



**T.C.  
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE UZUN KODLAMAYAN RNA  
FAM83H-AS1'İN PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**SERCAN KAPANCIK**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**SIVAS-2020**

**T.C.  
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE UZUN KODLAMAYAN RNA  
FAM83H-AS1'İN PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**SERCAN KAPANCIK**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR.V. KENAN ÇELİK**

**SİVAS-2020**

**“Meme Kanserinde Uzun Kodlamayan RNA FAM83H-AS1’in Proliferasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi”** adlı **Doktora** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyokimya Ana Bilim Dalında Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

(Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜDÜRÜ**

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-830).

**ÖZET**  
**MEME KANSERİNDE UZUN KODLAMAYAN RNA FAM83H-AS1'İN**  
**PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**SERCAN KAPANCIK**

**Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. V. Kenan ÇELİK**

**2020, 95 sayfa**

Meme kanseri, insidans ve prognoz açısından farklılık gösteren, farklı alt tipleri kapsayan, dünyada ve ülkemizde kadınlar arasında en fazla rastlanılan ve en sık ölümle sonuçlanan heterojen bir hastalıktır.

İnsan genom projesinin tamamlanmasının ardından, insan DNA'sının çoğunun protein kodlayan mesajcı RNA (mRNA) yerine kodlamayan RNA'lara (ncRNA) transkribe olduğu ortaya çıkmıştır. Kodlamayan RNA sınıfı olan uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) işlevinin deşifre edilmesi, son yıllarda ortaya çıkan yeni bir araştırma alanıdır. LncRNA'lar kanser de dahil olmak üzere çeşitli patolojik hastalıklarda rol oynadığı bulunmuştur. LncRNA'lar hedef gen ekspresyonunu çeşitli mekanizmalar veya biyolojik moleküllerle etkileyebilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda meme kanserinde yüksek düzeyde eksprese edilen lncRNA FAM83H-AS1'in tümör süpresör genler ve onkogenler üzerinde etkilerinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanıldı. Dizayn edilen FAM83H-AS1-siRNA havuzunun transfekste edildiği hücreler (Grup 2) ile negatif kontrol siRNA'sının (Grup1) transfekste edildiği hücrelerden cDNA sentezlendi. Onkogenler ve tümör süpresör genler ile ilişkili proliferasyon genlerinin ifade edilme profilleri real-time PCR ile belirlendi. Proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri belirlendikten sonra, iki grup arasında bu genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar belirlendi. Ayrıca MCF-7 hücre hattında her iki grup için 72 saatlik inkübasyonun ardından XTT hücre canlılığı analizleri yapıldı.

Tümör süpresör genler olan BAX, FOXD3, MLH1, RUNX3 ve SERPINB5'in, grup 1'e göre kıyaslandığında grup 2'de ekspresyonları anlamlı

olarak arttı ( $p<0,05$ ). MYCN ve REL onkogenlerinin grup 1'e göre kıyaslandığında grup 2'de ekspresyonları anlamlı olarak azaldı ( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak, lncRNA FAM83H-AS1 tümör süpresör ve onkogenlerin ekspresyon düzeylerini etkileyerek, proliferasyonu arttırdığı meme kanserinin oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olduğu söylenebilir.



**ABSTRACT**  
**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LONG NON CODING RNA**  
**FAM83H-AS1 ON PROLIFERATION IN BREAST CANCER**

**SERCAN KAPANCIK**

**PhD Thesis, Department of Biochemistry**

**Adviser: Prof. Dr. V. Kenan ÇELİK**

**2020, 95 pages**

Breast cancer, is a heterogeneous disease which is the most common cause of death among women in our country and in the World, that shows the index of incidence and prognosis, with different subtypes,

Upon completion of the human genome project, it turns out that most of the human DNA is transcribed into non-coding RNAs (ncRNA) instead of the protein-encoding messenger RNA (mRNA).

Revealing the function of long non-coding RNAs (lncRNA), the class of non-coding RNAs, is a recently emerging area of research. It was found that, LncRNAs play a role in a variety of pathological diseases, including cancer.

LncRNAs can affect target gene expression by several mechanisms or biological molecules. Therefore, in our study, it was aimed to investigate whether the lncRNA FAM83H-AS1, which is highly expressed in breast cancer, has effects on tumor suppressor genes and oncogenes or not.

The breast cancer cell line MCF-7 was used in our study. cDNA was synthesized from the designed siRNA-FAM83H-AS1 transfected cells (Group 2) and transfected cells of the negative control siRNA (Group1) .

The expression of proliferation genes, which are related with oncogenes and tumor suppressor genes, was determined by real-time PCR. After determining the expression levels of proliferation related genes, the differences of expression levels between two groups were compared. Furthermore, XTT cell viability test was performed for both groups on MCF-7 cell line.

Expression of tumor suppressor genes BAX, FOXD3, MLH1, RUNX3 and SERPINB5 were significantly increased in group 2 when compared to group 1

( $p < 0.05$ ). When MYCN and REL oncogenes were compared to group 1, their expressions in group 2 decreased significantly ( $p < 0.05$ ).

As a result, it can be concluded that the lncRNA FAM83H-AS1 is effective in formation and progression of breast cancer by affecting the expression levels of oncogenes and tumor suppressor genes.



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının belirlenmesi, uygulanması, yazımı aşamalarında bana yol gösteren, katkı sağlayan ve her şekilde desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. V. Kenan ÇELİK'e teşekkür eder ve derin minnetimi sunarım.

Çalışmanın her aşamasında yardımcı olan, desteğiyle her daim bana güç veren ve hiç yalnız bırakmayan, enerjisiyle beni ayağa kaldıran ve hayata tutunmamı sağlayan canım eşim Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe Naime GEDİK KAPANCIK'a teşekkür ederim. Çalışmamda gerek tez konusunda gerekse manevi olarak bana destek olan ağabeyim Arş. Gör. Serkan KAPANCIK'a teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi. Ceylan HEPOKUR'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde emeği geçen Prof. Dr. Sevtap Bakır, Prof. Dr. Hatice PINARBAŞI ve Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda gerek faal gerekse manevi olarak katkılarda bulunan İstanbul Okan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Gülden BURÇAK ve Dr. Öğr. Üyesi Hadi KARİMKHANI'ye teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda bana destek olan tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu süreçte hep yanımda olan, beni yetiştirip bu günlere getiren, canım anneme ve şu anda yanımda olamayan ama yine de beni izlediğini düşündüğüm canım babama teşekkür ederim.

“Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından T-830 proje numarası ile desteklenmiştir”. Verdikleri destekten dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) birimine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi .....	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1 KANSER .....	5
2.2 MEME KANSERİ .....	6
2.2.1 Tanım .....	6
2.2.2 Epidemiyoloji.....	6
2.2.3 Meme Kanserinde Biyobelirteçler .....	7
2.2.4. Meme kanserinin sınıflandırılması.....	8
2.2.4.1. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması.....	8
2.2.4.2. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması.....	9
2.2.4.2.1.Luminal A Tip .....	10
2.2.4.2.2. Luminal B Tip.....	11
2.2.4.2.3. HER2 Pozitif Tip .....	11
2.2.4.2.4. Bazal Tip ve/veya Triple Negatif Tip.....	11
2.2.4.2.5. Claudin-low .....	12
2.2.5. Meme Kanserinde Yaygın Genetik Değişiklikler .....	12
2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ .....	14
2.3.1. G1 / S Fazının Hücre Döngüsü Molekülleri .....	15

2.4. TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER VE ONKOGENLER .....	16
2.5. KODLAMAYAN RNA'LAR (ncRNA).....	19
2.3.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNA) .....	21
2.3.1.1 Uzun Kodlamayan RNA'ların sınıflandırması .....	21
2.3.1.2. Uzun Kodlamayan RNA'ların Karakterizasyonu.....	22
2.3.1.4.Kanserde Uzun Kodlamayan RNA'lar .....	24
2.3.2. Onkogenik Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA FAM83H-AS1 (Onco- lncRNA-3).....	26
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	32
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	32
3.3. Meme kanseri Hücre Hattı.....	33
3.3.1 Meme Kanseri Hücre Hattının Çoğaltılması ve Pasajlanması .....	33
3.4 RNA İzolasyonu .....	34
3.4.1 MCF-7 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu .....	35
3.4.2 RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi .....	35
3.5 cDNA Sentezi .....	36
3.6 Gen İfadesi Analizi .....	36
3.6.1 Gen İfadelerinin Belirlenmesi .....	37
3.6.2 Gen İfadesi Verilerinin Analizi.....	37
3.7 siRNA Havuzu ile FAM83H-AS1'in Susturulması ve Susturma İşleminin Başarısının Ortaya Konulması.....	38
3.8 Onkogenler ve Tümör Supresör Genler RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Kit Aracılığıyla Proliferasyon ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Profillerinin Belirlenmesi .....	39
3.9 Proliferasyon düzeylerinin belirlenmesi .....	40
<b>4. İSTATİKSEL ANALİZ .....</b>	<b>41</b>

<b>5. BULGULAR</b> .....	<b>42</b>
5.1. FAM83H-AS1'in Susturma İşleminin Başarısının Kontrolü .....	42
5.2. FAM83H-AS1'in Susturulmasının Onkogen ve Tümör Süpresör Genler Üzerine Etkisi .....	45
5.3. FAM83H-AS1'in Susturulmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi .....	46
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>48</b>
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	<b>60</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>76</b>
<b>EK-1</b> .....	<b>78</b>
<b>ETİK KURUL KARARI</b> .....	<b>78</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1	2018 yılında kadın meme kanserlerinin yaşa göre standartize edilmiş, bölgeye özgü insidans ve mortalite oranları bar tablosu (GLOBOCAN, 2018)	1
Şekil 1. 2	Kadınlarda 2018'de en yaygın 10 kanserin insidans ve ölümlerinin dağılımı (GLOBOCAN, 2018)	2
Şekil 2. 1	PIP3. PI3K / AKT yolu. (Leslie & Downes, 2004)	18
Şekil 5. 1	FAM83H-AS1 gen amplifikasyonu örnek eğrileri.	42
Şekil 5. 2	GAPDH gen amplifikasyonu örnek eğrileri.	42
Şekil 5. 3	FAM83H-AS1'e ait örnek erime eğrileri.	43
Şekil 5. 4	GAPDH'a ait örnek erime eğrileri.	43
Şekil 5. 5	MCF-7 hücre hatlarında FAM83H-AS1 'in ifade edilme düzeyleri.	44
Şekil 5. 6	MCF-7 hücre hatlarında onkogen ve tümör süpresör genlerin ifade edilme düzeyleri.	45
Şekil 5. 7	FAM83H-AS1'in hücre proliferasyonu üzerine etkisi	47

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 3. 1</b> cDNA sentez reaksiyonu için reaksiyon karışımının hazırlanması	36
<b>Tablo 3. 2</b> Her bir örnek için PCR karışımı.....	37
<b>Tablo 3. 3</b> DNA amplifikasyonu koşulları .....	37
<b>Tablo 5. 1</b> Her bir örnek için genlerin ortalama Ct değerleri .....	44
<b>Tablo 5. 2</b> MCF-7 hücre hatlarında onkogen ve tümör süpresör genlerin ifade edilme kat regülasyonları. ....	46



## KISALTMALAR DİZİNİ

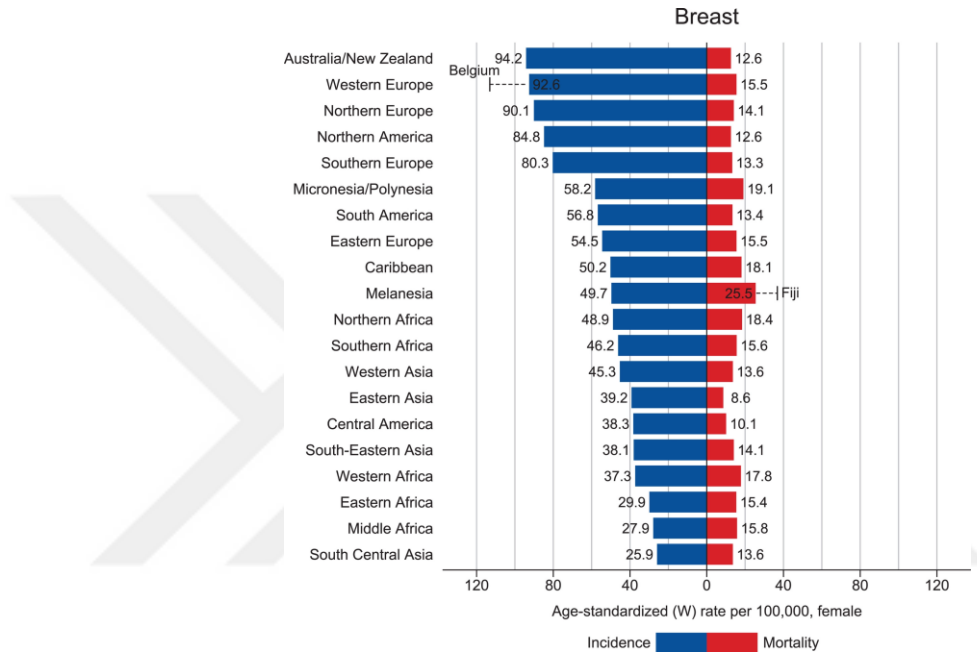
<b>AIB1</b>	Meme Kanserinde Amplifiye-1 Geni
<b>AML</b>	Akut Miyeloid Lösemi
<b>ANRIL</b>	INK4 Lokusundaki Antisens Kodlamayan RNA
<b>BRAF</b>	v-Raf Murin Sarkomu Viral Onkogen Homolog B
<b>BRCA</b>	İnvaziv Meme Karsinomu
<b>BRCA1</b>	Meme Kanseri Geni 1
<b>BRCA2</b>	Meme Kanseri Geni 2
<b>CASP8</b>	Kaspaz 8
<b>CCAT1</b>	Kolon Kanseri ile İlişkili Transkript 1
<b>CCND1</b>	Siklin D1
<b>CDK</b>	Serin / Treonin Sikline Bağımlı Kinaz
<b>CDKN1B</b>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B
<b>CRC</b>	Kolorektal Kanser
<b>DAPT</b>	Gamma-Sekretaz İnhibitörü
<b>DCIS</b>	Duktal Karsinom İn Situ
<b>EGR-1</b>	Büyüme Yanıtı Proteini 1
<b>EMT</b>	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
<b>ER</b>	Östrojen Reseptör
<b>ERK</b>	Ektraselüler Sinyal İlişkili Kinaz
<b>ESR1</b>	Östrojen Reseptör 1
<b>EZH2</b>	Zeste Homolog 2'nin Arttırıcısı
<b>GPCR</b>	G Proteini Bağlı Reseptör
<b>HCC</b>	Hepatosellüler Karsinom
<b>HER2</b>	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2
<b>IHC</b>	İmmünohistokimyasal Boyama
<b>LCAL7</b>	Akciğer Kanseri ile İlişkili Uzun Kodlamayan RNA 7
<b>LCIS</b>	Lobüler Karsinom İn Situ
<b>LncRNA</b>	Uzun Kodlamayan RNA
<b>LUAD</b>	Akciğer Adenokarsinomu
<b>LULC</b>	Akciğer Büyük Hücreli Karsinom
<b>LUSC</b>	Akciğer Yassı Epitel Hücreli Karsinom

<b>MAP3K1</b>	Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz 1
<b>MEG3</b>	Maternal Olarak Eksprese Edilen Gen 3
<b>MMP-9</b>	Matris Metallopeptidaz 9
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>NCOR1</b>	Nükleer Reseptör Korepresör 1
<b>ncRNA</b>	Kodlamayan RNA
<b>NST</b>	Özel Olmayan Tip
<b>ORF</b>	Açık Okuma Kesitleri
<b>PDA</b>	Pankreas Adenokarsinom Duktal Tip
<b>PGR</b>	Progesteron Reseptör
<b>PI3-kinaz</b>	Fosfoinozitol 3-Kinazın
<b>PIK3CA</b>	Fosfoinozitol 4,5-Bisfosfat 3-Kinaz
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfat
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol 3,4,5 Trifosfat
<b>PPAR- <math>\gamma</math></b>	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilmiş Reseptör $\gamma$
<b>PR</b>	Progesteron Reseptör
<b>PRC2</b>	Polycomb Baskılayıcı Kompleksi 2
<b>PTEN</b>	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
<b>RB</b>	Retinoblastom Tümör Baskılayıcı Protein
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	Ribozomal RNA
<b>SOC</b>	Over Kanseri
<b>SRA</b>	Steroid Reseptör Aktivatörü
<b>ST</b>	Özel Alt Tip
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>TNBC</b>	Triple- Negatif/ Bazal Benzeri Meme Kanseri
<b>TP53</b>	Tümör Proteini p53
<b>tRNA</b>	Transfer RNA
<b>TSS</b>	Transkripsiyon Başlangıç Bölgesi
<b>VEGF</b>	Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü

# 1. GİRİŞ

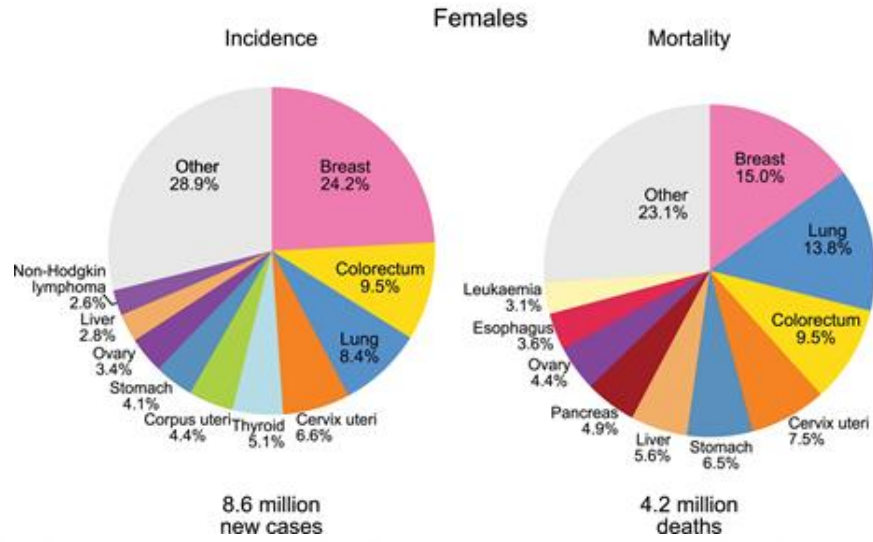
## 1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yapılan küresel kanser projesinin (GLOBOCAN, 2018) meme kanseri insidansı ve mortalite tahminlerine göre, kadınlarda en sık teşhis edilen kanser olduğu ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olduğu belirtilmiştir. (Şekil 1.1) (Bray, ve diğerleri, 2018) .



**Şekil 1. 1** 2018 yılında kadın meme kanserlerinin yaşa göre standartize edilmiş, bölgeye özgü insidans ve mortalite oranları bar tablosu (GLOBOCAN, 2018)

Dünya çapında, 2018'de yeni teşhis edilen kadın meme kanseri vakalarının yaklaşık 2,1 milyon kişi olacağı ve kadınlar arasında neredeyse 4 kanser vakasından 1'inin meme kanseri olacağı tahmin edilmiştir. Meme kanserinin, 100'den fazla ülkede kanser ölüm nedenlerinin başında gelen ve ülkelerin büyük çoğunluğunda (185 ülkenin 154'ünde) en sık teşhis edilen kanser olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.2). 2018 yılında, dünyanın 5 bölgesinde (Amerika, Afrika, Avrupa, Asya ve Okyanusya) 2.088.849 yeni meme kanseri vakası ve meme kanseri nedeniyle 626.679 ölüm vakası olacağı belirtilmiştir (Bray, ve diğerleri, 2018) (GLOBOCAN, 2018).



**Şekil 1. 2** Kadınlarda 2018'de en yaygın 10 kanserin insidans ve ölümlerinin dağılımı (GLOBOCAN, 2018)

Avrupa Birliği ülkelerinde meme kanseri ölümlerinin sayısı 2002'de 17.9 / 100.000'den 2012'de 15.2 / 100.000'e düşmüş ve 2020 yılının sonunda 13.4 / 100.000'e azalacağı tahmin edilmektedir (Carioli, ve diğerleri, 2017). Bu düşüşteki en büyük etken, tedavi yöntemindeki ilerlemelerin yanı sıra daha sık tarama yapılmasıyla birlikte hastalığın erken teşhis edilmesidir (Carioli, ve diğerleri, 2017). Ayrıca postmenopozal kadınlarda hormon kullanımının kesilmesi de bu düşüşe yardımcı olmuştur (Bray, ve diğerleri, 2018). Güney Amerika, Afrika ve Asya gibi diğer bölgelerde ise meme kanseri görülme sıklığı halen artmaktadır (Bray, ve diğerleri, 2018).

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlar arasında en fazla rastlanılan ve en sık ölümlle sonuçlanan kanser türüdür. Meme kanserinin insidansı yaşa bağlı olarak artmaktadır, batı ülkelerinin birçoğunda ise meme kanseri insidansı artarken mortalite oranları azalmakta veya stabil kalmaktadır. Türkiye'de yaklaşık olarak her yıl 17.000 kadında meme kanseri görülmektedir ve meme kanserinin insidansı 100 binde 46,8 olarak bildirilmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2016).

Amerikan kanser topluluğunun 2020 yılı verilerine göre ABD'de kadınlarda tanı alan 276.480 yeni invaziv meme kanseri ve 48.530 duktal karsinom (DCIS) vakası olacağı öngörülmüştür ayrıca 2020 yılında yaklaşık

olarak 42.690 meme kanseri ölümü (42.170 kadın, 520 erkek) meydana geleceği tahmin edilmektedir (American Cancer Society, 2020). Meme kanserinin erken evrelerde teşhis ve tedavi edilmesi sağ kalım oranını arttırmaktadır. İnvaziv meme kanseri teşhisi alan kadınlar için 5 ila 10 yıl içindeki sağ kalım oranları sırasıyla %91 ve %84'tür. Olguların yüzde altmış ikisi lokalize bir aşamada (memeyle sınırlı, lenf düğümlerine yayılma yok) teşhis edilmektedir ve bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %99 olduğu belirtilmiştir (Brinton, Gaudet, & Gierach, 2018).

Ailede meme kanseri öyküsü, kalıtsal mutasyonlar (BRCA1, BRCA2 ve diğer meme kanseri ilişkili genler) ve genetik faktörler meme kanseri vakalarının sadece %5 ila %10'luk kısmını oluşturmaktadır (Bray, ve diğerleri, 2018). Meme kanserinde diğer risk faktörleri; menstrüasyondaki düzensizlikler (menarşta erken yaş, menopozda daha ileri yaş), üreme (nulliparite, ilk doğumda geç yaş ve daha az çocuk), ekzojen hormon alımı (oral kontraseptif kullanımı ve hormon replasman tedavisi), beslenme (alkol alımı) ve antropometri (yetişkinlikte kilo alımı ve vücut yağ oranı fazlalığı) olarak bildirilmektedir. Tüm bu risk faktörlerinin aksine emzirme ve fiziksel aktivitenin ise koruyucu faktörler olduğu belirtilmektedir. (Brinton, Gaudet, & Gierach, 2018)

## **1.2. Araştırmanın Amacı**

Tüm ölüm nedenlerine bakıldığında, kanserin hem erkeklerde hem de kadınlarda 2. sırada yer aldığı söylenebilir. Kanserden dolayı meydana gelen ölümleri azaltabilmek için yeni terapötik yöntemlerin bulunması büyük önem arz etmektedir. Ayrıca kansere ya da kanserin kötü prognozuna sebep olan genetik fonksiyonların belirlenmesi, gelecek adına yeni tedavi kombinasyonlarının geliştirilmesinde öncü çalışmalar olacaktır.

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturur. Malign meme tümörlerinin yaklaşık %75'i luminal tip grubunda bulunmaktadır. Bu nedenle luminal tip meme kanserinin gen fonksiyonlarının aydınlatılması, gelecekte modern biyolojide ve tıpta önemli gelişmelere yol açacaktır.

