart olarak yerini almaktadır. Yüksek kapasiteli çalışmaların validasyonunda ve klinik biyobelirteç gelişiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda binlerce transkriptin aynı anda ölçümünü sağlayabilmek için qPCR temelli teknolojiler gelişmektedir. Örneğin; Qiagen,

Human miRNome miRNA PCR Array bu sistemlere bir örnektir ve bu plakalar ile aynı anda tek bir örneğin tüm mikroRNA profili elde edilebilir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

MikroRNA'lar küçük ve protein kodlamayan endojen RNA molekülleridir. miRNA'ların düzenleyici rolleri üzerine yapılan deneyler bu molekülerin başkalaşım, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi farklı hücresel işlemlerde önemli roller aldığını göstermiştir. Bu işlemlerin genellikle kanserde disregüle olduğunun bilinmesi miRNA'ların kanserle olabilecek ilişkilerine dikkat çekmektedir. Literatürde meme kanserinde miRNA ifade profillerinin araştırılan mikrodizin çalışmaları yer almaktadır. Meme kanseri konusunda yapılan miRNA ifade çalışmaları, miRNA'ların meme kanserini sınıflandırmada ve hastalığın gidişatını belirlemede önemli bir yere sahip olduğunu, tümör dokusunu normal dokudan ayıran miRNA'ların varlığını göstererek ayrıca miRNA ifade profillerinin ER ve PR ifadesi (miR-30) ve tümör derecesi (miR-213 ve miR-203) gibi patolojik verilerle de ilişkili olduğu göstererek işaret etmektedir. miRNA alanındaki gelişen ve derinleşen çalışmalar miRNA klonlaması, kantitatif PZR ve mikrodizin gibi yöntemleri kullanarak meme kanseri araştırmaları için yeni veriler çıkartmaya devam etmekte ve hastalığın oluşumu ve gelişimi ile ilgili soru işaretlerine cevap aramaya devam etmektedir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda meme kanseri tedavisinde duyarlı olan miRNA'ları belirlemeye yönelik çok az çalışma göze çarpmaktadır.

Tedaviye duyarlı miRNA'ların bulunmasına yönelik yapılan in vitro çalışmalarda miR-34a ve mir-221/222'nin docetaxel ve tamoxifen ilaçlarına cevap veren miRNA'lar oldukları gösterilmiştir. Trastuzumab'a duyarlı meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada miR-26a ve miR-30b'nin ifadelerinin trastuzumab ile düzenlendiği gösterilirken, miR-30b'nin trastuzumab uygulaması ile ifadesinin arttığı ve hücre çoğalmasını *CCNE2*'yi hedefleyerek durdurduğu gösterilmiştir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar tamoxifen'e ve trastuzumab'a cevap veren ve meme kanserinde regüle olan miRNA'ları bulmaya yönelik olsa da ortak moleküler mekanizmaları miRNA boyutunda aydınlatacak bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma, iki farklı meme kanseri alt-tipine uygulanacak olan iki farklı ilaç ile ortaya çıkacak duyarlı miRNA'lar arasında farklılık gösteren ve ortak olan miRNA listelerinin bulunmasını hedeflemektedir. Ayrıca bu ilaçların ortak moleküler etki mekanizmalarını miRNA boyutunda açıklamayı hedefleyen ilk çalışma olacaktır. Bu

Çalışma ile meme kanseri patolojik alt tiplerinde değişmeyen ve tedaviye yanıt veren ortak miRNA imzası bulunması amaçlanmaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Meme kanseri hücre hatları

Çalışmalarda ATCC marka SK-BR-3 (HTB-30), BT474 (HTB-20) ve MCF7 (HTB-22) meme kanseri hücre hatları kullanılmış olup MCF7 hücre hattı Yrd. Doç. Dr. Arzu Atalay tarafından hediye edilmiştir. Çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatları, patolojik bilgileri ve kullanılan ilaca cevap durumları Çizelge 4.1’de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatları, patolojik bilgileri ve kullanılan ilaca cevap durumu

	ER	PR	HER2	İlaç Cevabı
SK-BR-3	-	-	+	trastuzumab duyarlı
MCF7	+	+	-	tamoxifen duyarlı
BT474	+	+	+	trastuzumab ve tamoxifen duyarlı

Hücre idamesi için Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (Lonza, BE12-741F), RPMI-1640 (Lonza, BE12-702F) ve McCoy’s (Lonza, BE12-688F) besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerine fetal calf serum (FCS) (Biowest, S181G-500) ve penisilin/streptomisin (Biowest, L0018-100) ve gerektiğinde L-glutamin (Lonza, BE17-605E) ve Bovine İnsulin (Sigma, I6634) eklenmiştir. Hücrelerin yıkanması için PBS (Lonza, BE17-516F) ve hücrelerin plakalardan kaldırılması için tripsin-EDTA (Lonza, BE17-161E) kullanılmıştır.

HER2+ hücre hatlarında etkili olduğu bilinen trastuzumab (Herceptin) Prof. Dr. Hakan Gürdal tarafından hediye edilmiştir. Östrojen reseptörünü hedef alan tamoxifen (54965-24-1) ise TOCRIS firması tarafından sağlanmıştır.

4.1.2. Kullanılan kitler

Hücrelerin ilaçlara olan hassasiyetleri WST-1 (Hücre proliferasyon reaktifi) (Roche, 11 644 807 001) protokolü ile belirlenmiştir. İlaç ile muamele edilen hücrelerden ve edilmeyen kontrol hücrelerinden RNA izolasyonu QIAzol (Qiagen, 79306) ile gerçekleştirilmiştir. Total RNA kullanılarak yapılan cDNA sentez reaksiyonlarında miScript II RT (Qiagen, 218160) kiti kullanılmıştır. Elde edilen cDNA’lar SYBR green ve

Taq polimeraz enzimini içeren PCR karışımı ile bir araya getirilerek Human miRNome miRNA PCR Array (Qiagen, MIHS-3216Z) miRNA qRT-array sistemi kullanılarak miRNA profili oluşturulmuştur.

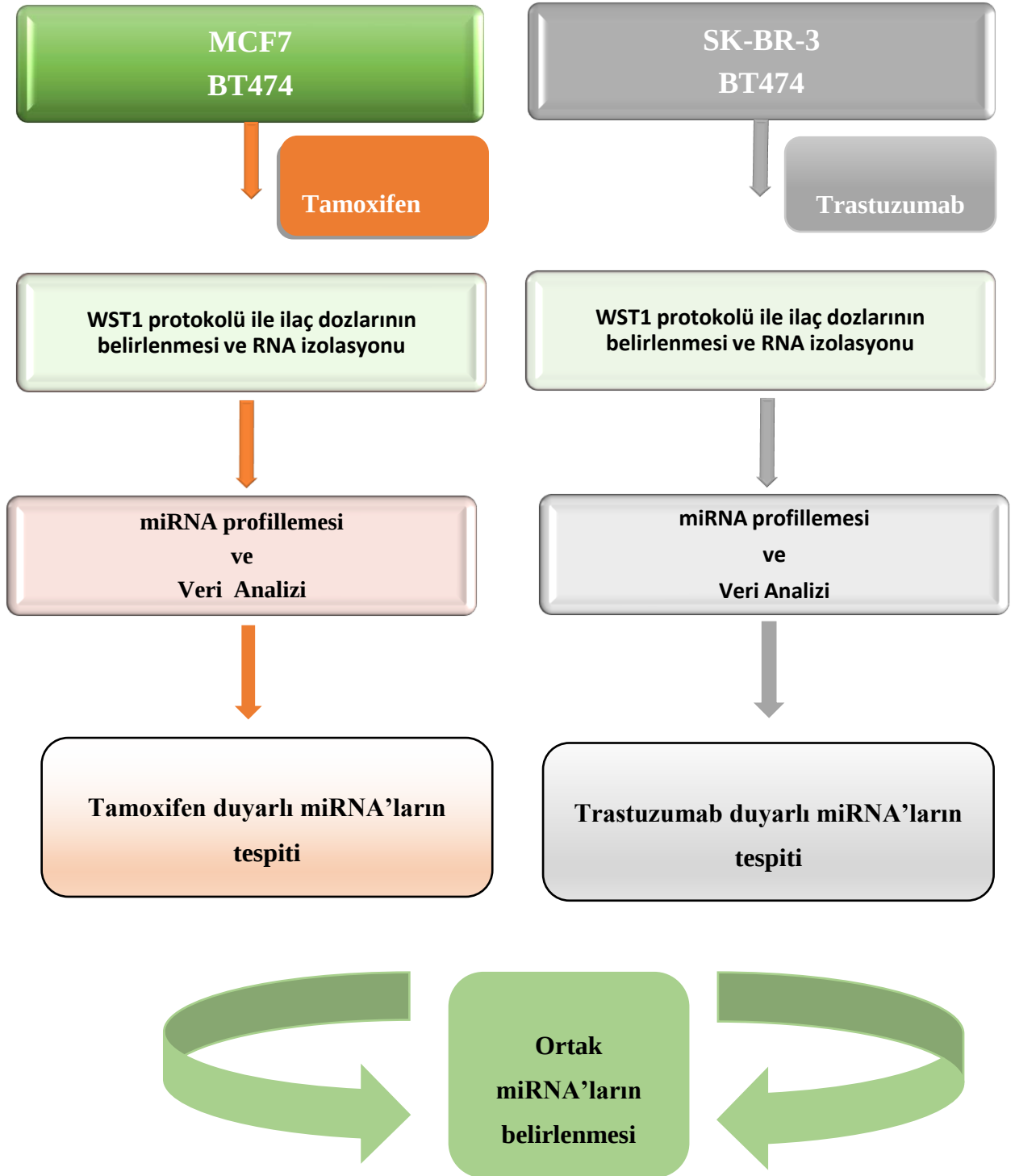
Kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar

5xTBE 54 g Tris Baz (Amresco, 0826-1kg), 27.5 g Borik asit(Amresco, 0588-1kg), 20 ml 0.5 M EDTA (Sigma, E9884-1kg) deiyonize suyla (ddH₂O) 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. 1xTBE dilusyonu yapılarak kullanılmıştır.

DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp Ladder Plus) Ladder'a 166 µl 6x Loading Dye (Fermentas, 0611) ve 734 µl distile su eklenerek kullanılmıştır.

Seakem LE Agaroz (Lonza, 50004) adlı ürün kullanılarak agaroz jel hazırlanmıştır.

4.2. Yöntem



Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması ve deney tasarımı

4.2.1. Hücre kültürü kurulması ve idamesi

Çalışmada kullanılması planlanan meme kanseri hücre hatlarından östrojen reseptör pozitif (ER+) (MCF7 ve BT474) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif (HER2+) (SK-BR-3 ve BT474) olan hücre hatları açılarak idamesi sağlanmıştır. MCF7 hücreleri; %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde idame ettirilmiştir. SK-BR-3 hücreleri %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A besiyerinde, BT474 hücreleri ise %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin ve %2 Bovine İnsulin içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde kültür edilmiştir. Hücrelerin devamlılığı T-25 (25 cm²'lik) ve T-75 (75 cm²'lik) flasklarda sağlanmıştır. Flaskların %80 oranında kaplanması durumunda hücreler tripsin enzimi ile muamele edilip kaldırılarak pasajlanmış ve çoğatılmıştır. Uzun süreli stok olarak saklanacak olan hücreler, %10 DMSO ve %90 FCS içeren saklama ortamında dondurularak, sıvı nitrojende kriyoviallerde saklanmış ve her hücre hattının depolanması sağlanmıştır.

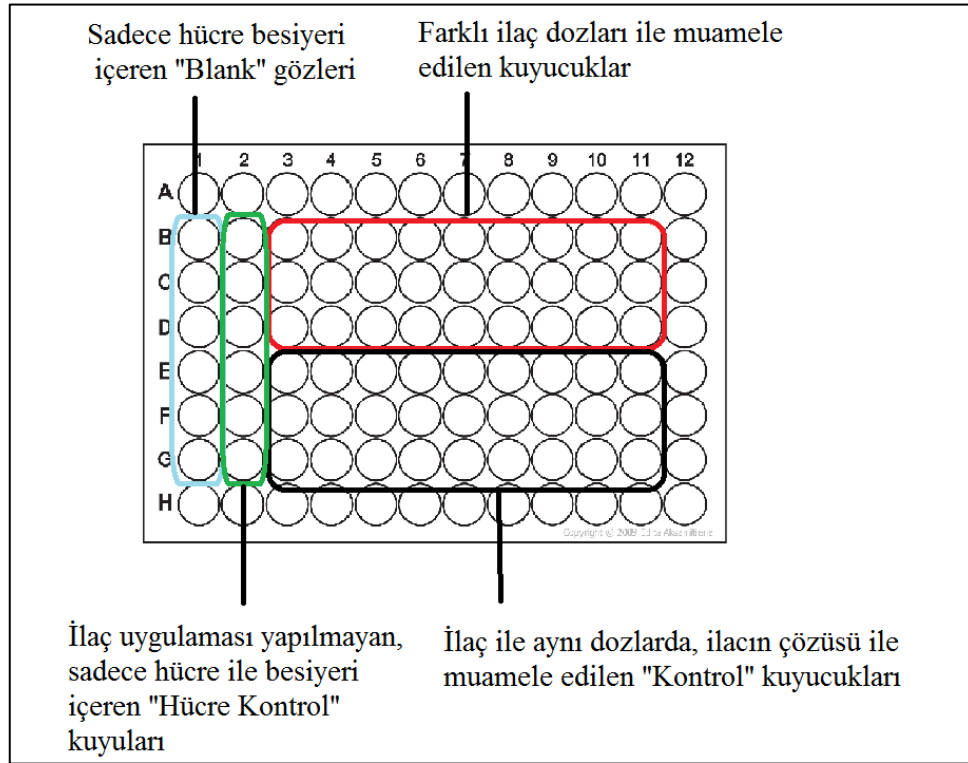
4.2.2. Hücrelerin ilaçlara olan hassasiyetinin WST-1 üreme protokolü ile belirlenmesi ve ilaç dozlarının ayarlanması

WST-1 protokolü yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek amacı ile tasarlanmış bir protokoldür ve hücre çoğalması ve sitotoksikite testleri için kullanılan bir yöntemdir. Protokol, WST-1'in yaşayan hücreler tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda suda çözülebilen formazan tuzu oluşur ve açığa çıkan formazan boyası bir spektrofotometrik okuyucu tarafından ölçülür. Absorbans değeri hücre sayısı ile doğru orantılıdır, yani OD (optik dansite) değeri yüksek ise hücre canlılığı fazla demektir. Bu yöntem aracılığıyla farklı dozlardaki ilaç uygulamasının hücre çoğalmasına etkisi gözlenebilmekte ve IC₅₀ değeri hesaplanabilmektedir. IC₅₀ değeri; bir ilacın hücre çoğalmasının en az yarısını (%50) inhibe etmesi için gereken konsantrasyondur, bir başka deyişle etkinlik gösterdiği minimum konsantrasyondur.

Buna göre, uygun trastuzumab (Herceptin) dozlarının belirlenmesi için ilk olarak 96 kuyucuklu hücre plaklarında her bir kuyuya denk düşecek ideal hücre sayısı belirlenmiştir. SK-BR-3 hücresi için 72 saatlik uygulamalar sırasında her bir kuyuya 6000 hücre, 144

saatlik uygulamalar içinse 4000 hücre ekilmesi tercih edilmiştir. BT474 hücresi için yine 72 saatlik ilaç uygulamalara 6000 hücre, 144 saatlik ilaç uygulamalarına ise 6000 hücre ekilmesi tercih edilmiştir.

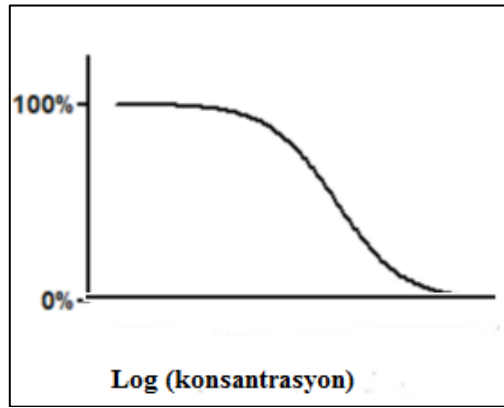
Trastuzumab uygulaması için 300, 60, 30, 6, 2, 0,5, 0,1, 0,05 µg/ml dozları belirlenmiştir. Bunun için önce SK-BR-3 hücreleri Şekil 4.2’de gösterilen deney düzeneğine uygun şekilde her bir kuyuya 6000 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin uygun şekilde tutunduğu gözlendikten sonra ise ilaç uygulaması yapılmıştır. Ekim ve ilaç uygulaması her bir kuyu için 100 µl besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Dozların elde edilmesi için 30 mg/ml ana stoktan sulandırmalar hazırlanmış ve ilaç muamelesi gerçekleştirilen her bir kuyuya büyük sulandırmadan küçüğe doğru olacak şekilde -3 teknik tekrar ile uygulanmıştır.



Şekil 4.2. Trastuzumab ve tamoxifen için yapılan WST-1 uygulamasının 96 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği

Trastuzumab çözücüsü olan PBS ile de aynı dozlarda sulandırmalar hazırlanıp hücrelere kontrol amaçlı verilmiştir. Bunun dışında hücrelerin durumunu kontrol etmek amacıyla sadece hücre ve besiyerinden ibaret “Hücre Kontrol” kuyuları, absorbans ölçümü sırasında kullanılan ve sadece besiyerinden oluşan “Blank” kuyuları da plak üzerinde hazırlanmıştır.

SK-BR-3 ve BT474 hücreleri için 72 ve 144 saat ilaç uygulamasını içeren plaklar ayrı ayrı hazırlanmış ve sulandırmalar plak üzerinde Şekil 4.2'deki gibi uygulanmıştır. 72 saat uygulama yapılan plaktaki kuyulara yine aynı şekilde 10 µl WST-1 eklenip 2 saat sonra okutma yapılarak sonuç alınmıştır. 144 saat ilaç uygulaması yapılan plaktaki ilaç ise etkinliğinin devamı için 72. saatte besiyeri ile birlikte değiştirilip uygulaması yenilenmiştir. Ardından her bir kuyuya 10 µl WST-1 eklenip 2 saat beklendikten sonra 450 nm spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Sonuçta elde edilen absorbans değerleri kullanılarak IC₅₀ değeri ve canlılık oranları hesaplanmıştır. IC₅₀ değerinin hesaplanması için absorbans değerleri (OD değerleri) logaritma tabanına çevrilmiş, daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi yardımı ile hesaplanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Doğrusal olmayan regresyon eğrisi

Graphpad Prism 6 ile eğrinin IC₅₀ değerinin hesaplanması için $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope}))})$ eşitliği kullanılmıştır. Canlılık hesabının yapılması için; OD değeri (ilaç) / OD değeri (Hücre Kontrol) *100 hesabından faydalanılmıştır.

MCF7 ve BT474 hücre hatlarında uygun tamoxifen dozlarının belirlenmesi için ilk olarak 96 kuyulu hücre plaklarında her bir kuyuya denk düşecek ideal hücre sayısı belirlenmiştir. MCF7 hücre hattı için 72 saatlik uygulamalar sırasında her bir kuyuya 3000 hücre ekilmiştir. BT474 hücrelerinde tamoxifen uygulaması için yukarıda bahsedilen işlem her bir kuyuya 6000 hücre gelecek şekilde yapılmıştır.

Her iki hücre hattının da tamoxifen ile muamelesi için ilk olarak; 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0,50, 0,25 µM dozları belirlenmiştir. Bunun için MCF7 ve BT474 hücreleri ayrı ayrı Şekil 4.2'de gösterilen deney düzeneğine uygun şekilde her bir kuyuya sırasıyla 3000 ve 6000

hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin uygun şekilde tutunduğu gözlemlendikten sonra ise ilaç uygulaması yapılmıştır. Ekim ve ilaç uygulaması her bir kuyu için 100 µl besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Dozların elde edilmesi için 10 mM ana stoktan sulandırmalar hazırlanmış ve ilaç muamelesi gerçekleştirilen her bir kuyuya büyük sulandırmadan küçüğe doğru olacak şekilde -3 teknik tekrar ile uygulanmıştır.

Tamoxifen çözümü olan Etil alkol ile de aynı dozlarda sulandırmalar hazırlanıp kontrol amaçlı hücrelere verilmiştir. Bunun dışında hücrelerin durumunu kontrol etmek amacıyla sadece hücre ve besiyerinden ibaret “Hücre Kontrol” kuyuları, absorbans ölçümü sırasında kullanılan ve sadece besiyerinden oluşan “Blank” kuyuları da plak üzerinde hazırlanmıştır.

İlaç uygulamasının ardından 72 saat inkübe edilmiş sonra her bir kuyuya 10 µl WST-1 eklenip 2 saat bekletildikten sonra 450 nm spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Okuma sonucunda MCF7 hücrelerinde beklenen azalma gözlenmemiş ve yeni dozlar belirlenerek WST-1 uygulamasının tekrarlanmasına karar verilmiştir.