Luminal tip meme kanserinde uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) rolleri hakkında çok az bilgi vardır. Yapılan bir çalışmada Luminal tip meme kanseri dokusunda lncRNA FAM83H-AS1'in yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiş ve yeni bir biyobelirteç olabileceği öngörülmüştür (Song, Wei, Pei, & Zhenjun, 2018). Fakat, Luminal tip meme kanserinde, lncRNA FAM83H-AS1'in biyolojik rolü hala aydınlatılamamıştır. Bu tezden çıkan sonuçlar ile luminal tip meme kanserinde lncRNA FAM83H-AS1'in proliferasyondaki rolü belirlenecek ve böylelikle hastalığın biyolojisi hakkında FAM83H-AS1'in olası rolünün tespiti sağlanmış olacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 KANSER

Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz çoğalması olarak tanımlanabilir. Kanser hücreleri genellikle çevre dokuya yayılır veya kan ya da lenfatik sistem yoluyla uzak organlara metastaz yapar (Rusciano & Burger, 1992) (Fidler, 1989). Kanser hücreleri birçok doku ve organda ortaya çıkabilir (Baylin & Ohm, 2006). Erken teşhis ve tedavideki ilerlemelere rağmen, kanser halen araştırmalarda önceliğe sahip büyük bir sağlık sorunudur (Bray, Jemal, Grey, Ferlay, & Forman, 2012) (Bertucci, Finetti, & Birnbaum, 2012). Kanser oluşumunun ilk adımı genetik mutasyon olan “Başlatma” aşamasıdır. Genetik mutasyon sürecine neden olan veya bunu destekleyen “başlatıcılar”; hormonlar, kimyasallar, radyasyon, enfeksiyon ve hipoksiyi içerir (Weinberg, 1988) (Nelson, ve diğerleri, 2004). Genetik mutasyonlar RAS (Downward, 2003) ve MYC (Finver, ve diğerleri, 1988) gibi pro-onkogenik genlerde veya meme kanseri geni 1 (BRCA1), meme kanseri geni 2 (BRCA2) ve tümör protein p53 geni (TP53) (Friedenson, 2007) (Baker, Markowitz, Fearon, Willson, & Vogelstein, 1990) gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilir. Genel olarak, kanser çoklu genetik değişikliklerin ortaya çıkmasıyla gelişir (Devilee & Cornelisse, 1994) (Bieche & Lidereau, 1995). Mutasyona uğramış hücreler yavaşlamış bir fazda kalabilir veya proliferatif olabilirler. Kanser oluşumunun ikinci aşaması olan “Yükselme” aşaması, hiperplazi (hücre sayısında artış), displazi (hücrelerde fenotipik değişiklikler), in situ karsinom (erken evre kanser) ve son olarak invaziv karsinom (yayılmış çevre dokular) gibi adımları içerir (H. & S.L., 2000).

Bugüne kadar, kanser hücrelerinin anormal büyümelerini sürdürdükleri ve büyüme baskılayıcı mekanizmalardan kaçtıkları altı kanser belirtisi tanımlanmıştır (Hanahan & Weinberg, 2011). Bunlar arasında proliferasyon sinyalinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, apoptoza direnme, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenezin indüklenmesi ve aktif invazyon ve metastaz bulunmaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011).

## **2.2 MEME KANSERİ**

### **2.2.1 Tanım**

Meme bezi, süt üretimi görevi olan değişikliğe uğramış bir apokrin ter bezidir. Erişkin kadın normal meme dokusu epitelyal ve stromal kısımlardan oluşmaktadır. Dallanan duktus yapıları ile birleşen lobüller, epitelyal komponenti oluştururken, birbirinden farklı miktardaki adipoz ve fibröz bağ dokusu stromal komponenti meydana getirir (Ellis & Cox, 1984) (Weinstein, 1990) (MacNoughton, Bonoh, Mcloud, Hee, & Burger, 1992).

Meme kanseri, glandüler süt kanallarının epitel hücrelerinden veya memenin lobüllerinden kaynaklanan malign bir tümördür (Benson, ve diğerleri, 2009). Meme karsinomu, tümörün bazal zarın dışında büyümeye başlayıp başlamamasına bağlı olarak invaziv ve noninvaziv (in situ karsinom) olarak sınıflandırılır. İnvaziv karsinomlar, kanserleşmiş hücrelerin çevredeki bağ dokulara yayıldığı ve vücudun uzak organlarına metastaz yaptığı kanserlerdir. Meme karsinomlarının yaklaşık üçte ikisi duktal karsinom adı verilen kanalların epitel hücrelerinden geri kalan üçte birlik kısmı lobüler karsinom adı verilen lobüllerden kaynaklanır (Malhotra, Zhao, Band, & Band, 2010). Diğer daha az yaygın histolojik gruplar, enflamatuvar, medüller, apokrin, müsinöz ve tübüler karsinomlar olarak tanımlanmaktadır (Malhotra, Zhao, Band, & Band, 2010).

### **2.2.2 Epidemiyoloji**

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser hastalığıdır. 2018 yılında yaklaşık 2,1 milyon yeni vakanın teşhis edilmesi beklenmiştir ve kadınlar arasında kanserden ölümlerin en önemli sebebidir (Bray, ve diğerleri, 2018). 2018 yılında, dünyanın 5 bölgesinde (Amerika, Afrika, Avrupa, Asya ve Okyanusya) 2.088.849 yeni meme kanseri vakası ve meme kanseri nedeniyle 626.679 ölüm vakası olabileceği belirtilmiştir (Bray, ve diğerleri, 2018) (GLOBOCAN, 2018).

Amerikan kanser topluluğunun 2020 yılı verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda tanı alan 276.480 yeni invaziv meme kanseri ve 48.530 duktal karsinom (DCIS) vakası olacağı öngörülmüştür ayrıca 2020 yılında yaklaşık olarak 42.690 meme kanseri ölümü (42.170 kadın, 520 erkek)

meydana geleceği tahmin edilmektedir (American Cancer Society, 2020). Meme kanserinin erken evrelerde teŖhis ve tedavi edilmesi sağ kalım oranını arttırmaktadır. İnvaziv meme kanseri teŖhisi alan kadınlar için 5 ila 10 yıl içindeki sağ kalım oranları sırasıyla %91 ve %84'tür. Olguların yüzde altmış ikisi lokalize bir aşamada (memeyle sınırlı, lenf düğümlerine yayılma yok) teŖhis edilmektedir ve bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %99 olduğu belirtilmiŖtir (American Cancer Society, 2020).

Avrupa Birliği ÷lkelerinde meme kanseri ölümlerinin sayısı 2002'de 17.9 / 100.000'den 2012'de 15.2 / 100.000'e düŖmüŖ ve 2020 yılının sonunda 13.4 / 100.000'e azalacağı tahmin edilmektedir (Carioli, ve diğerleri, 2017). Bu düŖüŖteki en büyük etken, tedavi yöntemindeki ilerlemelerin yanı sıra daha sık tarama yapılmasıyla birlikte hastalığın erken teŖhis edilmesidir (Carioli, ve diğerleri, 2017). Ayrıca postmenopozal kadınlarda hormon kullanımının kesilmesi de bu düŖüŖe yardımcı olmuŖtur (Bray, ve diğerleri, 2018). Güney Amerika, Afrika ve Asya gibi diğer bölgelerde ise meme kanseri gör÷lme sıklığı halen artmaktadır (Bray, ve diğerleri, 2018). Türkiye'de yaklaşık olarak her yıl 17.000 kadında meme kanseri gör÷lmektedir ve meme kanserinin insidansı 100 binde 46,8 olarak bildirilmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2016). Bu bölgesel insidans farklılıkları yaŖ dağılımını, diyet, yaŖam tarzı, etnik köken, genetik arka plan ve pop÷lasyonlar arasındaki diğer meme kanseri risk faktörlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir.

### **2.2.3 Meme Kanserinde Biyobelirteçler**

Tümör biyobelirteçleri, bir tümör tarafından veya bir tümöre yanıt olarak üretilen bir molekül olarak tanımlanır (Mishra & Verma, 2010) ("Biomarker", NCI Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute., tarih yok). Biyobelirteçler, meme dahil vücuttaki herhangi bir dokudan saptanabilir (Mishra & Verma, 2010) ("Biomarker", NCI Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute., tarih yok). Prognostik, diagnostik ve / veya prediktif değerleri olabilir (Vivanco, 2010). Prognostik biyobelirteçler tedaviden bağımsız olarak doğal hastalık seyrini önceden bildirirken, prediktif biyobelirteçler bir hastanın belirli bir tedaviye yanıtını öngörür (Weigel & Dowsett, 2010). Östrojen reseptör

(ER) ve progesteron reseptör (PR) gibi hormon reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri zayıf prognostik ancak güçlü prediktif biyobelirteçlerin iyi örnekleridir (Radhakrishna, 2015). Oysa İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu, hem güçlü bir prognostik biyobelirteç hem de güçlü bir prediktif biyobelirteç için uygun bir örnek olabilir (Radhakrishna, 2015). Bununla birlikte, bilinen biyobelirteçlere ek olarak, çoğu klinik kullanım için onaylanamayan ve pratik olarak nitelendirilemeyen çok sayıda başka biyobelirteç önerilmiştir.

#### **2.2.4. Meme kanserinin sınıflandırılması**

Meme kanseri, farklı klinik davranışlar ile karakterize edilen farklı histolojik ve moleküler özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde doğru yaklaşımda bulunabilmek için kanserin biyolojik özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Kesin prognozu belirlemek ve etkili bir tedavi planlamak için meme kanseri sınıflandırması son derece önemlidir. Bu nedenle, histopatolojik özellikleri ile moleküler özelliklerinin her ikisi de meme kanserinin sınıflandırılmasında dikkate alınmaktadır (Russnes, Lingjærde, Børresen-Dale, & Caldas, 2017).

##### **2.2.4.1. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması**

Meme kanserleri, lezyonun yayılımına göre invaziv veya non-invaziv form olmak üzere ikiye ayrılır. Noninvaziv formlar, çevresindeki normal göğüs dokusuna yayılmadan hücrelerin anormal proliferasyonu ile karakterizedir ve meme bezindeki kanserli lezyonun bulunduğu yere bağlı olarak Duktal Karsinom İn Situ (DCIS) veya Lobüler Karsinom İn Situ (LCIS) (Lakhani, Ellis, Schnitt, Hoon, & Van de, 2012) olarak tanımlanır. Kanser hücrelerinin meme kanalının (veya lobülünün) ötesindeki anormal büyümesi, “özel olmayan tip” (NST) veya “özel tip” (ST) olarak iki sınıfa ayrılan invazif meme karsinomu formlarını tanımlar. NST, invaziv meme kanserleri arasında en sık karşılaşılan tiptir ve farklılaşma özellikleri olmayan tüm tümörleri içerir (tüm meme kanserlerinin %75'i). ST meme kanserleri arasında; invaziv lobüler karsinomlar, tübüler, cribriform, metaplastik, apokrin, müsin, papiller ve mikropapiller

karsinomlar ile medüller, nöroendokrin ve adeno-kistik karsinomlar bulunmaktadır (Lakhani, Ellis, Schnitt, Hoon, & Van de, 2012).

Histolojik derece ve TNM evreleme sistemi tanıda hastalığın şiddetini değerlendirmek için kullanılır. TNM tümör (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) kelimelerinin kısaltmasıdır. Derecelendirme sistemi tübül oluşumu, mitotik hücre sayısı ve nükleer pleomorfizmanın frekanslarına dayanır ve tümörleri 1 ila 3 arasında değişen bir puana göre böler (Elston & Ellis, 1991): Derece 1 (G1), iyi diferansiye karsinomlar; derece 2 (G2), orta derecede diferansiye karsinomlar; derece 3 (G3), zayıf diferansiye karsinomlar. TNM tümör evrelemesinde, nodüllerin çapı T (0-4) ile belirtilir, T1; 2 cm'den küçük tümörler, T2; 2-5 cm arasında, T3; 5 cm'den büyük ve T4; komşu organları istila eden tümör lezyonları için kullanılır. Hastalığın lenf düğümlerine yayılması N (0-3) ile uzak bölge metastazının varlığı M (0-1) ile gösterilir (Giuliano, ve diğerleri, 2017). Patolojik özelliğe ek olarak, invaziv meme kanserlerinde ER, PR, HER2 ve Ki67 gibi moleküler biyobelirteçlerin analizi tedavinin yönetiminde rutin olarak kullanılmaktadır İlk üç biyobelirteç klinik uygulamada kullanılan etkili tedavilerin hedefini temsil etmekle birlikte tedaviye yanıtı da öngörmektedir. ER ve PR'nin ekspresyonu hormonal tedavinin etkinliğini gösterebilmektedir (Hammond, ve diğerleri, 2010). ER meme kanserlerinin neredeyse %70'inde ifade edilirken meme kanserlerinin %60-65'i ise PR pozitifdir (Lakhani, Ellis, Schnitt, Hoon, & Van de, 2012). Diğer yandan HER2, meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'inde aşırı eksprese edilir. Ekspresyon analizi immünohistokimyasal boyama (IHC) yöntemleri ile yapılmaktadır (Wolff, ve diğerleri, 2018).

Son prognostik belirteç, neoadjuvan kemoterapi ile tedavi edilen ER pozitif meme kanserinde hücreler tarafından eksprese edilen ve prognostik olarak değerli bir antijen olan Ki67 proteindir (Bertucci, ve diğerleri, 2013).

#### **2.2.4.2. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması**

Genomik çalışmaların evrimi, meme kanseri heterojenliğinin moleküler açıdan analiz edilmesine destek olmuştur. Gen ekspresyon profili verileri, meme tümörlerini Luminal A, Luminal B, HER2+, Triple Negatif/Bazal benzeri ve

Claudin low alt tipleri olarak adlandırılan beş alt tipe ayırarak tanımlamıştır (Perou,ve diğerleri, 2000) (Sørli, ve diğerleri, 2001) (Herschkowitz, ve diğerleri, 2007).

Meme tümörleri, ER, PR, HER2 ve Ki-67 dahil olmak üzere dört iyi bilinen biyobelirteç kullanılarak 5 alt tipe sınıflandırılabilir (Sorlie, ve diğerleri, 2001). Bu molekülerin sınıflandırması genellikle prognoz ve terapötik stratejinin belirlenmesi için kritik öneme sahiptir (Parker, ve diğerleri, 2009). Luminal A, ER-pozitif, PR-pozitif, HER2-negatif ve Ki-67'nin düşük ekspresyonuna sahiptir, aynı zamanda hormonal tedavi ile en iyi sonuca sahip olan en yaygın tiptir (Cheang, ve diğerleri, 2009). Luminal B luminal A'ya benzemektedir, ancak proliferasyonla ilişkili bir gen olan yüksek Ki-67 ekspresyonuna sahiptir ve bu alt tip lüminal A'dan daha agresiftir (Heitz, ve diğerleri, 2009) (Cheang, ve diğerleri, 2009). Luminal B alt tipine sahip hastalar, HER2 ekspresyonuna bağlı olarak anti-HER2 antikoru Trastuzumab (Herceptin) ile kombinasyon halinde hormonal tedaviden yararlanabilir (Onitilo, Jessica, Robert, & Bickol, 2009) (Yersal & Barutca, 2014). Son olarak, Triple-Negatif/ Bazal Benzeri (TNBC) meme kanseri, spesifik ilaç hedeflerinin eksikliği nedeniyle kötü prognozu olan bir alt tiptir. Bu alt tip için birincil tedavi kemoterapidir (Senkus, ve diğerleri, 2013).

#### **2.2.4.2.1.Luminal A Tip**

Tüm meme kanserlerinin neredeyse %50-60'ı Luminal A alt tipine girmektedir. Bu tümörler düşük histolojik derece ve proliferasyon oranı ile karakterize edilir. Meme luminal hücrelerinde belirli genlerin ekspresyonu artmıştır. (Perou, ve diğerleri, 2000) Luminal A tümörleri, GATA3 ve östrojene bağlı LIV-1 (Sotiriou, ve diğerleri, 2003) gibi ER transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilen genlerin yüksek ekspresyonunu gösterir ve DNA düzeyinde, bu tümörlerde düşük sayıda mutasyon veya kopya sayısı değişikliği bulunmuştur (Curtis, ve diğerleri, 2012). İyi prognoz ve düşük nüks oranı Luminal A alt tipi ile ilişkilidir ve ayrıca hormonal aromataz inhibitörleri veya seçici östrojen reseptör inhibitörleri (yani tamoksifen) ve fulvestrant gibi seçici ER regülatörleri ile hasta endokrin terapisinden en iyi şekilde yararlanır.

#### **2.2.4.2.2. Luminal B Tip**

Luminal B tümörleri, meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturur ve daha düşük histolojik derece ve proliferatif indekse sahip Luminal A'dan daha agresif bir fenotip sunar. Bu tümörler, proliferasyon ve hücre döngüsü (örn. MKI67 ve AURKA) ile ilişkili yüksek seviyelerde gen veya protein eksprese eder. Ayrıca genomik mutasyon ve kopya sayısı değişiklikleri Luminal A'dan daha sıktır (Curtis, ve diğerleri, 2012). Luminal B tümörü ayrıca HER2'nin aşırı ekspresyonuna veya amplifikasyonuna sahip olabilir. ER'nin Lüminal A ya benzer ekspresyonuna rağmen, Luminal B alt tipi Luminal A'dan daha kötü bir prognoza sahiptir, buna ek olarak endokrin tedavisine kısmi bir cevap ile ilişkilidir, ancak neoadjuvan kemoterapiye olumlu yanıt vermektedir (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

#### **2.2.4.2.3. HER2 Pozitif Tip**

Bu tip, ERBB2 onkogeninin ve HER2 yolağındaki çeşitli genlerin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen tüm meme kanseri tiplerinin %15-20'sini içerir (Perou, ve diğerleri, 2000). Bu tümörler Östrojen Reseptör 1 (ESR1) ve Progesteron Reseptör (PGR) gibi lümenle ilişkili genlerin orta dereceli ekspresyonunu ve bazal ilişkili genlerin (örn. KRT5 ve FOXC1) düşük ekspresyonunu gösterirken, özellikle tüm meme kanseri tipleri arasında genom boyunca en fazla mutasyona sahiptirler. Bu mutasyonlara örnek olarak TP53 ve Fosfoinozitol 4,5-bisfosfat 3-kinaz (PIK3CA) gösterilmiştir (Curtis, ve diğerleri, 2012). Klinik açıdan, HER2 pozitif tümörler, yüksek proliferatif indeks ve yüksek histolojik derece ile karakterize edilirler. Ayrıca HER2 pozitif tümörleri olan hastalar, lüminal tümörlerden daha yüksek yanıt oranına sahip neoadjuvan tedaviden yarar görselerde, zayıf bir prognoza sahiptirler (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

#### **2.2.4.2.4. Bazal Tip ve/veya Triple Negatif Tip**

Bazal tip ve/veya Triple Negatif tümörler tüm meme kanserlerinin %10-20'sini temsil eder, bu tümörler meme bazal epitel hücrelerine özgü genleri eksprese eder ve immünohistokimyasal analizinde EGFR ile birlikte bazal keratinler 5/6

ve 17 için pozitif boyama yaparlar. Bazal tümörler yüksek düzeyde proliferasyonla ilişkili genleri (Örneğin MKI67 geni), orta düzeyde HER2 ile ilişkili genleri ve çok düşük miktarda lüminal gen ekspresyonunu gerçekleştirirler. TP53 ve PIK3CA en sık mutasyon geçiren genlerdir ve BRCA1'deki mutasyonlar genellikle Bazal tip ile ilişkilidir (Curtis, ve diğerleri, 2012). Yüksek histolojik derece, geniş tümör boyutu ve yüksek mitotik indeks ile birlikte lenf nodu tutulumu bazal tip tümörlere özgüdür (Slamon & Pegram, 2001). HER2+ gruba benzer şekilde, daha kötü prognoz ile karakterize olmasına rağmen kemoterapiye yüksek yanıt vermektedirler (Rouzier, ve diğerleri, 2005).

#### **2.2.4.2.5. Claudin-low**

2007 yılında, Herschkowitz ve arkadaşları transgenik meme kanseri fare modelleri ve insan meme kanseri veri setleri arasında karşılaştırmalı gen ekspresyon analizi yaparken, “claudin-low” (CL) adını verdikleri yeni bir meme kanseri moleküler alt tipi keşfetmişlerdir. Bu tipte de tümörlerin üçlü-negatif fenotip sergilediği belirtilmiştir, ancak üçlü-negatif meme kanserlerinin sadece az bir kısmı claudin-low özellik göstermektedir. Claudin-low alt tipi, meme kanseri kök hücresi özelliklerini taşımaktadır (Herschkowitz, ve diğerleri, 2007). Bu alt tip; claudin 3, 4, 7, Okkludin ve e-cadherin gibi transmembran proteinleri ve hücre-hücre adezyon moleküllerinin düşük ekspresyonu ile karakterizedir buna karşılık yüksek oranda mezenkimal ve meme kök hücresi benzerliği gösterirler (Herschkowitz, ve diğerleri, 2007) Claudin-low kanserleri kötü prognoza sahiptir. ER-, PR-, HER2- olan meme tümörlerine de benzediği belirtilmiştir. Diğer tip meme kanserlerinin yaklaşık %5-7'si Claudin-low tip tümörlerden oluşmaktadır (Prat, ve diğerleri, 2010).

#### **2.2.5. Meme Kanserinde Yaygın Genetik Değişiklikler**

Proto-onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ile inaktivasyonu meme kanseri gelişimine katkıda bulunur (Lee & Muller, 2010). 100 insan meme tümörünün genomlarını analiz eden bir çalışmada, en az 40 kanser geninde mutasyonlar ve mutasyona uğramış genlerin 73 farklı kombinasyonu bulunmuştur (Stephens, ve diğerleri, 2012). Bu

gözlemler, büyük genetik çeşitliliğe sahip bir hastalık olarak meme kanseri kavramını vurgulamaktadır.

Heterodimerik Fosfoinozid 3-Kinazın (PI3-kinaz) p110 katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA geni, tüm meme kanserlerinin %30-36'sında nokta mutasyonları ile hedeflenen bir onkogen olarak kabul edilmektedir (Stephens, ve diğerleri, 2012) (Network, 2012). PIK3CA mutasyonlarının ER+ meme kanserlerinde ve HER2+ meme kanseri grubunda fazlasıyla olduğu bildirilmektedir (Network, 2012) (Cizkova, ve diğerleri, 2012). Meme kanserinde yer alan bir başka onkogen, 11q13 kromozomunda bulunan ve tüm meme kanserlerinin %8-15'inde amplifiye edilen siklin D1'dir (CCND1). (Jirstrom, ve diğerleri, 2005) (Lundgren, ve diğerleri, 2012). HER2'yi kodlayan ERBB2 geni (17q12), meme kanserlerinin %10-34'ünde amplifiye edilir ayrıca MYC (8q24) meme kanserlerinin yaklaşık %11'de amplifiye edilir (Cuny, ve diğerleri, 2000) (Ross & Fletcher, 1998). Meme kanserinde kromozom 20q13 üzerindeki amplifiye-1 (AIB1) geni, ER'nin koaktivatörü olarak işlev görür ve meme kanserlerinin %5-10'unda bulunmaktadır (S.L., ve diğerleri, 1997) (Bautista, ve diğerleri, 1998).

BRCA1 ve BRCA2'nin kalıtsal germ hattı mutasyonları gibi genetik değişiklikler, fonksiyon kaybının malign hücre davranışına katkıda bulunduğu tümör baskılayıcı genlerin örnekleridir. Tümör baskılayıcı genlerin diğer örnekleri, TP53 ve Retinoblastoma (RB) genleridir. Her ikisinin de tüm meme kanserlerinin sırasıyla %15-34 ve %39'unda somatik nokta mutasyonları tarafından inaktive edildiği gösterilmiştir (Herschkowitz, He, Fan, & Perou, 2008) (Ingvarsson, 1999). "E-cadherin" kodlayan CDH1 geninin nokta mutasyonları veya promotör gen metilasyonunun, lobüler invaziv karsinomların %85'inde var olduğu bildirilmiştir (Droufakou, ve diğerleri, 2001). Meme kanserinde tümör baskılayıcılar olarak tanımlanan diğer genler fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), nükleer reseptör korepresör 1 (NCOR1), kaspaz 8 (CASP8), mitojen aktive protein kinaz 1 (MAP3K1) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B'dir (CDKN1B). (Stephens, ve diğerleri, 2012). Transkripsiyon faktörü GATA3'ün ER+ tümörlerinin yaklaşık %18'inde nokta mutasyonlarını barındırdığı gösterilmiştir (Stephens, ve diğerleri, 2012).

### 2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Normal hücreler ve dokular, hücre döngüsüne girişi düzenleyen ve böylece doku homeostazı ve fonksiyonunun korunmasını sağlayan, büyüme teşvik eden sinyallerin modülasyonu ile hücre proliferasyonunu kontrol eder. Hücre döngüsü, bir hücrenin iki hücreye bölünmesine neden olan karmaşık olaylar dizisidir. Hücre büyümesi ve bölünmesinin temel süreci, siklinler olarak bilinen bir protein ailesi tarafından başlatılır ve sürdürülür. Siklinler, serin / treonin sikline bağımlı kinaz (CDK) ailesinin üyelerine spesifik bir şekilde bağlanır ve bunları aktive eder (Norbury & Nurse, 1992). Ökaryotik hücre döngüsü iki faza ayrılır: interfaz ve mitoz/M fazı. İnterfaz, G1, S ve G2 fazından oluşan hücre döngüsünün en uzun fazıdır.

Hücre döngüsünün ana aşamaları şunlardır:

G<sub>0</sub> fazı (Gap fazı); Hücrenin, bir hücre döngüsünün başlamasını tetiklemek için harici bir uyaran bekleyen, durgun, dinlenme durumunda kaldığı fazdır. Vücuttaki hücrelerin çoğu bu aşamada bulunur.

G1 fazı (Boşluk 1 fazı); Hücre, harici bir mitojenik sinyal aldığı anda bu faza girilir ve DNA replikasyonunun hazırlanmasını içerir.

S fazı (Sentetik faz); Hücrenin DNA'sını kopyaladığı fazdır.

G2 fazı (Boşluk 2 fazı); Hücrenin M fazı ve hücre bölünmesine hazırlandığı aşamadır.

M fazı (Mitoz); Kopyalanmış kromozomların iki ayrı hücre olarak ayrılmasını içerir. Bu faz profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere birçok farklı alt fazdan oluşur. M fazı, gerçek hücre bölünmesi olan sitokinez ile sona erer.

Normal hücrede, hücre çoğalmasına yönelik çeşitli adımların düzgün bir şekilde uygulanmasını sağlamak için, farklı aşamalar boyunca “kontrol noktaları” olarak adlandırılan çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır (Hartwell & Weinert, 1989). Kanseri hücreleri, bu tür kontrol noktalarını geçersiz kılarak kontrolsüz çoğalmaya yol açan edinilmiş özelliklere sahip hücreler olarak tanımlanabilir. Kısıtlama noktası başlangıçta mayada geç G1 fazında hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden bir kontrol noktası olarak tanımlanmıştır, ancak günümüzde kendi başına bir kontrol noktası olarak düşünülmemektedir

(Planas-Silva & Weinberg, 1997). Bunun yerine, kısıtlama noktası, hücre döngüsü ilerlemesi için geri dönüşü olmayan bir nokta olarak tanımlanır ve hücrenin, dış mitojenik uyarılara bağımlılıktan bağımsızlıklarına geçebileceği hücre döngüsü zamanındaki noktayı belirtir. Kanserli hücrelerin ayırt edici özelliklerinden biri, hücre proliferasyonu için dış sinyallerden bağımsız olması ve kısıtlama noktasının düzenlenmesinde yer alan olayların kanserde sıklıkla değişmesidir (Hanahan & Weinberg, 2011) (Malumbres & Barbacid, 2001). Aşağıdaki bölüm, esas olarak geç G1 / S fazında kısıtlama noktasının geçişine katılan hücre döngüsü proteinlerini ele alacaktır.

### **2.3.1. G1 / S Fazının Hücre Döngüsü Molekülleri**

Hücre bir dış mitojenik sinyal aldığı anda eksprese edilecek ilk siklinler, siklin D1 gibi D-tipi siklin ailesidir (Sherr, 1993). Ras / Raf / MAPK, ER ve PI 3-kinaz yolları da dahil olmak üzere siklin D1 ekspresyonunu indükleyen birkaç sinyal yolağı belirtilmiştir (Sabbah, Courilleau, Mester, & Redeuilh, 1999) (Takuwa & Takuwa, 2001). Çeşitli sitokinler, STAT3 ve STAT5 yoluyla siklin D1 ekspresyonunu indükleyebilirler (Leslie, ve diğerleri, 2006) (Matsumura, ve diğerleri, 1999).

Siklin D, fosforilasyona ve böylece retinoblastom tümör baskılayıcı proteininin (RB) inaktivasyonuna izin veren siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) katalitik alt birimleri ile bir kompleks oluşturur. Fosforilasyon ile RB'ye uygulanan konformasyonel değişiklik, E2F transkripsiyon faktörü ailesine ait transkripsiyon faktörlerinin salınmasına yol açar ve siklin E ve siklin A gibi hedef genlerin ekspresyonunu tetikler. E2F'lere ek olarak RB kompleksi, histon deasetilazlar ve kromozomal yeniden modellenen SWI / SNF kompleksleri gibi transkripsiyonel baskılayıcıları içerir ve bu etkileşimler de fosforilasyon olayı tarafından bozulur (Sherr, The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited., 2000). Sonrasında siklin E-CDK2 ve siklin D-CDK4 / 6 kompleksleri, RB'yi fosforile etmeye devam ederek siklin E ve siklin A transkripsiyon seviyelerini artıran pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturur. Hücre G1'den S fazına doğru daha fazla itilir. RB'nin daha fazla fosforilasyonunu inhibe eden hiçbir negatif sinyal (örn. Mitojenlerin geri çekilmesi) alınmazsa,

kısıtlama noktası geçer ve hücre döngüsünün ilerlemesi, siklin E-CDK2 kompleksleri tarafından uygulanan intrinsik sinyallere bağımlıdır. Hücre S fazına girdiğinde siklin A, CDK2'ye bağlı baskın siklin haline gelir (Sherr, The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited., 2000).

Siklin ailesi, proliferasyonu teşvik etme kapasiteleri nedeniyle proto-onkogenler olarak tanımlanmıştır ve meme kanserinde siklin D1 ve siklin E'nin aşırı ekspresyonu veya deregülasyonu sıklıkla gözlenmektedir (Sutherland & Musgrove, 2004). Tümör baskılayıcı RB'nin kanser ortamında ya kaybedildiği ya da işlevsel olarak inaktive edildiği bildirilmektedir (Malumbres & Barbacid, 2001).

#### **2.4. TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER VE ONKOGENLER**

Tümör süpresör genler ve onkogenler, kanser oluşumun inaktivasyonunu (tümör süpresör genler) veya aktivasyonunu (onkogenler) yönlendirebilen iki gen sınıfıdır. Tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler veya epigenetik değişiklikler bu genlerin inaktivasyonuna neden olurken mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar veya anormal sinyalleşme nedeniyle aşırı ekspresyon, onkogenlerin aktivasyonuna yol açabilir.

Genel olarak, Knudson'un “iki vuruş hipotezi” tümör süpresör genler için geçerlidir. Knudson'un bu hipotezi, her iki allel de iki mutasyonel olay tarafından inaktif hale gelirse tümör baskılayıcı genlerin işlevlerini kaybettiğini göstermektedir (Knudson, 1971). Bu kurala istisna olarak tümör süpresör genlerin epigenetik değişiklikler yoluyla da işlevlerini kaybedebileceği bildirilmiştir (Paige, 2003). Yoğun olarak çalışılmış TP53 geni, tümör süpresör genin bir örneğidir ve insan kanserlerinde en yüksek mutasyon oranlarına sahiptir (Suzanne, ve diğerleri, 1990). TP53 çoğunlukla hücre döngüsü durması ve apoptozu indüklemeye yeteneği ile bilinir (Kasthuber & Lowe, 2017). Aynı zamanda BRCA1 ve BRCA2 genleri de tümör süpresör genlerin iyi örneklerindedir. BRCA genleri DNA hasarı onarımında önemli bir rol oynar. BRCA genlerindeki kalıtsal mutasyonların meme, yumurtalık ve prostat kanseri riskini büyük ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Miki, 1994) (Wooster & al., 1996) (Tavtigian, ve diğerleri, 1996) (Sigurdsson & al., 1997).

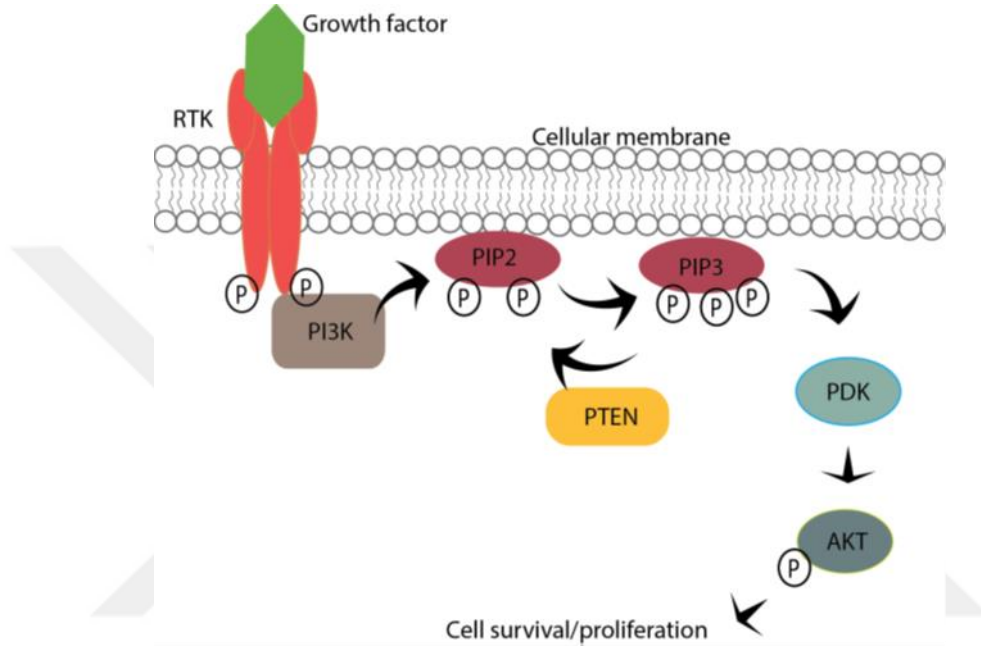
Onkogen Src, tavuk retrovirüsünde keşfedilen ilk onkogendir (Martin, 2001). O zamandan beri çok sayıda onkogen keşfedilmiştir. Onkogenlerin başka bir örneği, insan kanserlerinde sıklıkla çoğalan transkripsiyon faktörü MYC'dir. Proto-onkogen MYC'nin anormal ekspresyonu birçok genin transkripsiyonal deregülasyonu sebep olur ayrıca genomik instabilite rolleriyle de bilinmektedir (Kuzyk & Mai, 2014). İnsanlarda üç RAS geni bulunur (NRAS, KRAS ve HRAS) ve hepsinin çeşitli kanser türlerinde onkojenik olduğu gösterilmiştir (Bos, 1989). RAS proteinleri GTPazlardır ve RAS genlerindeki onkojenik mutasyonlar, PI3KAKT-MTOR ve Raf-MEK yollarını aktive ederler (Takashima & Faller, 2013).

Birlikte ele alındığında, tümör supresör genler ve onkogenler tümör oluşumu ve tümör progresyonunda önemli bir rol oynar.

Bir diğer tümör supresör molekül olan PTEN çeşitli tümör tiplerinde sıklıkla düzensiz olduğu ve PTEN baskılanmış farelerin tümör oluşumlarına eğilimli olduğu gösterilmiştir (Steck, ve diğerleri, 1997) (Song, Salmena, & Pandolfi, 2012). Bu ilk çalışmalar PTEN'in tümör baskılayıcı aktivitesini doğrulamıştır. PTEN seviyeleri transkripsiyonel, post-traskripsiyonel ve post-translasyonel olarak düzenlenebilir. Tümör baskılayıcı p53, büyüme yanıtı proteini 1 (EGR-1) ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama (PPAR-  $\gamma$ ), PTEN transkripsiyonunu aktive etmek için PTEN promotörüne bağlanarak PTEN'in pozitif düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır (Patel & al., 2001) (Stambolic, ve diğerleri, 2001) (Virolle, ve diğerleri, 2001).

Bu fosfatazın ana katalitik fonksiyonu, PIP3'ün (fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat) defosforilasyonu ile inaktif PIP2 formunu (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat) üretmektir. Tipik olarak PI3K (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz), reseptör kinazlar veya G proteinleri bağlı reseptörlere (GPCR'ler) bazı sinyal moleküllerinin (hormonlar, büyüme faktörleri, kemokinler veya sitokinler) bağlanmasıyla aktive edilir. PI3K, PIP2 inositol halkasının 3-pozisyonunu fosforile ederek fosfolipid PIP3'ü üretir (Vanhaesebroeck, ve diğerleri, 2001). PIP3, hücre içi membrana lokalizedir ve PDK (3-fosfoinositüde bağımlı kinaz) ve AKT'yi (protein kinaz B) aktive eder (Maehama & Dixon, 1998). AKT'nin Thr308 ve Ser473 aminoasit kalıntıları fosforillenir

ve aktive edilir (Manning & Cantley, 2007). Aktif AKT, hücrenin hayatta kalmasını, hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi ve hücre metabolizmayı yönlendiren çeşitli proteinlerin aktivasyonuna yol açar. Bu nedenle PTEN kaybı yapısal olarak PI3K-AKT-mTOR yolunun aktivasyonuna yol açar ve hücre büyümesini ve hayatta kalmasını destekler (Leslie & Downes, 2004) (Şekil 2.4.1).



**Şekil 2. 1** PIP3. PI3K / AKT yolu. (Leslie & Downes, 2004)

Reseptör tirozin kinaz (RTK) bir sinyal molekülü bağladığında, PIP2'nin PIP3'e fosforilasyonunu katalize eden PI3K kinazı aktive eder. PIP3 daha sonra PDK'yi, aktive olan PDK'da AKT'yi fosforiller ve aktive eder. PTEN, PIP3'ü defosforile ederek PI3K / AKT yolunu antagonize eder ve döngü bu şekilde tekrarlanır.

BRAF (v-Raf murin sarkomu viral onkogen homolog B) mutasyonları insan tümörlerinin %8'inde bulunur ve en yüksek BRAF mutasyon insidansı melanomda (%27-67) görülür. BRAF, melanomada hücre proliferasyonunu, hayatta kalma, yaşlanma ve farklılaşmayı kontrol eden RAS / RAF / MEK / ERK sinyal yolunun bir parçasıdır (Fecher, Amaravadi, & Flaherty, 2008). RAS (HRAS, KRAS ve NRAS), RAF (ARAF, BRAF, CRAF), MEK (MEK1, MEK2) ve ERK (ERK1, ERK2) proteinleri MAPK yolunun temel bileşenleridir. Genel

olarak, RAS proteinlerinin aktivasyonu için, hücre dışı sinyaller veya reseptör tirozin kinazların aktive olması gereklidir (Cobb, 1999). Bu, aktif olmayan RAS-GDP formundan aktif RAS-GTP komplekslerinin oluşumuna yol açar. RAS-GTP, homodimerizasyonunu destekleyen BRAF'ın fosforilasyonuna ve aktivasyonuna aracılık eder (Leevers, Paterson, & Marshall, 1994). Homodimerizasyon sonucu ERK aktiflenir (Howe & al., 1992). Aktif ERK hücre proliferasyonuna yol açan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. ERK ayrıca reseptör tirozin kinazların inhibisyonu ve BRAF'ın defosforilasyonu aracılığı ile RAS'ın fosforilasyonunu inhibe ederek MAPK yolunda negatif feedbacki indükler. (Dougherty, ve diğerleri, 2005) (Douville & Downward, 1997).

## **2.5. KODLAMAYAN RNA'LAR (ncRNA)**

1958'de Francis Crick, genetik bilginin DNA'dan RNA'ya aktığını öne sürerek proteinlere çeviri için bir şablon görevi gördüğünü bildirmiştir (Crick, 1958). Daha sonra 1961'de Jacob ve Monod, mesajcı RNA veya mRNA olarak adlandırılan bir RNA ara maddesine ihtiyaç olduğunu göstermiştir. (Jacob & Monod, 1961). Bu, genetik bilgiyi içeren DNA'nın mRNA'ya transkripsiyonunun yapıldığı biyolojinin santral dogmasına yol açmış ve protein kritik fonksiyonel ürün olarak kabul edilmiştir. Moleküler biyolojinin santral dogmasına göre RNA, DNA'daki genetik bilgiyi proteinlere çeviren bir haberci molekül olmasına rağmen, tüm RNA moleküllerinin mesajcı RNA'lar olarak hareket etmediği ve protein kodlamadığı daha sonrasında anlaşılmıştır. RNA'nın protein sentezinde sadece bir haberci molekül olarak değil, daha sonra transfer RNA'lar (tRNA'lar) olarak adlandırılan amino asitler için bir adaptör molekülü olduğu gösterilmiştir (RajBhandary & Kohrer, 2006). Benzer şekilde, ribozomal RNA'lar (rRNA) ve ribozomlar arasında da aynı zamanda bir bağlantı kurulmuştur (Palade, 1955). Bunlar, protein kodlayıcı olmayan fonksiyonlara sahip ilk RNA molekülleridir. Ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA) dan oluşan kodlayıcı olmayan RNA'lar protein kodlamasalar bile translyasyon sürecine katkıda bulunurlar. rRNA, amino asitlerin protein zincirlerine katılımını katalize eden ribozomları oluşturmak için proteinlerle

birleşir. Her bir amino asit, büyüyen polipeptit zincirine eklenmek üzere spesifik bir tRNA'ya kovalent olarak bağlanır (Fox, 2010). rRNA'ların ve tRNA'ların keşfinden sonra, küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) ve küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) gibi diğer küçük RNA gruplarının birçoğu keşfedilmiştir. snRNA'lar RNA eklemesinde rol oynar (Dreyfuss, Philipson, & Mattaj, 1988) (Weinberg & Penman, 1968) , snoRNA'lar ise rRNA işlemede (Maxwell & Fournier, 1995) görev alır.

1982'de, ilk "enzimatik olarak aktif" RNA (ribozim), spesifik biyolojik fonksiyonları ile tanımlanmıştır (Kruger, ve diğerleri, 1982). Bu RNA enzimleri, transkripsiyon sonrasında RNA'daki bazı bölümlerin (intron'ların) çıkartılmasını katalize eder (Garriga & Lambowitz, 1984). Bu ilk bulgular, kodlayıcı olmayan fonksiyonlar sergileyen RNA'ların araştırılmasına neden olmuştur.

Sekanslama teknolojilerinin ilerlemesi, DNA Elementleri Ansiklopedisi (ENCODE) çalışması ve İnsan Genom Projesinin tamamlanması, insan genomunun yaklaşık %80'inin transkribe olduğunu ve transkribe edilen genlerin çoğunun proteinleri kodlamadığını ortaya koymuştur (İnsan genomunun %3'den daha azının proteinleri kodladığı anlaşılmıştır) (Birney, ve diğerleri, 2007). Başlangıçta kodlayıcı olmayan genomik bölgelerin çoğunun "transkripsiyonel gürültü" olduğu düşünülmesine rağmen şimdi bunların birçoğunun biyolojik olarak çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu kabul edilmektedir.

Bir zamanlar "önemsiz" olarak kabul edilen ncRNA'ların, proteinleri kodlamamasına rağmen çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip oldukları tespit edilmiştir. NcRNA'lar tipik olarak proteinleri kodlamamalarının sebebi Açık Okuma Kesitleri (ORF) olmamasıdır. Bazı ncRNA'lar küçük peptitler üreten çok küçük ORF'ler içerir (Bazzini, ve diğerleri, 2014) (Galindo, Pueyo, Fouix, Bishop, & Couso, 2007), ancak bu durum işlevsel oldukları anlamına gelmemektedir. Bu ncRNA'lar genel olarak boyutlarına göre, küçük ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) olarak sınıflandırılır. Küçük ncRNA'lar arasında küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük interfering RNA'lar (siRNA'lar) ve PIWI etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) yer alır.

LncRNA'lar, protein kodlamayan 200 nükleotitten daha uzun RNA'lar olarak tanımlanmaktadır. 2002'de lncRNA'lar, farede tam uzunlukta bir cDNA kütüphanesinin sekanslanmasından sonra resmen protein kodlamayan RNA moleküllerinin önemli bir sınıfı olarak tanımlanmıştır (Okazaki Y, ve diğerleri, 2002).

NcRNA'ların bu sınıfı, kanser de dahil olmak üzere çeşitli patolojik hastalıklarda rol oynadığı bulunmuştur. Spesifik ncRNA ekspresyonu sağkalım ile ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle hastalık tanısı ve prognozu için biyobelirteçler olarak çalışılmaktadır. Ek olarak, spesifik ncRNA'ların, kanserin ayırt edici özellikleri ile fonksiyonel olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve terapötik hedefler olarak takip edilmektedir.

### **2.3.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNA)**

2009 yılında, Dr. John Rinn ve Dr. Eric Lander'in Broad Institute'deki laboratuvarlarında, memelilerde yüksek oranda korunan binden fazla lncRNA tespit etmiştir (Guttman, ve diğerleri, 2009). Bu, son 10 yıl içinde lncRNA'lar üzerindeki araştırmalarda büyük artışa katkıda bulunmuştur (Miao, ve diğerleri, 2017). Şimdiye kadar, LNCipedia genel veritabanında (Lncipedia.org) 127.000'den fazla insan lncRNA transkripti vardır, ancak bunlardan çok azı tam olarak karakterize edilmiştir. Kuşkusuz, lncRNA'ların transkribe edilmesi biyolojik bir fonksiyona sahip olduğu anlamına gelmez, fakat son zamanlarda birçok lncRNA'nın fonksiyonel olarak önemli olduğu belirtilmektedir. LncRNA'lar, genomun kodlamayan kısmının (<https://www.encodegenes.org/human/stats.html>, tarih yok) büyük bir çoğunluğunu oluşturur, bu nedenle bu RNA sınıfını daha fazla araştırmak ve karakterize etmek önemlidir.

#### **2.3.1.1 Uzun Kodlamayan RNA'ların sınıflandırması**

Uzun kodlamayan RNA'lar, protein kodlama potansiyeli minimum olan veya hiç olmayan 200 bazdan daha uzun RNA molekülleri olarak tanımlanır (Djebali & diğerleri, 2012). Uzunluğa göre sınıflandırılmanın dışında, lncRNA'lar ayrıca en yakın protein kodlayan genin genomik yönelimine bağlı olarak sens, antisens,

çift yönlü, intergenik veya intronik transkriptlere gruplanabilirler (Djebali & diğerleri, 2012) (Mercer, Dinger, & Mattick, 2009) (Ponting, Oliver, & Reik, 2009) (Zhang, 2014). İnterjenik bölgelerden transkripsiyon yapılan lncRNA'lara uzun intergenik kodlamayan RNA'lar (lincRNA'lar) denir. İntrogenik transkriptler ise bir protein kodlayıcı genle çakışır. LncRNA transkriptlerinin neredeyse %60'ı intergenik kategoriye girmektedir (Ulitsky & Bartel, 2013). İntrogenik lncRNA'lar ayrıca protein kodlayan gene göre yönlerine bağlı olarak sense veya anti-sense transkriptler olarak sınıflandırılabilir. Bunlar dış promotörlerden veya üst üste geldikleri genlerin dahili promotörlerinden kaynaklanabilir. İnternal promotörlerden kaynaklanan transkriptler, toplam transkriptlerin %30'unu oluşturan ikinci en büyük lncRNA grubudur (Derrien & et al., 2012). Ek olarak, lncRNA'lar ayrıca proto-onkojenik (Chen & et al., 2016) (Wang & et al., 2015) veya tümör baskılayıcı (Yang & al., 2013) (Wang & al., 2016) gibi kanserdeki fonksiyonel rollere göre sınıflandırılmaktadır.

### **2.3.1.2. Uzun Kodlamayan RNA'ların Karakterizasyonu**

LncRNA'lar ve mRNA'lar benzer özelliklere sahiptir. LncRNA'lar, mRNA'lardan farklı olarak ORF'den yoksundurlar. LncRNA'lar RNA polimeraz II tarafından transkribe olurlar ve 5' başlık takılması ve 3'-poliadenilasyonu içeren post transkripsiyonel işleme tabi tutulurlar (Derrien T. e., 2012) (Consortium, 2012). LncRNA'lar genel olarak mRNA'lara kıyasla daha az eksprese edilir, ancak yüksek doku spesifitesi gösterir (Djebali & et, Landscape of transcription in human cells., 2012) (Mercer & et, Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain., 2008) (Cabili & et al., 2011) ve biyolojik fonksiyona bağlı olarak hücrede belirli bir kompartımanda lokalize olabilir (Geisler & Coller, 2013) (Batista & Chang, 2013).

LncRNA'ların mRNA'lara benzer şekilde, ekspresyonu epigenetik düzenlemeye tabidir (Mikkelsen & et al., 2007) (Guttman & al., 2009) (Khalil & al., 2009) (Sati & al., 2012). Transkripsiyon başlangıç bölgesi (TSS) çevresindeki aktive eden (H3K4me3 ve H3K36me3) ve baskılayan (H3K27me3) histon işaretleri, bir lncRNA'nın transkripsiyon durumunu tanımlamaktadır.

LncRNA'ların da mRNA muadillerine göre çok daha yoğun bir metilasyon durumu sergilediği gösterilmiştir (Sati & al., 2012).

LncRNA'lar mRNA'larla karşılaştırıldığında, mRNA'lar genellikle sitoplazmada ribozomlarda lokalize iken, lncRNA'ların lokalizasyonlarında farklılıklar görülebilmektedir. LncRNA'lar esas olarak çekirdekte lokalizedir ancak sitoplazmada da lokalize olabilir (Djebali S, ve diğerleri). LncRNA'ların esas olarak çekirdekte lokalizasyonu, lncRNA'ların çekirdekteki gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesine katkıda bulunabilir (Derrien T. e., 2012). Birçok lncRNA, ana transport kompleksi TREX ve NXF1 / NXT1 nükleer transport reseptörü ile kanonik mRNA yolu aracılığı ile çekirdekte sitoplazmaya taşınır (Palazzo & Lee, 2018).

Nükleer lncRNA'lar transkripsiyon faktörleri (Chen & al., 2016) üzerinde veya kromatin modifiye edici kompleksler için kılavuz olarak hareket edebilir (Gupta & al., 2010), buna karşın sitoplazmik lncRNA'lar, sıklıkla transkripsiyonel gen ekspresyonu düzenlemesinde veya mRNA'ların stabilitesinin düzenlenmesi rol oynarlar (Yuan & al., 2014) (Wang, ve diğerleri, 2010.).