MCF7 hücrelerinde tamoxifen için belirlenen yeni dozlar; 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1 µg/ml belirlenmiş ve yukarıda belirtilen dozlarda sulandırmalar hazırlanıp hücreler muamele edilerek uygulama gerçekleştirilmiştir. 72 saat uygulama yapılan plaktaki kuyulara yine aynı şekilde 10 µl WST-1 eklenip 2 saat sonra okutma yapılarak sonuç alınmıştır.

Sonuçta elde edilen absorbans değerleri kullanılarak IC₅₀ değeri ve canlılık oranları hesaplanmıştır. IC₅₀ değerinin hesaplanması için absorbans değerleri (OD değerleri) logaritma tabanına çevrilmiş, daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi yardımı ile hesaplanmıştır.

Tamoxifen ve trastuzumab ilaçları için uygulama dozu olarak her hücre hattında yaklaşık %70 hücre ölümü sağlayan IC₇₀ dozları seçilmiştir. Bu işlem Graphpad programı kullanılarak hesaplanmıştır.

T-75 flasklar kullanılarak idame ettirilip çoğaltılan MCF7, SK-BR-3 ve BT474 hücreleri, 58 cm² alana sahip hücre plaklarına alınarak çoğaltılmıştır. Hücre yoğunluğu her bir hücre plağı için 2 x 10⁶ olarak belirlenmiştir. Bu uygulamalar sonrasında elde edilecek olan

hücreler RNA izolasyonunda kullanılacağı için ilaç uygulamaları Petri kaplarında yapılmıştır. Her hücre hattı için 2 adet biyolojik tekrar kullanılmıştır. Ayrıca ilaç ile muamele edilecek olan hücrelerin kontrolü olarak, ilaçların içinde çözüleceği kimyasallar olan PBS ve Etil alkol ile muamele edilmiştir.

Uygulama konsantrasyonu olarak **trastuzumab için 6 µg/ml** seçilmiş ve her bir hücre 6 gün boyunca PBS ve trastuzumab ile seçilen dozda muamele edilmiştir. 3. gün daha önce belirtildiği gibi ilaç besiyeri değiştirilerek etkinliğinin devamı için ilaç uygulaması yenilenmiştir. Tamoxifen uygulama konsantrasyonu **BT474 hücrelerinde 10 µg/ml** olarak seçilmiş ve 3 gün boyunca etil alkol ve tamoxifen uygun konsantrasyonda muamele edilmiştir. **MCF7 hücreleri için aynı işlem 37,87 µg/ml** konsantrasyonu için yapılmıştır.

4.2.3. RNA eldesi ve kalite kontrolü

RNA izolasyonu yapılacak olan hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, bir kazıyıcı yardımı ile kaldırılmış ve PBS ile birlikte toplanıp ayrı ayrı 15 ml'lik tüplere alınarak santrifüj edilerek toplanmıştır. Tüm işlemler buz üzerinde ve laminar kabin içinde yapılmıştır. Elde edilen hücre peletlerine 1 ml QIAzol (Qiagen, 79306) eklenmiş ve QIAzol ile RNA izolasyonuna devam edilmiştir. Hücre peletleri QIAzol eklendikten sonra enjektörden geçirilmiş ve pipetaj ile dağılmaları sağlanmıştır. Hücreler tamamen çözüldükten sonra 1,5 ml'lik tüplere alınmış ve üzerine 200 µl kloroform (Sigma, C2432-500ml) eklenmiş sertçe çalkalanıp 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. 14.000 rpm 4°C'de 25 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra 3 farklı fazın ayrımı görülmüştür. En alttaki pembe faz organik fazdır ve burada organik bileşikler ile fenol ve kloroform bulunmaktadır. Orta faz beyaz renklidir ve DNA bulunmaktadır. En üstteki berrak fazda ise total RNA (rRNA, tRNA, mRNA, miRNA vb.) bulunmaktadır. Dikkatlice üstteki berrak faz pipet yardımıyla toplanmıştır. Toplanan RNA yeni bir tüpe (RNAsız, DNAsız) alınmış, başlangıç QIAzol miktarının yarısı kadar izopropanol (Sigma, I9516-25ml) (1 ml QIAzol için 500 µl izopropanol) eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen örnekler sonrasında 14.000 rpm 4°C'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve izopropanol pelete dikkat edilerek dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Başlangıç QIAzol miktarı kadar (1 ml) yeni hazırlanmış %70 Etanol eklenerek 10.000 rpm 4°C'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra yukarıda belirtilen Etanol işlemi tekrarlanmıştır.

Peletler 25 µl moleküler derecede su (Lonza, BE51200) ile sulandırılıp pipetaj yapılmış ve buz üzerine alınmıştır.

RNA kantifikasyonu için 2 µl su ile sulandırılmış RNA kullanılmış ve Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi sağlanmıştır. RNA örnekleri için A_{260}/A_{280} oranlarının 1.8-2 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca bir kısım RNA örneği %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Hassas terazide (Shimadzu BX320H) tartılan 1g agaroz (Seakem LE Agoroz , Lonza) 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlanmış mikrodalga fırında çözülmesi sağlanan jel biraz soğutulduktan sonra 5 µl Etidium bromür eklenerek jel tablasına dökülmüş ve polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilmiş 2 µl DNA, 3 µl 6x Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örnekler 90 voltta 30 dakika yürütülmüştür. UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülenmiş ve termal yazıcı (SonyUP-D895) ile görüntü alınmıştır.

4.2.4. miRNA eş-zamanlı PZR dizin çalışmasının gerçekleştirilmesi

Bu işlem 4 alt grupta gerçekleştirilmiştir.

Total RNA'dan universal kuyruk kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Tamamlayıcı DNA sentezi için izole edilen total RNA kullanılmıştır. Total RNA kullanılarak yapılan cDNA sentez reaksiyonlarında mRNA'yı total RNA'dan ayırmak için mRNA'nın 3' ucunda bulunan polyA kuyruğu kullanılır ve oligoT primeri polyA kuyruğuna hedef olarak kullanılarak totalRNA'nın içinde bulunan mRNA'dan tamamlayıcı DNA sentezlenir. Olgun miRNA'ların 3' uçlarında polyA kuyruğu bulunmamaktadır ve bu durum klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. Klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. miRNA'lardan cDNA sentezi için öncelikle miRNA'ların 3' uçlarına polyA kuyruğunu da içeren bir "universal tag" eklenmiştir. Bu ek hem cDNA sentezi için kullanılmış primer sekansını içermiş (polyA) hem de miRNA'nın boyunu qRT-PCR için yeterli uzunluğa getirmiştir. Bir sonraki basamakta universal tag'a özgül primer kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemi gerçekleştirmek için miScript II RT (Qiagen) kiti kullanılmıştır.

Her örneğin konsantrasyonu 400 ng/μL olacak şekilde Rnazsız su ile sulandırılıp aşağıda belirtilen karışım hazırlanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyonu

Reaktif	Miktar (μl)
5X miScript HiSpec Buffer	4
10X miScript Nucleics mix	2
RNAsız su	3
miScript RT mix	2
Total RNA	9
Toplam	20

Belirtilen karışım tüplere dağıtılıp kısa santrifüj işleminden sonra öncelikle 37°C’de 60 dakika ardından 95°C’de 5 dakika termal cyclus da inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp üzerlerine 310 μl su eklenip iyice pipetlenmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir.

Eş-zamanlı PZR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi

Elde edilen cDNA’lar SYBR green ve Taq polimeraz enzimini içeren PZR karışımı ile bir araya getirilmiş ve 384-kuyulu dizinlere eklemeye hazır hale getirilmiştir. Her bir kuyunun içinde yalnızca tek bir miRNA’ya özel primer bulunmaktadır. Böylelikle her bir kuyuda bir miRNA’nın ifade profili belirlenebilmektedir. Bu dizin sistemi (Human miRNome miRNA PCR Array: MIHS-3216Z; Qiagen) ile 1066 adet miRNA’nın ifade profilini belirlemek mümkün olmuştur. miScript SYBR Green PCR kiti (Qiagen) kullanılarak eş-zamanlı PZR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Eş-zamanlı PZR reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
2X SYBR Green PCR mix	2050
10X Universal Primer	410
RNA'sız su	1540
cDNA	100
Toplam	4100

MCF7, SK-BR-3 ve BT474 hücre hatlarından elde edilen RNA'lar ile hazırlanmış olan cDNA-PZR reaktifleri karışımı 384-kuyulu dizinlere dağıtıldıktan sonra dizin üzeri film ile düzgünce kapatılıp 15°C ve 1000 g'de ve 1 dakika santrifüj edilmiştir. Dizin sisteminin uyumlu olduğu eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşağıda belirtilen koşullarda Roche Light Cycler480 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Pre-inkübasyon aşamasında 95°C'de 10 dk bekletilmiş, ardından amplifikasyon işlemi 94°C 15 sn, 55°C 30 sn ve 70°C 30 sn olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. Veri analizi

Eş-zamanlı PZR dizin analizi

Farklı hücre hattında ilaç (trastuzumab veya tamoxifen) ile muamele edilmiş hücrelerde ve kontrol hücrelerinde 1066 adet miRNA ifadesini içerecek olan veri dosyaları ham Cp (crossing point) değerleri olarak elde edilmiştir. miScript miRNA PCR Array analizleri için “<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>” adresinden ulaşılabilen veri analiz programı kullanılmıştır. Ham veriler $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir miRNA'nın ifade seviyesi referans genlerin (SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A, RNU6-2) ifadeleri ile normalize edilerek hesaplanmış daha sonra hücre hatlarındaki miRNA değişimleri birbirleri ile kıyaslanmıştır. Analiz işlemi aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek tamamlanmıştır.

- Öncelikle çalışmanın kontrolü ve normalizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Her array içerisinde çalışmanın kontrolü için primerler bulunmaktadır. RNA kalitesi ve

PCR işleminin uygun şartlarda tamamlanıp tamamlanmadığını C_T^{PPC} değeri göstermektedir. Bu değer 19 ± 2 aralığında ise ileri analizlere devam edilebilir.

- Reverse transcription kontrolünün (miRTC) C_T değeri pozitif PCR kontrolleri (PPC) kullanılarak $\Delta CT = AVG C_T^{miRTC} - AVG C_T^{PPC}$ formülü ile hesaplanır. Bu değer 7'den küçük ise reverse transkripsiyon işleminde herhangi bir inhibitör etkisi yoktur denilir.
- Her miRNA için $\Delta CT = C_T^{miRNA} - AVG C_T^{SN1/2/3/4/5/6}$ formülü ile ΔCT değeri hesaplanır.
- $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{örnek 2}) - \Delta CT (\text{örnek 1})$ formülü ile her bir miRNA için $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplanır. Örnek 2 olarak belirtilen kısım ilaç uygulaması sonrasında elde edilen RNA'ların qRT-PCR sonuçlarıdır. Örnek 1 ise kontrol grubu değerleridir.
- Son olarak her miRNA için $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ile kat değişimleri hesaplanır.

t-test

Referans ifadeleri ile normalize edilmiş her bir miRNA'nın ifade seviyesi istatistiksel bir metod olan "Student t-test" ile hesaplanmış ve p değeri elde edilmiştir.

Biyoinformatik olarak miRNA hedeflerinin belirlenmesi ve yolak analizi

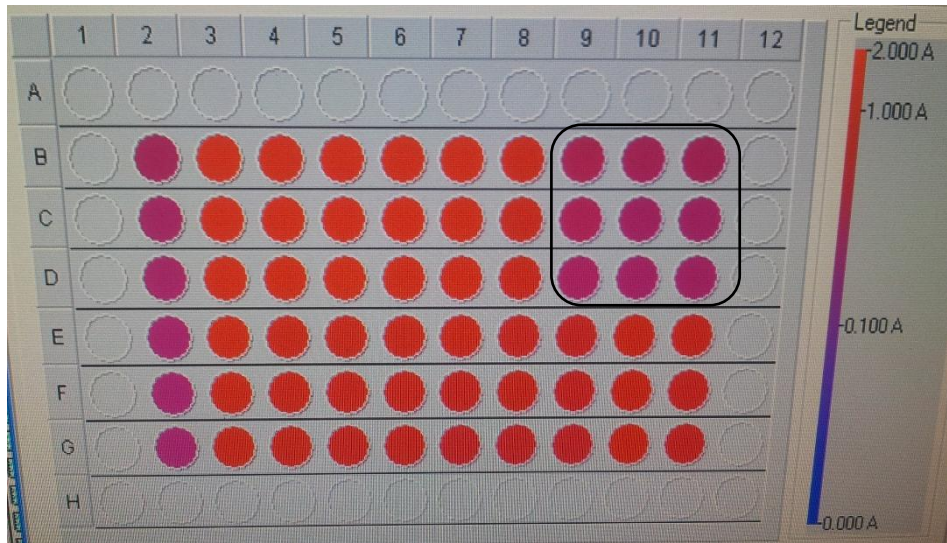
Ham verinin analizi sonucunda ifade profili en çok değişen miRNA'lar belirlenmiş ve bu miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesi için "miRWalk" (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) (83) biyoinformatik programı kullanılmıştır.

Her miRNA'ya ait hedef gen listeleri tespit edildikten sonra bu listeler WebGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) (84) internet sitesi aracılığıyla yolak zenginleştirme analizine alınmışlardır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. WST-1 Sonuçları

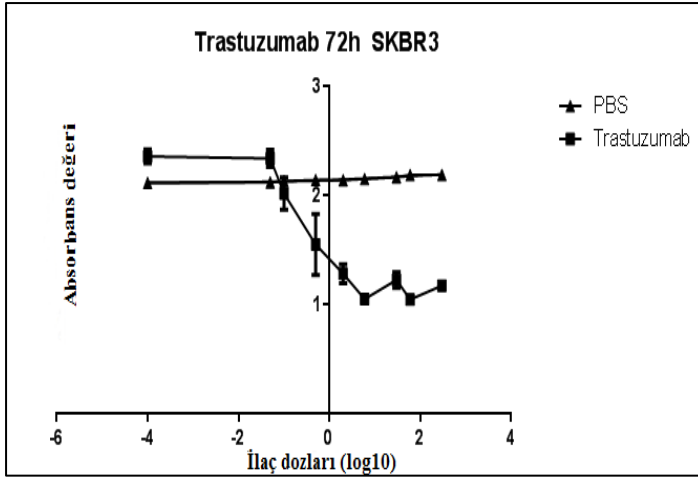
İlaç uygulaması sonrasında artan ilaç konsantrasyonlarında hücre ölümü gözlenirken ilaç ile aynı konsantrasyonlarda ilacın çözücüsü ile muamele edilen kontrol kuyularında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Wallac programı kullanılarak alınan spektrofotometrik ölçümün temsili görüntüsü Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Spektrofotometrik ölçümün temsili görüntüsü. B, C ve D satırı ilaç uygulanan kuyuları, E, F ve G satırları ilaç çözücüsü olarak kullanılan EtOH ve PBS uygulanan kuyuları göstermektedir.

Trastuzumab uygulamasına ait WST-1 bulguları

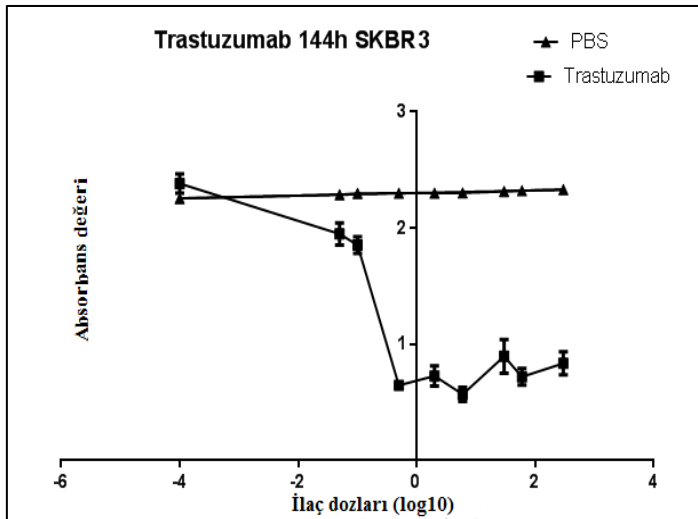
Trastuzumab konsantrasyonu için; 300, 60, 30, 6, 2, 0,5, 0,1, 0,05 µg/ml dozlarında karar verilmiştir. SK-BR-3 ve BT474 hücreleri için 72 ve 144 saat ilaç uygulamasını içeren plaklar ayrı ayrı hazırlanmış ve ilaç sulandırmaları eklenerek test uygulanmıştır. Elde edilen absorbans değerleri Ek 1 Çizelge 8.1, Çizelge 8.2, Çizelge 8.3, Çizelge 8.4’de verilmiştir. Sonuçta elde edilen absorbans değerleri kullanılarak IC50 değeri ve canlılık oranları hesaplanmıştır. SK-BR-3 hücreleri için 72 ve 144 saat sonuçları Şekil 5.2 ve Şekil 5.3’de verilmiştir.



Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
300	49,87
60	44,46
30	52,08
6	44,64
2	54,52
0,5	65,84
0,1	85,67
0,05	99,33

Şekil 5.2. SK-BR-3 hücrelerinin 72 saat boyunca trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

SK-BR-3 hücrelerine uygulanan trastuzumab süresi 3 günden 6 güne çıkartıldığında canlılık yüzdesinin %23'e kadar düştüğü gözlenmiştir (Şekil 5.3).

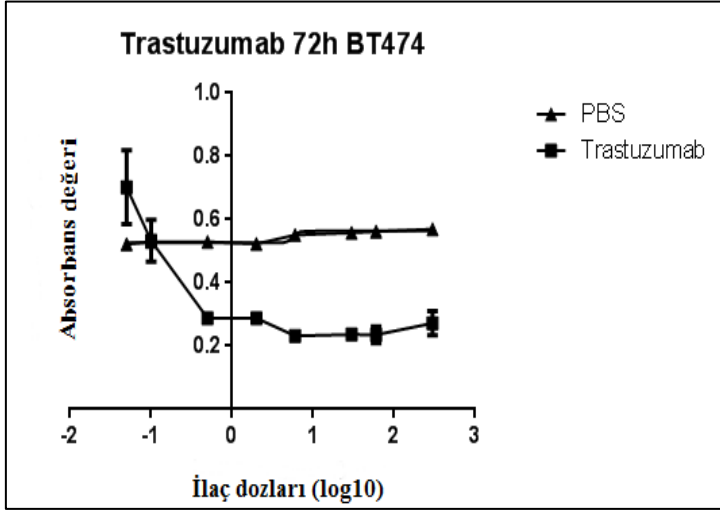


Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
300	35,05
60	30,17
30	37,63
6	23,84
2	30,50
0,5	27,13
0,1	77,81
0,05	81,82

Şekil 5.3. SK-BR-3 hücrelerinin 144 saat ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

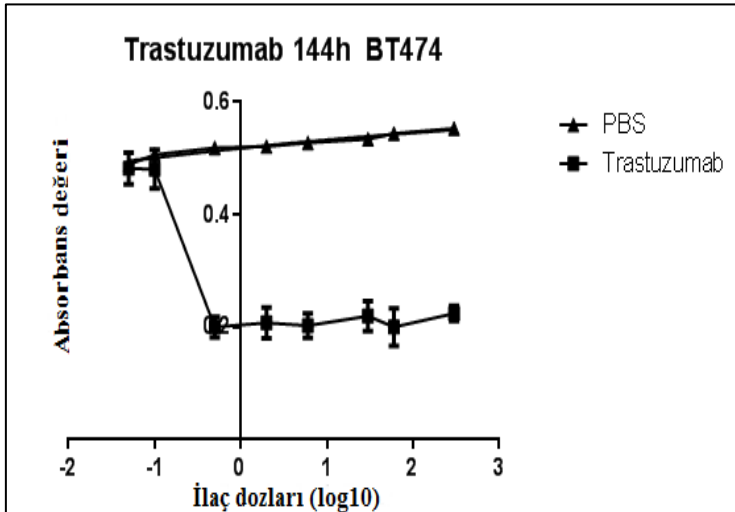
Graphpad Prism 6 ile eğrinin IC_{50} değerinin hesaplanması için $Y=100/(1+10^{((\text{Log}IC_{50}-X)*\text{HillSlope}))})$ eşitliği kullanılmıştır. Canlılık hesabının yapılması için; OD değeri (ilaç) / OD değeri (Hücre Kontrol) *100 hesabından faydalanılmıştır. SK-BR-3 hücreleri için 72 saat ve 144 saatte elde edilen IC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 0,2739 µg/ml ve 0.1347 µg/ml olarak belirlenmiştir.

BT474 hücreleri için 72 ve 144 saat sonuçları Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'da verilmiştir.



Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
300	43,41
60	37,53
30	37,66
6	36,97
2	45,93
0,5	45,97
0,1	85,05

Şekil 5.4. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları



Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
300	30,17
60	26,95
30	29,54
6	27,31
2	27,98
0,5	26,97
0,1	64,68
0,05	64,92

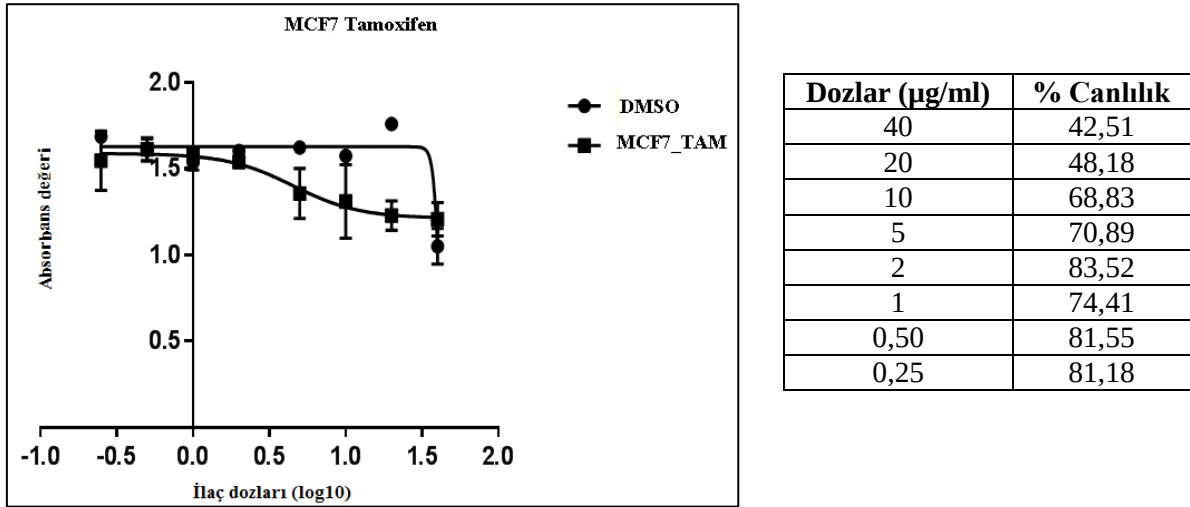
Şekil 5.5. BT474 hücrelerinin 144 saat boyunca ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

BT474 hücrelerinin ilgili dozlarla muamelesi sonucu hücre canlılık oranının yeterli miktarda azaldığı tespit edilmiş ve daha önce anlatılan yolla IC₅₀ değerleri sırasıyla; 72 saat için 0,07088 µg/ml ve 144 saat için 0.1372 µg/ml bulunmuştur.

SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinin ilgili dozlarla 144 saat boyunca muamelesi sonucu hücre canlılık oranının azaldığı gözlenmiş ve her iki hücre hattına ait doz cevap eğrilerinde de 6 µg/ml doz en iyi oranda hücre canlılığını durdurarak etkinlik göstermiştir. Bu yüzden RNA izolasyonu için yapılacak olan **trastuzumab doz muamelesinin her iki hücre için de 6 µg/ml** olmasına karar verilmiştir.

Tamoxifen uygulamasına ait WST-1 bulguları

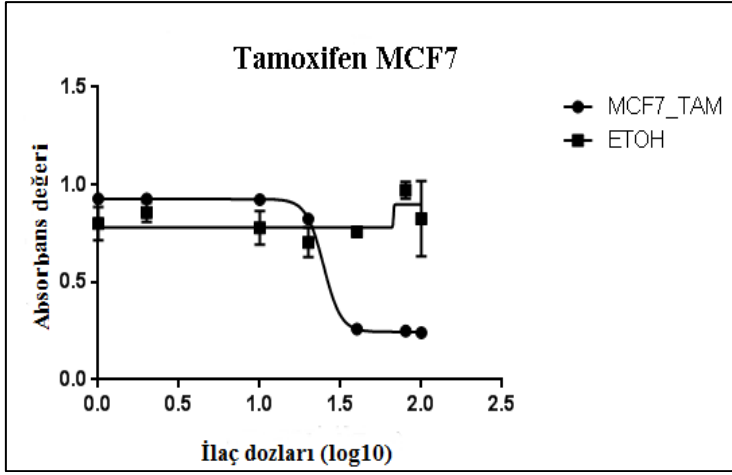
Tamoxifen uygulaması için ilk olarak; 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml dozları belirlenmiştir. MCF7 ve BT474 hücreleri ayrı ayrı her bir kuyuya sırasıyla 3000 ve 6000 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve ilişkili tamoxifen dozları ile 72 saat boyunca muamele edilmiştir ve daha sonra WST-1 uygulanıp absorbans değerleri (OD değerleri) ölçülmüştür. MCF7 için elde edilen absorbans değerleri Ek 1 Çizelge 8.5'deki gibidir. Ayrıca elde edilen grafikler ve dozlara göre % canlılık değerleri Şekil 5.6'da yer almaktadır.



Şekil 5.6. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca ilgili dozlarla muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

Tamoxifen ile yapılan uygulamada yüksek dozlarda beklenen etkiyi görülmediği için 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1 µg/ml olarak belirlenen yeni tamoxifen dozlarına karar verilmiştir. Ayrıca ilaç çözücüsü olarak kullanılan DMSO'un (Dimetilsülfoksit) belirli bir doz üzerinde hücrelerde öldürücü olduğu gözlemlenmiş ve DMSO yerine diğer bir çözücü olan etil alkol kullanılması tercih edilmiştir.

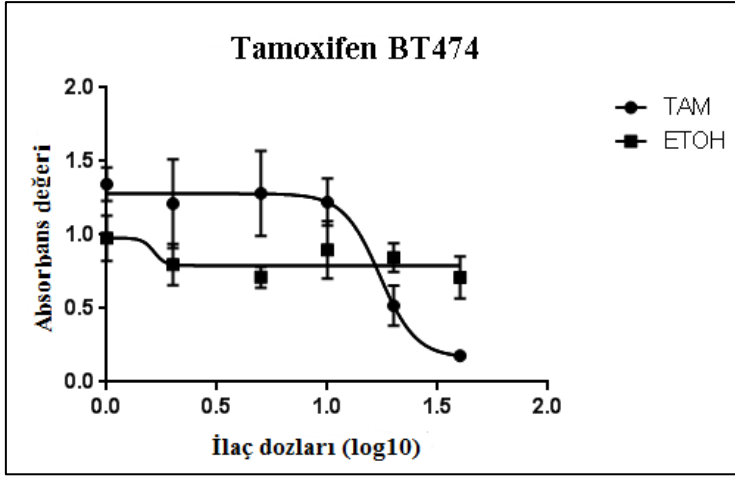
MCF7 hücreleri her bir kuyuya 3000 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve ilişkili tamoxifen dozları ile 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından WST-1 uygulanıp absorbans değerleri (OD değerleri) ölçülmüştür. Elde edilen yeni absorbans değerleri Ek 1 Çizelge 8.6'daki gibidir. Ayrıca elde edilen grafikler ve dozlara göre % canlılık değerleri Şekil 5.7'de yer almaktadır.



Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
100	0,42
80	0,86
40	4,35
20	67,93
10	87,26
5	91,77
2	94,91
1	94,70

Şekil 5.7. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca ilgili tamoxifen doz uygulaması (1-100 uM) sonucu elde edilen yeni doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

BT474 hücreleri ayrı ayrı her bir kuyuya 6000 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve 0.25-40 µM tamoxifen dozları ile 72 saat boyunca muamele edilmiş, daha sonra WST-1 uygulanıp absorbans değerleri (OD değerleri) ölçülmüştür. İlaç çözücüsü olarak daha önce kararlaştırılan etil alkol kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri Ek 1 Çizelge 8.7'deki gibidir. Ayrıca elde edilen grafikler ve dozlara göre % canlılık değerleri Şekil 5.8'da yer almaktadır.



Dozlar (µg/ml)	% Canlılık
100	3,16
80	3,13
40	36,10
20	44,98
10	72,99
5	80,69
2	86,92
1	99,17

Şekil 5.8. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca ilişkili tamoxifen muamelesi sonucu elde edilen doz cevap eğrisi ve hücre canlılık oranları

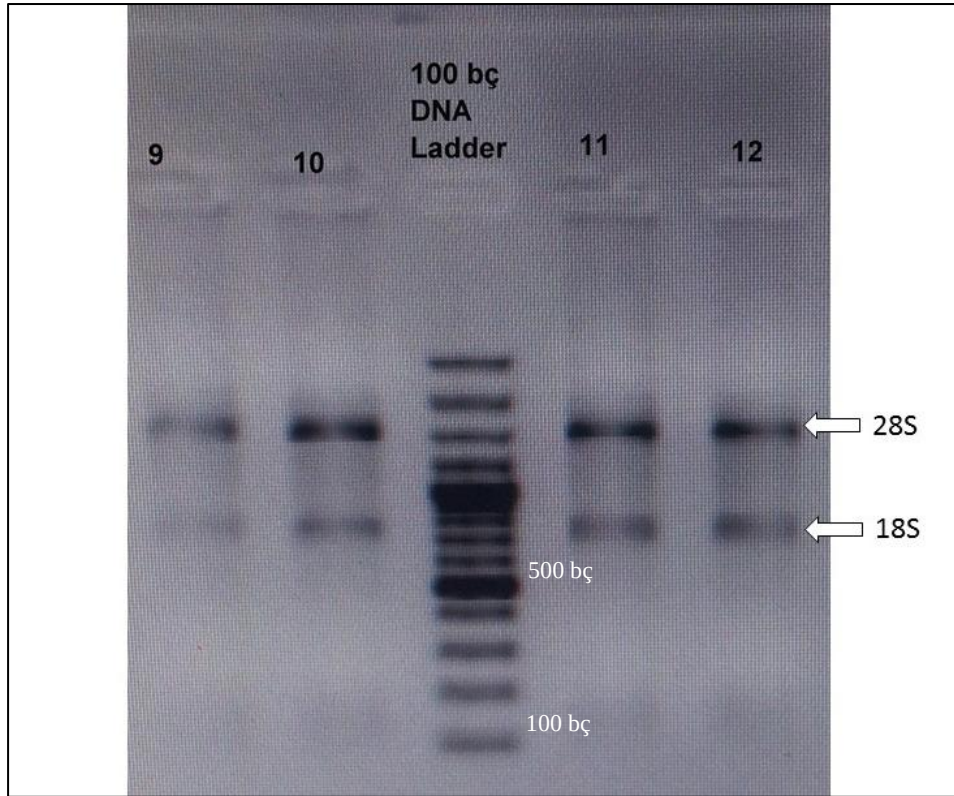
MCF7 ve BT474 hücrelerinin ilgili dozlarla 72 saat boyunca muamelesi sonucu hücre canlılık oranının yeterli miktarda azaldığı tespit edilmiş ve daha önce anlatılan yolla IC_{50} değerleri sırasıyla; MCF7 için 35,24 µg/ml ve BT474 için 6,124 µg/ml bulunmuştur. 72 saat ilaç muamelesi sonucu hücre canlılık oranlarının daha iyi azaldığı gözlenmiş ve her iki hücre hattına ait doz cevap eğrilerinde sırasıyla MCF7 için 37,87 µg/ml ve BT474 için 10 µg/ml doz en iyi oranda hücre canlılığını durdurarak etkinlik göstermiştir. Bu yüzden RNA izolasyonu için yapılacak olan doz muamelesinin MCF7 için 37,87 µg/ml ve BT474 için 10 µg/ml düzeyinde olmasına karar verilmiştir. Her bir hücre hattı ve ilaç için belirlenen IC_{50} ve IC_{70} dozları Çizelge 5.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 5.1. Kullanılan her hücre hattı ve ilaç için belirlenen IC_{50} ve IC_{70} dozları

İlaç	Hücre Hattı	IC_{50}	IC_{70}
Tamoxifen	BT474	6,124 µg/ml	10 µg/ml
	MCF7	35,24 µg/ml	37,87 µg/ml
Trastuzumab	SK-BR-3	0,1347 µg/ml	6 µg/ml
	BT474	0,1372 µg/ml	6 µg/ml

5.2. RNA Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü ile elde edilen konsantrasyonları Çizelge 5.2’de görülmektedir. İzole edilen total RNA’lar %1’lik agaroz jelde yürütülerek genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı ve 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüğü kontrol edilmiştir ve temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 5.9’da verilmiştir. Örneklere ait total RNA’larda DNA kontaminasyonuna rastlanmamıştır. İzole edilen RNA’ların 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüklerini korudukları tespit edilmiştir.



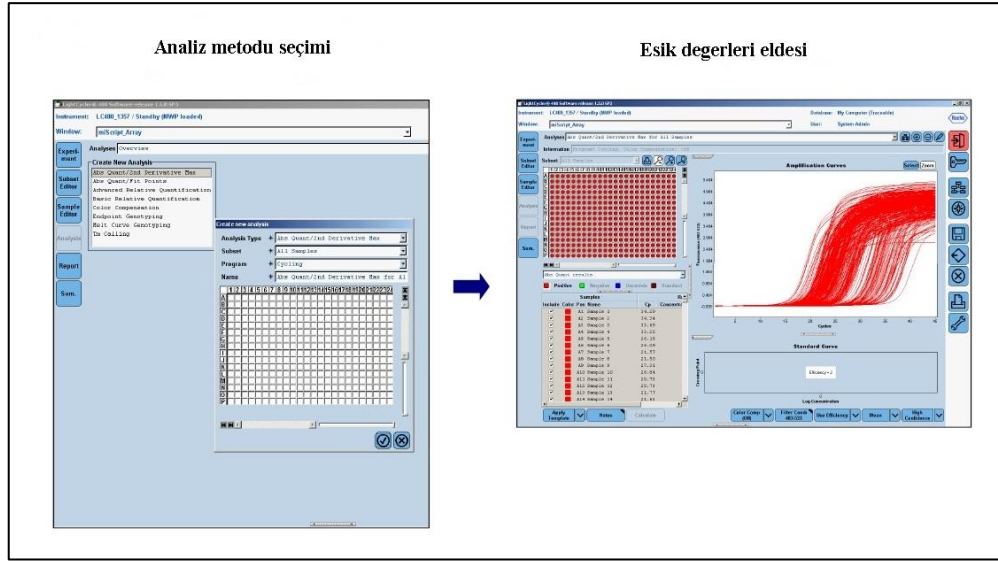
Şekil 5.9. İzole edilen total RNA’ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. %1’lik agaroz jelde 90 V’da 30 dakika yürütülmüşlerdir.

Çizelge 5.2. RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm değerleri

Örnek Adı	Örnek No	ng/ μ L	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
SK-BR-3 Kontrol 1	1	756,4	2,03	2,10
SK-BR-3 Kontrol 2	2	2026	2,05	2,10
BT474_Trastuzumab Kontrol 1	3	1415,1	2,09	2,17
BT474_Trastuzumab Kontrol 2	4	740,5	2,07	2,14
SK-BR-3 Trastuzumab 1	5	1205,1	2,09	2,04
SK-BR-3 Trastuzumab 2	6	824,5	2,07	2,04
BT474 Trastuzumab 1	7	326,9	2,04	1,66
BT474 Trastuzumab 2	8	458,3	2,01	1,76
MCF7 Kontrol 1	13	120,5	2,05	2,10
MCF7 Kontrol 2	14	200,1	2,08	2,10
BT474_Tamoxifen Kontrol 1	9	363,1	2,01	1,95
BT474_Tamoxifen Kontrol 2	10	440,4	2,00	2,00
MCF7 Tamoxifen 1	15	185,6	2,07	2,10
MCF7 Tamoxifen 2	16	198,7	2,09	2,10
BT474 Tamoxifen 1	11	300,1	1,99	2,05
BT474 Tamoxifen 2	12	330,4	1,97	2,04

5.3. Eş-zamanlı PZR Dizin Sonuçları

Eş-zamanlı PZR dizin çalışması için her örnekten 400 ng RNA ile cDNA elde edilmiş ve Roche Light Cycler480 cihazı ile PZR dizin çalışması gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen eşik değerlerine (C_T) ait temsili görüntü Şekil 5.10'da verilmiştir.



Şekil 5.10. Roche Light Cycler480 cihazı ile PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen temsili C_T değerleri görüntüsü

Veri analizi sırasında dizinlere (arraylere) ait temsili kalite kontrol sonuçları Çizelge 5.3’de görülmektedir. Bu çizelgede çalışmada kullanılan referans genlere ait C_T değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 5.3. miScript PZR Kontrollerinin temsili C_T değerleri

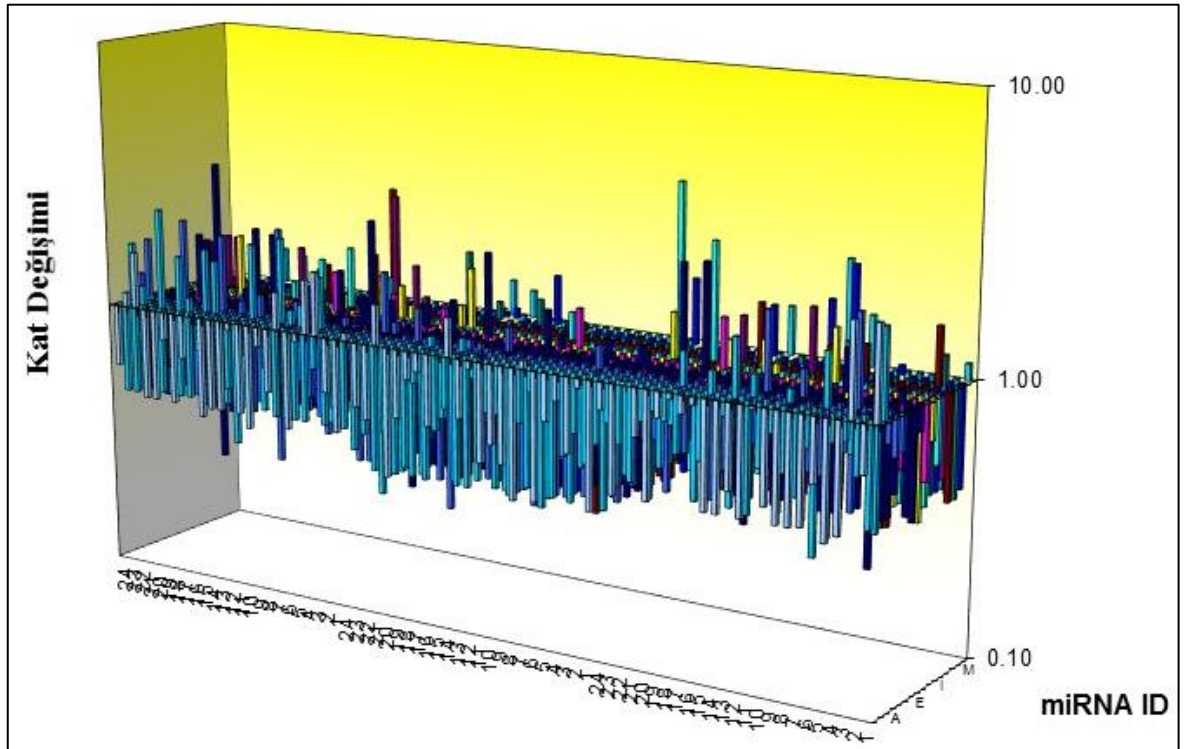
	Örnek 1	Örnek 2
SNORD61	21,8	19,7
SNORD68	19,6	20,1
SNORD72	19,7	20,6
SNORD95	21,5	21,0
SNORD96A	21,7	20,2
RNU6-2	20,6	20,1

5.3.1. Trastuzumab’a duyarlı miRNA’ların belirlenmesi

Trastuzumaba duyarlı miRNA profilini elde etmek amacıyla $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak analiz edilen her bir miRNA’nın ifade seviyesi ve kat değişimleri sonucunda elde edilen grafikler SK-BR-3 hücreleri için Şekil 5.11’de ve BT474 hücreleri için Şekil 5.12’te gösterilmiştir. x düzlemi 384-well PZR dizininde yer alan miRNA’ları temsil ederken y eksenini her miRNA için ilaç uygulanan hücrelerdeki miRNA’ların kontrole göre kat değişimini göstermektedir.

Trastuzumab uygulaması sonrası genel miRNA profiline bakıldığında her iki hücre hattında da miRNA profilindeki azalma dikkat çekmektedir (Şekil 5.11 ve Şekil 5.12). Her bir hücre için istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren miRNA'lar detaylı olarak verilmiştir.

SK-BR-3 hücrelerinin trastuzumab uygulaması sonrasında miRNA eş zamanlı PZR dizin sonucuna göre 1,5 kat farklılık gösteren miRNA'ların bir kısmı Çizelge 5.4 gösterilmiştir. Listenin tamamı Ek 2'de sunulmuştur.