Heterojen bir molekül sınıfı olan lncRNA'lar, kromatin modifiye edici komplekslerin (Wang & et al., 2015) veya transkripsiyon faktörlerinin (Chen & et al., 2016) alımında DNA, RNA veya proteinlerle etkileşime girerek veya endojen RNA'lar olarak hareket ederek çeşitli fonksiyonel roller oynar (Wang, ve diğerleri, 2010.) (Yuan & al., 2014). Farklı organizmalar, sınırlı ekspresyon paternleri ve karmaşıklık arasında sınırlı dizi korunmasına bakılmaksızın, lncRNA'ların, çoklu biyolojik süreçlerin düzenlenmesindeki önemli fonksiyonel rolleri nedeniyle daha yüksek evrilmiş organizmaların gelişimsel karmaşıklıklarını anlamamıza yardımcı olduğu gösterilmiştir (Mercer, Dinger, & Mattick, 2009) (Taft, Pheasant, & Mattick, 2007) (Pang, Frith, & Mattick, 2006).

2016 yılında yapılan bir derlemede, yeni tanımlanan bir lncRNA'yı tanımlamak ve karakterize etmek için kullanılacak bazı araştırma teknikleri özetlenmiştir (Kashi, Henderson, Bonetti, & Carninci, 2016). Belirli bir lncRNA tanımlandıktan sonra araştırmacıların bu RNA'ların biyogenezi, genomik yeri,

protein olmayan kodlama potansiyeli, ekspresyon seviyesi, boyutu ve birincil yapı ve ikincil yapı, lokalizasyonu ve biyolojik fonksiyonu gibi özelliklerini saptayabileceği bildirilmiştir. (Kashi, Henderson, Bonetti, & Carninci, 2016).

### **2.3.1.3. Uzun Kodlamayan RNA'ların Biyolojik Fonksiyonu**

LncRNA'nın biyolojik fonksiyonunun incelenmesi kritiktir, çünkü lncRNA'ların gelişimsel süreçlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Amaral & Mattick, 2008) ve lncRNA'ların düzensizliği hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Esteller, 2011). ncRNA'lar proliferasyon, apoptoz ve gen ekspresyonunu düzenleyerek farklılaşma, mRNA splicing gibi birçok biyolojik süreçle ilişkili olduğu bulunmuştur. (Kim, ve diğerleri, 2015)

### **2.3.1.4. Kanserde Uzun Kodlamayan RNA'lar**

Birçok lncRNA'nın, Alzheimer hastalığı, şizofreni, hipertansiyon ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı belirlenmiştir (Harries, 2012) ve bu lncRNA'ların kanserdeki rollerini belirleyebilmek için son dönemlerde yoğun bir şekilde araştırmalar yapılmaktadır. LncRNA'ların düzensizliği ve diğer biyolojik moleküller ile etkileşimleri sonucu meydana gelen değişiklikler, gen ekspresyonunu ve kanserde önemi belirtilen çeşitli yolların aktive veya inaktive olmasını sağlayabilmektedir. LncRNA'ların, sindirim, solunum, üreme, idrar, iskelet ve santral sinir sistemi gibi birçok sistemi içeren kanserlerle ilişkileri saptanmıştır (Zhang, Xia, Lu, Zhang, & Zhu, 2016). Bu lncRNA'lar farklı kanserlerde rol oynamaktadır. Ayrıca, bazı kanserlerde tümör genesise veya tümörün progresyonuna katkıda bulunan birden fazla lncRNA vardır. LncRNA HOTAIR, migrasyon ve invazyonu aktive ederek tümör genesisten sorumlu vasküler epitelyal büyüme faktörü (VEGF), matris metalloproteinaz 9 (MMP-9) ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilgili genlerin upregüle edilmesiyle insan serviks kanserinin ilerlemesinde rol oynamıştır (Kim, ve diğerleri, 2015) . HOTAIR'in aşırı ekspresyonu primer meme kanseri tümörlerinde de bulunmuştur, ancak en sık metastatik tümörlerde bulunur (Gupta, ve diğerleri). HOTAIR'in aşırı ekspresyonu, metastatik progresyona yol açan H3 lizin 27 trimetilasyonuna ve polycomb baskılayıcı kompleksi 2'nin

(PRC2) genomik yer değiştirmesine neden olduğu bildirilmektedir (Gupta & al., 2010). ANRIL (INK4 lokusundaki antisens kodlayıcı olmayan bir RNA) over kanseri (SOC) dokularında aşırı eksprese edilmektedir; yüksek ANRIL seviyelerinin lenf nodu metastazı ve SOC'de kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Qiu, ve diğerleri, 2015). LncRNA SRA'nın (steroid reseptör aktivatörü) artan ekspresyonu meme kanseri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir; ayrıca lncRNA SRA'daki polimorfizmlerin meme gelişimindeki östrojen reseptörlerini etkilediği ileri sürülmüştür (Yan, ve diğerleri, 2016). Meme kanseri hücrelerindeki östrojenle uyarılan hücre büyümesinin de lncRNA H19'dan etkilendiği, MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında büyümeyi destekleyen H19 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Sun, ve diğerleri, 2015). Çeşitli çalışmalar, lncRNA MALAT1 (metastazla ilişkili akciğer adenokarsinom transkript 1) ekspresyonunun akciğer kanserlerinde arttığını göstermiştir (Feng, ve diğerleri, 2019) (Gutschner, ve diğerleri, 2013) (Li, Mei, Hu, & Zhang, 2018); metastatik gen ekspresyonunu (Gutschner, ve diğerleri, 2013) düzenleyerek, miR-124 ekspresyonunu modüle ederek (Li, Mei, Hu, & Zhang, 2018) ve miR-200a süngerimsi yoluyla gefitinib direncini düzenleyerek hastalık ilerlemesine katkı sağladığı saptanmıştır (Feng, ve diğerleri, 2019). Safra kesesi kanserlerinde MALAT1 ekspresyonunun arttığı ve tümör supresör bir rol oynayan miR-206'yı suprese ederek kansere neden olabilecek onkojenik bir rol oynadığı bildirilmiştir (Wang, ve diğerleri, 2016).

H19 da mesane kanserlerinde upregüle olarak EZH2 (zeste homolog 2'nin bir arttırıcısı) ile etkileşir ve E-cadherin'i (hücreden hücreye yapışmada önemli bir molekül) inhibe ederek metastazı teşvik edebilir (Luo, ve diğerleri, 2013). XIST lncRNA'nın mesane kanserlerinde rol oynadığı ve mesane kanseri dokularında artmış androjen reseptör seviyeleri ile birlikte ekspresyonunun upregüle edildiği bulunmuştur. Artan XIST ve androjen reseptör seviyeleri, mesane kanserinin daha kötü bir tümör, nod, metastaz (TNM) evresi ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, lncRNA XIST'in parçalanması, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunun azalmasına neden olmuştur (Xiong, ve diğerleri, 2017). LncRNA XIST'in glioblastomun (yaygın ve agresif bir beyin tümörü) progresyonuna katkıda bulunduğu ve glioblastom kök

hücreleri ve dokularında upregüle olduğu bulunmuştur (Yao, ve diğerleri, 2015). LncRNA MEG3'ün (maternal olarak eksprese edilen gen 3) aşırı ekspresyonunun, hepatosellüler karsinom (HCC) hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalttığı ve HCC hücreleri ve dokularında downregüle olduğu bulunmuştur (He, ve diğerleri, 2017). MEG3'ün aşırı eksprese edilmesinin miR-664'ü suprese ederek, HCC'de bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören, HCC hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eden ADH4 geninin transkripsiyonunu ve translasyonunu sağladığı saptanmıştır (He, ve diğerleri, 2014). Akut miyeloid lösemide (AML) (M4 ve M5 alt tipleri) ve kolon kanserlerinde LncRNA CCAT1 (kolon kanseri ile ilişkili transkript 1) ekspresyonu artmaktadır (Alaiyan, ve diğerleri, 2013) (Chen, Wang, Cao, Li, & Wang, 2016). AML'de artan CCAT1 ekspresyonu, hücre proliferasyonunu artırır ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören ve AML'de upregüle edilen miR-155'i bağlayarak miyeloid hücrelerin farklılaşmasını inhibe eder ve c-Myc ekspresyonunu kontrol eder (Chen, Wang, Cao, Li, & Wang, 2016). Kolon kanserlerinde, CCAT1'in aşırı ekspresyonu kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna ve invazyonuna neden olur ki bu durumda hasta dokularında evre, lenf nodu metastazı ve sağkalım süresi ile anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. c-Myc'in ayrıca kolon kanserlerinde CCAT1 transkripsiyonunu ve ekspresyonunu teşvik ettiği bulunmuştur (He, ve diğerleri, 2014). CCAT1'in, mide kanserinde upregüle edilmesiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunun ve migrasyonunun arttığı bildirilmiştir. CCAT1 aşırı ekspresyonu, primer tümörlerin büyümesi, lenf nodu metastazı ve metastatik hastalık ile de ilişkilidir; c-Myc, mide karsinomundaki ekspresyonunu etkiler (Yang, ve diğerleri, 2013). Onkojenik veya tümör baskılayıcı kapasitelerde olası ilişkilerin ve katkıların ana hatlarını çizerek, kanserlerde diğer birçok lncRNA tanımlanmıştır ve tanımlanmaya devam etmektedir.

### **2.3.2. Onkogenik Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA FAM83H-AS1 (Onco-lncRNA-3)**

2014 yılında, genomdaki FAM83H-AS1, ENST00000533004, ENST00000534398 ve ENST00000435097'nin bir kısmını içeren LCAL7'nin

(akciğer kanseri ile ilişkili uzun kodlayıcı olmayan RNA 7) ilk olarak akciğer adenokarsinomu (LUAD) ve akciğer yassı epitel hücreli karsinom da (LUSC) kontrollere kıyaslandığında up regüle olduğu belirtilmiştir. LCAL7, bir akciğer kanseri hücre hattında LCAL7 sekansı ve chr8: 144,823,553-144,828,510'da bulunur ve GenBank'ta kayıtlara geçmiştir (erişim numarası: KF773847) (White, ve diğerleri, 2014). Genel olarak, LCAL7 (bir kısmı FAM83H-AS1 içerir) akciğer kanserinde up regüle edilmektedir.

2015 yılında, 'FAM83H-AS1' ekspresyonu, tümörlerden ve normal dokulardan açık erişimli TCGA RNAseq verileri kullanılarak ayrıca analiz edilmiştir. LncRNA FAM83H-AS1'in, meme invaziv karsinomu (BRCA), kolorektal ve rektal kanser (CRC), akciğer adenokarsinomu (LUAD) ve akciğer skuamöz hücreli karsinomda (LUSC) up regüle edildiği belirlenmiştir. LncRNA FAM83H-AS1'in mesane ürotelyal karsinomunda (BLCA), böbrek renal hücre karsinomunda (KIRC) veya uterin korpus endometriyal karsinomda (UCEC) değiştiği saptanmamıştır. Fonksiyonel olarak, LncRNA FAM83H-AS1, hücre döngüsü regülasyonunda yer alan birçok protein kodlayıcı gen ile birlikte ifade edildiğinden, FAM83H-AS1'in hücre döngüsü progresyonunda rol oynadığı tahmin edilmektedir. LncRNA FAM83H-AS1'in, kanserde S-faz hücre döngüsünde rol oynadığı gösterilmiştir. (Cabanski, ve diğerleri, 2015). Bu çalışmada, lncRNA FAM83H-AS1'in meme kanseri, kolorektal kanser ve akciğer kanserinde up regüle olduğu ve hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynadığı bulunmuştur.

Yang ve arkadaşları FAM83H-AS1'i meme kanseri dokularını normal dokularla kıyaslandığında, meme kanseri dokularının RNA-seq analizlerinde en fazla up regüle olan lncRNA olarak tanımlamıştır. Ek olarak, 626 meme kanseri örneğinin 105 kanserli olmayan meme dokusu kıyaslandığında, kanserli dokularda önemli ölçüde daha yüksek bir FAM83H-AS1 ekspresyon düzeyi gösterilmiştir. Luminal tip meme kanseri 'The Cancer Genome Atlas' TCGA verilerinin analizi, daha yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonunun daha düşük genel sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Meme kanseri hastalarının TCGA kohortunun (tüm alt tipleri içeren) analiz edilmesi, daha düşük genel sağkalım ile ilişkili yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonunu ortaya

çıkarmıştır (Yang, ve diğerleri, 2016). Bu nedenle FAM83H-AS1'in meme kanserinde bağımsız bir prognostik belirteç olabileceği düşünülmektedir.

LncRNA'ların diferansiyel ekspresyonu için çoklu kolorektal kanser mikroarray analizinde, FAM83H-AS1'in, komşu normal dokulara kıyasla kolorektal kanser (CRC) dokularında up regüle olduğu gösterildi. İnsan kolorektal kanser hücre dizilerinin daha ayrıntılı analizinde, analiz edilen bir hücre hattı hariç hepsinde FAM83H-AS1 ekspresyon artışı doğrulanmıştır. CRC hastalarında yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonu, düşük FAM83H-AS1 ekspresyonuna sahip olanlardan daha zayıf genel sağkalım ile korelasyon göstermiştir (Yang, Xu, Wang, Wang, & An, 2016). FAM83H-AS1'in, kolorektal kanser hastalarında da potansiyel bir prognoz biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

TCGA'da LUAD dokularının RNA-seq analizi kontrollerle kıyaslandığında FAM83HAS1'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı soydaki bitişik normal dokuya karşı tümörde FAM83H-AS1 ekspresyonunu analiz eden diğer çalışmalarda, LUAD, akciğer büyük hücreli karsinom (LULC), LUSC, mesane kanseri, meme kanseri, mide kanseri, kafa ve boyun kanseri ve prostat kanserinde FAM83H-AS1 'in ekspresyon artışı önemli bulunurken böbrek kanseri, karaciğer kanseri ve tiroid kanserinde önemli bir fark gözlemlenmemiştir (Zhang, ve diğerleri, 2017). Farklı bir çalışmadan elde edilen veriler, TCGA'daki gastrik kanser hastalarının FAM83H-AS1'in ekspresyonunun da farklılık ortaya koymadığını göstermiştir (Baratieh, ve diğerleri, 2017). Akciğer kanseri hastalarında, yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonu, daha kötü sağkalım ile korelasyon göstermiştir. Akciğer kanseri hücre hatlarında FAM83H-AS1 ekspresyonunun baskılanması, proliferasyon, migrasyon ve invazyonun yanı sıra hücre döngüsünün S fazındaki hücrelerin yüzdesini de azaltmıştır. FAM83H-AS1 öncelikle akciğer kanseri hücrelerinin çekirdeğinde lokalize olarak bulunmaktadır. Akciğer kanseri hücre hatlarında FAM83H-AS1'in susturulması, MET, EGFR ve bunların alt proteinleri AKT ve ERK1 / 2'nin protein ekspresyonunu azaltmıştır. Özellikle, FAM83H-AS1'in susturulması MET'in transkripsiyonel ve translasyon düzeyinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Zhang, ve diğerleri, 2017). Akciğer kanserinde

FAM83H-AS1, potansiyel olarak bir hücre proliferasyonu ve invazyonu ile ilişkili MET / EGFR sinyalini etkileyen prognostik bir belirteç veya terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Pankreas adenokarsinom duktal tipinde (PDA) TCGA'daki RNA-seq verileri, diferansiyel lncRNA ekspresyonu için analiz edilmiştir. FAM83H-AS1 ve yakınındaki protein kodlayan gen FAM83H muhtemelen aynı promotör bölgesini paylaşır, ancak zıt yönlerde kopyalanır. FAM83H-AS1, PDA'da sıklıkla amplifiye edilen bir genomik bölgede bulunur (8q23.3-8q24.3) ve ekspresyonu aslında amplifikasyon ile önemli ölçüde ilişkilidir. Analiz sonucunda dört eksona sahip olduğunu ve pankreas kanseri hücre hattında aktif olarak transkripsiyona uğramış bir bölgede bulunduğu gösterilmiştir. FAM83H-AS1 ekspresyonunun PDA hücre hatlarında ve ayrıca bir meme kanseri hücre hattında up regüle olduğu gösterilmiştir. Klinik olarak FAM83H-AS1'in yüksek ekspresyonu, PDA'da daha düşük genel sağkalım ile ilişkilidir. İki farklı siRNA (siRNA1 ve siRNA2) tarafından bir pankreas kanseri hücre hattında FAM83H-AS1'in susturulmasıyla hücrelerde farklı şekilde eksprese edilen 719 gen ortaya çıkarılmıştır. Regulator network analizi 146 FAM83H-AS1 genini (78 pozitif / aktif ve 68 negatif / inhibe edilmiş) öngördü. Bu genlerden negatif olarak düzenlenen hedefler daha iyi huylu süreçlerle ilişkiliyken, pozitif olarak düzenlenen hedefler daha kötü huylu süreçlerle ilişkili bulunmuştur (Arnes, ve diğerleri, 2018). Bu nedenle, FAM83H-AS1'in pankreas kanserinin progresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Bi ve arkadaşları FAM83H-AS1'in, glioma dokularında ve hücre hatlarında up regüle edildiğini saptayarak FAM83H-AS1 ekspresyonunun, tümör derecesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Yüksek FAM83HAS1 ekspresyonu olan hastalar, gliomada daha kötü genel sağkalım ile ilişkili olarak bulunmuştur. Araştırmacılar FAM83H-AS1 ekspresyonunun gliomada bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmada glioma hücrelerinde FAM83H-AS1'in aşırı ekspresyonu, hücre canlılığını ve koloni oluşumunu arttırmıştır. Glioma hücrelerinde FAM83H-AS1'in susturulması, hücre canlılığını, koloni oluşumunu, hücre döngüsünün S fazındaki hücrelerin yüzdesini ve sikline bağlı kinazları (CDK2, CDK4, CDK6)

azaltırken, glioma hücrelerinde hücrel apoptozu arttırmıştır. Ek olarak, glioma hücrelerinde FAM83H-AS1 öncelikle çekirdekte lokalizedir ve glioma hücrelerinde EZH2'ye bağlanarak p21 ekspresyonunun epigenetik transkripsiyonel düzenlemesine katkıda bulunur. P21 ekspresyonundaki azalma potansiyel olarak FAM83H-AS1 onkojenik fonksiyonuna katkıda bulunur (Bi, Shen, Quan, Jiang, & Xu, 2018). Birlikte, FAM83H-AS1, glioma hastalarında prognostik bir belirteç olabilir ve / veya terapötik olarak FAM83H-AS1 hedefli ilaçlar glioma hastalarını iyileştirebilir.

Kolorektal kanser (CRC) dokularında ve hücrelerinde FAM83H-AS1 ekspresyonu up regüle edilmiştir. CRC klinik hastalarında, FAM83H-AS1 ekspresyonu tümör evresi ve boyutu ile ilişkilidir ve FAM83H-AS1'in yüksek ekspresyonu azalmış toplam sağkalım ile ilişkilidir. Kolorektal kanser hücrelerinde FAM83H-AS1'in susturulması, proliferasyonun, invazyonun ve migrasyonun azalmasına neden olurken hücre apoptozunun artmasına sebep olmuştur. Ek olarak, FAM83H-AS1'in susturulması Notch1 mRNA ekspresyonunda bir azalmaya yol açmıştır. Kolorektal kanser hücrelerinin, Notch sinyal yolundaki (Notch1 dahil) reseptörleri ve ligandları bloke eden, yaygın olarak kullanılan bir gamma-sekretaz inhibitörü (DAPT) ile tedavisinin, FAM83H-AS1 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, FAM83H-AS1'in Notch yolağı yoluyla düzenlendiğini göstermektedir. (Lu, Dong, Zhao, & Liu, 2018) Genel olarak, kolorektal kanser dokularındaki FAM83H-AS1 ekspresyonunun analizi, kolorektal karsinomda bağımsız bir prognostik faktör olarak işlev görebilmektedir. Terapötik olarak FAM83H-AS1'i hedeflemenin, hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü ile ilişkili olan Notch sinyal yolağının düzenlenmesiyle klinik olarak destekleyici sonuçlara yol açabileceği düşünülmektedir.

Genel olarak, FAM83H-AS1 akciğer (Cabanski, ve diğerleri, 2015) (White, ve diğerleri, 2014) (Zhang, ve diğerleri, 2017), meme (Cabanski, ve diğerleri, 2015) (Yang, ve diğerleri, 2016) (Zhang, ve diğerleri, 2017), kolorektal (Cabanski, ve diğerleri, 2015) (Yang, ve diğerleri, 2016) (Lu, Dong, Zhao, & Liu, 2018), pankreatik (Arnes, ve diğerleri, 2018), glioma beyin (Bi, Shen, Quan, Jiang, & Xu, 2018), mesane (Zhang, ve diğerleri, 2017), prostat (Zhang, ve

diğerleri, 2017) kanserlerinde up regüle edilmektedir. FAM83H-AS1 ekspresyonunun, bazı gastrik kanser (Zhang, ve diğerleri, 2017) ve HNSCC (Zhang, ve diğerleri, 2017) çalışmalarında up regüle olduğu belirlenmiş ve bu çalışmaları doğrulayan başka bir çalışmada da gastrik (Baratieh, ve diğerleri, 2017) ve HNSCC (Cabanski, ve diğerleri, 2015) dokularında ekspresyon artışı saptanmıştır. Dolayısıyla, FAM83H-AS1 potansiyel olarak bu kanserlerde tanısal bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. FAM83H-AS1'in yüksek ekspresyonu, meme (Yang, ve diğerleri, 2016), kolorektal (Yang, Xu, Wang, Wang, & An, 2016), akciğer (Zhang, ve diğerleri, 2017), pankreatik (Arnes, ve diğerleri, 2018), ve glioma beyin (Bi, Shen, Quan, Jiang, & Xu, 2018) kanserlerinde daha kötü genel sağkalım ile ilişkilidir; bu nedenle FAM83H-AS1 potansiyel olarak bu kanser türlerinde prognostik bir belirteç olabilir. FAM83H-AS1 esas olarak pankreas kanseri hücrelerinde (Arnes, ve diğerleri, 2018) epitelde ve özellikle akciğer kanseri (Zhang, ve diğerleri, 2017), glioma beyin kanseri (Bi, Shen, Quan, Jiang, & Xu, 2018) hücrelerinde çekirdekte lokalizedir. Ayrıca FAM83H-AS1, kolorektal kanserde Notch sinyal yolağını (Lu, Dong, Zhao, & Liu, 2018), akciğer kanserinde MET / EGFR sinyal yolağını ve gliomada (Bi, Shen, Quan, Jiang, & Xu, 2018) p21 ekspresyonunu düzenlemektedir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Real-time PCR (Rotor Gene Q 6000, Qiagen; Almanya)
- Real-time PCR Kabini (Biosan; Türkiye)
- Thermal Cyclers (Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems; ABD)
- Nanodrop spektrofotometresi (Maestro Gen; Tayvan)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Nüve; Türkiye)
- Invert (ters) mikroskop (Bes Scope; ABD)
- Santrifüj (Nüve; Türkiye)
- Mikro santrifüj (Sigma; ABD)
- Mikro hacimli spektrofotometre (BMG Labtech; Almanya)
- Biyogüvenlik kabini (Bilser class II; Türkiye)
- Otomatik pipetler (10 µl, 200 µl ve 1000 µl) (Gilson; ABD)
- Buzdolabı (Arçelik; Türkiye)
- Derin dondurucu (Uğur; Türkiye)
- Vorteks (WiseMix; Kore)
- -80 °C Dondurucu (Nüve; Türkiye)
- Strip tüp (0,1mL, Qiagen; Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 218; Türkiye)
- Flask (25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>, Nest; Çin)
- Steril pipetler (5 ml ve 10 ml, Sarstedt; Almanya)
- Steril polipropilen test tüpleri (15 ml ve 50 ml, Nest; Çin)
- Steril mikrosantifüj tüpleri (1,5 ml ve 0,2 ml, Isolab; Almanya)
- Çeşitli ebatlarda erlen, beher, cam pipet ve mezürler (Teknik cam, Türkiye)
- Otomatik pipet uçları (Sarı, mavi ve beyaz, Gilson; ABD)

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

- LPH02105A Katalog Numaralı FAM83H-AS1 Primeri (Qiagen; Almanya)
- 100128338 Katalog Numaralı FAM83H-AS1-siRNA (Dharmacon; ABD)
- DMEM (Hyclone; ABD)
- Fosfat Tamponu (Hyclone; ABD)

- Fötal Sığır Serum (Hyclone; ABD)
- Penicillin-Streptomycin (Capricorn; Almanya)
- Tripsin-EDTA (Hyclone; ABD)
- XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5 karboksilik -anilid) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck, Almanya)
- Etil alkol (Merck, Almanya)
- RNA izolasyon kiti (GeneAll Hybrid-RTM Kit, Güney Kore)
- cDNA sentez kiti (WizScript™ Kit, Güney Kore)
- RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen; Almanya)
- Transfeksiyon Çözeltisi (ABT; Türkiye)
- PPH00150F Katalog Numaralı GAPDH Primeri (Qiagen; Almanya)

### **3.3. Meme kanseri Hücre Hattı**

Projeye başlamadan önce Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruldu ve 30.07.2018 tarih ve "2018-07/13" karar numarası ile etik kurul onayı alındı. Meme kanserinde lncRNA FAM83H-AS1 en yüksek ekspresyon seviyesine luminal tipte ulaşılmıştır (Yang F. , ve diğerleri, 2016). Bu nedenle luminal tip meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 seçildi.

Çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücre hatları için, %10 fötal sığır serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM (%1 oranında L-glutamine'li) besiyeri kullanıldı. Hücreler 37°C 'de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde çoğaltıldı.

#### **3.3.1 Meme Kanseri Hücre Hattının Çoğaltılması ve Pasajlanması**

Kriyo tüp içinde -80°C'de dondurulmuş MCF-7 hücreleri, sıcaklığı 37°C 'ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözdürüldü. Ardından kriyotüp içeriği 15 ml 'lik falkon tüpe alınarak, 5 ml yukarıda içeriğini verdiğimiz besiyeri ilave edildi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, peletin üzerine 5 ml besiyerinden eklenerek, peleti oluşturan hücreler süspanse edilerek ve 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara aktarıldı. Flaskların etüvde inkübasyona bırakılmasını

müteakiben, ilk gün 24 saat sonrasında, sonraki günlerde 48 saatte bir, besi ortamları yenilendi. Hücreler bütün flask yüzeyini yoğun bir şekilde (%80) kaplamışsa başka flasklara pasaj yapıldı, kaplamamışsa flasktaki atık besiyeri ortamı değiştirilerek yüzen ölü hücreler uzaklaştırıldı ve flask etüvde inkübasyona bırakıldı.

Çoğaltılmakta olan hücreler, kültür flaskının yaklaşık %80'ini kaplayan yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Pasajlama için, hücre kültür flaskının içerisindeki tüm besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklendi, yıkama işlemi gerçekleştirilip PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Flasktaki hücrelerin üzerine 1 ml tripsin ilave edilip flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübatörden alınan flasklar inverted mikroskopla incelenip, tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığının kontrolü yapıldı. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra, flaska 1 ml besiyeri ilave edilerek tripsin aktivitesi inhibe edildi ve flasktaki karışım 15 ml 'lik falcon tüpe alınarak 5 dakika 1500 rpm 'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenip hücreler süspansen hale getirildi. Süspansen hale gelen hücrelerin thoma lamında sayımı gerçekleştirildi. Sayımı yapılan hücreler, uygun hücre yoğunluğunda, flasklara ekimleri yapılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Hücreler çoğaldığında, birinci dönem için deneyde kullanılmayacak kısmı donduruldu. Sayımı yapılmış olan süspansen haldeki hücreler, falcon tüpte 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, sonrasında supernatant uzaklaştırıldı. Pelet, dondurma ortamında (9 ml 0,22µm boyutundaki filtreden geçirilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılarak hazırlanmış) pipetaj yapılarak süspansen edildi (1 ml 'lik ortam içinde, yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre). Dondurma ortamı içindeki hücreler, her kriyotüpe 1ml düşecek şekilde dağıtıldı ve -80°C 'lik derin donduruculara saklanmak üzere kaldırıldı.

### **3.4 RNA İzolasyonu**

RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti (GeneAll Hybrid-RTM Kit, Güney Kore) kullanıldı. Kitin kullanım protokolüne uygun olarak izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

### 3.4.1 MCF-7 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu

- Flaskdaki  $1 \times 10^7$  hücre sayısı başına 1 ml RiboEx™ çözeltisi flaska aktarılarak hücreler lizis edildi. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve steril ependorf tüpe aktarıldı.
- Homojenatın üzerine, her 1 ml RiboEx™ çözeltisi başına 200µl kloroform eklendi. Karışım 15 saniye güçlü bir şekilde karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Ependorf tüpteki karışım, 4°C ve 12000xg 'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst şeffaf olan faz(süpernatant) bir diğer steril ependorf tüpe aktarıldı.
- Ependorf tüpe süpernatantın 1/1 oranında RPI tamponundan eklendi ve 700 µl'lik karışım mini kolona aktarıldı.
- Mini kolon 30 saniye 10000xg 'de santrifüj edildi ve kolonun altındaki elüt uzaklaştırıldı.
- Mini kolonun üzerine SWI tamponundan 500 µl eklendi.
- Mini kolon 30 saniye 10000xg 'de santrifüj edildi ve kolonun altındaki elüt uzaklaştırıldı.
- Mini kolonun üzerine RNW tamponundan 500 µl eklendi ve mini kolon yine 30 saniye 10000xg 'de santrifüj edildi ve kolonun altındaki elüt uzaklaştırıldı.
- Mini kolon yeni bir steril ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenip, ependorf tüp 1 dakika 10000xg 'de santrifüj edilerek total RNA elüe edildi.
- Elde edilen RNA'nın 1-2 µl kadarı RNA saflık ve konsantrasyon ölçümünde kullanıldı. Kalan kısım uzun süreli saklanmak üzere -20 °C'lik dondurucuya kaldırıldı.

### 3.4.2 RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

RNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi için nanodrop spektrofotometresi kullanıldı. İzole edilen RNA örneklerinin A260/A280 oranının 2 civarında olmasına dikkat edildi.

### 3.5 cDNA Sentezi

Örneklerden elde edilen RNA'lardan, cDNA sentez kiti (WizScript™ Kit, Güney Kore) kullanılarak cDNA sentezlendi. Tablo 3.1'de verildiği gibi cDNA sentez reaksiyonu için toplam hacim 10 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3. 1** cDNA sentez reaksiyonu için reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon bileşeni	Her bir örnek için eklenecek miktar (µl)
10X Reaksiyon Tamponu	2
20X dNTP Karışım	1
Hekzamer	2
WizScript™ RTaz	1
RNAaz İnhibitörü	0,5
Nükleaz içermeyen su	3.5
<b>Toplam hacim</b>	<b>10</b>

Tabloya uygun şekilde hazırlanan 10 µl reaksiyon karışımının üzerine, 10 µl izole edilmiş olan RNA örneğinden eklendi ve son karışım 25°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından, karışım 37°C 'de 120 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak karışım 85°C 'de 5 dakika inkübasyona bırakılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C 'lik dondurucuya kaldırıldı.

### 3.6 Gen İfadesi Analizi

Sentezi gerçekleştirdiğimiz cDNA örneklerinde real-time PCR yöntemi kullanılarak FAM83H-AS1'in gen ifadesi analizi yapıldı. FAM83H-AS1 genine spesifik PCR ürünü oluşturmak için, sıcaklık profilleri üretici firma tarafından optimize edilmiş primerler (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Referans gen primeri olarak da GAPDH geni primeri (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

### 3.6.1 Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Her bir PCR reaksiyon karışımı toplam hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 3.2’de belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3. 2** Her bir örnek için PCR karışımı

PCR bileşenleri	Her bir örnek için eklenecek miktar (µl)
<b>SYBR® Green Mastermix</b>	12.5
<b>Primer</b>	1
<b>cDNA</b>	1
<b>Nükleaz içermeyen su</b>	10.5
<b>Toplam Hacim</b>	25

Hazırlanan PCR karışımı real-time PCR cihazına yerleştirilerek Tablo 3.3’de gösterilen DNA amplifikasyon koşullarına göre her bir genin amplifiye edilmesi sağlandı. Real-time PCR reaksiyonu sonrasında amplifiye edilen PCR ürünlerinin spesifikliği erime eğrisi analizi yoluyla teyit edildi.

**Tablo 3. 3** DNA amplifikasyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Açıklamalar
<b>Başlangıç aktivasyonu</b>	95 °C	10 dk.	HotStarTaq Plus DNA Polimerazı aktive eder
<b>Denatürasyon</b>	40	95 °C	15 sn
<b>Uzama</b>	döngü	60 °C	60 sn Floresan veri birikimi sağlar.

### 3.6.2 Gen İfadesi Verilerinin Analizi

Gen ifadesi analizine ait tüm RT-PCR sonuçları, Rotor-Gene 6000 Series Software Version 1.7 yazılımı ile kantite edildi. Verilerin  $\Delta\Delta CT$  metodu ile istatistiksel analizi “RT<sup>2</sup> profiler RT-PCR Array Data Analysis Version 3.5” yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.7 siRNA Havuzu ile FAM83H-AS1'in Susturulması ve Susturma İşleminin Başarısının Ortaya Konulması

FAM83H-AS1'i susturacak (Knockdown işlemi) siRNA havuzu (siRNA; 5nmol) ve negatif kontrol siRNA'sı (siRNA; 5nmol) hazır olarak satın alındı. Gen susturma işlemi aşamasında;

1. siRNA ile gen susturma işlemine tabi tutulmayan meme kanseri hücreleri
2. Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen meme kanseri hücreleri
3. Dizayn edilen FAM83H-AS1-siRNA havuzu ile transfekte edilen meme kanseri hücrelerinin olduğu 3 farklı hücre hattı kullanıldı.

Dizayn edilen FAM83H-AS1-siRNA havuzu ile gen susturma işlemine tabi tutulan hücrelerdeki uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1 düzeyi, negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler ve hiçbir işlem görmemiş hücrelerdeki uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1 düzeyi ile karşılaştırılarak susturma işleminin başarısı ortaya konuldu. İşlem sonunda, negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in düzeyi ile hiçbir işlem görmemiş hücrelerdeki uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in düzeyi arasında anlamlı bir fark olmamıştır.

Flasklarda %80 yoğunluğa ulaşmış olan meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu plaklara sırasıyla; %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen 2'şer ml DMEM besiyerlerinde  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nemli hava ortamında bir gece inkübe edildi. Pelet halindeki siRNA'lardan, üretici firmanın verdiği tabloya uygun şekilde siRNA buffer kullanarak 5  $\mu\text{M}$  siRNA stok solüsyonları hazırlandı. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuk için 2 ayrı ependorf tüpü hazırlandı. Birine A, diğerine B yazıldı. A tüpüne 5  $\mu\text{M}$  stok siRNA solüsyonundan, 10  $\mu\text{l}$  (25nM) eklendi ve FBS ile antibiyotik içermeyen DMEM ile 200  $\mu\text{l}$  'ye tamamlandı. B tüpüne 4  $\mu\text{l}$  transfeksiyon reaktifi eklendi ve FBS ile antibiyotik içermeyen DMEM ile 200  $\mu\text{l}$  'ye tamamlandı. A ve B tüpü karıştırılıp, 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 400  $\mu\text{l}$ 'lik transfeksiyon çözeltisine, %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen 1600  $\mu\text{l}$  DMEM besiyerlerinden eklenerek toplam hacim 2 ml'ye tamamlandı. Plakalardaki besiyeri ortamı kaldırılarak, hazırladığımız 2ml'lik

transfeksiyon ortamı kuyucuklardan birine aktarılarak, hücreler 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında 24 inkübasyona bırakıldı. Bu işlemler 6 kuyucuk için ayrı ayrı yapıldı. Sonrasında, FAM83H-AS1-siRNA havuzu veya negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücreler tripsinize edilerek toplandı. Ardından hücrelerin lizatları hazırlanıp RNA izolasyonu yapılarak elde edilen cDNA örnekleri RT-PCR proliferasyon analiz kiti tainlerinde ve gen susturma işleminin başarısının belirlenmesi amacıyla FAM83H-AS1’in 3 tekrarlı olarak ekspresyon analizinde kullanıldı.

### **3.8 Onkogenler ve Tümör Supresör Genler RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Kit Aracılığıyla Proliferasyon ile İlişkili Genlerin Gen İfadesi Profillerinin Belirlenmesi**

Dizayn edilen FAM83H-AS1-siRNA havuzunun transfekte edildiği hücreler ile negatif kontrol siRNA ‘sının transfekte edildiği hücrelerden, elde edilmiş olan cDNA örneklerinden, onkogenler ve tümör süpresör genler RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (Qiagen, Almanya) kiti aracılığıyla, proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme profilleri, kit protokolüne uygun şekilde analiz edildi. Proliferasyon ile ilişkili genlerin ifade edilme düzeyleri belirlendikten sonra, iki hücre tipinde bu genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar belirlendi.

Kit aracılığıyla ifade edilme düzeyleri belirlenen proliferasyon ile ilişkili genler; BAX, BCL2L1 (BCLXL), CASP8 (FLICE), CDK4, ELK1, ETS1, HGF, JAK2, JUNB, JUND, KIT (CD117), KITLG (SCF), MCL1, MET, MOS, MYB, NFKBIA (I $\kappa$ B $\alpha$ , MAD3), NRAS, PIK3CA (p110-alpha), PML, PRKCA, RAF1, RARA, REL, ROS1, RUNX1 (AML1), SRC, STAT3, ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1 (E-Cadherin), CDKN2B (p15INK4b), CDKN3, E2F1, FHIT, FOXD3, HIC1, IGF2R, MEN1, MGMT (AGT), MLH1, NF1, NF2, RASSF1, RUNX3, S100A4, SERPINB5 (maspin), SMAD4 (MADH4), STK11 (LKB1), TP73, TSC1, VHL, WT1, WWOX, XRCC1, BCR, EGF, ERBB2 (HER-2, NEU), ESR1 (ER $\alpha$ ), FOS, HRAS, JUN, KRAS, MDM2, MYC, MYCN, NFKB1, PIK3C2A, RB1, RET, SH3PXD2A, TGFB1, TNF, TP53 (p53), ABL1, CDKN2A (p16INK4a), CTNNB1, E2F1, MEN1, MYB, TGFB1, ZHX2 dir.

Verilerin  $\Delta\Delta C_T$  metodu ile istatistiksel analizi “RT<sup>2</sup> profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5” yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

### **3.9 Proliferasyon düzeylerinin belirlenmesi**

Dizayn edilen FAM83H-AS1-siRNA havuzunun transfekte edildiği hücreler ile negatif kontrol siRNA ‘sının transfekte edildiği hücrelerin proliferasyon düzeyi; 24, 48 ve 72. saat için ayrı ayrı olarak XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksilik-anilid) ticari kiti aracılığıyla belirlendi.

Proliferasyon düzeyinin tayini için, % 10 fotal sıgır serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonlarından ( $1 \times 10^5$  /ml hücre yoğunluğuna sahip), 96 kuyucuklu plaklara 100  $\mu$ l eklendi. Kontrol kuyucuğuna sadece besiyeri ortamından 100  $\mu$ l eklendi. XTT proliferasyon düzeyinin tayini, 3 tekrarlı olarak yapıldı ve bulunan değerlerin ortalaması alındı. Hücre proliferasyonunda zamana bağımlı etkinin araştırılabilmesi amacıyla tayin işleminin her örnek grubu için 24, 48 ve 72. saatlerde çalışıldı. Bu saatlerin sonunda her bir kuyucuğa 50  $\mu$ L aktive edilmiş XTT solüsyonu (49  $\mu$ L XTT Reaksiyon Solüsyonu ve 1  $\mu$ L Aktivatör Solüsyonu) eklendi. Plakalar, 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, plakalarda çalışılan grupların absorbans değerleri, ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okundu. Yüzde proliferasyon değeri, her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin, kontrol kuyucuğundaki optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı.

#### 4. İSTATİKSEL ANALİZ

Sonuçların istatistiki değerlendirilmesi SPSS (Statistical Packages of Social Sciences version 16.0 for Windows) programı ve  $\Delta\Delta C_T$  metodu ile “RT<sup>2</sup> profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5” yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. “p<0,05” değeri istatikselsel olarak anlamlı kabul edildi.

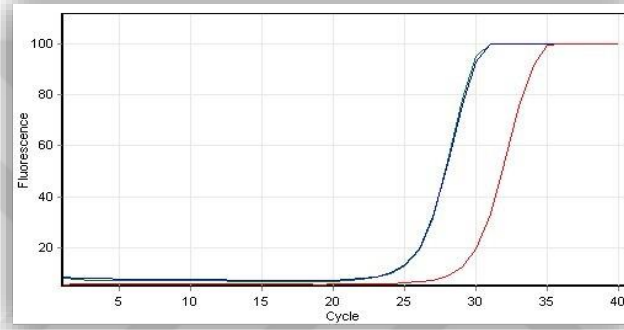
Çalışmamızdaki genlerin ekspresyonlarının verileri (ct değeri) kullanılarak iki grup arasındaki kat değişiminin “fold change” ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) hesaplanması için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi “Student’s T-test” kullanıldı.



## 5. BULGULAR

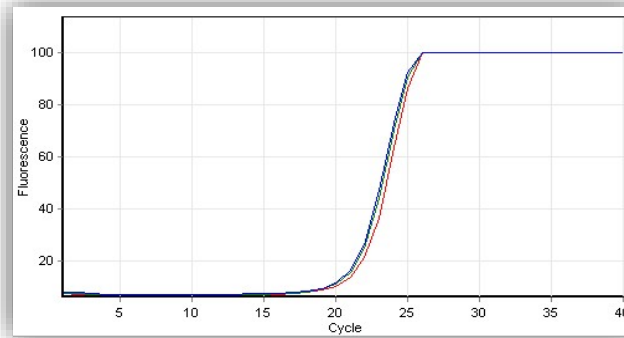
### 5.1. FAM83H-AS1'in Susturma İşleminin Başarısının Kontrolü

MCF-7 meme kanseri hücrelerine 25 nM FAM83H-AS1-siRNA ve 25 nM Kontrol-siRNA'ların uygulanmasından 24 saat sonra FAM83H-AS1'in ifade edilme düzeyleri belirlendi. FAM83H-AS1 geninin ifade düzeyleri RT-PCR cihazı kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu aracılığıyla rölatif kantitasyonla saptandı. Çalışmadan elde edilen FAM83H-AS1 gen amplifikasyonu eğrilerine ait örnek Şekil 5.1'de, iç kontrol olan GAPDH gen amplifikasyonu eğrilerine ait örnek ise Şekil 5.2 'de verildi.



**Şekil 5. 1** FAM83H-AS1 gen amplifikasyonu örnek eğrileri.

Yeşil=MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mavi=Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri, Kırmızı=FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri.

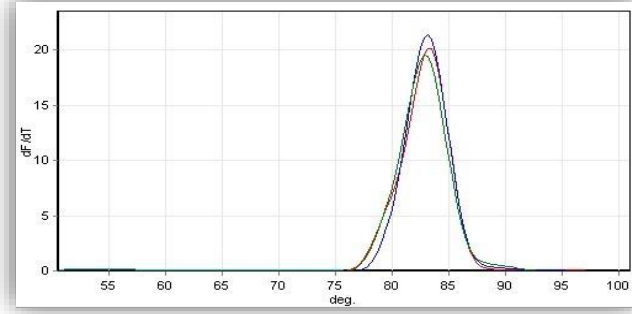


**Şekil 5. 2** GAPDH gen amplifikasyonu örnek eğrileri.

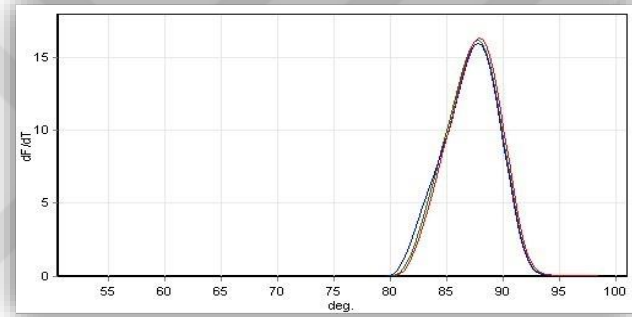
Yeşil=MCF-7 hücre hattına ait eğri, Mavi=Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri, Kırmızı=FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait eğri.

Real-time PCR işleminin ardından amplifiye edilmiş olan PCR ürünlerinin spesifikliği erime eğrisi analizi yöntemi yardımıyla test edildi. Çalışmadan elde

edilen FAM83H-AS1'in erime eğrilerine ait örnek Şekil 5.3'de, iç kontrol olan GAPDH 'in erime eğrilerine ait örnek ise Şekil 5.4'de verildi.



Şekil 5. 3 FAM83H-AS1'e ait örnek erime eğrileri.



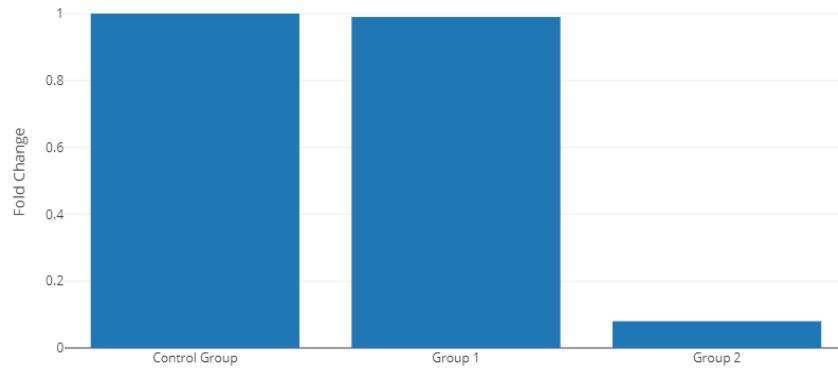
Şekil 5. 4 GAPDH'a ait örnek erime eğrileri.

RT-PCR cihazı yardımıyla her bir örnek için 3 tekrarlı elde edilen verilerden ortalama Ct değerleri hesaplandı. FAM83H-AS1 gen amplifikasyonu eğrileri için Threshold=0,020 olarak saptandı. İç kontrol olan GAPDH gen amplifikasyonu eğrileri için Threshold=0,030 olarak saptandı.

**Tablo 5. 1** Her bir örnek için genlerin ortalama Ct değerleri

	GEN ADI	
	FAM83H-AS1	GAPDH
MCF-7 hücre hattına ait ortalama Ct değeri	19,85	16,18
Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait ortalama Ct değeri	19,88	16,19
FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattına ait ortalama Ct değeri	23,64	16,39

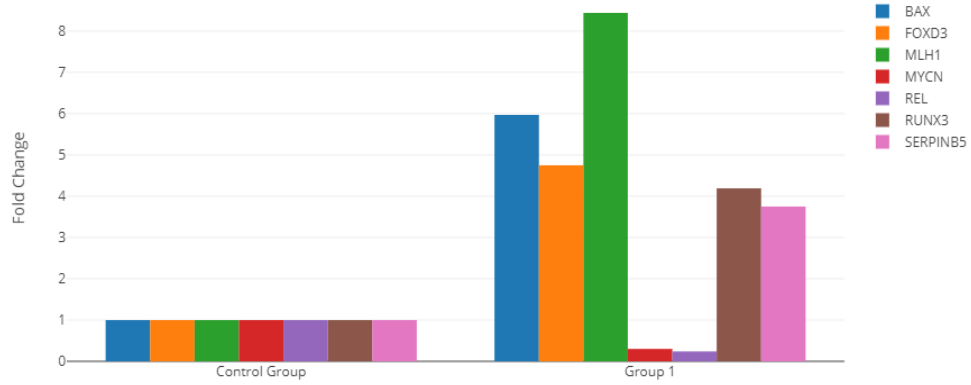
Ortalama Ct değerlerinden yararlanarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu aracılığıyla her bir örnek için FAM83H-AS1'in ifade edilme düzeyleri belirlendi. MCF-7 hücre hattı ile Kontrol-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattı arasında FAM83H-AS1'in ifade edilme düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Kontrol-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattı ile FAM83H-AS1-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattı arasında FAM83H-AS1'in ifade edilme düzeyleri karşılaştırıldığında, FAM83H-AS1-siRNA uygulamasının ardından FAM83H-AS1 'in ifadesinin %91 oranında susturulduğu saptandı (Şekil 5.5). Böylelikle siRNA aracılığıyla susturma işleminin başarısı ortaya konuldu.



**Şekil 5. 5** MCF-7 hücre hatlarında FAM83H-AS1 'in ifade edilme düzeyleri. Kontrol grubu=MCF-7 hücre hattı, Grup 1=25 nM Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı, Grup 2=25 nM FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı.

## 5.2. FAM83H-AS1'in Susturulmasının Onkogen ve Tümör Süpresör Genler Üzerine Etkisi

Kontrol-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattı ile FAM83H-AS1-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattından elde edilme cDNA örneklerinde, 84 adet onkogen ve tümör süpresör genin ifade edilme düzeyleri belirlendi. Çalıştığımız bu genlerden BAX, FOXD3, MLH1, MYCN, REL, RUNX3 ve SERPINB5 ifade edilme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.6) ve (Tablo 5.2).



**Şekil 5. 6** MCF-7 hücre hatlarında onkogen ve tümör süpresör genlerin ifade edilme düzeyleri.

Kontrol grubu=25 nM Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı, Grup 1=25 nM FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı.

FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı ile Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı tümör süpresör genlerin ifadesi bakımından kıyaslandığında; FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattında BAX ifadesi 5,97 kat, FOXD3 ifadesi 4,75 kat, MLH1 ifadesi 8,44 kat, RUNX3 ifadesi 4,19 kat ve SERPINB5 ifadesi 3,15 kat anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0,05$ ) (Tablo 5.2).

FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı ile Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı onkogenlerin ifadesi bakımından kıyaslandığında ise; FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattında

MYCN ifadesi 3,32 kat, REL ifadesi 4,32 kat anlamlı olarak azalmıştır (p <0,05) (Tablo 5.2).

**Tablo 5. 2** MCF-7 hücre hatlarında onkogen ve tümör süpresör genlerin ifade edilme kat regülasyonları.

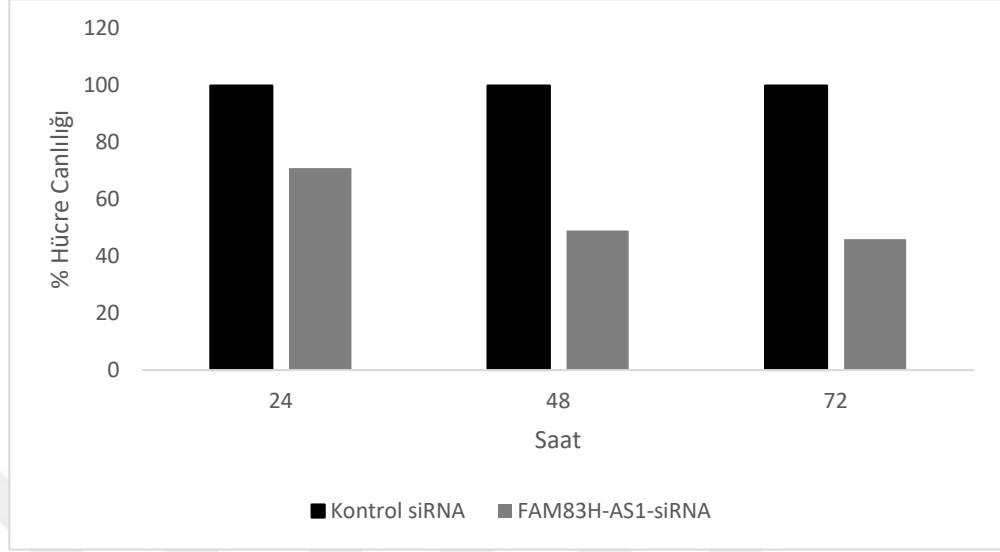
K=25 nM Kontrol-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı, S=25 nM FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hattı. K için iç kontrollerin ortalama Ct değeri 18,16 olarak saptanmıştır. S için ise iç kontrollerin ortalama Ct değeri 18,93 olarak saptanmıştır.

GEN ADI	Ortalama Ct değeri		Ortalama $\Delta$ Ct		Kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$		Kat Farkı
	K	S	K	S	K	S	
BAX	21,81	20	3,65	1,07	0,07988	0,47698	5,97
FOXD3	30,22	28,74	12,06	9,81	0,00024	0,00111	4,75
MLH1	30,70	28,39	12,54	9,46	0,000168	0,00142	8,44
MYCN	32,50	35	14,34	16,07	0,00005	0,00002	-3,32
REL	23,64	26,47	5,48	7,54	0,02247	0,00538	-4,18
RUNX3	22,50	21,20	4,34	2,27	0,04952	0,20762	4,19
SERPINB5	29,75	28,61	11,59	9,68	0,00033	0,00122	3,15

### 5.3. FAM83H-AS1'in Susturulmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

FAM83H-AS1'in meme kanserindeki biyolojik rolünün ortaya çıkarılması amacıyla, bu gen MCF-7 hücre hattında FAM83H-AS1-siRNA aracılığıyla susturuldu. MCF-7 hücrelerinde susturma işleminin 24, 48 ve 72 saat sonrası, hücre canlılığı XTT testi aracılığıyla değerlendirildi. Kontrol-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattı ile FAM83H-AS1-siRNA uygulanan MCF-7 hücre hattındaki hücre canlılık oranları karşılaştırıldı. FAM83H-AS1-siRNA grubundaki hücre

canlılığının 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla %71, %49 ve %46 olduğu saptandı (Şekil.5.7).



**Şekil 5. 7** FAM83H-AS1'in hücre proliferasyonu üzerine etkisi

FAM83H-AS1-siRNA uygulanmış MCF-7 hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki proliferasyonun anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, 72. saatte proliferasyonun anlamlı düzeyde azalmadığı saptandı ( $p > 0,05$ ). FAM83H-AS1-siRNA uygulamasının özellikle ilk 48 saatte hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil.5.7).

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser hastalığıdır. Her yıl yaklaşık 2,1 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmektedir ve kadınlar arasında kanserden ölümlerin en önemli sebebidir (Bray, ve diğerleri, 2018). 2018 yılında, dünyanın 5 bölgesinde (Amerika, Afrika, Avrupa, Asya ve Okyanusya) 2.088.849 kişi meme kanseri tanısı almış ve meme kanseri nedeniyle 626.679 kişi ise hayatını kaybetmiştir (Bray, ve diğerleri, 2018) (GLOBOCAN, 2018).

Amerikan kanser topluluğunun 2020 yılı verilerine göre ABD'de kadınlarda tanı alan 276.480 yeni invaziv meme kanseri ve 48.530 duktal karsinom (DCIS) vakası olacağı öngörülmüştür ayrıca 2020 yılında yaklaşık olarak 42.690 meme kanseri ölümü (42.170 kadın, 520 erkek) meydana geleceği tahmin edilmektedir (American Cancer Society, 2020). Meme kanserinin erken evrelerde teşhis ve tedavi edilmesi sağ kalım oranını arttırmaktadır. İnvaziv meme kanseri teşhisi alan kadınlar için 5 ila 10 yıl içindeki sağ kalım oranları sırasıyla %91 ve %84'tür. Olguların yüzde altmış ikisi lokalize bir aşamada (memeye sınırlı, lenf düğümlerine yayılma yok) teşhis edilmektedir ve bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranının %99 olduğu belirtilmiştir (American Cancer Society, 2020). Sonuç olarak, meme kanseri erken evrede teşhis edilen bireylerde ölüm oranı düşük olmasına rağmen, ileri evrede teşhis alan hastaların ölüm oranları yüksektir. Bundan dolayı meme kanseri nedeniyle meydana gelen ölümleri azaltabilmek için yeni terapötik yöntemlerin bulunması büyük (Birney, ve diğerleri, Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project., 2007) önem arz etmektedir. Ayrıca kansere ya da kanserin kötü prognozuna sebep olan genetik fonksiyonların belirlenmesi, gelecek adına yeni tedavi edici ajanların geliştirilmesinde öncü çalışmalar olacaktır.

Genel olarak, DNA'daki genomik bilgilerin RNA'ya aktarıldığı ve son ürün olarak proteinlerin sentezlendiği, moleküler biyolojinin santral dogması temelinde biyomedikal araştırmalar yapılmıştır. 2007 yılında DNA Elementleri Ansiklopedisi (ENCODE), insan genomunun %80'inden fazlasının transkribe olduğunu göstermiştir, ancak bu moleküllerin %3'ünden daha azı protein olarak

sentezlenmiştir (Consortium, 2011). Bu yeni keşfedilmiş çok sayıda kopyalanmış RNA, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak sınıflandırılmıştır. İnsan genomu tarafından kodlanan 30.000 protein kodlayan genin yanı sıra hücresel yolların yeni regülatörlerini tanımlamak için araştırmacılar ncRNA'lara odaklanmıştır. Tek bir ncRNA, birçok farklı hücresel yolda yer alan birçok farklı geni düzenleyebilmektedir, bu nedenle bu bireysel ncRNA'ların rollerini daha ayrıntılı olarak incelemek önem arz etmektedir.

NcRNA ekspresyonları, kanser ile ilişkili çeşitli hücresel süreçlerle değişiklik göstermiştir (Bierhoff, ve diğerleri, 2014).

İnsan hücrelerinde ifade edilen farklı kodlamayan RNA sınıflarının (ncRNA'lar) son zamanlarda keşfi, kromatinin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel kontrol ve transkripsiyonel düzenleme gibi hücresel süreçlerin anlaşılmasında yeni bir araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Uzun kodlayıcı olmayan RNAlar (lncRNA'lar) olarak adlandırılan bu ncRNA sınıflarından biri, proteinlere dönüştürülmemiş 200 nükleotitten daha büyük RNA'lar olarak tanımlanır. Son bulgular, lncRNA'ların sinyal, kılavuz, tuzak veya iskele RNA'ları olarak işlev görerek transkripsiyonel seviyede gen düzenlemesine dahil olduğunu göstermektedir (Long, Wang, Youmans, & Cech, 2017.) (Marchese, Raimondi, & Huarte, 2017). LncRNA'ların düzensizliği, çeşitli kanserlerde meydana gelmektedir ve bu ncRNA'ların tanı, prognoz, kanser evresi ve tedaviye yanıt için biyobelirteçler olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. (Chen, Dzakah, & Shan, 2018).

2015 yılında, TCGA RNAseq verileri kullanılarak yapılan bir çalışmada lncRNA FAM83H-AS1 ekspresyonunun meme invaziv karsinomu (BRCA), kolorektal ve rektal kanser (CRC), akciğer adenokarsinomu (LUAD) ve akciğer skuamöz hücreli karsinomda (LUSC) upregüle olduğu belirtilmiştir. Fonksiyonel olarak, lncRNA FAM83H-AS1, hücre döngüsü regülasyonunda yer alan birçok protein kodlayan gen ile birlikte ifade edildiğinden, FAM83H-AS1'in hücre döngüsü progresyonunda rol oynadığı tahmin edilmektedir. Aynı çalışmada lncRNA FAM83H-AS1'in, kanserde S-faz hücre döngüsünde rol oynadığı gösterilmiştir. (Cabanski, ve diğerleri, 2015).

Yang ve arkadaşları FAM83H-AS1'i meme kanseri dokularında ve normal meme dokularında ayrı ayrı incelediğinde, meme kanseri dokularının RNA-seq analizlerinde FAM83H-AS1'i en fazla upregüle olan lncRNA olarak tanımlamıştır. Ek olarak, 626 meme kanseri dokusu örneği ile 105 kanserli olmayan meme dokusu kıyaslandığında, kanserli dokularda önemli ölçüde daha yüksek bir FAM83H-AS1 ekspresyon düzeyi gösterilmiştir. Luminal tip meme kanseri hastalarında 'The Cancer Genome Atlas' TCGA verilerinin analizi, daha yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonunun daha düşük genel sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Meme kanseri hastalarının TCGA kohortunun (tüm alt tipleri içeren) analiz edilmesi, daha düşük genel sağkalım ile ilişkili yüksek FAM83H-AS1 ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır (Yang, ve diğerleri, 2016). Meme kanserinde lncRNA FAM83H-AS1'in ekspresyonunda artışı belirtilmesine rağmen hücre progresyonunu etkileyen genetik veya moleküler mekanizmalar hakkında yeterli kanıt bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda lncRNA FAM83H-AS1'in luminal tip meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de, tümör süpresör genler ve onkogenleri etkileyerek proliferasyon üzerine etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaca uygun olarak toplamda 84 tümör süpresör genlerle onkogenlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Çalıştığımız bu genlerin 7 tanesinin (BAX, FOXD3, MLH1, MYCN, REL, RUNX3, SERPINB5) ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p < 0,005$ ). Çalışılan bu genler hücre proliferasyonu, invazyonu, migrasyonu ve apoptozun da önemli rol oynadığı bildirilen genlerdir.

FOXD3 olarak da bilinen "Forkhead box" D3 tümör süpresör geni bir transkripsiyon baskılayıcı olarak işlev gören Forkhead proteinini kopyalamaktadır (Pohl & Knöchel, 2001). Xu ve arkadaşları, FOXD3'ün WDR5'i transkripsiyonel olarak baskılayarak akciğer kanserinde tümör başlatma özelliklerini inhibe ettiğini göstermiştir (Xu, ve diğerleri, 2019). Li ve arkadaşları ise, FOXD3'ün EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK yolunu inaktive ederek kolon karsinomunu baskıladığını bulmuştur (Li, ve diğerleri, 2016). Liu ve arkadaşları, FoxD3 / miR-137 / AKT2 düzenleyici ağın hepatosellüler karsinomdaki tümör büyümesini ve metastazını baskıladığını bildirmiştir (Liu,

ve diğeri, 2014). Farklı bir çalışmada, FOXD3'ün fare embriyosunun multipotent embriyonik hücrelerinin gelişimi için gerekli olduğunu gösterilmiştir (Hanna, Foreman, Tarasenko, Kessler, & Labosky, 2002). Son zamanlarda, FOXD3'ün kanser oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. FOXD3'ün susturulması akciğer kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini uyarılmış ve hücre apoptozunu inhibe etmiştir (Yan, Zhao, Ding, & Zhou, 2015). Melanomada FOXD3, PAX3 ekspresyonunu arttırdığı ve melanom ilerlemesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Kubic, Little, Kaiser, Young, & Lang, 2016). FOXD3 ekspresyonundaki artış, melanomada hücre migrasyonunda önemli bir azalmaya yol açmıştır (Weiss, Abel, Dadpey, & Aplin, 2014). FOXD3 aynı zamanda nöroblastomun büyümesini, invazyonunu, metastazını ve anjiyogenezini etkileyen yeni bir tümör süpresör olarak saptanmıştır (Li, ve diğeri, 2013).

Xiaoxing ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FOXD3'ün, nazofarengeal karsinomu (NPC) dokularında ve hücrelerinde down regüle olan bir gen olduğu saptanmıştır. Ayrıca FOXD3 up regülasyonunun, PI3K / Akt yolağı hedef genlerinin ve proteinlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiş ve FOXD3 ekspresyonunun artmasının, proliferasyon, migrasyon ve NPC hücrelerinin invazyonun inhibisyonuna sebep olduğu saptanmıştır (Xiaoxing, ve diğeri, 2020). PI3K / Akt Yolağının anormal aktivasyonu meme, akciğer, endometriyum ve prostat da dahil olmak üzere insanlardaki pek çok kanserde yaygın olarak gözlenmektedir (Andrea & Lewis, 2010). Çalışmamızda FOXD3 geninin, FAM83H-AS1-siRNA ile susturulan MCF-7 hücre hattında ekspresyonu anlamlı olarak 4,75 kat artmıştır. Önceki çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak FAM83H-AS1'in susturulmasıyla hücre proliferasyonunun inhibe olduğu düşünülmektedir. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde FAM83H-AS1'in hangi yolak üzerinden proliferasyonu aktive ettiğini tanımlayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte, FOXD3'ün meme kanseri oluşumunu etkilemedeki rolü hakkında çok az bilgi mevcut olduğundan çalışmamızın gelecekteki çalışmalara da ışık tutacağı öngörülmektedir.

MLH1 geni, kalıtsal kolon kanserinde sıklıkla mutasyona uğramış bir gen lokusu olarak tanımlanmıştır. E. Coli'de DNA yanlış eşleşme tanıma, DNA

zincir ayrımı ve DNA baz dizisi çıkarma sırasında protein-protein etkileşimlerine aracılık eden DNA onarım geni mutL'nin homologudur. ("Entrez Gene: MLH1 mutL homolog 1, kolon kanseri, nonpoliposis tip 2 (E. coli)", tarih yok). DNA onarım mekanizmalarından biri olan yanlış eşleşme tamiri (MMR) replikasyon esnasında meydana gelen yanlış baz eşleşmeleri ve genellikle replikasyon sırasındaki kaymalardan oluşan insersiyon/delesyon ilmeklerini düzelterek genomik kararlılığı korumaktır (Peltomaki, 2016) (Crouse, 2016). MLH1 geni ve kodladığı MLH1 proteini, MutL kompleksi olarak adlandırılan heterodimer oluşturmaktadır. MutL heterodimerlerinin önemi MMR'da oldukça yüksektir. (Li G. , 2008) (Peltomaki, 2016). MLH1'in endonukleaz aktivitesi yanlış eşleşmenin olduğu dizinin ayırt edilmesini sağlamaktadır (Li G. , 2008). MMR ile DNA onarımı mümkün değilse, hücre döngüsü durmakta ya da hücre apoptoza gitmektedir (Li, 2008) (Li, Pearlman, & Hsieh, 2016) (Peltomaki, 2016). Yapılan çalışmalarda, MutS ve MutL mutasyonlu hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsünün durdurulmasında kusurlar ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak apoptoz proteinleri olan p53 ve p73'ün fosforilasyonunun gerçekleşmemesi düşünülmüştür (Li G. , 2008). MutS ve MutL'nin p53 ve p73'ü fosforilleyen ATM, ATR ve c-Abl kinazlarıyla fiziksel olarak ilişkide olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar, MutS ve MutL'nin dahil olduğu sinyal yollarının hücre döngüsünün durdurulmasında ve/veya apoptozda rolü olduğu düşündürmektedir (Li, 2008). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada MLH1 ekspresyonundaki azalma kemoterapiye olan direnci arttırmış ve hastalığın kötü progresyonuna sebep olmuştur (Mackay, ve diğerleri, 2000). Bu verilerin ışığında çalışmamızda, MCF-7 hücre hattında lncRNA FAM83H-AS1'in FAM83H-AS1-siRNA ile susturulmasından sonra MLH1 geninin ekspresyonunun anlamlı olarak 8,44 kat arttığı belirlenmiştir. Uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in meme kanseri hücre hattı MCF-7'de MLH1 ekspresyonunu baskıladığını bu nedenle hücrenin apoptoza gidemediği ve proliferere olduğu varsayılmaktadır. Meme kanserinde FAM83H-AS1'in MLH1 geni üzerinden proliferasyon ve apoptozla olan ilişkisini iyi anlayabilmek için destekleyici çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca meme kanserinde FAM83H-

AS1'in MLH1 ekspresyonunu baskıladığından dolayı töröpatik bir hedef olabilir.

MYCN, aynı zamanda c-MYC ve MYCL'yide içeren MYC proto-onkogen ailesinin bir üyesidir. Gen ilk olarak nöroblastoma hücre hatlarında keşfedilmiştir(Schwab, ve diğerleri, 1983) (Kohl, ve diğerleri, 1983). Nöroblastomaya ek olarak, MYCN amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, sıklıkla embriyonik ve/veya nöroendokrin kökenli retinoblastom (Lee, Murphree, & Benedict, 1984), Wilm's tümörü (Nisen, Zimmerman, Cotter, Gilbert, & Alt, 1986), rabdomyosarkom (Dias, ve diğerleri, 1990), medulloblastom (E. Rouah, 1989). , glioblastoma (Hui, Lo, Yin, Poon, & H.K., 2001) ve küçük hücreli akciğer kanseri (Nau, ve diğerleri, 1986) gibi kanserlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Diğer MYC proteinleri gibi MYCN, birçok hedef genin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür ve bu da proliferasyon, hücre büyümesi, protein sentezi, metabolizma, apoptoz ve farklılaşma dahil olmak üzere temel hücresel süreçleri düzenlemektedir (Eilers & Eisenman, 2008).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre MCF-7 hücre hattında lncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasıyla proto-onkogen olan MYCN'nin ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak 3,32 kat azalmıştır. 2018 yılında yapılan bir çalışmada uzun kodlamayan RNA LINCO1296'ın aşırı ekspresyonu MYCN ekspresyonunu arttırdığı ve MYCN nin kolanjiokarsinoma hücrelerinde hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu teşvik ettiği belirtilmiştir (Dawei, ve diğerleri, 2018). Rabdomyosarkom ve nöroblastoma tümör örneklerinde ve MYCN genomik amplifikasyonu olan hücre hatlarında farklı bir lncRNA MYCNOS-01 transkript seviyeleri yüksek bulunmuş ve MYCNOS-01'in indirgenmesiyle MYCN ekspresyonu azalmış ve hücre proliferasyonunu azaltmıştır. Bu nedenle lncRNA MYCNOS-01'in, MYCN'nin post-transkripsiyonel düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Eleanor, Selfe, Martins, Walters, & Shipley, 2018). Bir başka çalışmada uzun kodlamayan RNA lncUSMycN'nin RNA bağlayıcı protein NonO'ya bağlanarak N-Myc'nin upregülasyonuna ve nöroblastoma hücre proliferasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Pei Y. Liu, 2014). İnsan nöroblastoma dokularında yüksek

seviyelerde lncUSMycN ve NonO ekspresyonu kötü hasta prognozuna sebep olduğu saptanmıştır (Pei Y. Liu, 2014). Çalışmamızı literatürle kıyasladığımızda onkojenik bir kodlamayan RNA olduğu düşünülen lncRNA FAM83H-AS1 meme kanseri hücrelerinde MYCN'nin pozitif düzenleyicisi olabileceği ve bu yolla hücre proliferasyonuna katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Tüm memeli hücrelerinde bulunan NF- $\kappa$ B tek bir gen değil, birbiriyle yakın ilişkili 5 üyeden oluşan bir ailedir: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) ve p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). Rel proteinleri kendi arasında RelA, RelB, c-Rel ve p50, p52 olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Proto-onkogen c-Rel, insanlarda REL geni tarafından kodlanan bir proteindir. (Ruben, ve diğerleri, 1992) Tüm üyeler korunmuş Rel homoloji domain (RHD) taşımaktadır. C-Rel proteini, transkripsiyon faktörlerinin NF- $\kappa$ B ailesinin bir üyesidir. (Li, Li, & Chen, 2020) c-Rel, B hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonunda önemli bir role sahiptir. REL geninin, diffüze büyük B hücreli lenfoma ve Hodgkin lenfoma dahil olmak üzere birçok insan B hücresi lenfomasında amplifiye veya mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Gilmore, Kalaitzidis, Liang, & Starczynowski, 2004).

Nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel ailesi üyeleri, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan dimerik transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmektedir (Li, Li, & Chen, 2020).

NF- $\kappa$ B/Rel, ökaryotik hücreler tarafından proliferasyon, invazyon, migrasyon, inflamasyon, apoptoz, farklılaşma ve hücre sağkalımını kontrol eden genlerin düzenleyicisi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. NF- $\kappa$ B yapısal olarak aktiftir, aktif NF- $\kappa$ B, hücrenin çoğalmasını sağlayan ve hücreyi apoptoz yoluyla ölmesine neden olacak koşullardan koruyan genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır. Kanserde, NF- $\kappa$ B sinyalini kontrol eden proteinler mutasyona uğramakta veya anormal bir şekilde ifade edilmektedir. Bu durum da malign hücre ile organizmanın geri kalanı arasında hatalı koordinasyona yol açabilmektedir (Vlahopoulos, 2017).

MCF-7 hücrelerinde yapılan bir çalışmada NF- $\kappa$ B'nin down-regüle edilmesinin, proliferasyonu ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir. (Ch. V. Rao, 2004).

Artan kanıtlar, lncRNA'ların kanserle ilgili çeşitli genlerin pro-inflamatuar transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B, 'yi düzenlediğini göstermiştir. NF-  $\kappa$ B ilişkili lncRNA'lar H19 (Y. Sun, 2017), NKILA (B. Liu, 2015)), Pacer (M. Krawczyk, 2014), Hotair (Özeş, ve diğerleri, 2016), ANRIL (X. Zhou, 2016), thril (Z. Li, 2014) ve MALAT1 (N.E. Ilott, 2014) olarak belirtilmiştir.

Ayrıca, NF- $\kappa$ B aktivasyonu meme kanseri patogenezi ile yakından ilişkili bulunmuştur (M.A. Sovak, 1997). NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen gen ürünleri meme kanserli hastalarda güçlü aktivasyona sahiptir(X. Dai, 2012). NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu aynı zamanda meme kanseri hücreleri tarafından kemoterapiye direnç gelişimine de katkıda bulunmuştur (K. Velaei, 2017). NF- $\kappa$ B aktivasyonu, tümör oluşumu ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu modüle ederek meme kanseri gelişimine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir(M. Liu, 2010).

Bir çalışmada multiple myeloma hücrelerinde lncRNA H19'un susturulmasının proliferasyonu, canlılığı, koloni oluşumunu ve NF- $\kappa$ B yolağını da inhibe ettiği bildirilmiştir (Y. Sun, 2017).

Çalışmamızda NF- $\kappa$ B ile ilişkili onkogen REL ekspresyonunun MCF-7 hücre hatlarında up regüle edildiği saptanmıştır. Bu ekspresyonun FAM83H-AS1-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, edilmeyenlere göre anlamlı düzeyde 4,18 kat azaldığı saptanmıştır. Literatürdeki benzer çalışmalar bulgularımızı desteklemektedir. Uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in NF- $\kappa$ B yolağında önemli bir düzenleyici olduğu düşünülebilir. Bu uzun kodlamayan RNA'nın NF- $\kappa$ B yolağı üzerindeki moleküler mekanizmalarını açıklayabilmek için yeterli kanıtımız bulunmamaktadır. Bu nedenle FAM83H-AS1'in bu yolaklar üzerindeki rolleri hakkındaki kanıtlar için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

RUNX3, birkaç önemli gelişim yolunda gen ekspresyonunu düzenleyen Runt ile ilişkili transkripsiyon faktör ailesine ait bir genidir (Levanon, ve diğerleri, 1994). RUNX3 ilk olarak, RUNX3'ün down regülasyonu ile mide

kanserinin oluşumu ve progresyonu arasındaki ilişki nedeniyle bir tümör süpresör gen olduğu ileri sürülmüştür (Li, ve diğerleri, 2002). Mide kanserinin başlaması ve ilerlemesinde RUNX3'ün potansiyel rolünün keşfedilmesinden bu yana, RUNX3'ün kolorektal kanser, karaciğer kanseri, akciğer kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişiminde rol oynadığı bulunmuştur (Subramaniam, ve diğerleri, 2009). Birçok kanserde olduğu gibi, RUNX3, meme kanserinde genin ifadesindeki azalma, promoter hipermetilasyon, homozigot delesyon ve protein yanlış lokalizasyonu aracılığıyla inaktive edilmektedir (Chen, ve diğerleri, 2007.) (Lau, ve diğerleri, 2006) (Subramaniam, ve diğerleri, 2009). RUNX3 inaktivasyonu göğüs kanserinin ilk evrelerinde meydana gelmekte ve bu süreç sırasında ekspresyonu azalmaktadır (Subramaniam, ve diğerleri, 2009). Artan RUNX3 ekspresyonu, meme kanseri hastalarında azalmış nüks ve daha iyi hayatta kalma oranları ile olumlu prognoz göstergesi olarak bildirilmiştir (Finak G, 2008). RUNX3'ün aşırı ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, tümörjenik potansiyelini ve invazivliğini inhibe etmiştir (Lau, ve diğerleri, 2006) (Chen, ve diğerleri, 2007.). Ortaya çıkan kanıtlar, RUNX3'ün meme kanserinde bir tümör baskılayıcı olduğunu göstermektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda MCF-7 hücre hatlarında tümör süpresör gen RUNX3'ün ekspresyonunun azaldığını ve FAM83H-AS1-siRNA ile lncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasıyla RUNX3 ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. FAM83H-AS1'in MCF-7 hücre hatlarında ekspresyon artışı RUNX3'ün baskılanmasına ve meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna, tümörjenik potansiyeline veya invazivliğine sebep olduğu düşünülebilir. RUNX3'ün inaktivasyonu, meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili olduğundan dolayı, FAM83H-AS1 hedeflenerek RUNX3 aktivasyonu eski haline getirilebileceği varsayılmaktadır. LncRNA FAM83H-AS1 hedeflenerek meme kanserinin tedavisi için yeni bir terapötik strateji planlanabilir. LncRNA FAM83H-AS1'in RUNX3 inaktivasyonunu hangi mekanizmalar ile gerçekleştirdiği hakkında yeterli kanıt bulunmamaktadır. Bu nedenle sonraki çalışmalar ile FAM83H-AS1'in meme kanserinde RUNX3 geni üzerinden nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırılmalıdır.

LncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasıyla RUNX3 ekspresyonunun arttığı ilk defa bizim çalışmamızda bildirilmiştir.

Maspin veya serpin B5 (meme serin proteaz inhibitörü) tümör süpresör bir gen olup serpin ailesinin bir üyesidir (Khalkhali-Ellis, 2006)(EL-Maqsoud Nehad & Tawfiek Ehab, 2010). Maspin ilk olarak invaziv ve metastatik meme kanserinde down regüle edilmiş bir gen olarak keşfedilmiştir (Zou, ve diğerleri, 1994). O zamandan beri, yumurtalık, tiroid, kolon, prostat, pankreas, cilt, over ve korneanın stromal hücreleri ile akciğer epitelyum hücreleri gibi çok çeşitli hücrelerde maspin ekspresyonu gösterilmiştir (Shao-Xin, ve diğerleri, 2020). Önceki çalışmalar maspinin klinikte faydalı olabileceğini göstermiştir (Latha, Zhang, Cella, ShiH, & Zhang, 2005) (Shay & Roninson, 2004).

Mesane kanseri hücre hatları ve tümör dokularında yapılan bir çalışmada, Maspinin in vitro ve in vivo hücre büyümesini bloke eden PTEN ve p53 up regülatörü olduğu ve mesane karsinom hücrelerinde HDAC1 inhibitörü olarak işlev gören bir gen olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Maspinin mesane kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olduğu düşünülmüştür (Yu-Hsiang, ve diğerleri, 2020).

2020 yılında yapılan bir çalışmada azalmış miR-21 ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinin istilasının ve proliferasyonunun baskılandığı ortaya konulmuştur. Tümör süpresör gen olan Maspinin potansiyel moleküler mekanizmasının, miR-21 ekspresyonunu down regüle ederek proliferasyonu düzenlediği ve spesifik miR-21 hedef genlerinin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Shao-Xin, ve diğerleri, 2020).

Maspin, meme kanserinde bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır, ancak altta yatan düzenleyici mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızda MCF-7 hücre hatlarında lncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasıyla birlikte Maspin ekspresyonu anlamlı olarak 3,75 kat artmıştır. Literatürdeki verilere ve elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak lncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasıyla proliferasyonun düzenlendiği öngörülmektedir. Ancak FAM83H-AS1'in hangi mekanizmalarla maspin ekspresyonunu baskıladığı konusunda yeterli kanıt bulunamamıştır. Bu nedenle sonraki çalışmalarla altta yatan mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Apoptoz olarak da bilinen programlanmış hücre ölümü, meme kanserinde tedaviye yanıt ve dirençle ilişkilidir (Parton, Dowsett, & Smith, 2001). Apoptoz, hücre homeostazının sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Apoptoz, diğer farklı yolların yanı sıra ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollarla programlanmış bir hücre ölümü türüdür (Liang, ve diğerleri, 2014) (Peng, Tong, Gu, & Li, 2020) (Song, ve diğerleri, 2014). Apoptoz intrinsik yolunda kanser hücreleri, mitokondride Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 dahil olmak üzere daha yüksek anti-apoptotik faktör ekspresyonuna sahiptir (Placzek, ve diğerleri, (2010)). Anti-apoptotik faktörlerin aksine, Bax, Bak ve Bid gibi proapoptotik proteinler, intrinsik bir apoptotik yolağın teşvik edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İntrinsik apoptotik yol, mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenlemek için mitokondride anti-apoptotik Bcl-2 veya proapoptotik Bax'ı azaltarak karşılıklı olarak antagonize edilmektedir (Ghobrial, Witzig, & Adjei, 2005). Apoptoz süreci, Bcl-2'yi inhibe edebilen veya Bax gen ekspresyonunu artırabilen belirli maddelerle hızlandırılabilir. Bununla birlikte Meme kanserinde FAM83H-AS1'in rolü iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada MCF-7 hücre hatlarında öncesinde belirtmiş olduğumuz birkaç proliferasyonla ilişkili tümör süpresör ve onkogenlerin yanı sıra lncRNA FAM83H-AS1'in susturulmasından sonra anormal ekspresyon seviyeleri gösteren apoptotik gende (BAX) belirlenmiştir. BAX, kanserde apoptozu pozitif olarak düzenleyen bir gen dir (Kushnareva, Andreyev, Kuwana, & Newmeyer, 2012) (Jia, ve diğerleri, 2001). Önceki çalışmalar BAX'ın lncRNA ile indüklenen hücre apoptozu sırasında kritik bir regülatör olduğunu göstermiştir (Gao, ve diğerleri, 2015). Akciğer kanseri hücre hattında ve dokuların da yapılan bir çalışmada lncRNA TUG1'in susturulmasıyla BAX ekspresyonunun arttığı ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (Huan, ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, çalışmamızda FAM83H-AS1'in BAX'ı hedefleyerek apoptozu düzenleyip düzenlemediğini belirledi. MCF-7 hücre hattında FAM83H-AS1-siRNA ile FAM83H-AS1'in susturulması BAX mRNA ekspresyon seviyesini önemli ölçüde arttırmıştır. Öncül çalışmalara benzer olarak çalışmamızda da proapoptotik bir gen olan BAX'ın, FAM83H-AS1'in susturulmasıyla birlikte artan ekspresyonunun, hücreleri apoptoza yönlendirebileceği düşünülmektedir.

Ayrıca meme kanserinde Bax, apoptozun kolaylaştırıcısı olarak çok önemli bir rol oynamakta ve antiapoptotik üyesi Bcl-2 tarafından dengede tutulmaktadır (Reed, 1996). Hücrenin hayatta kalıp kalmayacağına karar veren Bcl-2/Bax oranı olduğu çeşitli araştırmalarla saptanmıştır. Çalışmamızda FAM83H-AS1'in susturulmasıyla Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle Bcl-2/Bax oranı Bax yönüne kaymıştır. Bu durum, hücrenin apoptoza yönlendirildiği hipotezini büyük oranda doğrulamaktadır. FAM83H-AS1'in hangi moleküllerle/genlerle etkileşerek BAX ekspresyonunu ve bununla birlikte apoptozu nasıl baskıladığına dair mekanizmaların anlaşılması gelecekte yapılacak çalışmaların ışığında netlik kazanabilecektir.

Sonuç olarak, çalışmamızda insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında uzun kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in çeşitli tümör süpresör genleri (ör: BAX, FOXD3, MLH1, RUNX3 ve SERPINB5) ve onkogenleri (ör: MYCN ve REL) düzenleyerek proliferasyon ve apoptoz üzerinde önemli etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kanserin oluşumunda ve ilerlemesinde FAM83H-AS1'in etkili olduğu söylenebilir. FAM83H-AS1'in sinyal yolları veya genler üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için farklı deneylere ve daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmanın bulguları ışığında, FAM83H-AS1'in lüminal tip meme kanserinde terapötik bir hedef olarak kullanılabilmesi ve araştırmanın gerek halihazırda süregelen çalışmalara gerekse gelecekte yapılacak çalışmalara ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 7.KAYNAKLAR

- "Biomarker", *NCI Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute.* (tarih yok). [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov). adresinden alındı
- "Entrez Gene: *MLH1* mutL homolog 1, kolon kanseri, nonpoliposis tip 2 (*E. coli*)". (tarih yok). [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). adresinden alındı
- Alaiyan, B., Ilyayev, N., Stojadinovic, A., Izadjoo, M., Roistacher, M., Pavlov, V., & Nissan, A. (2013). Differential expression of colon cancer associated transcript1 (CCAT1) along the colonic adenoma-carcinoma sequence. *BMC Cancer, 13*(1), 196.
- Amaral, P., & Mattick, J. (2008). Noncoding RNA in development. *Mamm Genome, 19*, 454-492.
- American Cancer Society. (2020). *Cancer Facts and Figures*.
- Andrea, P. M., & Lewis, C. C. (2010). Targeting a common collaborator in cancer development. *Sci Transl Med, 48*.
- Arnes, L., Liu, Z., Wang, J., Carlo, M. H., Sagalovskiy, I., Sanchez-Martin, M., . . . Rabadan, R. (2018). Comprehensive characterisation of compartment-specific long non-coding RNAs associated with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut, 314353*.
- B. Liu, L. S. (2015)). A cytoplasmic NF- $\kappa$ B interacting long noncoding RNA blocks I $\kappa$ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell, 370-381*.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., & Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wildtype p53. *Science, 249*(4971), 912-5.
- Baratieh, Z., Khalaj, Z., Honardoost, M., Emadi-Baygi, M., Khanahmad, H., Salehi, M., & Nikpour, P. (2017). Aberrant expression of PlncRNA-1 and TUG1: potential biomarkers for gastric cancer diagnosis and clinically monitoring cancer progression. *Biomark Med, 11*, 1077-1090.
- Batista, P., & Chang, H. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell, 3*, 1298-307.
- Bautista, S., Valles, H., Walker, R., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P., & Theillet, C. (1998). In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res, 4*(12), 2925-2929.
- Baylin, S., & Ohm, J. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*(6(2)), 107-16.
- Bazzini, A., Johnstone, T., Christiano, R., Mackowiak, S., Obermayer, B., Fleming, E., . . . Giraldez, A. (2014). Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *Embo j, 33*, 981-993.
- Benson, J., Jatoui, I., Keisch, M., Estava, F., Makris, A., & Jordan, V. (2009). Early breast cancer. *Lancet, 2009. 373*(9673): p. 1463-79. *Lancet, 373*(9673), 1463-79.
- Bertucci, F., Finetti, P., & Birnbaum, D. (2012). Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. . *Curr Mol Med*(12(1)), 96-110.
- Bertucci, F., Finetti, P., Roche, H., Le Doussal, J., Marisa, L., Martin, A., & al., e. (2013). Comparison of the prognostic value of genomic grade index,

- Ki67 expression and mitotic activity index in early node-positive breast cancer patients. 2013 Mar;24(3):625-3. *Ann Oncol*, 24(3), 625-3.
- Bi, Y., Shen, G., Quan, Y., Jiang, W., & Xu, F. (2018). Long noncoding RNA FAM83H-AS1 exerts an oncogenic role in glioma through epigenetically silencing CDKN1A (p21). *J Cell Physiol*, 26813.
- Bieche, I., & Lidereau, R. (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cance*, 14(4), 227-51.
- Bierhoff, H., Dammert, M., Brocks, D., Dambacher, S., Schotta, G., & Grummt, I. (2014). Quiescence-induced LncRNAs trigger H4K20 trimethylation and transcriptional silencing. *Mol Cell*, 54, 675-682.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T., Margulies, E., . . . Koch, C. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447, 799-816.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J., Dutta, A., Guigo, R., T.R., G., Margulies, E., . . . Malhotra, A. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447, 799-816.
- Bos, J. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, R. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.*(68), 394-424.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncology*(13(8)), 790-801.
- Brinton, L. A., Gaudet, M. M., & Gierach, G. L. (2018). Breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention* (s. 861-888). içinde New York: Oxford University Press.
- Cabanski, C., White, N., Dang, H., Silva-Fisher, J., Rauck, C., Cicka, D., & Maher, C. (2015). Pan-cancer transcriptome analysis reveals long noncoding RNAs with conserved function. *RNA Biol*, 12, 628-642.
- Cabili, M., & et al. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*, 25(18), 1915-27.
- Carioli, G., Malvezzi, M., Rodriges, T., Bertuccio, P., Negri, E., & La Vecchia, C. (2017). Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. *The Breast*(36), 89-95.
- Cheang, M., Stephen, K. C., David, V., Dongxia, G., Samuel, L., Jacqueline, S., . . . Torsten, O. N. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10), 736-50.
- Chen, L., Dzakah, E., & Shan, G. (2018). Targetable long non-coding RNAs in cancer treatments. *Cancer Lett*, 418, 119-124.
- Chen, L., Wang, W., Cao, L., Li, Z., & Wang, X. (2016). Long non-coding RNA CCAT1 acts as a competing endogenous rna to regulate cell growth and

- differentiation in acute myeloid leukemia. *Molecules and Cells*, 39(4), 330–336.
- Chen, W., Salto-Tellez, M., Palanisamy, N., Ganesan, K., Hou, Q., Tan, L., . . . Ito, Y. T. (2007.). Targets of genome copy number reduction in primary breast cancers identified by integrative genomics. *Genes, Chromosomes Cancer*, 46, 288–301.
- Chen, Z., & al., e. (2016). LncSox4 promotes the self-renewal of liver tumour-initiating cells through Stat3-mediated Sox4 expression. *Nat Commun*, 12598.
- Chen, Z., & et al. (2016). LncSox4 promotes the self-renewal of liver tumour-initiating cells through Stat3-mediated Sox4 expression. . *Nat Commun*, 12598.
- Cizkova, M., Susini, A., Vacher, S., Cizeron-Clairac, G., Andrieu, C., Driouch, K., . . . Bieche, I. (2012). PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res*, 14(1), R28.
- Cobb, M. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*, 71, 479-500.
- Consortium, E. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74.
- Consortium, T. E. (2011). A User's Guide to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). *PLoS Biology*.
- Crick, F. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12, 138-63.
- Crouse, G. (2016). Non-canonical actions of mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, 38, 102-109.
- Cuny, M., Kramar, A., Courjal, F., Johannsdottir, V., Iacopetta, B., Fontaine, H., . . . Theillet, C. (2000). Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res*, 60(4), 1077-1083.
- Curtis, C., Shah, S., Chin, S., Turashvili, G., Rueda, O., Dunning, M., & al., e. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. . *Nature*. , 346-52.
- Dawei, Z., Haiyan, L., Juping, X., Decan, J., Liangqi, C., Xuwei, Y., . . . Xiaofeng, J. (2018). Long noncoding RNA LINC01296 promotes tumor growth and progression by sponging miR-5095 in human cholangiocarcinoma. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 52, 1777-1786.
- Derrien, T. e. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9), 1775-89.
- Derrien, T., & et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9), 1775-89.
- Devilee, P., & Cornelisse, C. (1994). Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1198(2-3), 113-30.
- Dias, P., Kumar, P., Marsden, H., Gattamaneni, H., Heighway, J., & Kumar, S. (1990). N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int J Cancer*, 45, 593-596.

- Djebali S, D. C., Xue, C., Marinov, G., Khatun, J., Williams, B., Zaleski, C., . . . Roder, M. (tarix yok). .
- Djebali, S., & diğerleri, v. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101-8.
- Djebali, S., & et, a. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101-8.
- Dougherty, M., Müller, J., Ritt, D., Zhou, A., Zhou, X. Z., Copeland, T., . . . Morrison, D. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell*, 17, 215-24.
- Douville, E., & Downward, J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*, 15, 373-83.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11-22.
- Dreyfuss, G., Philipson, L., & Mattaj, I. (1988). Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol*, 106(5), 1419-25.
- Droufakou, S., Deshmane, V., Roylance, R., Hanby, A., Tomlinson, I., & Hart, I. (2001). Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer*, 92(3), 404-408.
- E. Rouah, D. W. (1989). N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*, 49, 1797-1801.
- Eilers, M., & Eisenman, R. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev*, 22, 2755-2766.
- Eleanor, M. O., Selfe, J. L., Martins, A. S., Walters, Z. S., & Shipley, J. M. (2018). The long non-coding RNA MYCNOS-01 regulates MYCN protein levels and affects growth of MYCN-amplified rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cells. *BMC Cancer*, 18, 217.
- Ellis, H., & Cox, P. J. (1984). Breast problems in 1,000 consecutive referrals to surgical out - patients. *Postgrad Med. J.*, 60, 653.
- EL-Maqsoud Nehad, M., & Tawfik Ehab, R. (2010). Loss of Maspin Expression in Bladder Cancer: Its Relationship with p53 and Clinicopathological Parameters. *Journal of Egyptian Nat. Cancer Inst.*, 22, 1-12.
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience From a Large Study With Long-Term Follow-Up. *Histopathology*, 19(5), 403-10.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. . *Cancer Treat Rev.*, 38(6), 698-707.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12, 861-874.
- Fecher, L., Amaravadi, R., & Flaherty, K. (2008). The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 20, 183-9.
- Feng, C., Zhao, Y., Li, Y., Zhang, T., Ma, Y., & Liu, Y. (2019). LncRNA MALAT1 promotes lung cancer proliferation and gefitinib resistance by acting as a mir-200a sponge. *Archivos de Bronconeumología*, 55(12), 627-633.

- Fidler, I. (1989). Origin and biology of cancer metastasis. . *Cytometry*, 673-80.
- Finak G, B. N. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*, 14, 518– 527.
- Finver, S., Nishikura, K., Finger, R. L., Haluska, F. G., Finan, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1988). Sequence analysis of the MYC oncogene involved in the t(8;14)(q24;q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(9), 3052-6.
- Friedenson, B. (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*, 7, 152.
- Galindo, M., Pueyo, J., Fouix, S., Bishop, S., & Couso, J. (2007). Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol*, 106.
- Gao, J., Liu, M., Zou, Y., Mao, M., Shen, T., Zhang, C., . . . Li, P. (2015). Long non-coding RNA growth arrest-specific transcript 5 is involved in ovarian cancer cell apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. . *Oncol Rep*, 34, 3212-3221.
- Garriga, G., & Lambowitz, A. (1984). RNA splicing in neurospora mitochondria: self-splicing of a mitochondrial intron in vitro. *Cell*, 39, 631-641.
- Geisler, S., & Coller, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), 699-712.
- Ghobrial, I., Witzig, T., & Adjei, A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.*, 55, 178–194.
- Gilmore, T., Kalaitzidis, D., Liang, M., & Starczynowski, D. (2004). The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene.*, 22(13), 2275–86.
- Giuliano, A. E., Connolly, J. L., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S., Solin, L. J., . . . Hortobagyi, G. N. (2017). Breast Cancer-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*, 67(4), 290-303.
- GLOBOCAN. (2018). *Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer.* ([gco.iarc.fr](http://gco.iarc.fr)).
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., & . . . Chang, H. (tarih yok).
- Gupta, R., & al., e. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071-6.
- Gutschner, T., Hammerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., & . . . Diederichs, S. (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Research*, 73(3), 1180–1189.
- Guttman, M., & al., e. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223-7.

- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M., Feldser, D., . . . Lander, E. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, *458*, 223-227.
- H., L., & S.L., Z. (2000). Tumor Cells and the Onset of Cancer. *Molecular Cell Biology*. (4 b.). içinde
- Hammond, M., Hayes, D., Dowsett, M., Allred, D., Hagerty, K., Badve, S., & al., e. (2010). Hammond ME, Hayes DF, Dowse American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 3543.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-74.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Hanna, L., Foreman, R., Tarasenko, I., Kessler, D., & Labosky, P. (2002). Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev.*, *16*, 2650-61.
- Harries, L. W. (2012). Long non-coding RNAs and human disease. *Biochemical Society Transactions*, *40*(4), 902-906.
- Hartwell, L., & Weinert, T. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, *246*(4930), 629-634.
- He, J.-H., Han, Z.-P., Liu, J.-M., Zhou, J.-B., Zou, M.-X., Lv, Y.-B., & ... Cao, M.-R. (2017). Overexpression of long non-coding rna MEG3 inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma huh7 cells via negative modulation of miRNA-664. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(11), 3713-3721.
- He, X., Tan, X., Wang, X., Jin, H., Liu, L., Ma, L., & ... Fan, Z. (2014). C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion. *Tumor Biolo*, *35*(12), 12181-12188.
- Heitz, F., Philipp, H., Hans-Joachim, L., Annette, F.-E., Fatemeh, L.-S., Stefanie, S.-B., . . . Andreas, d. B. (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*, *45*(16), 2792-8.
- Herschkowitz, J. S., Weigman, V., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., & al., e. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. . 2007;8(5):R76. *Genome Biol*, *8*(5), R76.
- Herschkowitz, J., He, X., Fan, C., & Perou, C. (2008). The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res*, *10*(5), R75.
- Howe, L., & al., e. (1992). Activation of the Map Kinase Pathway by the Protein-Kinase Raf. *Cell*, *71*, 335-342.
- <https://www.encodegenes.org/human/stats.html>. (tarih yok).
- Huan, L., Guizhi, Z., Xin, F., Haiyan, C., Guangrui, P., Yao, X., & S., W. (2017). Long noncoding RNA TUG1 is a diagnostic factor in lung adenocarcinoma and suppresses apoptosis via epigenetic silencing of BAX. *Oncotarget*, *8*, 101899-101910.

- Hui, A., Lo, K., Yin, X., Poon, W., & H.K., N. (2001). Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest*, *81*, 717-723.
- Ingvarsson, S. (1999). Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*, *9*(4), 277-288.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, *3*, 318-356.
- Jia, L., Patwari, Y., Srinivasula, S., Newland, A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E., & Kelsey, S. (2001). Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*, *20*, 4817-4826.
- Jirstrom, K., Stendahl, M., Ryden, L., Kronblad, A., Bendahl, P., Stal, O., & Landberg, G. (2005). Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res*, *65*(17), 8009-8016.
- K. Velaei, N. S. (2017). NFκBP65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer. *Breast Cancer*, 552-561.
- Kashi, K., Henderson, L., Bonetti, A., & Carninci, P. (2016). Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta*, *1859*, 3-15.
- Kastenhuber, E., & Lowe, S. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, *170*, 1062-1078.
- Khalil, A., & al., e. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(28), 11667-72.
- Khalkhali-Ellis, Z. (2006). Maspin: the new frontier. *Clin. Cancer Res*, *12*(24), 7279-83.
- Kim, H. J., Lee, D. W., Yim, G. W., Nam, E. J., Kim, S., Kim, S. W., & Kim, Y. T. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *International Journal of Oncolog*, *46*(2), 521-530.
- Knudson, A. (1971). Mutation and Cancer - Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*, 820.
- Kohl, N., Kanda, N., Schreck, R., Bruns, G., Latt, S., & Gilbert, F. (1983). İnsan nöroblastomalarında onkojenle ilişkili dizilerin transpozisyonu ve amplifikasyonu. *Cell*, 359 - 367.
- Kruger, K., Grabowski, P., Zaug, A., Sands, J., Gottschling, D., & Cech, T. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, *31*, 147-157.
- Kubic, J., Little, E., Kaiser, R., Young, K., & Lang, D. (2016). FOXD3 Promotes PAX3 Expression in Melanoma Cells. *J Cell Biochem*, *117*, 533-41.
- Kushnareva, Y., Andreyev, A., Kuwana, T., & Newmeyer, D. (2012). Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. *PLoS Biol.*, *10*:e1001394.