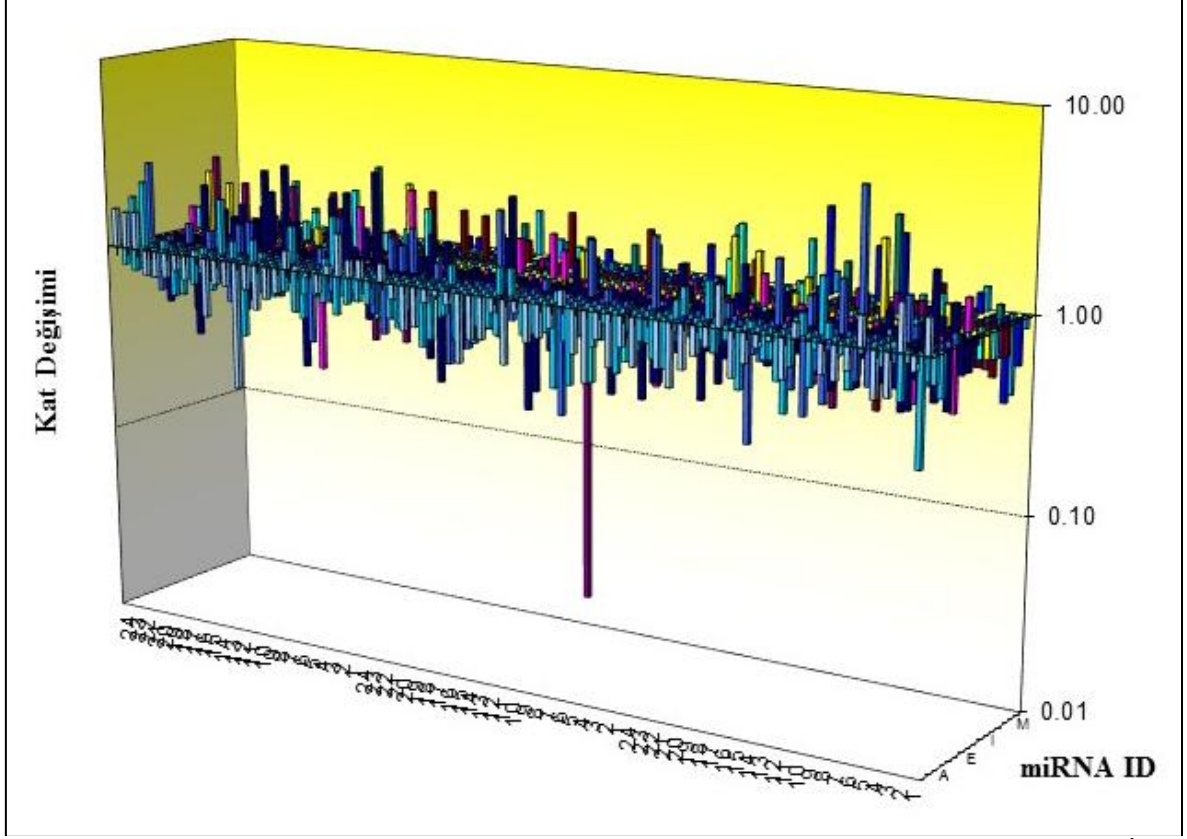


Şekil 5.11. Trastuzumab ile muamele edilmiş SK-BR-3 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.

Çizelge 5.4. SK-BR-3 hücrelerinde trastuzumab’a duyarlı 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA’ların listesi

miRNA ID	Kat değişimi	p değeri
hsa-miR-373*	-3,42	7,45E-07
hsa-miR-33b	-3,19	0,018518
hsa-miR-328	-2,88	0,013499
hsa-miR-129*	-2,87	5,61E-05
hsa-miR-135b	-2,75	0,000520
hsa-miR-7-2*	-2,64	0,000411
hsa-miR-500a	-2,61	0,001050
hsa-miR-4302	-2,55	0,002019
hsa-miR-34a*	-2,49	3,84E-05
hsa-miR-224	-2,33	0,006803
hsa-miR-22*	-2,28	0,011953
hsa-miR-301b	-2,25	0,007225
hsa-miR-301a	-2,21	0,000306
hsa-miR-590-5p	-2,16	0,013481
hsa-miR-490-3p	-2,16	0,006119
hsa-miR-32	-2,11	0,041315
hsa-miR-31	-2,07	0,008655
hsa-miR-374a*	-2,01	0,015244
hsa-miR-148a	-2,00	0,002088
hsa-miR-18a	-1,89	0,005763
hsa-let-7i*	-1,82	0,004197
hsa-miR-20a	-1,51	0,021142
hsa-miR-33a	-1,72	0,025784
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,52	0,007148
hsa-miR-19a	-1,52	0,015148
hsa-miR-205	-1,56	4,36E-06
hsa-miR-20b	-1,59	0,000574
hsa-miR-770-5p	2,13	2,29E-05
hsa-miR-3176	1,68	7,27E-05
hsa-miR-188-3p	1,62	0,020772
hsa-miR-193b	1,57	0,022031
hsa-miR-1248	1,56	3,42E-09
hsa-miR-106b*	1,53	1,38E-05
hsa-miR-1290	1,59	0,015668

BT474 hücrelerinde, trastuzumab uygulaması sonrasında miRNA eş zamanlı PZR dizin sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren miRNA'ların bir kısmı Çizelge 5.5 gösterilmiştir. Listenin tamamı Ek 3'de sunulmuştur.

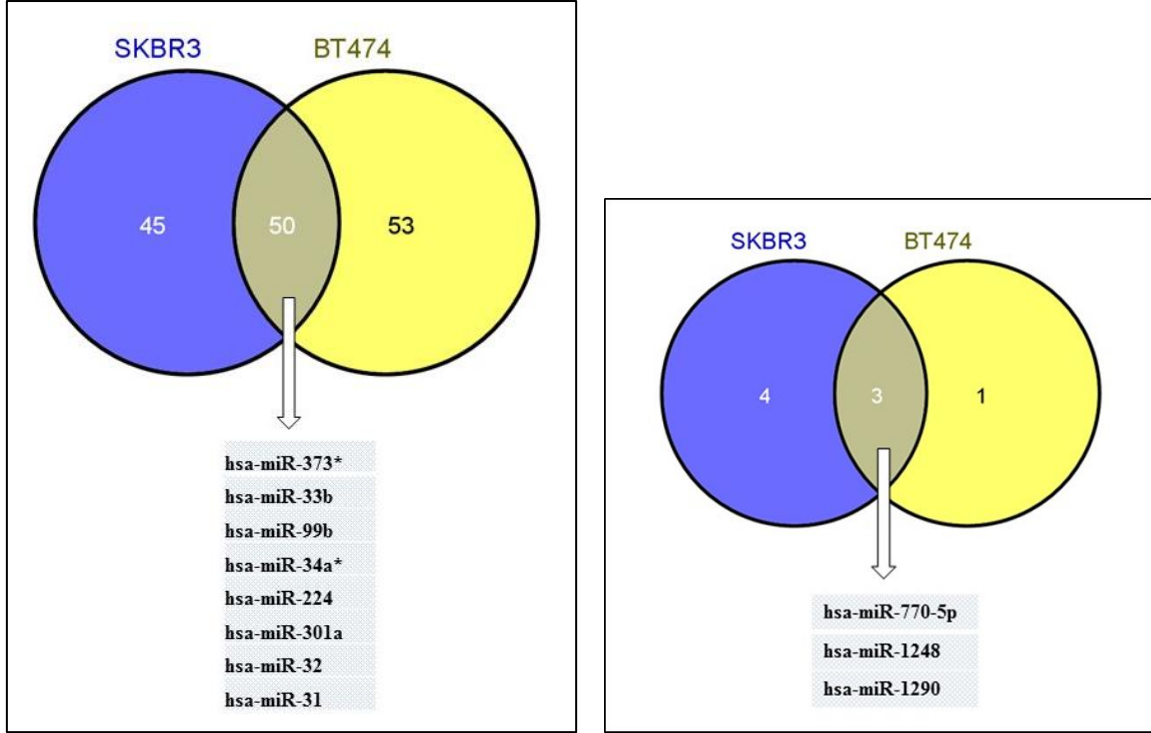


Şekil 5.12. Trastuzumab ile muamele edilmiş BT474 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.

Çizelge 5.5. BT474 hücrelerinde trastuzumab'a duyarlı 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların temsili listesi

miRNA ID	Kat değişimi	p değeri
hsa-miR-373*	-4,02	3,01E-05
hsa-miR-720	-3,83	4,71E-06
hsa-miR-7	-3,26	2,51E-07
hsa-miR-425	-2,65	0,001174
hsa-miR-16-2*	-2,64	0,000471
hsa-miR-34a*	-2,60	0,000124
hsa-miR-1287	-2,54	1,05E-07
hsa-miR-33b	-2,53	0,003073
hsa-miR-1260	-2,51	0,001366
hsa-miR-141*	-2,49	1,55E-05
hsa-miR-4286	-2,47	0,000639
hsa-miR-502-5p	-2,38	0,000547
hsa-miR-18a	-2,34	0,000155
hsa-miR-3676	-2,27	5,57E-06
hsa-miR-142-3p	-2,25	2,63E-07
hsa-miR-1280	-2,24	0,004931
hsa-miR-500a	-2,24	4,46E-06
hsa-miR-596	-2,21	0,002762
hsa-miR-362-5p	-2,17	0,00163
hsa-miR-224	-2,15	3,87E-06
hsa-miR-4289	-2,13	1,03E-07
hsa-miR-106b	-2,11	4,35E-05
hsa-miR-7-1*	-2,08	2,79E-07
hsa-miR-31	-2,04	1,81E-05
hsa-miR-454*	-2,02	0,007461
hsa-miR-32	-2,01	2,99E-05
hsa-miR-188-5p	-2,01	2,19E-06
hsa-miR-200c*	-2,01	0,000636
hsa-miR-193a-3p	-2,01	0,052551
hsa-miR-301a	-2,00	1,11E-05
hsa-let-7i*	-1,93	0,002615
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,89	0,009832
hsa-miR-20b	-1,67	0,000603
hsa-miR-20a	-1,85	5,72E-05
hsa-miR-770-5p	1,66	0,000373
hsa-miR-1248	1,87	0,029971
hsa-miR-1290	1,70	0,048967

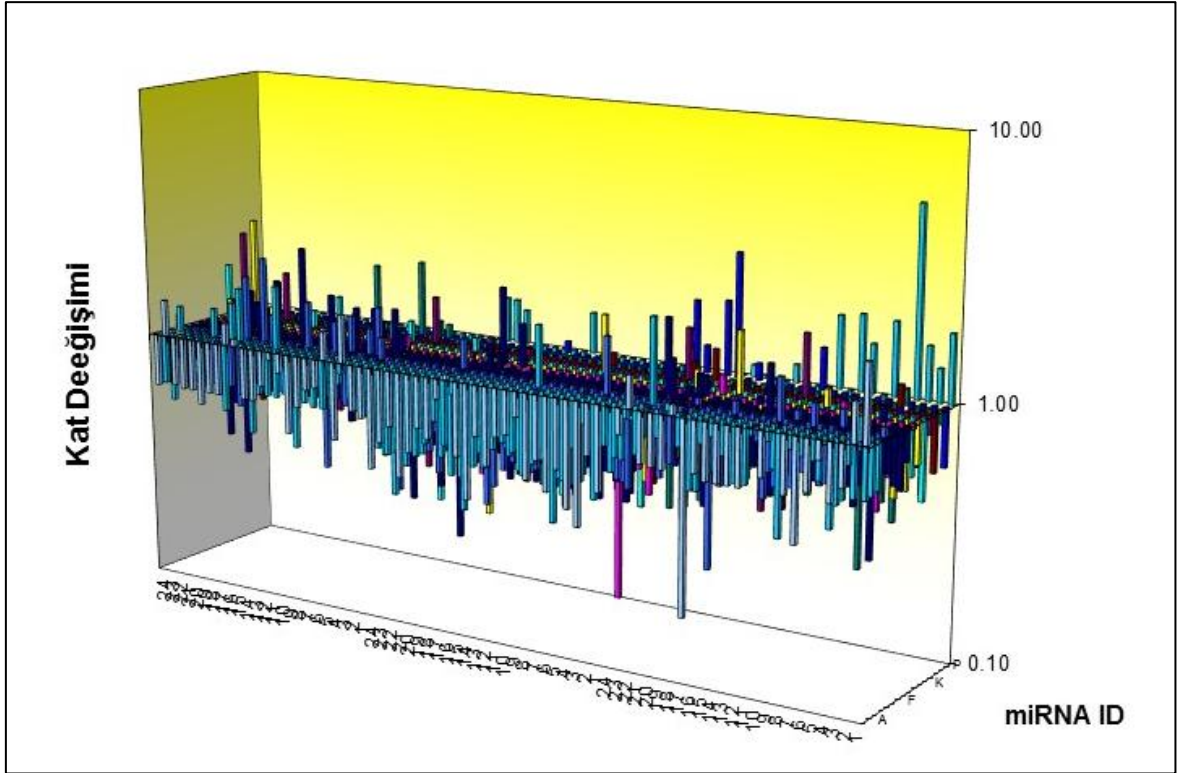
SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzerinde değişiklik gösteren miRNA'lar VENNY programı ile kesiştirilmiştir (Şekil 5.13). 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren miRNA'lar listelendiğinde her iki hücre hattında da azalan 50 adet miRNA'nın ve artan 3 adet miRNA'nın yer aldığı görülmektedir.



Şekil 5.13. SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde trastuzumaba ortak yanıt veren miRNA'ların listesi. Azalan 50 miRNA'dan temsili 8 adet miRNA ve 3 adet ortak artış gösteren miRNA listelenmiştir.

5.3.2. Tamoxifen'e duyarlı miRNA'ların belirlenmesi

Tamoxifen'e duyarlı miRNA profilini elde etmek amacıyla BT474 ve MCF7 hücre hatlarından elde edilen veriler $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak analiz edilmiş, her bir miRNA'nın ifade seviyesi ve kat değişimleri sonucunda elde edilen grafikler Şekil 5.14 ve Şekil 5.15'de gösterilmiştir.



Şekil 5.14. Tamoxifen ile muamele edilmiş BT474 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.

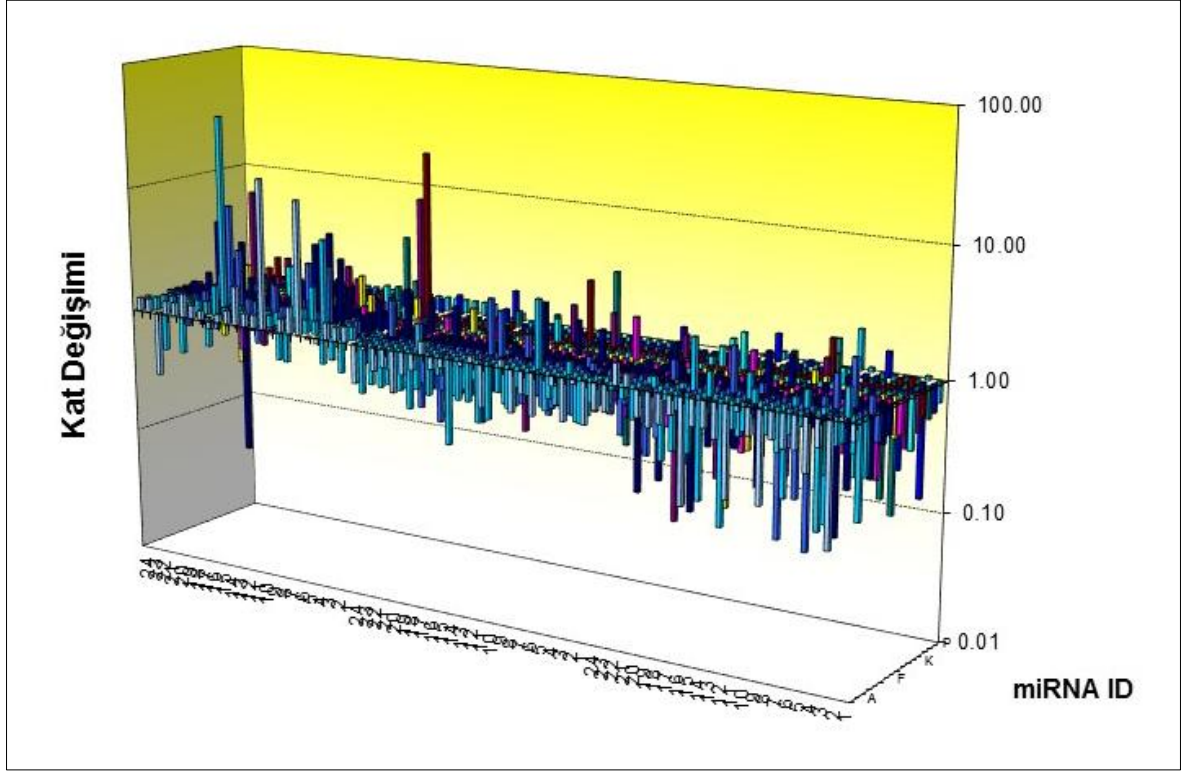
BT474 hücrelerinde, tamoxifen uygulaması sonrasında miRNA eş zamanlı PZR dizin sonucuna göre 1,5 kat ve üzeri farklılık gösteren miRNA'ların bir kısmı Çizelge 5.6'da gösterilmiştir. Ek 4'de BT474 tamoxifen için 1,5 kat artan ve azalan miRNA'lar tamamı listelenmiştir.

Çizelge 5.6. BT474 hücrelerinde tamoxifene duyarlı 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların listesi

miRNA ID	Kat Değişimi	p değeri
hsa-miR-7-2*	-2,99	1,05E-06
hsa-miR-653	-2,80	0,001343
hsa-miR-489	-2,92	0,012178
hsa-miR-7	-2,79	0,011241
hsa-miR-708	-2,74	0,002208
hsa-miR-20a*	-2,54	0,000166
hsa-miR-1180	-2,49	1,95E-10
hsa-miR-31	-2,41	1,77E-07
hsa-miR-490-3p	-2,42	4,65E-12
hsa-miR-335*	-2,41	0,002546
hsa-miR-93*	-2,28	0,004614
hsa-miR-454*	-2,18	0,000992
hsa-miR-328	-2,14	0,000024
hsa-miR-499-5p	-2,05	0,005311
hsa-miR-20a	-1,82	0,050605
hsa-miR-19b	-1,75	0,025473
hsa-miR-15b	-1,62	0,033235
hsa-miR-652	-1,76	0,028933
hsa-miR-20b	-2,05	0,023799
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,78	1,53E-05
hsa-miR-18a	-1,82	0,024754
hsa-miR-23c	-1,81	0,000530
hsa-miR-33a	-1,70	0,030950
hsa-miR-32	-1,71	0,009666
hsa-let-7i*	-1,51	0,051312
hsa-miR-19a	-1,77	0,027150
hsa-miR-373*	-1,59	0,017078
hsa-miR-23b	-1,68	0,028197
hsa-miR-205	-1,54	0,035634
hsa-miR-30a*	-1,67	0,031804
hsa-miR-590-5p	-1,52	0,048583
hsa-miR-193a-3p	1,54	0,025433

BT474 hücrelerinin tamoxifene verdiği yanıt incelendiğinde genel bir miRNA ifade azalışı olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle 2 kat ve üzeri değişikliklerin ifade azalışı şeklinde olduğu gözlenmektedir.

MCF7 hücrelerinde genel duruma bakıldığında anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar arasında ifadesi artan ve azalanların eşit dağılım gösterdiği söylenebilir (Çizelge 5.7).



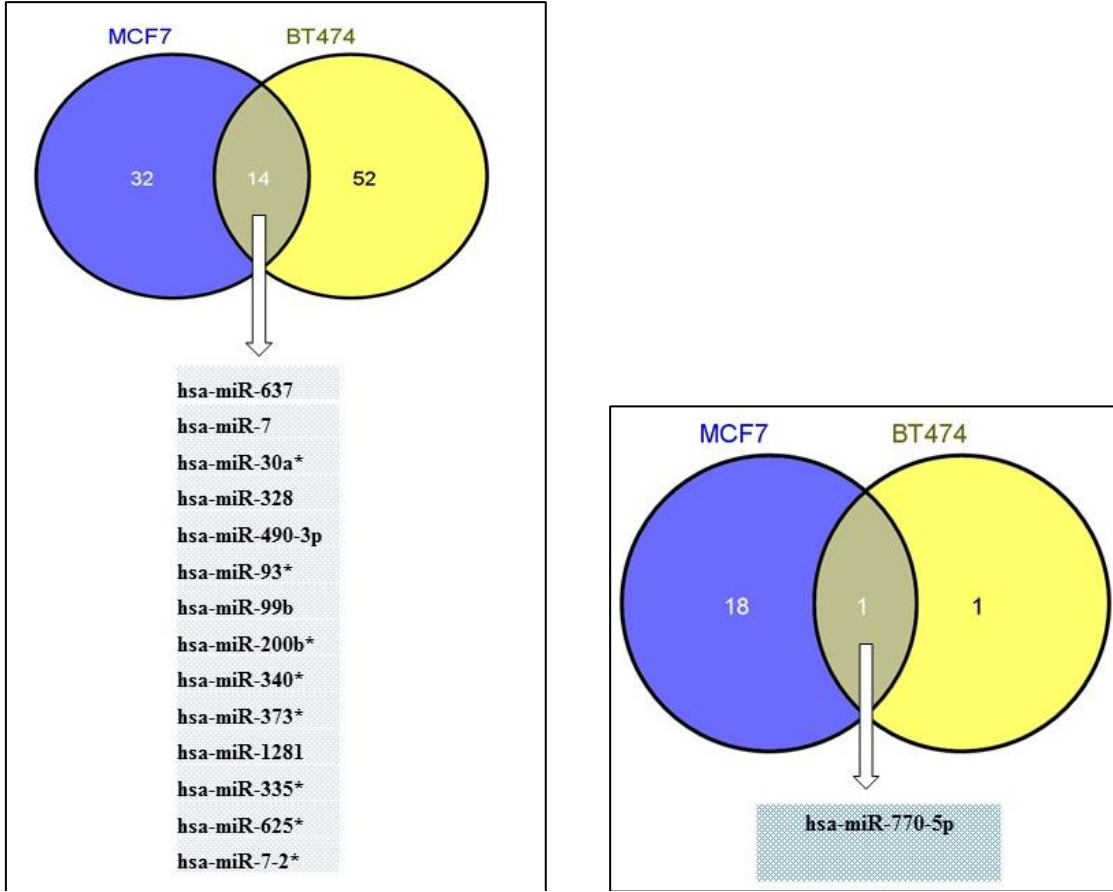
Şekil 5.15. Tamoxifen ile muamele edilmiş MCF7 hücrelerinin miRNA profili. İlaç uygulanan hücrelerin Ct değerleri kontrol Ct değerleri ile normalize edilerek kat değişim hesaplanmış ve grafikleştirilmiştir.

MCF7 hücrelerinin tamoxifen uygulaması sonrasında miRNA eş zamanlı PZR dizin sonucuna göre 1,5 kat ve üzeri farklılık gösteren miRNA'ların bir kısmı Çizelge 5.7'de gösterilmiştir, Ek 5'de MCF7 tamoxifen için 1,5 kat artan ve azalan miRNA'ların tamamı listelenmiştir.

Çizelge 5.7. MCF7 hücrelerinde tamoxifene duyarlı 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

miRNA ID	Kat Değişimi	p değeri
hsa-let-7d*	-6,40	0,013594
hsa-miR-628-3p	-6,08	0,013848
hsa-miR-1281	-4,17	0,034981
hsa-miR-188-3p	-3,82	0,041693
hsa-miR-532-3p	-3,17	0,014822
hsa-miR-18b	-3,01	0,024804
hsa-miR-502-5p	-2,84	0,033894
hsa-miR-188-5p	-2,79	0,041286
hsa-miR-100	-2,62	0,045443
hsa-miR-637	-2,58	0,016084
hsa-miR-1260	-2,22	0,049744
hsa-miR-218	-2,14	0,020834
hsa-miR-421	-2,05	0,013552
hsa-miR-9*	-2,09	0,022650
hsa-miR-32	2,20	0,000501
hsa-miR-497	2,30	0,000276
hsa-miR-33a	2,46	0,007600
hsa-miR-3200-5p	4,19	8,2E-05
hsa-miR-3907	7,68	9,31E-06
hsa-miR-205	1,51	1,83E-05
hsa-miR-374c	1,53	0,041715
hsa-let-7i	1,53	0,011763
hsa-miR-200b	1,53	0,000279
hsa-miR-19a	1,57	0,002369
hsa-miR-15a	1,58	0,002195
hsa-let-7i*	1,63	0,006456
hsa-miR-16-2*	1,65	1,24E-05
hsa-miR-22	1,68	9,9E-05
hsa-miR-96	1,74	0,000317
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	1,79	6,52E-07
hsa-miR-770-5p	1,80	0,039962
hsa-miR-664*	1,92	0,038166
hsa-miR-148a	1,96	0,005183

Tamoxifene duyarlı MCF7 ve BT474 hücrelerinde 1,5 kat azalan ve artan miRNA'lar VENNY programı ile kesiştirilmiş ve 14 adet azalan, 1 adet ise artan ortak miRNA tespit edilmiştir (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. Tamoxifen duyarlı MCF7 ve BT474 hücrelerinde ortak farklılık gösteren miRNA'lar. 14 tane miRNA'nın azaldığı, hsa-miR-770-5p'nin arttığı gözlenmektedir.

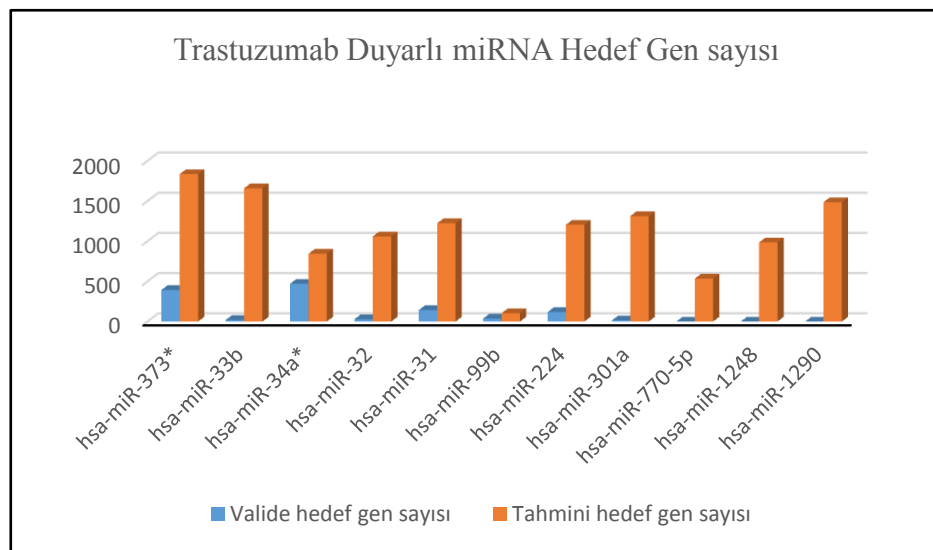
Hücrelerde trastuzumab ve tamoxifen cevabı kıyaslandığında hsa-miR-373* ve hsa-miR-99b'nin her iki ilacın muamelesinde de ortak olarak azaldığı dikkat çekmektedir. Ayrıca Her iki tedavide de ortak olarak ifade artışı gösteren miRNA hsa-miR-770-5p'dir. Bu üç miRNA'nın meme kanseri tedavisinde hücre tipi ve terapiden bağımsız aday hedef olma ihtimalleri ortaya çıkmaktadır.

5.4. Ortak Hedef Genler

Trastuzumab muamelesi sonucunda hücre tipinden bağımsız, tedaviye cevap oluşturan miRNA'ların araştırılması için SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde trastuzumaba duyarlı 1,5 kat artan ve azalan miRNA'ların kesişimi bulunmuştur. Bu miRNA'lar ile hedef analizine gidilmiştir. miRNA'ların hedefleri biyoinformatik analizler ile tahmini olarak tespit edilmektedir. Ayrıca farklı yöntemlerle doğrulanmış hedeflerin yer aldığı veritabanları da bulunmaktadır. Her miRNA için tahmini ve doğrulanmış hedefler “miRWalk” sitesinden indirilerek depolanmıştır. Çalışmada anlamlı olarak kat değişimi gösteren her ortak miRNA'nın tahmini ve doğrulanmış hedef sayıları verilmektedir (Çizelge 5.8 ve Şekil 5.17).

Çizelge 5.8. Trastuzumab duyarlı ortak miRNA tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayıları

miRNA ID	Doğrulanmış hedef gen sayısı	Tahmini hedef gen sayısı
hsa-miR-373*	392	1835
hsa-miR-33b	20	1658
hsa-miR-34a*	470	844
hsa-miR-32	29	1060
hsa-miR-31	143	1224
hsa-miR-99b	38	104
hsa-miR-224	118	1205
hsa-miR-301a	15	1313
hsa-miR-770-5p	0	534
hsa-miR-1248	0	985
hsa-miR-1290	0	1485

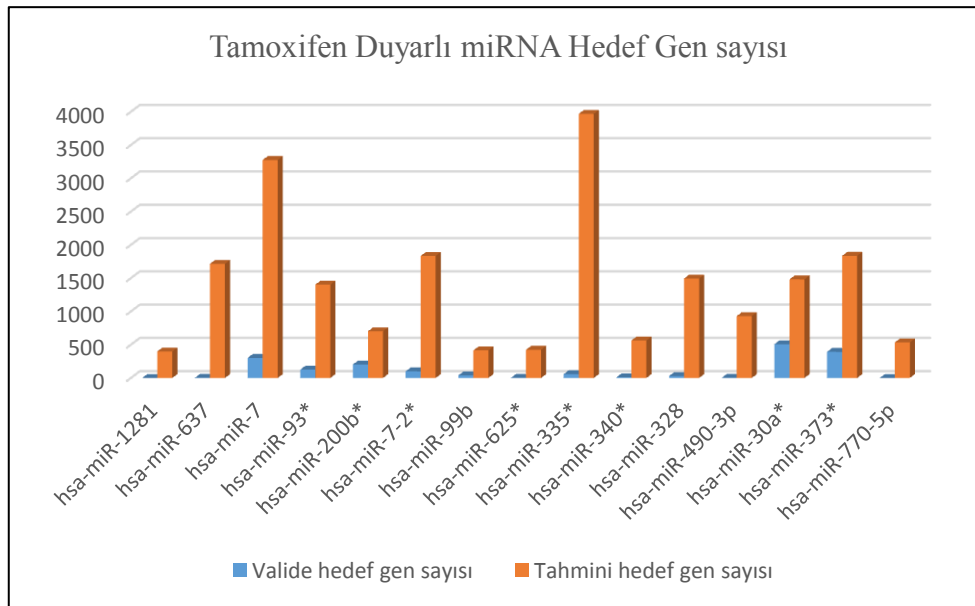


Şekil 5.17. Trastuzumab duyarlı hücre hatlarında ortak miRNA'ların miRWalk 'dan elde edilen tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayılarını gösteren grafik.

Tamoxifen muamelesi sonucunda hücre tipinden bağımsız, tedaviye cevap oluşturan miRNA'ların araştırılması amacı ile MCF7 ve BT474 hücrelerinde 1,5 kat artan ve azalan miRNA'ların kesişimi sonucunda elde edilen ortak miRNA'ların hedef analizine gidilmiştir. Her miRNA için tahmini ve doğrulanmış hedefler “miRWalk” sitesinden indirilerek depolanmıştır. Çalışmada anlamlı olarak kat değişimi gösteren her ortak miRNA'nın tahmini ve doğrulanmış hedef sayıları verilmektedir (Çizelge 5.9 ve Şekil 5.18).

Çizelge 5.9. Tamoxifen duyarlı ortak miRNA tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayıları

miRNA ID	Doğrulanmış hedef gen sayısı	Tahmini hedef gen sayısı
hsa-miR-1281	0	398
hsa-miR-637	2	1715
hsa-miR-7	301	3275
hsa-miR-93*	125	1402
hsa-miR-200b*	203	702
hsa-miR-7-2*	99	1833
hsa-miR-99b	38	414
hsa-miR-625*	2	424
hsa-miR-335*	57	3968
hsa-miR-340*	9	563
hsa-miR-328	28	1494
hsa-miR-490-3p	2	930
hsa-miR-30a*	507	1481
hsa-miR-373*	392	1835
hsa-miR-770-5p	0	534



Şekil 5.18. Tamoxifen duyarlı hücre hatlarında ortak miRNA'ların miRWalk'dan elde edilen tahmini ve doğrulanmış hedef gen sayılarını gösteren grafik.

5.5. Ortak Hedef Genlerin Yolak Analizi

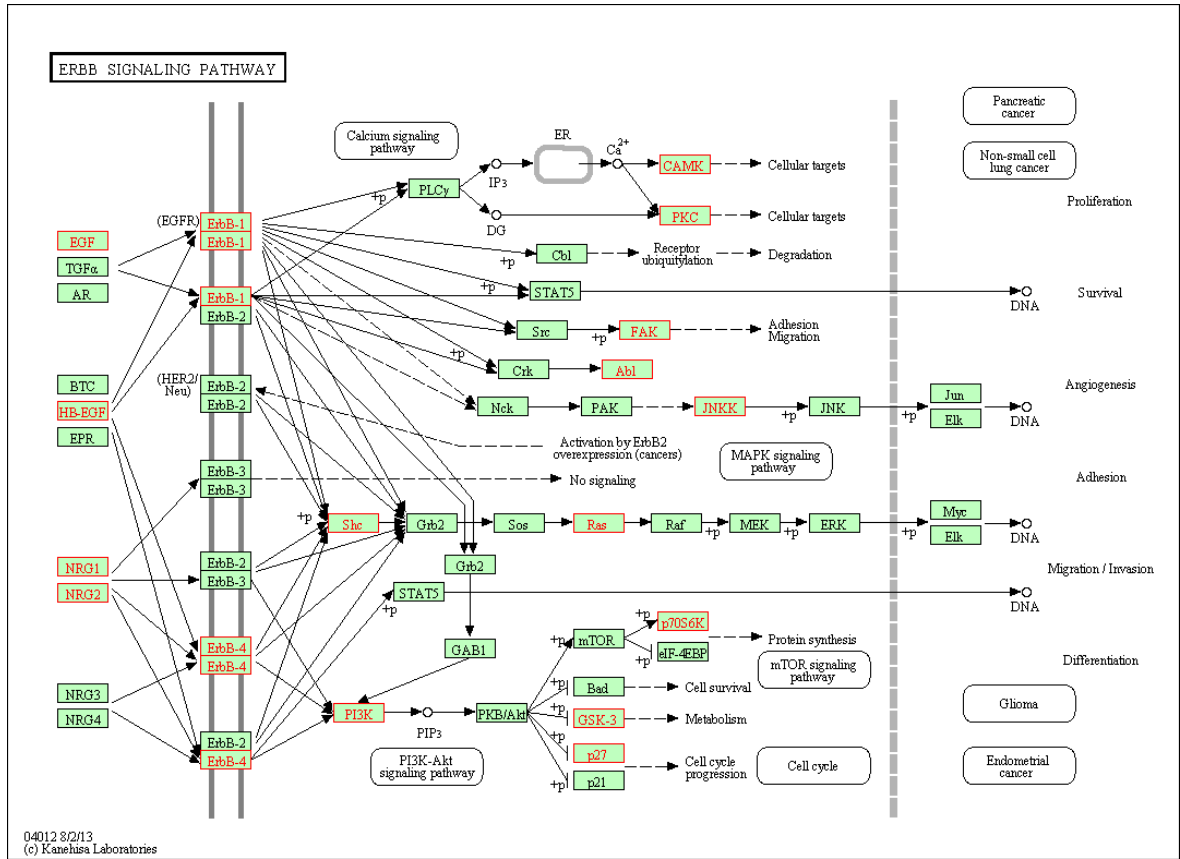
Biyoinformatik olarak doğrulanmış miRNA hedeflerinin rol aldığı yolaklar web tabanlı WebGestalt yolak analiz programı kullanılarak KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) veritabanı üzerinde tespit edilmiştir.

Trastuzumab duyarlı miRNA'lar ve hedefledikleri yolaklar

Trastuzumab duyarlı miRNA profilini elde etmek amacıyla SK-BR-3 ve BT474 hücre hatlarında eş-zamanlı PZR dizin çalışması yapılmış ve her bir miRNA'nın ifade seviyesi ve kat değişimleri belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da ortak olarak 1,5 kat ve üzeri artan miRNA'lar hsa-miR-770-5p, hsa-miR-1248 ve hsa-miR-1290 olarak belirlenmiştir. Anlamlı olarak farklılık gösterdiği bulunan 3 miRNA'nın hedef genleri ile yolak analizleri gerçekleştirilmiş yolak analiz sonucu Çizelge 5.10'de verilmiştir. Ortak yolaklara bakıldığında trastuzumab cevabı için önemli olduğu bilinen ErbB sinyal yolağı (Şekil 5.19), sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, fokal adezyon sinyal yolağı, kalsiyum sinyal yolağı, metabolik sinyal yolakları ve kanser sinyal yolağının zenginleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca trastuzumab duyarlı bu üç ifade artışı gösteren miRNA'nın östrojen reseptörünü de hedef aldığı belirlenmiştir.

Çizelge 5.10. SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde ifadesi artan hsa-miR-770-5p, hsa-miR-1248 ve hsa-miR-1290'a ait hedeflerin yolak analizi sonuçları

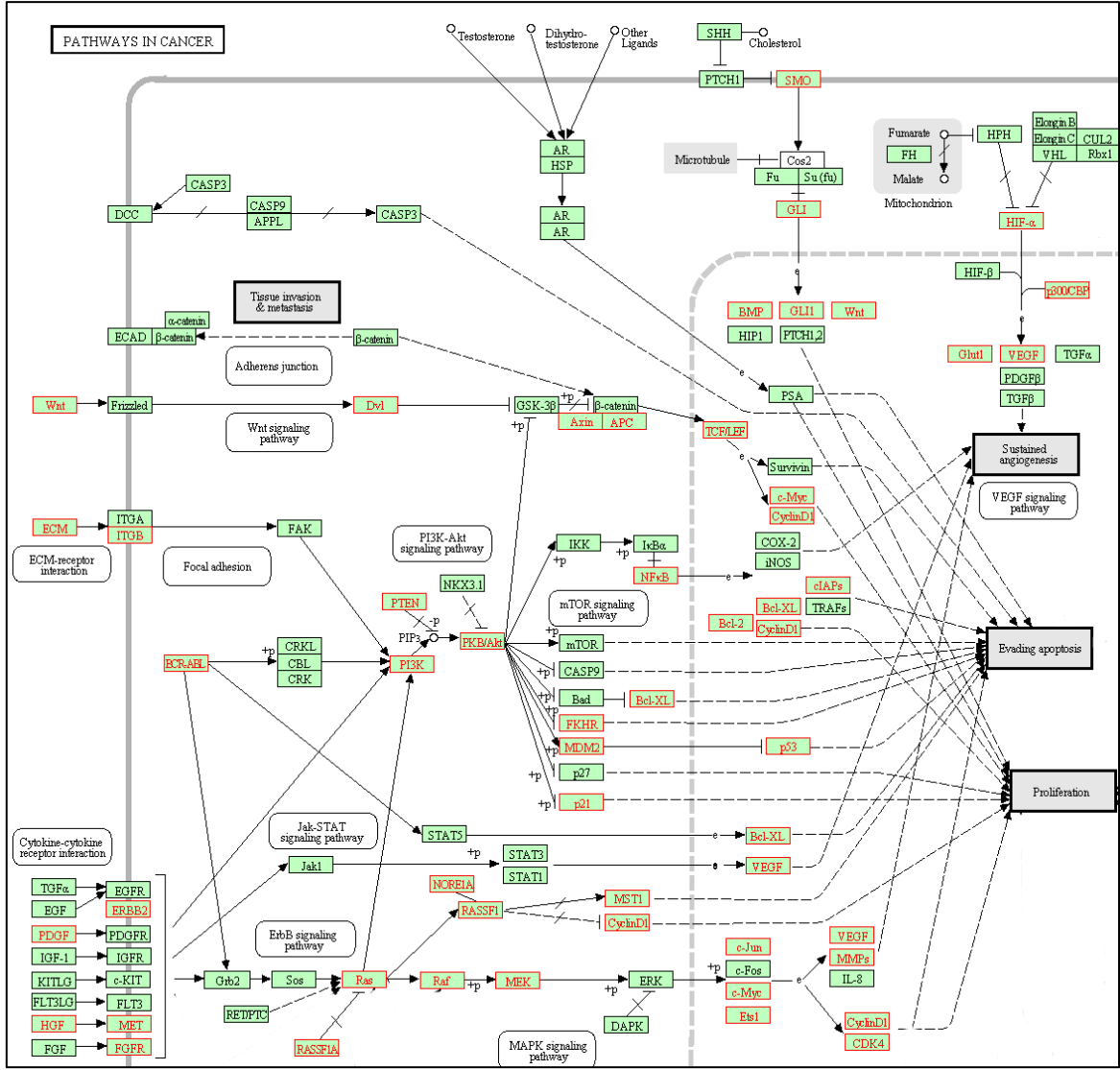
Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Metabolik yolaklar	126	7,04e-16
Kanser yolakları	52	2,95e-12
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	43	1,50e-10
Kalsiyum sinyal yolağı	38	7,84e-13
Aktin regülasyonu	37	5,04e-10
Fokal adezyon sinyal yolağı	34	5,17e-09
Nörotropin sinyal yolağı	26	9,88e-09
ErbB sinyal yolağı	21	1,75e-08



Şekil 5.19. Trastuzumab hedefi olarak bilinen ErbB sinyal yolağında, EGF, HB-EGF, ErbB1, ve ErbB4 gibi genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinin trastuzumab cevabı sonucunda ortak olarak 1,5 kat ve üzeri azalan hsa-miR-373* (hsa-miR-373-3p), hsa-miR-33b, hsa-miR-500a, hsa-miR-34a* (hsa-miR-34a-3p), hsa-miR-224, hsa-miR-301a, hsa-miR-32 ve hsa-miR-31 olmak üzere 8 adet miRNA tespit edilmiştir.

Her iki hücre hattında da trastuzumab duyarlı miRNA profiline bakıldığında çok sayıda azalan miRNA olması dikkat çekmiş ve bu miRNA'lar ER/HER arasındaki karşılıklı etkileşimi açıklamak açısından önemli görülmüştür. HER2 sinyal yolağı trastuzumab ile kapatıldığında ER sinyal yolağı açılarak kanser hücresinde büyüme ve çoğalma işlemlerini gerçekleştiren RAS, PI3K, VEGF gibi kanser yolakları tekrar aktifleşmektedir ve bir süre sonra hücre HER2 dirençli kazanmaktadır. Azalan bu miRNA'ların hedeflediği genlerindeki artış ile kanser yolaklarında tekrar aktifleşme gerçekleşebilir (Şekil 5.20).



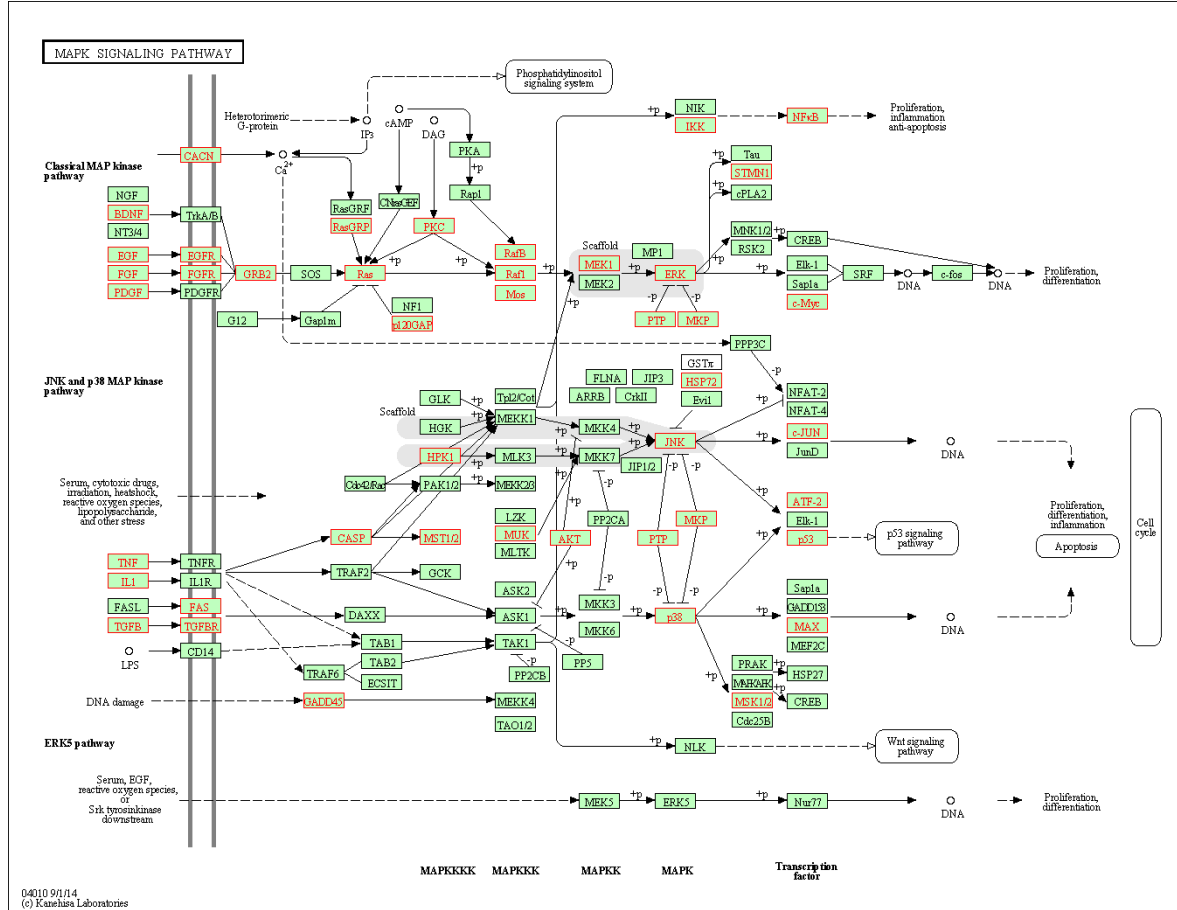
Şekil 5.20. Trastuzumab duyarlı hücrelerde azalan miRNA'ların kanser yolaklarını tekrar aktifleştirdiğini gösteren KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

Tamoxifen duyarlı miRNA'lar ve hedefledikleri yolaklar

Tamoxifen duyarlı miRNA profilini belirlemek için MCF7 ve BT474 hücre hatlarında qRT-PCR array çalışması yapılmış ve her bir miRNA'nın ifade seviyesi ve kat değişimleri belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da ortak olarak 1,5 kat ve üzeri artan tek miRNA hsa-miR-770-5p olarak belirlenmiştir. Anlamlı olarak artış gösterdiği bulunan miRNA'ların hedef genleri ile yolak analizleri gerçekleştirilmiş ve yolak analiz sonucu Çizelge 5.11'de verilmiştir. Ortak yolaklara bakıldığında tamoxifen cevabı için önemli olduğu bilinen MAPK sinyal yolağı (Şekil 5.21.), hücre döngüsü sinyal yolağı, fokal adezyon sinyal yolağı ve kanser sinyal yolağının zenginleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5.11. Tamoxifen duyarlı MCF7 ve BT474 hücrelerinde ifadesi artan miRNA'lara ait hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Kanser yolakları	119	9,83e-117
MAPK sinyal yolağı	56	1,29e-39
Fokal adezyon sinyal yolağı	55	1,56e-45
Hücre döngüsü sinyal yolağı	39	3,50e-35



Şekil 5.21. Tamoxifen duyarlı hücrelerde MAPK sinyal yolağında, TNF, TGFRB, ERK, ve AKT gibi genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

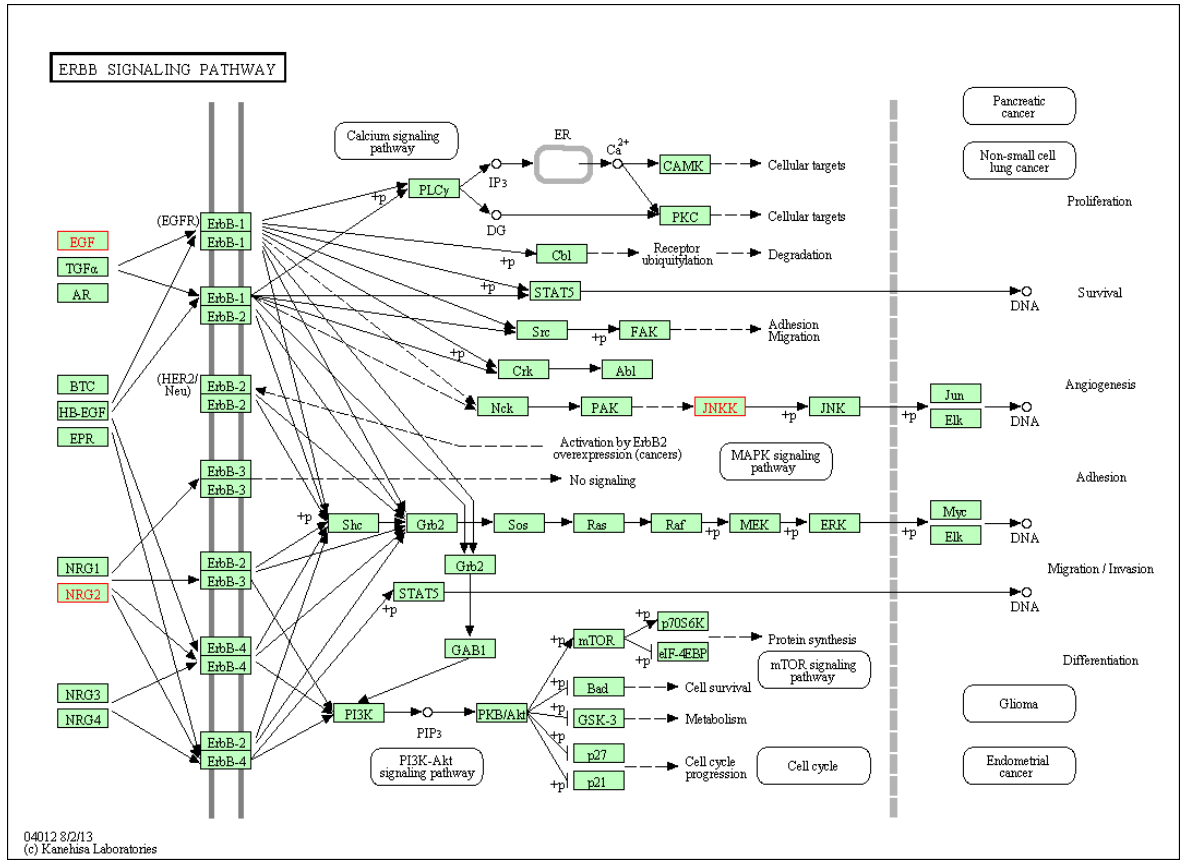
MCF7 hücre hattında tamoxifen duyarlı 18 tane artan miRNA tespit edilmiş ve bunlardan hsa-770-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-19a, hsa-miR-17, hsa-let-7i'nin doğrulanmış hedefleri arasında östrojen reseptörünü kodlayan ESR1 ve ESR2 genlerinin yer aldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte BT474 hücrelerinde tamoxifen cevabı aynı duyarlılıkta gerçekleşmemiştir. Bu durumun her iki hücre arasında var olan ER/PR/HER2 gibi histopatolojik durumlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Trastuzumab ve tamoxifen duyarlı hücre hatlarında ortak olarak artış gösteren hsa-miR-770-5p'nin hedef genleri ile yolak analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.12). Ortak yollara bakıldığında trastuzumab cevabı için önemli olduğu bilinen ErbB sinyal yolağının varlığının yanında tamoxifen için önemli olan östrojen sinyal yolağının varlığı dikkat çekmektedir. Ayrıca MAPK sinyal yolağı ve Wnt sinyal yolağı gibi kanserde etkinliği bilinen sinyal yolaklarının zenginleştiği tespit edilmiştir. hsa-miR-770-5p'nin hedef genleri arasında ErbB sinyal yolağında yer alan EGF ve NRG2 genlerinin varlığı ayrıca östrojen sinyal yolağının önemli bir parçası olan ESR2 geninin varlığı gözlenmiştir (Şekil 5.22).

Çizelge 5.12. Trastuzumab ve tamoxifen duyarlı hücrelerde ifadesi artan hsa-miR-770-5p'ye ait hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
MAPK sinyal yolağı	6	0,0333
Hücre döngüsü sinyal yolağı	5	0,0095
Endositosis	5	0,0380
Wnt sinyal yolağı	4	0,0407
Nörotropin sinyal yolağı	4	0,0380
ErbB sinyal yolağı	3	0,0582

MCF7, BT474 ve SK-BR-3 hücrelerinde her iki ilacın cevabı olan miRNA'ların kesişimi alınmış ve hsa-miR-770-5p artan tek miRNA iken hsa-miR-373*, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-99b ise azalan miRNA'lar olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.22. hsa-miR-770-5p'nin ErbB sinyal yolağında, EGF, NRG2, ve JNKK genlerinin KEGG yolak analiz sonucu. miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

Ayrıca kullanılan hücre hatlarında ifadesi değişen miRNA'lar kesiştirildiğinde 38 miRNA'nın tüm hücre hatlarında ilaç bağımsız olarak ortak olduğu gözlenmiş ve bunlardan 13 tanesinin SK-BR-3 ve BT474 hücrelerinde azalırken; MCF7 hücrelerinde artan ifade göstermesi dikkat çekmiştir (Çizelge 5.13). Bilindiği üzere SK-BR-3 ve BT474 hücreleri HER2+ iken MCF7 hücresi HER2-’dir. Bu durum bahsedilen miRNA’ların HER2 profili ile ilişkili olabileceğini akıllara getirmektedir.

Çizelge 5.13. Tüm hücre hatlarında ilaç bağımsız olarak HER2 profilini gösteren miRNA'lar

miRNA ID	SK-BR-3	BT474	MCF7
hsa-miR-489	-1,3112	-2,9231	1,04367
hsa-miR-19b	-1,4348	-1,7502	1,36762
hsa-miR-15b	-1,4348	-1,6161	1,05824
hsa-miR-20a	-1,5061	-1,8182	1,24977
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,5183	-1,7777	1,77871
hsa-miR-19a	-1,5219	-1,7685	1,57098
hsa-miR-205	-1,5592	-1,5449	1,50699
hsa-miR-20b	-1,5865	-2,0527	1,13813
hsa-miR-33a	-1,7181	-1,6964	2,46514
hsa-let-7i*	-1,8161	-1,5079	1,63203
hsa-miR-18a	-1,8932	-1,8245	1,19472
hsa-miR-32	-2,1006	-1,7142	2,20636
hsa-miR-590-5p	-2,1597	-1,5236	1,08799

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Tartışma

Bu çalışmada tamoxifene duyarlı ER+ ve trastuzumaba duyarlı HER2+ hücre hatlarında mikroRNA profilini elde etmek amacıyla yüksek işlem kapasiteli eş-zamanlı PZR dizin (qRT-PCR array) yöntemi kullanılmıştır. ER+ ve HER2+ meme kanseri hücre hatlarına uygulanan iki farklı ilaç ile ortaya çıkan miRNA'ların varlığı bu ilaçların miRNA boyutunda etki mekanizmalarını açıklamak için faydalı olacağı düşünülmüştür

Yapılan çalışma teknik olarak ele alındığında, hibridizasyon esasına dayalı bir yöntem olan mikrodizin yönteminin aksine yine yüksek işlem kapasiteli bir yöntem olan, aynı zamanda altın standart olarak da kabul edilen eş-zamanlı PZR dizin (qRT-PCR Array) yöntemi tercih edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı bir yöntem olması sonuçların güvenilirliğini arttırmakla birlikte mikrodizin deneyleri sonucunda ifade farklılığı gösteren miRNA'ların eş-zamanlı PZR gibi altın standart kabul edilen bir başka yöntem ile doğrulanması gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların (miRNA) bulunması ve hücrede çok önemli işlevlere sahip olduklarının gösterilmesi bu molekülleri de meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol alan şüpheliler listesine koymuştur ve mRNA ifade profilleri ile açıklanamayan farklılıklar miRNA çipleri ile araştırılmaya başlanmıştır. miRNA çipleri sayesinde meme kanserine sebep olabilecek hedef miRNA'lar bulunmaya başlanmıştır. miR-125a ve miR-125b'nin meme karsinogenezinde önemli olan HER2 ve HER3 genlerini ayrıca kanserde önemli rolü olan c-RAF geninin ifadesini azalttığı bilinmektedir (82,85). İnvazyon ve metastatik potansiyeli olan meme kanseri hücre hatlarında miR34'ün direkt olarak Fral geninin mRNA ve protein ifadesini baskıladığı bildirilmiştir (86). miR-31'in metastatik meme kanseri ile ilişkili birçok genin ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (87). Yapılan birçok çalışma mikroRNA'ların meme kanserinde bilinen mekanizmaları etkileyebildiğini göstermekte ve bu düzenleyici RNA moleküllerinin tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef molekül olabileceği fikrini akıllara getirmektedir.

Meme kanseri korunması ve terapideki son yeniliklere karşın 2010 yılında tüm dünyada yaklaşık 425.000 ölüm ile kadınlarda önemli malignansiler arasında yerini korumaktadır (88). Meme kanseri heterojenik bir hastalık olup çeşitli tümör özellikleri farklı tedavi cevaplarını oluşturmaktadır. Son yıllarda moleküler biyolojisi temel alınarak yapılan meme kanseri sınıflandırılmasına paralel olarak araştırmacılar tarafından tümör oluşumu, korunması ve yayılmasında yer alan süreçleri kontrol eden sinyal yolları incelenmeye başlanmıştır. Tümör gelişiminde gerekli olan ve sonradan çeşitli düzenlemelerle edinilen özelliklerden olan hücre çoğalmasının sürekliliği, büyüme kontrol mekanizmalarından kaçış, hücre ölümüne direnç, sınırsız çoğalma kapasitesi, genomik dengesizlik, invazyon ve yayılma gibi mekanizmalar değerlendirilmiştir. Klasik olarak meme kanseri histopatolojik özellikleri (ER, PR ve HER2) kullanılarak farklı klinik alt tiplere sınıflandırılmıştır. Hormon reseptör pozitif (HR+) HER2 pozitif (HER2+) ve her iki reseptör negatif olarak ayrılan bu alt tipler farklı biyolojik davranışlar ve tedavi duyarlılığı göstermektedir.

Meme kanseri hastalarının çoğunun ölüm hızı tümörlerin östrojen reseptörü taşıması ile ilişkilidir (89). Çalışmada ER(+) olduğu bilinen hücre hatlarında tamoxifen uygulaması sonucunda ilaca duyarlı mikroRNA profili belirlenmiş ve hsa-miR-770-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-19a, hsa-let-7i, hsa-miR-200b, hsa-miR-17 gibi mikroRNA'ların artan ifade profili gösterdiği belirlenmiştir. Belirtilen miRNA'ların hedef genleri içerisinde ESR1 ve ESR2 genlerinin varlığı dikkat çekmiştir. Hücre çoğalması ve büyümesi gibi pek çok hücre fonksiyonu destekleyen ligand düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden olan östrojen reseptörü, ESR1 geni tarafından kodlanan ER α ve ESR2 geni ile ifade olan ER β olmak üzere iki farklı reseptörden oluşur (90,91). Steroid hormon olan östradiol (E2) ER α ve ER β 'nın başlıca ligandıdır ve normal koşullarda hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder (92). Estradiol ile aktive olan ER α hücre çoğalması ve apoptozdan kaçış uyarımında önemli rol oynamaktadır (93). Estradiolun biyolojik etkisi hem çekirdekte genomik transkripsiyonel etki aracılığıyla hemde ER α ile çekirdek dışında genomik olmayan etkileme ile gerçekleşir. Klasik genomik ER transkripsiyon mekanizmasında, ER α reseptörüne E2 bağlandığında reseptörün şekli değişir. Aktif ER dimerize olur ve dimer direkt yada dolaylı olarak östrojen yanıt elementlerine (ERE) bağlanarak, hücre çoğalması ve devamlılığında yer alan genleri hedef alır (94). Çalışmada ESR1 ve ESR2 genlerini hedef alan ve bu genlerin ifadesini azaltan mikroRNA'ların varlığı tamoxifen

varlığında bu miRNA'ların ER'yi baskılayarak E2 sentezini engelineceği, hücre çoğalmasını dururabileceği ve hücreyi apoptoza sürekleeyeceği tahmin edilmektedir.

ER pozitif meme kanseri tedavisinde aromataz inhibitörleri ya da anti-östrojen etkisi gösteren moleküller ile E2 sentezinin kapatılması ilk seçenek olmasına rağmen yaygın olarak hormonal terapiye karşı direnç oluşur ve bu direnci IGF-IR ve EGFR/HER2 reseptör fonksiyonunu artırarak yansıtır (95). ER, AP-1 (aktivatör protein-1), SP-1 (spesifite protein -1), NFKB gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile bağlanarak gen ifadesini sağlamaktadır. Bu alternatif genomik yolak klasik olmayan ER genomik yolağı olarak bilinir. ER bu yol aracılığıyla birçok reseptör tirozin kinaz (RTK) (örneğin HER2, IGF-IR) ve MAPK ya da AKT gibi alt sinyal yolakları ile hızlı etkileşime girmekte ve hücrenin devamlılığı sağlanmaktadır. Çalışmamızda tamoxifen uygulamaları sonrasında azalan pekçok miRNA tespit edilmiştir. Bu mikroRNA'ların varlığı tamoxifen uygulaması sonrasında artan ifade gösteren miRNA'lar ile östojen resptörü ve dolayısıyla E2 sentezi baskılanırken genomik olmayan sinyal iletim sistemi ile hormonal terapiye direnç yaratarak büyümenin EGFR/HER2 veya IGFR gibi diğer reseptörler aracılığıyla devam edebileceğini göstermektedir. Tamoxifen varlığında azalan bu mikroRNA'ların hedefleri arasınd IGFR, IGF ve MAPK ailesi üyelerinin varlığı bu fikri desteklemektedir.

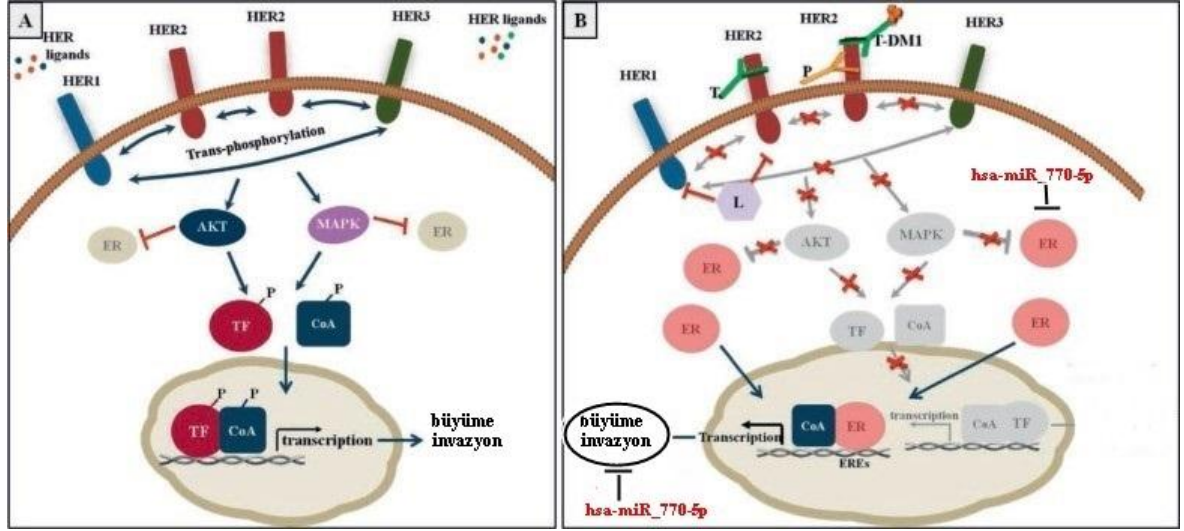
Meme kanserinde hücre çoğalmasının sürekliliği mekanizmalarından biri de HER2 sinyal yolağıdır. HER2, HER ailesine ait membran reseptörü olup homo yada heterodimer oluşumu ile tirozinkinaz fonksiyonunu aktif hale getirir. Bu reseptör 3 temel sinyal yoloğının aktifleşmesinde rol alır: Ras/Raf/MAPK, JAK/Stat ve PI3K/Akt/mTOR (96). Bu üç yollak büyüme ve hücrenin varlığını sürdürmesi, çoğalma, bölünme, metabolizma ve yayılması gibi hücrel fonksiyonlar içerir. Çalışmada trastuzumab varlığında hsa-miR-770-5p, hsa-miR-3176, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-193b, hsa-miR-106b, hsa-miR-1290 ve hsa-miR-1248 gibi ifade artışı gösteren mikroRNA'lar tespit edilmiştir. Bu mikroRNA'ların hedefleri arasında ErbB ailesi üyelerinden olan EGFR ve ErbB4 olması ayrıca Ras/MAPK yolağında yer alan bazı genlerin varlığı ve PI3K/Akt iletim sisteminde yer alan PTEN varlığı dikkat çekmiştir. HER sinyal yolağında HER aşırı ifadelenmesi ile PI3K/Akt yolağında Akt'ın aktif hale gelmesi, genetik ve epigenetik mekanizmalar ile PTEN ifadesinde azalma olduğu bilinmektedir (97). Trastuzumab varlığında artan

mikroRNA'ların hedef genlerin ifadesini azaltacağı ve böylece kanser yolaklarında gerileme olacağı düşünülebilir.

Ayrıca trastuzumab varlığında HER2+ hücrelerde hsa-miR-373-3p, hsa-miR-33b, hsa-miR-34a*, hsa-miR-22, hsa-miR-301b, hsa-let-7i, hsa-miR-17 gibi azalan mikroRNA profili saptanmıştır. Son zamanlarda HER sinyal yolağını etkin şekilde kapatabilen ilaçlar klinik uygulamalarda yerini almaktadır. Monoklonal antikorlar olarak bilinen bu ilaçlardan FDA onaylı olanlar trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtasin'dir (T-DM1). Bu ajanların etkinliğine rağmen HER2+ tümörlerde HER sinyal yoloğunun yeniden aktif olması ya da alternatif kaçış yolaklarının etkin hale gelmesi ile direnç oluşmaktadır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarla meme kanserinde ER ve HER2 ifadesi arasında ters etki olduğu gösterilmiştir (98). Meme kanserinde klinik öncesi modellerde HER2'nin HER sinyalindeki blokajı ile ER seviyesinin arttığı gösterilmiştir (99). Trastuzumab varlığında azalan mikroRNA'lar içinde hsa-mir-22, hsa-let-7i ve hsa-miR-17 gibi ESR1 ve ESR2 genlerini hedef alan miRNA'ların negatif regülasyonu ile ER artışının muhtemel olacağı düşünülmüştür. Dolayısı ile trastuzumab ile HER2 yolağı baskılanırken hücre direnç mekanizması, miRNA'lar üzerinden ER yolağını aktif hale getirip kaçış yolu bulabilir. ER ve HER2 sinyal yolakları arasındaki çift yönlü moleküler karşılıklı etkileşim varlığı bu fikri desteklemektedir.

Meme kanserinde hücre çoğalması ve varlığını sürdürmesinde ER ve HER2 sinyal yolakları baskın rol almaktadır. Bu nedenle bu sinyal yolaklarını hedef alan terapiler etkin olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte hem endokrin hem de anti-HER2 terapilerine karşı oluşan direnç temel klinik sorunlardan biridir. ER ve HER2 sinyal yolakları arasındaki çift yönlü moleküler karşılıklı etkileşim varlığı ilgi uyandırmaktadır. Çalışmada trastuzumab ve tamoxifen varlığında hsa-miR-770-5p hücre bağımsız olarak artan tek mikroRNA'dır. Bu mikroRNA'nın hedefleri arasında ErbB ailesi üyeleri ve ESR2 geninin olması dikkat çekicidir. Trastuzumab varlığında HER2 reseptörleri bloklanarak Akt ve MAPK ifadelerinde azalma gözleneceği düşünülmektedir. Bu azalmaya bağlı olarak ER sinyal yolağının etkin hale geçeceği ve hücresel çoğalma ve hayatta kalmanın sağlandığı bilinmektedir (99). Çalışmamızda trastuzumab uygulaması sonucunda hsa-miR-770-5p'nin attığı görülmüştür. Bu mikroRNA'nın hedefleri arasında ESR2 geninin olması, ER β 'ya

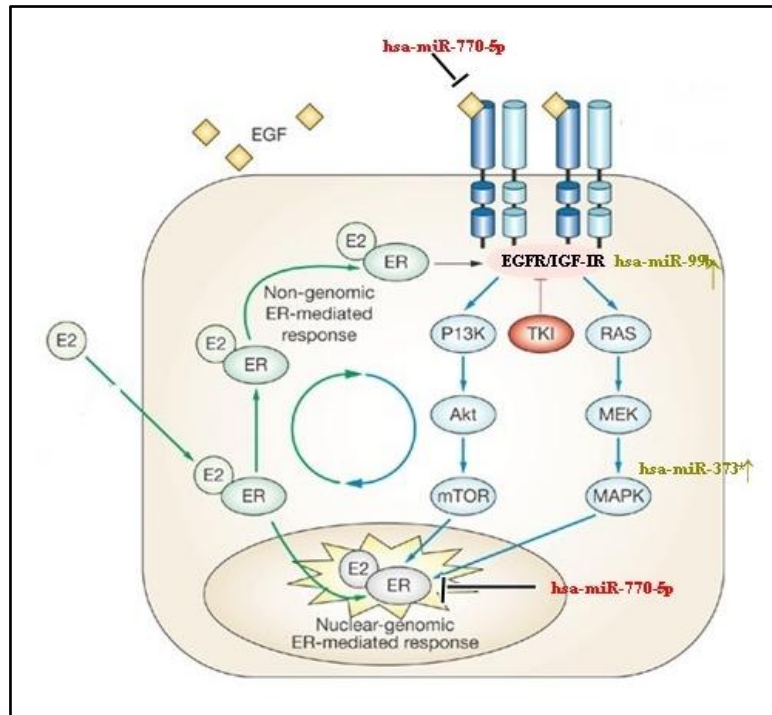
bağlanarak ER'ı inhibe edebileceğini ve böylece trastuzumab varlığında etkin hale gelmesi muhtemel ER sinyal yolağının ifadesini azaltabileceğini düşündürmektedir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Trastuzumab varlığında hsa-miR-770-5p ile ER/HER karşılıklı etkileşiminin kapatılabileceğini gösteren temsili grafik. Solda yer alan (A) bölüm normal koşullarda HER reseptörünün aktifleşerek büyüme ve invazyonu sağladığını göstermektedir. B kısmı ise trastuzumab varlığında ER'nin aktif olduğu ve hsa-miR-770-5p'nin ER 'yi baskılayarak hücre çoğalmasını baskılayabileceğini gösterilmektedir.

Tamoxifen varlığında ER reseptörü inhibe olacağından aralarındaki ters korelasyon düşünüldüğünde HER2 ifadesi artacak ve HER sinyal yolağının altında yer alan AKT ve MAPK ifadelerindeki artış ile çoğalma, hayatta kalım ve yayılma sağlanacaktır. Çalışmada artan hsa-miR-770-5p'nin hedefleri arasında ErBB ailesi üyelerinin varlığı göz önünde bulundurulduğunda tamoxifen varlığında ER/HER karşılıklı etkileşimi sebebiyle bu miRNA'nın aşırı ifade olan HER2 ifadesini baskılayabileceği düşünülmektedir (Şekil 6.2).

yer alan MAPK ve Akt yolları açılır. Artan ifade gösteren hsa-miR-770-5p'nin hedefleri arasında ErbB ailesinden EGFR ve HER2 ve ErbB4 ayrıca ESR2 geninin olduğu gözlenmiş ve artan hsa-miR-770-5p ile bu reseptörlerin ifadesinin azalacağı düşünülmüştür bu sayede ER/HER2 karşılıklı etkileşimin susturulabileceği tahmin edilmiştir. Ancak ER/IGF-IR arasındaki karşılıklı etkileşim bloklanmadığı için hücre büyümesinin tamamen durması ihtimali düşük olacaktır. Çalışmada her iki ilaç varlığında da ortak azaldığı gözlenen hsa-mir-99b'nin doğrulanmış hedefleri içinde jun (AP-1), IGF-IR ve IGF Akt gibi genlerin bulunduğu görülmüştür. Bilindiği üzere AP-1 ER'nin genomik olmayan transkripsiyonunda koaktivatör olarak görev alır ve ER'nin transkripsiyonu sağlar. ER varlığında onunla sinerjik etki gösteren IGF-IR ifadesi de artacaktır. IGF-IR iletim sisteminin altında yer alan MAPK ve Akt sinyal iletim mekanizmaları aktifleşecek ve çoğalma devam edecektir. Bu fikri hsa-miR-373-3p'nin doğrulanmış hedefleri arasında olan ve MAPK iletim sisteminde yer alan MAPK14 (p38 MAPK), MAPK1IP1L ve MAPK3K12 genleri desteklemektedir. Tüm hücre hatlarında ilaç bağımsız olarak artan hsa-miR-770-5p'nin hücre büyümesini tamamen durduramama nedeninin ortak olarak azalan hsa-miR-99b ve hsa-miR-373*'nin tetiklediği IGFR iletim sisteminin aktif kalması ile açıklanabileceği düşünülmüştür (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. ER/HER-IGFR arasındaki karşılıklı etkileşim ve bu iletim sisteminde rol alan ortak miRNA'ları gösteren temsili grafik. hsa-miR-770-5p'nin ifade artışına rağmen hücrenin büyümesinin tamamen durdurulamama nedeni açıklamaktadır.

6.2. Sonuç

Bu çalışma sonucunda;

- İki farklı meme kanseri alt-tipine uygulanan iki farklı ilaç ile ortaya çıkan duyarlı miRNA'lar arasında farklılık gösteren ve ortak olan miRNA listeleri saptanmıştır.
- İki farklı meme kanseri alt-tipine uygulanan tamoxifen ve trastuzumab duyarlı miRNA'ların hedeflediği genler bulunmuş, yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.
- Tamoxifen ve trastuzumab duyarlı mikroRNA'ların hedeflerinin kanserde etkinliği bilinen MAPK yolağı, Wnt sinyal sistemi ve ErbB iletim yolağında rol aldıkları tespit edilmiştir.
- Kullanılan üç hücre hattında ifadesi anlamlı olarak değişen miRNA'lar kesiştirilmiş ve 38 miRNA'nın tüm hücre hatlarında ilaç bağımsız olarak ortak olduğu gözlenmiştir. Bu grup içerisinde reseptör profiline bağlı olarak ilaç duyarlılığı gösteren mikroRNA'lar belirlenmiştir.
- Tamoxifen ve trastuzumab uygulamaları sonucunda bütün hücrelerde anlamlı olarak artış gösteren tek miRNA hsa-miR-770-5p olarak saptanmıştır ve bu miRNA'nın hedefleri incelendiğinde ER+ ve HER+ meme kanserlerinde bu iki reseptör arasındaki karşılıklı etkileşimi engelleyebileceği düşünülmüştür.
- İlaç ve iki farklı meme kanseri alt-tipinden bağımsız olarak anlamlı azalma gösteren 2 miRNA'nın (hsa-miR-99b ve hsa-miR-373*) varlığı tespit edilmiştir.
- Bu üç miRNA meme kanserinde var olan tedavilerin etkisini arttırmak için hedef olarak ya da potansiyel terapatik hedef miRNA olarak belirlenmiştir.

İleride yapılması düşünülen çalışmalar aşağıda sıralanmıştır;

- İfadesi artan tek miRNA olan hsa-miR-770-5p ve ifadesi azalan hsa-miR-99b ve hsa-miR-373* ile fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilmesi,
- Bu miRNA'ların etkinlikleri özellikle ER/PR ve HER2 reseptör ifadesi olmayan ve diğerlerine kıyasla kötü prognoz ile seyreden üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde test edilmesi,
- ER/HER arasındaki karşılıklı etkileşimi miRNA boyutunda açıklayabilmek amacıyla fonksiyonel çalışmalar yapılması,
- mikroRNA'ların hedef validasyonu amacıyla seçilecek olan hedef proteinlerin Western blot tekniği ile doğrulanması planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26(19):2799–803.
2. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130(7):2113–29.
3. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, Gillespie E, Slack FJ. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res.* 2007;67(23):11111–6.
4. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 1990;50(23):7415–21.
5. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2010;1(2):109–26.
6. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter’s concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727–30.
7. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 1999;9(12):M53–6.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
9. Cazzaniga M, Bonanni B. Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:985620.
10. Youlten DR, Cramb SM, Dunn N a M, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(3):237–48.
11. Dubova S. EGE ÜNİVERSİTESİNDE MEME KANSERLERİ: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi. 2005;(2).

12. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747–52.
13. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale A-L, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(14):8418–23.
14. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth P a, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill G a, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76.
15. Tirona MT, Sehgal R, Ballester O. Prevention of breast cancer (part I): epidemiology, risk factors, and risk assessment tools. *Cancer Invest.* 2010;28(7):743–50.
16. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(18):10393–8.
17. Palmieri C, Patten DK, Januszewski A, Zucchini G, Howell SJ. Breast cancer: current and future endocrine therapies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014;382(1):695–723.
18. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(24):2431–42.
19. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13(10):1558–68.

20. Pelekanou V, Leclercq G. Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 2011;55(7-9):869–78.
21. Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62(13):1265–76.
22. Ocaña A, Cruz JJ, Pandiella A. Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *Am. J. Clin. Oncol.* 2006;29(1):90–5.
23. Nahta R, Yu D, Hung M-C, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006;3(5):269–80.
24. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, Fermeaux V, Bertheau P, Garnier J, Jeannin J-F, Coudert B. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br. J. Cancer* 2006;94(2):259–67.
25. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Da Prada G, Zambelli A, Costa A. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(17):5650–5.
26. Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, Repp R, Kalden JR, Valerius T, Herrmann M. Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J. Immunol.* 2003;171(10):5124–9.
27. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 2000;182(2):150–62.
28. Osborne CK, Bardou V, Hopp T a., Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua S a. W, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003;95(5):353–61.

29. Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF, Gee JM. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 1999;6(3):373–87.
30. Font de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(14):5041–7.
31. Hong S-H, Privalsky ML. The SMRT Corepressor Is Regulated by a MEK-1 Kinase Pathway: Inhibition of Corepressor Function Is Associated with SMRT Phosphorylation and Nuclear Export. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(17):6612–6625.
32. Yu Z, Gao W, Jiang E, Lu F, Zhang L, Shi Z, Wang X, Chen L, Lv T. Interaction between IGF-IR and ER induced by E2 and IGF-I. *PLoS One* 2013;8(5):e62642.
33. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(8):1616–22.
34. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008;5(9):531–42.
35. Kushner PJ, Agard D a, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000;74(5):311–7.
36. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91(18):8517–21.
37. Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E. Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22(26):4007–16.
38. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 2000;275(24):18447–53.
39. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling a. E, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu

- Cross-Talk in ER/HER2-Positive Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2004;96(12):926–935.
40. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411(6835):355–65.
 41. Kim J a. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am. J. Surg.* 2003;186(3):264–268.
 42. Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* 2008;3(7):e2818.
 43. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455(7209):58–63.
 44. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455(7209):64–71.
 45. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007;17(3):118–26.
 46. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75(5):855–862.
 47. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10(12):1957–66.
 48. Lee Y, Jeon K, Lee J, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;21(17):4663–70.
 49. Han J, Lee Y, Yeom K, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016–27.
 50. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415–9.

51. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004;10(2):185–91.
52. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15(20):2654–9.
53. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007;23:175–205.
54. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293–6.
55. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006;6(4):259–69.
56. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(11):4034–9.
57. Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp P a. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 2006;21(4):533–42.
58. Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol. Cell* 2006;22(4):553–60.
59. Lotterman CD, Kent O a., Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 2008;7(16):2493–9.
60. Tong a W, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther.* 2008;15(6):341–55.
61. Calin G a, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu C-G, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(13):5166–71.
62. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C-G, 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(39):13944–9.
63. 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(7043):828–33.
 64. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008;133(2):217–22.
 65. Liu C-G, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(26):9740–4.
 66. Iorio M V, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin G a, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065–70.
 67. Bautista S, Vallès H, Walker RL, Anzick S, Zeillinger R, Meltzer P, Theillet C. In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin. Cancer Res.* 1998;4(12):2925–9.
 68. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res.* 2001;61(3):903–7.
 69. Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(21):8191–201.
 70. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2008;283(2):1026–33.

71. Lu J, Getz G, Miska E a, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando A a, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834–8.
72. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 2007;120(5):1046–54.
73. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu C-G, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama* 2007;297(17):1901–8.
74. Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e24.
75. Fluiter K. In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(3):953–962.
76. Michael MZ, O’ Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003;1(12):882–91.
77. Haferlach T, Kohlmann a, Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Kern W. Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukaemia. *Br. J. Cancer* 2007;96(4):535–40.
78. Dunphy CH. Gene expression profiling data in lymphoma and leukemia: review of the literature and extrapolation of pertinent clinical applications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006;130(4):483–520.
79. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson R a, Golub TR, Rowley JD, Chen J. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(50):19971–6.

80. 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. *Advances in Brief* 2004;3753–3756.
81. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu C-G, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9(3):189–98.
82. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J. Biol. Chem.* 2007;282(2):1479–86.
83. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 2011;44(5):839–47.
84. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W741–8.
85. Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol.* 2013;6(5):575–83.
86. Griseri P, Pagès G. Regulation of the mRNA half-life in breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* 2014;5(3):323–34.
87. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009;137(6):1032–46.
88. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011;378(9801):1461–84.

89. Mook S, Van 't Veer LJ, Rutgers EJ, Ravdin PM, van de Velde AO, van Leeuwen FE, Visser O, Schmidt MK. Independent prognostic value of screen detection in invasive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011;103(7):585–97.
90. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med.* 2006;27(4):299–402.
91. McDonnell DP, Norris JD. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002;296(5573):1642–4.
92. Jensen E V, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(6):1980–9.
93. Skandalis SS, Afratis N, Smirlaki G, Nikitovic D, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2014;35:182–93.
94. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 2001;81(4):1535–65.
95. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* 2003;107(6):873–7.
96. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 2012;38(6):698–707.
97. Miller TW, Pérez-Torres M, Narasanna A, Guix M, Stål O, Pérez-Tenorio G, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB, Kennedy JP, Lindsley CW, Arteaga CL. Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69(10):4192–201.
98. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong H-M, Bauerfeind I, Felber M, Wang H-J, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone

- receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003;95(2):142–53.
99. Giuliano M, Trivedi M V, Schiff R. Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(4):256–62.
 100. Tsonis AI, Afratis N, Gialeli C, Ellina M-I, Piperigkou Z, Skandalis SS, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Evaluation of the coordinated actions of estrogen receptors with epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor in the expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and cell motility in breast cancer cells. *FEBS J.* 2013;280(10):2248–59.
 101. Pietras RJ. Interactions Between Estrogen and Growth Factor Receptors in Human Breast Cancers and the Tumor-Associated Vasculature. *Breast J.* 2003;9(5):361–373.
 102. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009;74(7):622–7.
 103. Nicholson RI, Johnston SR. Endocrine therapy--current benefits and limitations. *Breast Cancer Res. Treat.* 2005;93 Suppl 1:S3–10.

8. EKLER

Ek 1 Trastuzumab ve Tamoxifen belirlenen doz uygulamaları sonucunda elde edilen absorbens değerleri

Çizelge 8.1. SK-BR-3 hücrelerinin 72 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorbens değerleri

Blank	HK	300 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml	0,1 µg/ml	0,05 µg/ml	
0,163	2,482	1,354	1,183	1,476	1,226	1,370	2,038	2,302	İlaç
0,158	2,483	1,294	1,200	1,350	1,245	1,428	1,584	2,011	İlaç
0,160	2,595	1,364	1,246	1,342	1,171	1,543	1,520	2,233	İlaç
0,163	2,516	2,076	2,230	2,142	2,530	2,329	2,344	1,747	PBS
0,157	2,527	2,342	2,376	2,374	2,389	2,232	2,282	1,801	PBS
0,155	2,448	2,351	2,346	2,227	2,359	2,286	2,374	1,865	PBS

Çizelge 8.2. SK-BR-3 hücrelerinin 144 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorbens değerleri

Blank	HK	300 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	2 µg/ml	0.5 µg/ml	0.1 µg/ml	0.05 µg/ml	
0,282	2,587	1,166	1,004	1,025	0,784	0,932	0,882	2,053	İlaç
0,277	2,650	0,998	0,922	1,190	0,854	0,985	0,963	2,160	İlaç
0,216	2,687	1,116	1,005	1,250	0,841	1,038	0,870	2,124	İlaç
0,135	2,679	2,466	2,409	2,488	2,370	2,159	2,526	2,404	PBS
0,125	2,560	2,405	2,518	2,311	2,397	2,325	2,433	2,463	PBS
0,124	2,358	2,439	2,446	2,148	2,296	2,309	2,583	2,612	PBS

Çizelge 8.3.BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorbens değerleri

Blank	HK	300 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml	0,1 µg/ml	0,05 µg/ml	
0,134	0,729	0,362	0,351	0,363	0,356	0,420	0,421	0,629	İlaç
0,137	0,775	0,432	0,361	0,370	0,361	0,412	0,420	0,631	İlaç
0,130	0,778	0,423	0,395	0,377	0,380	0,433	0,425	0,740	İlaç
0,109	0,592	0,720	0,644	0,680	0,661	0,633	0,720	0,811	PBS
0,109	0,589	0,742	0,669	0,673	0,649	0,648	0,740	0,686	PBS
0,108	0,585	0,705	0,671	0,697	0,660	0,615	0,665	0,785	PBS

Çizelge 8.4. BT474 hücrelerinin 144 saat boyunca Trastuzumab ile muamelesi sonrası elde edilen yeni absorbens değerleri

Blank	HK	300 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml	0,1 µg/ml	0,05 µg/ml	
0,148	0,833	0,360	0,318	0,342	0,326	0,348	0,328	0,614	İlaç
0,145	0,913	0,384	0,341	0,363	0,362	0,330	0,361	0,665	İlaç
0,142	0,918	0,365	0,378	0,390	0,357	0,381	0,347	0,598	İlaç
0,137	0,827	0,759	0,861	0,844	0,834	0,886	0,874	0,706	PBS
0,140	0,838	0,753	0,897	0,834	0,848	0,935	0,830	0,796	PBS
0,135	0,903	0,790	0,827	0,866	0,803	0,799	0,794	0,724	PBS

Çizelge 8.5. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrası elde edilen absorbens değerleri

Blank	HK	40 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,50 µg/ml	0,25 µg/ml	
0,302	1,951	1,110	1,068	1,389	1,430	1,617	1,521	1,644	1,628	İlaç
0,290	2,053	1,003	1,154	1,408	1,674	1,784	1,566	1,679	1,686	İlaç
0,282	1,981	0,934	1,115	1,595	1,393	1,741	1,589	1,719	1,708	İlaç
0,347	1,953	1,494	1,565	1,774	1,593	1,660	0,139	1,694	1,626	DMSO
0,328	1,911	1,495	1,710	1,682	1,576	1,558	0,135	1,643	1,589	DMSO
0,384	2,026	1,712	1,902	1,866	1,824	1,830	0,132	1,585	1,509	DMSO

Çizelge 8.6. MCF7 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrasında elde edilen yeni absorbands değerleri

Blank	HK	1 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	
0,299	1,151	1,085	1,077	1,109	1,080	0,938	0,339	0,305	0,301	İlaç
0,275	1,176	1,158	1,162	1,124	1,082	0,890	0,330	0,286	0,280	İlaç
0,277	1,267	1,207	1,217	1,137	1,084	0,887	0,301	0,283	0,282	İlaç
0,288	1,217	0,971	0,921	0,921	0,950	0,775	0,715	1,019	0,914	EtOH
0,272	1,116	0,977	0,880	0,873	0,821	0,876	0,747	1,012	0,787	EtOH
0,273	1,112	0,954	0,855	0,906	0,737	0,728	0,700	1,131	0,785	EtOH

Çizelge 8.7. BT474 hücrelerinin 72 saat boyunca tamoxifen ile muamelesi sonrası elde edilen absorbands değerleri

Blank	HK	0,25 µg/ml	0,50 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	
0,149	0,726	0,747	0,660	0,593	0,509	0,396	0,360	0,164	0,162	İlaç
0,149	0,737	0,715	0,636	0,518	0,536	0,371	0,332	0,158	0,165	İlaç
0,141	0,765	0,751	0,697	0,771	0,699	0,477	0,393	0,173	0,168	İlaç
0,147	0,790	0,563	0,626	0,615	0,533	0,584	0,707	0,416	0,475	EtOH
0,146	0,771	0,721	0,528	0,486	0,590	0,477	0,422	0,457	0,477	EtOH
0,145	0,777	0,669	0,514	0,487	0,582	0,455	0,508	0,408	0,483	EtOH

Ek 2 SK-BR-3 trastuzumab duyarlı 1,5 kat ve üzeri ifade değışikliği gösteren miRNA'lar

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-373*	-3,42
hsa-miR-33b	-3,19
hsa-miR-328	-2,88
hsa-miR-129*	-2,87
hsa-miR-135b	-2,75
hsa-miR-7-2*	-2,64
hsa-miR-500a	-2,61
hsa-miR-4302	-2,55
hsa-miR-34a*	-2,49
hsa-miR-224	-2,33
hsa-miR-22*	-2,28
hsa-miR-301b	-2,25
hsa-miR-301a	-2,21
hsa-miR-590-5p	-2,16
hsa-miR-490-3p	-2,16
hsa-miR-32	-2,10
hsa-miR-31	-2,07
hsa-miR-374a*	-2,01
hsa-miR-148a	-2,00
hsa-miR-770-5p	2,13
hsa-miR-324-5p	-1,99
hsa-miR-362-5p	-1,97
hsa-miR-335*	-1,97
hsa-miR-378*	-1,96
hsa-miR-30a*	-1,92
hsa-miR-107	-1,91
hsa-miR-18a	-1,89
hsa-miR-31*	-1,88
hsa-miR-29a*	-1,8
hsa-miR-96	-1,84
hsa-miR-548d-5p	-1,84
hsa-miR-1247	-1,83
hsa-miR-4286	-1,83
hsa-miR-148b	-1,83
hsa-miR-129-3p	-1,83
hsa-miR-128	-1,82
hsa-let-7i*	-1,82
hsa-miR-20a*	-1,81
hsa-miR-29c*	-1,81
hsa-miR-345	-1,78
hsa-miR-720	-1,78
hsa-miR-532-5p	-1,76
hsa-miR-450a	-1,75
hsa-miR-637	-1,75

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-28-5p	-1,75
hsa-miR-362-3p	-1,74
hsa-miR-130b	-1,74
hsa-miR-30e*	-1,74
hsa-miR-22	-1,74
hsa-miR-141	-1,72
hsa-miR-33a	-1,72
hsa-miR-188-5p	-1,72
hsa-miR-424	-1,70
hsa-miR-454	-1,69
hsa-miR-126	-1,69
hsa-miR-4289	-1,68
hsa-miR-340	-1,68
hsa-miR-1260	-1,67
hsa-miR-3907	-1,67
hsa-miR-16-2*	-1,67
hsa-miR-576-5p	-1,66
hsa-miR-28-3p	-1,65
hsa-miR-24-2*	-1,65
hsa-miR-101	-1,64
hsa-miR-149	-1,64
hsa-miR-34a	-1,64
hsa-miR-324-3p	-1,64
hsa-miR-29b	-1,63
hsa-miR-1307	-1,63
hsa-miR-1280	-1,61
hsa-miR-361-5p	-1,59
hsa-miR-20b	-1,58
hsa-miR-660	-1,58
hsa-miR-130a	-1,58
hsa-miR-99b	-1,58
hsa-miR-185	-1,57
hsa-miR-425	-1,57
hsa-miR-205	-1,56
hsa-miR-98	-1,56
hsa-miR-103a	-1,56
hsa-miR-30e	-1,56
hsa-miR-130b*	-1,55
hsa-miR-422a	-1,55
hsa-miR-9	-1,54
hsa-miR-365	-1,54
hsa-miR-19a	-1,52
hsa-miR-141*	-1,52
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,52
hsa-miR-16	-1,52
hsa-miR-532-3p	-1,52

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-186	-1,52
hsa-miR-20a	-1,52
hsa-miR-219-5p	-1,51
hsa-miR-15a	-1,50
hsa-miR-106b	-1,50
hsa-miR-106b*	1,52
hsa-miR-1248	1,56
hsa-miR-193b	1,57
hsa-miR-188-3p	1,61
hsa-miR-3176	1,68
hsa-miR-770-5p	2,13

Ek 3 BT474 trastuzumab duyarlı 1,5 kat ve üzeri ifade değışikliğı gösteren miRNA'lar

miRNA ID	Kat değışimi
hsa-miR 373*	-4,02
hsa-miR-720	-3,83
hsa-miR-7	-3,26
hsa-miR-425	-2,65
hsa-miR-16-2*	-2,64
hsa-miR-34a*	-2,60
hsa-miR-1287	-2,54
hsa-miR-33b	-2,53
hsa-miR-1260	-2,51
hsa-miR-141*	-2,49
hsa-miR-4286	-2,47
hsa-miR-502-5p	-2,38
hsa-miR-18a	-2,34
hsa-miR-3676	-2,27
hsa-miR-142-3p	-2,25
hsa-miR-1280	-2,24
hsa-miR-500a	-2,24
hsa-miR-596	-2,21
hsa-miR-362-5p	-2,17
hsa-miR-224	-2,15
hsa-miR-4289	-2,13
hsa-miR-106b	-2,11
hsa-miR-7-1*	-2,08
hsa-miR-31	-2,04
hsa-miR-454*	-2,02
hsa-miR-32	-2,01
hsa-miR-188-5p	-2,01
hsa-miR-200c*	-2,01
hsa-miR-193a-3p	-2,01
hsa-miR-301a	-2,00
hsa-let-7i*	-1,93
hsa-miR-107	-1,91
hsa-miR-590-5p	-1,90
hsa-miR-15a*	-1,90
hsa-miR-3065-5p	-1,89
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,89
hsa-miR-330-5p	-1,89
hsa-miR-190b	-1,86
hsa-miR-200a	-1,86
hsa-miR-20a	-1,85
hsa-miR-93	-1,84
hsa-miR-15b*	-1,84
hsa-miR-362-3p	-1,84
hsa-miR-15a	-1,82

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-96	-1,82
hsa-miR-425*	-1,81
hsa-miR-429	-1,80
hsa-miR-22	-1,79
hsa-miR-183*	-1,79
hsa-miR-301b	-1,79
hsa-miR-17*	-1,77
hsa-let-7f-2*	-1,77
hsa-miR-34a	-1,77
hsa-miR-618	-1,76
hsa-miR-130b	-1,75
hsa-miR-4301	-1,74
hsa-miR-210	-1,74
hsa-miR-484	-1,74
hsa-miR-532-5p	-1,72
hsa-miR-660	-1,72
hsa-miR-454	-1,71
hsa-miR-1258	-1,70
hsa-miR-345	-1,70
hsa-miR-195	-1,69
hsa-miR-21*	-1,68
hsa-miR-330-3p	-1,68
hsa-miR-191*	-1,68
hsa-miR-20b	-1,67
hsa-miR-24-2*	-1,67
hsa-miR-629	-1,65
hsa-miR-490-3p	-1,64
hsa-miR-340	-1,64
hsa-miR-502-3p	-1,63
hsa-miR-497	-1,63
hsa-miR-708	-1,63
hsa-miR-29c*	-1,62
hsa-miR-99b	-1,61
hsa-miR-16	-1,60
hsa-miR-22*	-1,60
hsa-miR-3130-5p	-1,59
hsa-miR-342-3p	-1,59
hsa-miR-128	-1,58
hsa-miR-887	-1,58
hsa-miR-501-5p	-1,58
hsa-miR-98	-1,57
hsa-miR-326	-1,57
hsa-miR-18a*	-1,56
hsa-miR-3200-3p	-1,56
hsa-miR-1301	-1,55
hsa-miR-182*	-1,55

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-200a*	-1,55
hsa-miR-590-3p	-1,55
hsa-miR-1233	-1,54
hsa-miR-141	-1,54
hsa-miR-340*	-1,54
hsa-miR-93*	-1,53
hsa-let-7a*	-1,53
hsa-miR-140-3p	-1,52
hsa-miR-653	-1,52
hsa-miR-324-5p	-1,51
hsa-miR-103a	-1,51
hsa-miR-365	-1,51
hsa-miR-378*	-1,50
hsa-miR-770-5p	1,66
hsa-miR-1248	1,87
hsa-miR-1291	2,56

Ek 4 BT474 tamoxifen duyarlı 1,5 kat ve üzeri ifade değışikliğı gösteren miRNA'lar

miRNA ID	Kat Değışimi
hsa-miR-7-2*	-2,99
hsa-miR-489	-2,92
hsa-miR-653	-2,80
hsa-miR-7	-2,78
hsa-miR-708	-2,74
hsa-miR-20a*	-2,54
hsa-miR-1180	-2,49
hsa-miR-31	-2,42
hsa-miR-490-3p	-2,42
hsa-miR-335*	-2,41
hsa-miR-93*	-2,28
hsa-miR-454*	-2,17
hsa-miR-328	-2,14
hsa-miR-190b	-2,07
hsa-miR-20b	-2,06
hsa-miR-106b*	-2,06
hsa-miR-499-5p	-2,05
hsa-miR-637	-2,04
hsa-miR-200b*	-1,97
hsa-miR-1307	-1,93
hsa-miR-10b	-1,93
hsa-miR-92a	-1,92
hsa-miR-21*	-1,89
hsa-miR-17*	-1,87
hsa-miR-18a	-1,82
hsa-miR-20a	-1,82
hsa-miR-23c	-1,81
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	-1,78
hsa-miR-19a	-1,77
hsa-miR-3676	-1,76
hsa-miR-652	-1,76
hsa-miR-19b	-1,6
hsa-miR-93	-1,73
hsa-miR-99b	-1,72
hsa-miR-32	-1,71
hsa-miR-340*	-1,71
hsa-miR-4301	-1,70
hsa-miR-33a	-1,69
hsa-miR-23b	-1,68
hsa-miR-30a*	-1,66
hsa-miR-625*	-1,65
hsa-miR-196a	-1,62
hsa-miR-15b	-1,62
hsa-miR-29c*	-1,62
hsa-miR-1281	-1,62

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-378*	-1,62
hsa-miR-200a	-1,60
hsa-miR-24-2*	-1,59
hsa-miR-106b	-1,59
hsa-miR-373*	-1,59
hsa-miR-25	-1,59
hsa-miR-326	-1,58
hsa-miR-27b	-1,58
hsa-miR-501-5p	-1,57
hsa-miR-374a*	-1,57
hsa-miR-224	-1,56
hsa-miR-205	-1,54
hsa-miR-451	-1,53
hsa-miR-769-5p	-1,53
hsa-miR-301b	-1,53
hsa-miR-590-5p	-1,52
hsa-miR-183*	-1,52
hsa-miR-193b	-1,52
hsa-let-7f-2*	-1,51
hsa-let-7i*	-1,51
hsa-miR-542-3p	-1,50
hsa-miR-193a-3p	1,54

Ek 5 MCF7 tamoxifen duyarlı 1,5 kat ve üzeri ifade değışikliğı gösteren miRNA'lar

miRNA ID	Kat Değışimi
hsa-let-7d*	-6,40
hsa-miR-628-3p	-6,08
hsa-miR-1281	-4,17
hsa-miR-188-3p	-3,82
hsa-miR-532-3p	-3,17
hsa-miR-18b	-3,01
hsa-miR-502-5p	-2,84
hsa-miR-188-5p	-2,79
hsa-miR-100	-2,62
hsa-miR-637	-2,58
hsa-miR-1260	-2,22
hsa-miR-218	-2,16
hsa-miR-421	-2,12
hsa-miR-9*	-2,09
hsa-miR-7	-1,98
hsa-miR-1280	-1,98
hsa-miR-885-5p	-1,98
hsa-miR-596	-1,95
hsa-miR-181d	-1,95
hsa-miR-140-5p	-1,90
hsa-miR-93*	-1,89
hsa-miR-200b*	-1,86
hsa-miR-7-2*	-1,84
hsa-miR-370	-1,82
hsa-miR-590-3p	-1,79
hsa-miR-126*	-1,76
hsa-miR-375	-1,72
hsa-miR-99b	-1,72
hsa-miR-625*	-1,67
hsa-miR-151-3p	-1,68
hsa-miR-1247	-1,65
hsa-miR-374a	-1,65
hsa-miR-335*	-1,63
hsa-miR-1248	-1,63
hsa-miR-340*	-1,61
hsa-miR-328	-1,61
hsa-miR-744	-1,59
hsa-miR-9	-1,54
hsa-miR-30e*	-1,54
hsa-miR-490-3p	-1,53
hsa-miR-30a*	-1,53
hsa-miR-30c	-1,53
hsa-miR-28-3p	-1,52
hsa-miR-26b	-1,49
hsa-miR-190	-1,49

miRNA ID	Kat Değişimi
hsa-miR-373*	-1,49
hsa-miR-205	1,51
hsa-miR-374c	1,53
hsa-let-7i	1,53
hsa-miR-200b	1,53
hsa-miR-19a	1,57
hsa-miR-15a	1,58
hsa-let-7i*	1,63
hsa-miR-16-2*	1,65
hsa-miR-22	1,68
hsa-miR-96	1,74
hsa-miR-17 hsa-miR-106a	1,78
hsa-miR-770-5p	1,81
hsa-miR-664*	1,92
hsa-miR-148a	1,96
hsa-miR-32	2,21
hsa-miR-497	2,30
hsa-miR-33a	2,46
hsa-miR-3200-5p	4,19
hsa-miR-3907	7,68

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Senem Noyan

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 25.09.1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Çankaya Anadolu Lisesi - Almanca (2002)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2007)

İş Tecrübesi

Kurumu: Damagen Genetik Tanı Merkezi (2010 -)
Ay-Ka Ltd. Şti. (2007-2010)

Görevi: Laboratuvar Sorumlusu (2010 -)
Uygulama uzmanı (2007-2010)

Yayınlar

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Senem Noyan, Ezel Cilek, Bala Gur Dedeoglu. “Revealing the trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer cell lines by qPCR-based array”, *3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, İzmir, 2014, Poster sunumu

Ezel Cilek, **Senem Noyan**, Bala Gur Dedeoglu. “Identification of trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer by integration of two high-throughput Technologies” *EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology 08 - 11 November 2014* Heidelberg, 2014, Poster sunumu

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Senem Noyan, Ezel Cilek, Bala Gur Dedeoglu. “Revealing the trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer cell lines by qPCR-based array”, *3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, İzmir, 2014, Poster sunumu

Ezel Cilek, **Senem Noyan**, Bala Gur Dedeoglu. “Identification of trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer by integration of two high-throughput Technologies” *EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology 08 - 11 November 2014* Heidelberg, 2014, Poster sunumu

P113. Revealing the trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer cell lines by qPCR-based array

Senem Noyan^{1*}, Ezel Çilek¹, Bala Gür Dedeoğlu¹

¹Ankara University Biotechnology Institute

**These authors are equally contributed, senemnoyan@gmail.com*

Abstract

Breast cancer is the most frequently diagnosed life-threatening cancer in women and leading cause of cancer death [1]. Small noncoding microRNAs (miRNA) regulate the expression of target mRNAs by repressing their translation or orchestrating their sequence-specific degradation. According to various studies over past decade, miRNAs are an important and prevalent regulatory layer of gene expression that acts at the post-transcriptional level and have also been implicated to be in common diseases, including cancer [2,3]. Trastuzumab is monoclonal antibody directed against the HER2 tyrosine kinase receptor, which is overexpressed in approximately 25% of invasive breast cancers [4,5]. In this study, we investigated miRNA and miRNA target gene expression patterns in HER2(+) breast cancer to identify trastuzumab responsive candidate biomarkers. Our hypothesis is that there may be a common and stable miRNA response to trastuzumab treatment in HER2(+) breast cancer cells, from which we can extract the information of trastuzumab effectiveness via miRNAs. We used Qiagen miScript miRNA PCR Arrays to identify differentially expressed miRNAs that were regulated by trastuzumab in BT474 and SKBR3 cell lines and then used miRWalk to find validated target genes. Consequently, pathway analyses predicted that these miRNAs would regulate well-described cancer-associated signaling pathways, such as PI3K/Akt, p53 pathways.

Keywords: Breast cancer, miRNA, Trastuzumab, qPCR-based array

[1] Ganesh N. Sharma, Rahul Dave, Jyotsana Sanadya, Piush Sharma, K.K.Sharma, Various types and management of breast cancer: an overview, *J Adv Pharm Technol Res.* 2010 Apr;1(2):109-26.

[2] Ambros V, The functions of animal microRNAs, *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5

[3] Ventura A, Jacks T., MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way, *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):586-91.

[4] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

[5] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12)