- Kuzyk, A., & Mai, S. (2014). c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, a014373.
- Lakhani, S., Ellis, I., Schnitt, S., Hoon, T. P., & Van de, V. M. (2012). *WHO classification of tumors of the breast*. . Lyon.
- Latha, K., Zhang, W., Cella, N., ShiH, Y., & Zhang, M. (2005). Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. *Mol Cell Biol*, 25, 1737-1748.
- Lau, Q., Raja, E., Salto-Tellez, M., Liu, Q., Ito, K., Inoue, M., . . . Sukumar, S. (2006). RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer. *Cancer Res*, 66, 6512–6520.
- Lee, E., & Muller, W. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10), a003236.
- Lee, W., Murphree, A., & Benedict, W. (1984). Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature*, 309, 458-460.
- Leevers, S., Paterson, H., & Marshall, C. (1994). Requirement for Ras in Raf Activation Is Overcome by Targeting Raf to the Plasma-Membrane. *Nature*, 369, 411-414.
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., . . . al, e. (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res*, 66(5), 2544-2552.
- Leslie, N., & Downes, C. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J*, 382, 1-11.
- Levanon, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Bar-Am, I., Avivi, L., & Groner, Y. (1994). AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*, 23(2), 425–32.
- Li, D., Mei, H., Qi, M., Yang, D., Zhao, X., Xiang, X., . . . Tong, Q. (2013). FOXD3 is a novel tumor suppressor that affects growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma. *Oncotarget*, 4, 2021-44.
- Li, G. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, 18(1), 85-98.
- Li, J., & al., e. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, 1943-1947.
- Li, K., Guo, Q., Yang, J., Chen, H., Hu, K., & Zhao, J. (2016). FOXD3 is a tumor suppressor of colon cancer by inhibiting EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK signal pathway. *Oncotarget*.
- Li, Q., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X., . . . Hagiwara, A. (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, 109, 13–124.
- Li, S., Mei, Z., Hu, H.-B., & Zhang, X. (2018). The lncRNA MALAT1 contributes to non-small cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6679–6688.
- Li, T., Li, X., & Chen, Y. (2020). c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nature Cancer*, 507–517.

- Li, Z., Pearlman, A., & Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 38, 94-101.
- Liang, Z., Guo, Y., Yi, Y., Wang, R., Hu, Q., & Xiong, X. (2014). Ganoderma lucidum polysaccharide starget a Fas/caspase dependent pathway to induce apoptosis in human colon cancer cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 3981–3986.
- Liaw, D., & al., e. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genetics*, 16, 64-67.
- Liu, L. L., Lu, S. X., Li, M., Li, L. Z., Fu, J., & Hu, W. (2014). FoxD3-regulated microRNA-137 suppresses tumour growth and metastasis in human hepatocellular carcinoma by targeting AKT2. *Oncotarget*, 5(13), 5113-24.
- Long, Y., Wang, X., Youmans, D., & Cech, T. (2017.). How do lncRNAs regulate transcription? . *Sci Adv*.
- Lu, S., Dong, W., Zhao, P., & Liu, Z. (2018). LncRNA FAM83H-AS1 is associated with the prognosis of colorectal carcinoma and promotes cell proliferation by targeting the Notch signaling pathway. *Oncol Lett*, 1861-1868.
- Ludwig, J. a. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*, 5(11), 845-56.
- Lundgren, K., Brown, M., Pineda, S., Cuzick, J., Salter, J., Zabaglo, L., . . . Landberg, G. (2012). Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Res*, 14(2), R57.
- Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z., & Qiu, J. (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting Ecadherin expression. *Cancer Letters*, 333(2), 213–221.
- M. Krawczyk, B. E. (2014). p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF-κB complexes. *elife*.
- M. Liu, T. S.-S. (2010). The canonical NF-κB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*, 10464-10473.
- M.A. Sovak, R. B. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 2952-2960.
- Mackay, H., Cameron, D., Rahilly, M., Mackean, M., Paul, J., Kaye, S., & Brown, R. (2000). Reduced MLH1 Expression in Breast Tumors After Primary Chemotherapy Predicts Disease-Free Survival. *Journal of Clinical Oncology*, 18(1), 87-93.
- MacNoughton, J., Bonoh, M., Mcloud, P., Hee, J., & Burger, H. (1992). Age related changes in follicle stimulating hormone, Luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol*, 36(4), 336-339.
- Maehama, T., & Dixon, J. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, vdephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-vtrisphosphate. *J Biol Chem*, 273, 13375-8.

- Malhotra, G., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, *10*(10), 955-60.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, *1*(3), 222-231.
- Manning, B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*, 1261-74.
- Marchese, F., Raimondi, I., & Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol*, *18*, 206.
- Martin, G. (2001). The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*, 467-75.
- Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., . . . Kanakura, Y. (1999). Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J*, *18*(5), 1367-1377.
- Maxwell, E., & Fournier, M. (1995). The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem*, *64*, 897-934.
- Mercer, T., & et, a. (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(2), 716-21.
- Mercer, T., Dinger, M., & Mattick, J. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, *10*(3), 155-9.
- Miao, Y., Xu, S., Chen, L., Liang, G., Pu, Y., & Yin, L. (2017). Trends of long noncoding RNA research from 2007 to 2016: a bibliometric analysis. *Oncotarge*, *8*, 83114-83127.
- Miki, Y. e. (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian-Cancer Susceptibility Gene Brca1. *Science*, *266*, 66-71.
- Mikkelsen, T., & et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, *447*(7153), 553-60.
- Mishra, A., & Verma, M. (2010). Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? . *Cancers*, *2*(1), 190208.
- N.E. Ilott, J. H.-F. (2014). Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes. *Nat. Commun*, 3979.
- Nau, M., Brooks Jr., B., Carney, D., Gazdar, A., Battey, J., & Sausville, E. (1986). Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, *83*, 1092-1096.
- Nelson, D., Tan, T., Rabson, A., D., A., Degenhardt, K., & White, E. (2004). Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev*, *18*(17), 2095-107.
- Network, T. C. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61-70.
- Nisen, P., Zimmerman, K., Cotter, S., Gilbert, F., & Alt, F. (1986). Enhanced expression of the N-myc gene in Wilms' tumors. *Cancer Res*, *46*, 6217-6222.
- Norbury, C., & Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, *61*, 441-470.
- Okazaki Y, F. M., Yamanaka, I., Kiyosawa, H., Yagi, K., Tomaru, Y., Hasegawa, Y., . . . diğerleri, v. (2002). Analysis of the mouse

- transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420, 563-573.
- Onitilo, A., Jessica, M. E., Robert, T. G., & Bickol, N. M. (2009). Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res*, 7(1-2), 4-13.
- Özeş, A., Miller, D., Özeş, O., Fang, F., Liu, Y., Matei, D., . . . Nephew, K. (2016). NF-κB-HOTAIR axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. *Oncogene*, 35, 5350.
- Paige, A. (2003). Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2147-2163.
- Palade, G. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(1), 59-68.
- Palazzo, A., & Lee, E. (2018). Sequence Determinants for Nuclear Retention and Cytoplasmic Export of mRNAs and lncRNAs. *Front Genet*, 9, 440.
- Pang, K., Frith, M., & Mattick, J. (2006). Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet*, 22(1), 1-5.
- Parker, J., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., . . . Charles. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. , 2009. 27(8): p. 1160-7. *J Clin Oncol*, 27(8), 1160-7.
- Parton, M., Dowsett, M., & Smith, I. (2001). Studies of apoptosis in breast cancer. *Brit Med J*, 322, 1528-1532.
- Patel, L., & al., e. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*, 11, 764-8.
- Pei Y. Liu, D. E. (2014). Effects of a Novel Long Noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc Expression and Neuroblastoma Progression. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Peltomaki, P. (2016). Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer*, 15(3), 385-393.
- Peng, Q., Tong, P., Gu, L., & Li, W. (2020). Astragalus polysaccharide attenuates metabolic-memory-triggered ER stress and apoptosis via regulation of miR-204/SIRT1 axis in retinal pigment epithelial cells. *Biosci. Rep.*, 40, BSR20192121.
- Perou, C., Sørlie, T., Eisen, M., van de, R. M., Jeffrey, S., Rees, C., & al, e. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-52.
- Placzek, W., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J., & Pellicchia, M. (2010). A survey of the antiapoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis.*, e40.
- Planas-Silva, M., & Weinberg, R. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 9(6), 768-772.
- Pohl, B., & Knöchel, W. (2001). Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev.*, 103, 93-106.

- Ponting, C., Oliver, P., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, *136*(4), 629-41.
- Prat, A., Parker, J., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J., . . . Perou, C. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, *12*, 68-10.
- Qiu, J.-J., Lin, Y.-Y., Ding, J.-X., Feng, W.-W., Jin, H.-Y., & Hua, K.-Q. (2015). Long non-coding RNA ANRIL predicts poor prognosis and promotes invasion/metastasis in serous ovarian cancer. *International Journal of Oncology*, *46*(6), 2497–2505.
- Radhakrishna, S. (2015). Breast Diseases: Imaging and Clinical Management. . 233-140.
- RajBhandary, U., & Kohrer, C. (2006). Early days of tRNA research: discovery, function, purification and sequence analysis. *J Biosci*, *31*(4), 439-51.
- Reed, J. (1996). Balancing cell life and death: apoptosis and breast cancer. *J Clin Invest*, *97*, 2403-2404.
- Ross, J., & Fletcher, J. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, *16*(6), 413-428.
- Rouzier, R., Perou, C., Symmans, W., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., & al., e. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, *11*(16), 5678-85.
- Ruben, S., Klement, J., Coleman, T., Maher, M., Chen, C., & Rosen, C. (1992). I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev*, *6*(5), 745–60.
- Rusciano, D., & Burger, M. (1992). Why do cancer cells metastasize into particular organs? *Bioessays*, 185-94.
- Russnes, H., Lingjærde, O., Børresen-Dale, A., & Caldas, C. (2017). Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Patho*, *187*(10), 2152-2162.
- S.L., A., Kononen, J., Walker, R., Azorsa, D., Tanner, M., Guan, X., . . . Meltzer, P. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, *277*(5328), 965-968.
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., & Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(20), 11217-11222.
- Sati, S., & al., e. (2012). Genome-wide analysis reveals distinct patterns of epigenetic features in long non-coding RNA loci. *Nucleic Acids Res*, *40*(20), 10018-31.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K., Varmus, H., Bishop, J., & Gilbert, F. (1983). Myc hücresel onkogen ile sınırlı homolojiye sahip amplifiye DNA, insan nöroblastoma hücre hatları ve bir nöroblastoma tümörü tarafından paylaşılır. *Nature*, *305*, 245-248.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., . . . Cardoso, F. (2013). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 7-23.

- Shao-Xin, H., Wen-Yan, F., W., L., Hui, L., Xin, W., Hao, Z., & Wen-Bin, J. (2020). Maspin inhibits MCF-7 cell invasion and proliferation by downregulating miR-21 and increasing the expression of its target genes. *ONCOLOGY LETTERS*, *19*, 2621-2628.
- Shay, J., & Roninson, I. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, *23*, 2919-2933.
- Sherr, C. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*, *73*(6), 1059-1065.
- Sherr, C. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*, *60*(14), 3689-3695.
- Sigurdsson, S., & al., e. (1997). BRCA2 mutation in Icelandic prostate cancer patients. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, *75*, 758-761.
- Slamon, D., & Pegram, M. (2001). Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol*, 13-9.
- Song, L., Wei, D., Pei, Z., & Zhenjun, L. (2018). lncRNA FAM83H-AS1 is associated with the prognosis of colorectal carcinoma and promotes cell proliferation by targeting the Notch signaling pathway. *Oncol Lett*, *15*(2), 1861-1868.
- Song, M., Salmena, L., & Pandolfi, P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*, 283-296.
- Song, W., Hu, P., Shan, Y., Du, M., Liu, A., & Ye, R. (2014). Cartilage polysaccharide induces apoptosis in K562 cells through a reactive oxygen species-mediated caspase pathway. *Food Funct.*, *5*, 2486-2493.
- Sørlie, T., Perou, C., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., & al., e. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(19), 10869-74.
- Sorlie, T., Perou, C., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., . . . Thorsen, T. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(19), 10869-74.
- Sotiriou, C., Neo, S., McShane, L., Korn, E., Long, P., Jazaeri, A., & al., e. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10393-8.
- Stambolic, V., Pherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., . . . Mak, T. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, *8*, 317-25.
- Steck, P., Pershouse, M., Jasser, S., Yung, W., Lin, H., Ligon, A., . . . Tavtigian, S. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genetics*, *15*, 356-362.
- Stephens, P., Tarpey, P., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D., . . . al.; e. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, *486*(7403), 400-404.
- Subramaniam, M., Chan, J., Soong, R., Ito, K., Ito, Y., Yeoh, K., . . . Putti, T. (2009). RUNX3 inactivation by frequent promoter hypermethylation and protein mislocalization constitute an early event in breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*, *113*, 113-121.

- Sun, H., Wang, G., Peng, Y., Zeng, Y., Zhu, Q.-N., Li, T.-L., & ... Zhu, Y.-S. (2015). H19 lncRNA mediates 17 $\beta$ -estradiol-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 33(6), 3045–3052.
- Sutherland, R., & Musgrove, E. (2004). Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 9(1), 95-104.
- Suzanne, J., A. C., Jessup, J., Christos, P., Sanford, M. W., Stanley, H., & Bert, V. (1990). P53 Gene-Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*, 50, 7717- 7722.
- Taft, R., Pheasant, M., & Mattick, J. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29(3), 288-99.
- Takashima, A., & Faller, D. (2013). Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin Ther Targets*, 17, 507-31.
- Takuwa, N., & Takuwa, Y. (2001). Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system. *Mol Cell Endocrinol*, 177(1-2), 25-33.
- Tavtigian, S., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., . . . Dumont, M. (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13qlinked kindreds. *Nature Genetics*, 12, 333-337.
- Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726), 422-426.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, K. D. (2016). *Türkiye Kanser Kontrol Programı, 1.Baskı, Ankara*.
- Ulitsky, I., & Bartel, D. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26-46.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P., . . . Waterfield, M. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, 70, 535-602.
- Virolle, T., Adamson, E., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., & Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol*, 3, 1124-8.
- Vivanco, M. (2010). Biomarkers in breast cancer. *Methods Mol Biol*, 593, 137-56.
- Vlahopoulos, S. (2017). Aberrant control of NF- $\kappa$ B in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biology & Medicine*, 14(3), 254–270.
- Wang, J., Liu, X., Wu, H., Ni, P., Gu, Z., Qiao, Y., . . . Fan, Q. (2010.). CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Re*, 38(16), 5366-83.
- Wang, S.-H., Zhang, W.-J., Wu, X.-C., Zhang, M.-D., Weng, M.-Z., Zhou, D., & ... Quan, Z.-W. (2016). Long non-coding RNA MALAT1 promotes gallbladder cancer development by acting as a molecular sponge to regulate miR-206. *Oncotarge*, 7(25), 37857–37867.
- Wang, X., & al., e. (2016). Long non-coding RNA DILC regulates liver cancer stem cells via IL-6/STAT3 axis. *J Hepatol*, 64(6), 1283-94.

- Wang, Y., & et al. (2015). The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell*, 16(4), 413-25.
- Weigel, M., & Dowsett, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*, 17(4), 245-62.
- Weinberg, R. (1988). Finding the anti-oncogene. *Sci Am*, 259(3), 44-51.
- Weinberg, R., & Penman, S. (1968). Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *J Mol Biol*, 38(3), 289-304.
- Weinstein, L. (1990). Hormonal therapy in the patient with surgical menopause. *Obstet Gynecol*, 75, 475-505.
- Weiss, M., Abel, E., Dadpey, N., & Aplin, A. (2014). FOXD3 modulates migration through direct transcriptional repression of TWIST1 in melanoma. *Mol Cancer Res.*, 12, 1314-23.
- White, N., Cabanski, C., Silva-Fisher, J., Dang, H., Govindan, R., & Maher, C. (2014). Transcriptome sequencing reveals altered long intergenic non-coding RNAs in lung cancer. *Genome Biol*, 15, 429.
- Wolff, A., M.E.H., H., Allison, K., B.E., H., P.B., M., & J.M.S., B. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*, 36(20), 2105-2122.
- Wooster, R., & al., e. (1996). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 (vol 378, pg 789, 1995). *Nature*, 379, 749-749.
- X. Dai, S. Z. (2012). Correlated expression of Fas, NF-kappaB, and VEGF-C in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 633-639.
- X. Zhou, X. H.-M. (2016). Long non-coding RNA ANRIL regulates inflammatory responses as a novel component of NF-κB pathway. *RNA Biol.*, 98-108.
- Xiaoxing, X., Gaoyun, X., Wenjun, C., Hongdan, F., Mingqian, L., & Xiaoying, C. (2020). FOXD3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through regulation of the PI3K/Akt pathway. *Biochemistry and Cell Biology*.
- Xiong, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, M., He, W., & Qi, L. (2017). The long non-coding RNA XIST interacted with miR-124 to modulate bladder cancer growth, invasion and migration by targeting androgen receptor (AR). *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(1), 405-418.
- Xu, W., Li, J., Li, L., Hou, T., Cai, X., & Liu, T. (2019). FOXD3 suppresses tumor-initiating features in lung cancer via Transcriptional Repression of WDR5. *Stem Cells*.
- Y. Sun, J. P. (2017). Knockdown of long non-coding RNA H19 inhibits multiple myeloma cell growth via NF-κB pathway. *Sci. Rep.*
- Yan, J., Zhao, C., Ding, L., & Zhou, X. (2015). FOXD3 suppresses tumor growth and angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 466, 111-6.
- Yan, R., Wang, K., Peng, R., Wang, S., Cao, J., Wang, P., & Song, C. (2016). Genetic variants in lncRNA SRA and risk of breast cancer. *Oncotarge*, 7(16), 22486.

- Yang, F., & al., e. (2013). Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Mol Cell*, 49(6), 1083-96.
- Yang, F., Lv, S. X., Lv, L., Liu, Y. H., Dong, S. Y., Yao, Z. H., . . . Wang, O. C. (2016). Identification of lncRNA FAM83H-AS1 as a novel prognostic marker in luminal subtype breast cancer. *OncoTargets and therapy*, 9, 7039–7045.
- Yang, F., Lv, S., Lv, L., Liu, Y., Dong, S., Yao, Z., . . . Wang, O. (2016). Identification of lncRNA FAM83H-AS1 as a novel prognostic marker in luminal subtype breast cancer. *Onco Targets Ther*, 9, 7039-7045.
- Yang, F., Xue, X., Bi, J., Zheng, L., Zhi, K., Gu, Y., & Fang, G. (2013). Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(3), 437-445.
- Yang, L., Xu, L., Wang, Q., Wang, M., & An, G. (2016). Dysregulation of long non-coding RNA profiles in human colorectal cancer and its association with overall survival. *Oncol Lett*, 12, 4068-4074.
- Yao, Y., Ma, J., Xue, Y., Wang, P., Li, Z., Liu, J., & ... Liu, Y. (2015). Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma stem cells by up-regulating miR-152. *Cancer Letters*, 359(1), 75–86.
- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. . *World J Clin Oncol*, 5(3), 412-24.
- Yuan, J., & al., e. (2014). A long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 25(5), 666-81.
- Z. Li, T.-C. C.-Y. (2014). The long noncoding RNA THRIL regulates TNF $\alpha$  expression through its interaction with hnRNPL. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1002-1007.
- Zhang, J., Feng, S., Su, W., Bai, S., Xiao, L., Wang, L., . . . Chen, G. .. (2017). Overexpression of FAM83H-AS1 indicates poor patient survival and knockdown impairs cell proliferation and invasion viaMET/EGFR signaling in lung cancer. *Sci Rep*, 7, 42819.
- Zhang, K. e. (2014). The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. *Gene*, 547(1), 1-9.
- Zhang, R., Xia, L., Lu, W. W., Zhang, J., & Zhu, J. (2016). LncRNAs and cancer. *Oncology Letters*, 12(2), 1233-1239.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### SERCAN KAPANCIK ÖĞRETİM GÖREVLİSİ

**E-Posta Adresi** : sercan.kapancik@okan.edu.tr  
**Telefon (İş)** : 2166771630-3872  
**Telefon (Cep)** : 5428042738  
**Adres** : Ressam Vecihi Bereketoğlu Sok. Can Apt. No:13  
Daire:12/Kadıköy/İSTANBUL

#### Görevler

ÖĞRETİM GÖREVLİSİ 2019	İSTANBUL OKAN ÜNİVERSİTESİ/TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ 2019-2019	İSTANBUL AYVANSARAY ÜNİVERSİTESİ/PLATO MESLEK YÜKSEKOKULU/ECZANE HİZMETLERİ BÖLÜMÜ/ECZANE HİZMETLERİ PR. (TAM BURLU))

#### Projelerde Yaptığı Görevler:

- Proje No: CÜBAB T-553, Yüksek lisans öğrencisi-araştırmacı, Proje Adı: Tip-2 Diyabetli ve MemeKanserli Hastalarda İnsan Antimikrobiyal Katyonik Peptitlerin Düzeylerinin Araştırılması, ARASTIRMA PROJESİ. Araştırmacı:KAPANCIK SERCAN. . 18/02/2015 - 18/02/2015 (ULUSAL)
- Proje No: 12310, Tübitak 1512 Aşama 2 "Bireysel Genç Girişim Programı (BİGG)", DoktoraÖğrencisi-Girişimci, Proje Adı: Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan 1, 2 ve 3. Nesil TirozinKinaz İnhibitörlerine Dirençli Ksenograft Nude Fare Modelinin Geliştirilmesi., TÜBİTAK PROJESİ, Araştırmacı:KAPANCIK SERCAN. . 15/05/2017 - 15/05/2017 (ULUSAL)

#### İdari Görevler

Eğitim Koordinatörü  
2019 İSTANBUL OKAN ÜNİVERSİTESİ/TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ

#### Dersler \*

2019-2020

##### Lisans

	Öğrenim Dili	Ders Saati
Biyokimya	Türkçe	2
Medical Biochemistry Laboratory	İngilizce	1
Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı	Türkçe	1

#### Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Dogan Halef Okan,Buyuktuna Seyit Ali,KAPANCIK SERCAN,Bakir Sevtap (2018). Evaluation of the associations between endothelial dysfunction, inflammation and coagulation in Crimean-Congo hemorrhagic fever patients. ARCHIVES OF VIROLOGY, 163(3), 609-616., Doi: 10.1007/s00705-017-3653-1 (Yayın No: 5678062)
2. Celik V. Kenan,KAPANCIK SERCAN,Kacan Turgut,Kacan Selen Baloglu,Kapancik Serkan,Kilicgun Hasan (2017). Serum levels of polyamine synthesis enzymes increase in diabetic patients with breast cancer. ENDOCRINE CONNECTIONS, 6(8), 574-579., Doi: 10.1530/EC-17-0137 (Yayın No: 5678082)
3. Kapancik Serkan,Celik V. Kenan,Kilickap Saadettin,Kacan Turgut,KAPANCIK SERCAN (2016). The Relationship of Agmatine Deficiency with the Lung Cancer. UHOD-ULUSLARARASI HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ DERGISI, 26(2), 103-109., Doi: 10.4999/uhod.160971 (Yayın No: 5678072)

#### E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. KAPANCIK SERCAN (2016). Kapancık, S., Çelik, V.K., Kaçan, T., Baloğlu K. S., "Antimikrobiyal Etkili Katyonik Peptitlerin Meme Kanseri ve Tip 2 Diyabet ile İlişkisi" 6. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi, Belek, Antalya,Kongre Kitabı, 272, 2016.. Kongre (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5002432)
2. KAPANCIK SERCAN (2015). Kapancık, S., Çelik V.K., Kılıçkap, S., Kaçan, T., Kapancık, S., "Agmatin Eksikliğinin Akciğer Kanseriyle İlişkisi" 21. Ulusal Kanser Kongresi, Belek, Antalya, Kongre Kitabı (sözel bildiri), 225,2015.. Bildiri (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5002430)

#### Sertifika

1. İleri Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu Sertifikası, ., İstanbul, Sertifika, 07.09.2016 -07.09.2016 (Ulusal)
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, ., İstanbul, Sertifika, 15.03.2016 -15.03.2016 (Ulusal)

#### Kurs

3. Klinik Toksikoloji Kursu, ., İstanbul, Kurs, 15.05.2017 -15.05.2017 (Ulusal)

**EK-1**  
**ETİK KURUL KARARI**



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK  
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme Kanserinde Uzun Kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in Proliferasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi
-----------------------	---

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Veysel Kenan Çelik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Doktora tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza:



## CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme Kanserinde Uzun Kodlamayan RNA FAM83H-AS1'in Proliferasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2018-07/13	Tarih: 30.07.2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
Başkanın Unvanı / Adı / Soyadı:	Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anatomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Muhittin Sönmez
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yalçın Karagöz
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Hatice Özer
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Ercan Özdemir
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Gülay Yıldırım
Dr. Öğret. Üyesi Mehmet Ataş	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Mehmet Ataş
Dr. Öğret. Üyesi Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Binnur Bağcı
Dr. Öğret. Üyesi Engin Altınkaya	İç hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Engin Altınkaya
Dr. Öğret. Üyesi Melih Ülgey	Protetik Diş Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Melih Ülgey

\*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza: