

**KANSER KÖK HÜCRE SİNYAL İLETİM  
YOLAKLARINDA GÖREV ALAN MİKRORNA'LARIN  
MEME TÜMÖRLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Elif ERTÜRK**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER KÖK HÜCRE SİNYAL İLETİM YOLAKLARINDA GÖREV ALAN  
MİKRORNA'LARIN MEME TÜMÖRLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Elif ERTÜRK**  
0000-0001-7668-796X

Prof. Dr. Ferda ARI

Prof. Dr. M. Şehsuvar GÖKGÖZ  
Bursa Uludağ Üniversitesi

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2020  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ ONAYI

Elif ERTÜRK tarafından hazırlanan "KANSER KÖK HÜCRE SINYAL İLETİM YOLAKLARINDA GÖREV ALAN MİKRORNA'LARIN MEME TÜMÖRLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Ferda ARI  
**İkinci Danışman** : Prof. Dr. M. Şehsuvar GÖKGÖZ (Bursa Uludağ Üniversitesi)

**Başkan** : Prof. Dr. Ferda ARI  
0000-0002-6729-7908  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Prof. Dr. Hale ŞAMLI  
0000-0003-4728-0735  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Genetik Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK  
0000-0001-8403-2939  
İstanbul Üniversitesi,  
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Prof. Dr. İlhan YAYLIM  
0000-0003-2615-0202  
İstanbul Üniversitesi,  
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Doç. Dr. Egemen DERE  
0000-0001-9572-1051  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN Y.,  
Enstitü Müdürü  
2023...

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**25/08/2020**

**Elif ERTÜRK**

## ÖZET

Doktora Tezi

### KANSER KÖK HÜCRE SİNYAL İLETİM YOLAKLARINDA GÖREV ALAN MİKRORNA'LARIN MEME TÜMÖRLERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

**Elif ERTÜRK**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Ferda ARI

**İkinci Danışman:** Prof. Dr. M. Şehsuvar GÖKGÖZ (Bursa Uludağ Üniversitesi)

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve kanser ölümünün en sık nedenidir. mikroRNA (miRNA)'ların kanserin başlaması ve ilerlemesi ve kanser kök hücrelerin oluşumundaki etkili rolleri nedeniyle biyobelirteç ve/veya terapötik hedef olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, kanser kök hücre sinyal yollarında etkili miRNA'ların meme tümörlerinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, 50 meme kanserli hastanın taze tümör doku örnekleri ve ilgili hastaların 20'sinin normal doku örneklerinde 15 miRNA'nın RT-qPCR yöntemiyle ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Verilerin değerlendirilmesinde, Ki-Kare, Kolmogorov Smirnov, T, Tukey, Mann Whitney U, Spearman's Rho korelasyon testleri, Binary Logistic Regresyon ve ROC analizi yapıldı. Tüm meme kanseri hastalarında miR-31 (p=0.034) ve miR-150-3p (p=0.034) ekspresyon düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. miR-31 ve miR-150-3p'nin tanısal değerleri araştırıldığında, bu iki miRNA'nın birlikte kullanımının meme kanseri tanısında önemli olabileceği belirlendi. Moleküler alt gruplara göre Luminal A, Luminal B, HER2(+) ve TNBC olarak 4 gruba ayrılan hastalar arasındaki miRNA ekspresyonları incelendiğinde ise, ılımlı (Luminal A ve B) grupta miR-200c (p=0.039) ve miR-27a (p=0.018) ekspresyonlarının artışı, agresif (HER2(+) ve TNBC) grupta ise aynı miRNA'ların ekspresyonlarının azalışı istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi. miR-200c ve miR-27a'nın tanısal gücü değerlendirildiğinde, bu iki miRNA'nın hastalığın Luminal A ve B ya da HER2+ ve TNBC özellikte olma durumunu belirlemede etkili olabileceği görüldü. Bu bulguların ışığında, miR-31 ve miR-150-3p miRNA'larının meme kanseri hastalarının prognozunu ve gelişebilecek metastatik süreci değerlendirmede yol gösterici, miR-200c ve miR-27a'nın meme tümörlerinin alt tiplerinin ayırımında prediktif potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, miRNA ekspresyon farklılıklarının meme tümörlerinde biyobelirteç olarak kullanılmasının yakın gelecekte mümkün olabileceği ve bu doğrultuda ileri fonksiyonel analizlerin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, miRNA, kanser kök hücre, biyobelirteç

**2020, xi + 143 sayfa.**

## ABSTRACT

PhD Thesis

### EVALUATION OF MICRORNAS IN CANCER STEM CELL SIGNALING PATHWAYS AS BIOMARKERS IN BREAST TUMORS

**Elif ERTURK**

Bursa Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Ferda ARI

**Second Supervisor:** Prof. Dr. M. Sehsuvar GOKGOZ (Bursa Uludag University)

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide and is the most common cause of cancer death. It is thought that microRNAs (miRNAs) can be used as biomarkers and/or therapeutic targets due to their effective role in the initiation and progression of cancer and in the formation of cancer stem cells. In this thesis work, it is aimed to investigate miRNAs effective in cancer stem cell signaling pathways in breast tumors. Expression analyzes of 15 miRNAs were performed by RT-qPCR method in fresh tumor tissue samples of 50 breast cancer patients and in normal tissue samples of 20 of the related patients. In the evaluation of the data, Chi-Square, Kolmogorov Smirnov, T, Tukey, Mann Whitney U, Spearman's Rho correlation test, Binary Logistic Regression and ROC analysis were performed. The increase in miR-31 ( $p=0.034$ ) and miR-150-3p ( $p=0.034$ ) expression levels was statistically significant in all breast cancer patients. When the diagnostic values of miR-31 and miR-150-3p were investigated, it was determined that the use of these two miRNAs together could be important in the diagnosis of breast cancer. When the miRNA expressions were examined among the patients who were divided into 4 groups as Luminal A, Luminal B, HER2 (+) and TNBC according to molecular subgroups, the increase in miR-200c ( $p = 0.039$ ) and miR-27a ( $p = 0.018$ ) expressions in the mild (Luminal A and B) group and a decrease in the expressions of the same miRNAs in the aggressive (HER2 (+) and TNBC) group were statistically significant. When the diagnostic power of miR-200c and miR-27a was evaluated, these two miRNAs were found to be effective in determining whether the disease was Luminal A and B or HER2+ and TNBC. In the light of these findings, it is thought that miR-31 and miR-150-3p miRNAs can be a guide the evaluation of the prognosis of breast cancer patients and the metastatic process that may develop, miR-200c and miR-27a can be thought to have predictive potential in the differentiation of subtypes of breast tumors. As a result, it was concluded that the use of miRNA expression differences as a biomarker in breast tumors may be possible in the near future and further functional analyzes should be performed accordingly.

**Key words:** Breast cancer, miRNA, cancer stem cell, biomarker

**2020, xi + 143 pages.**

## ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, insani ve ahlaki değerlerini örnek aldığım, birlikte çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, hoşgörüsü ve desteği ile her zaman yanımda olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ferda ARI'ya en derin minnet duygularıyla,

Doktora çalışmalarımda eş danışmanlığımı üstlenen, bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, her aşamada bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve ilk tanıdığım günden itibaren her zaman arkamda olduğunu hissettiren değerli hocam Prof. Dr. M. Şehsuvar GÖKGÖZ'e,

Çalışmalarımın tamamlanması sürecinde katkı, öneri ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Şahsine TOLUNAY'a,

Tez çalışmama farklı bakış açıları içeren fikirleriyle ve tavsiyeleriyle katkı sağlayan, bilgi ve önerilerini benimle paylaşan ve tez izleme komitesi üyeliğini yapan değerli hocam Prof. Dr. Hale ŞAMLI'ya,

Tez çalışmamın örneklerini temin etmede yardımlarını ve emeklerini esirgemeyen arkadaşlarım Hülya GÜNDÜZ, Hediye AVCI ve Büşra BİLEN'e, bilimsel ve manevi desteklerinden ötürü Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Birimi ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı değerli asistan ve personeline,

Doktora eğitimime başladığım günden beri dostlukları, yardımları, yol göstermeleri ve bilimsel tecrübeleri ile katkılarından ötürü BUKAL ailesinin kıymetli doktora ve yüksek lisans öğrencilerine,

Deneysel çalışmalarım esnasında göstermiş olduğu sabrı, özverisi, desteğinden ve çalışmama kattığı tüm emeklerinden dolayı Berkay BOZKURT ve İZGE laboratuvarının tüm personeline,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olup moral ve motivasyon sağlayan, bütün sevinç ve üzüntülerimi paylaştığım değerli dostlarıma,

Dünyaya gözümü ilk açtığım andan bugünüme kadar hep yanımda olan, her alanda desteklerini, sonsuz güvenlerini ve sevgilerini hissettiğim canım aileme,

Bu doktora tez çalışmasını; DDP(F)-2020/5 proje numarası ile destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif ERTÜRK  
25/08/2020

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	4
2.3. Meme Kanseri.....	9
2.4. Meme Anatomisi.....	10
2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	11
2.6. Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	15
2.6.1. Patoloji, İnvazivlik ve Prevalansa Dayalı Meme Kanseri Türleri.....	15
2.6.2. İnvaziv Olmayan (veya İn Situ) Meme Kanseri.....	16
2.6.3. İnvaziv veya İnfiltratif Meme Kanseri.....	16
2.6.4. Metastatik Meme Kanseri.....	17
2.6.5. Daha Az Yaygın Meme Kanseri Türleri.....	18
2.7. Meme Kanserinin Moleküler veya İntrinsik Alt Tipleri.....	19
2.7.1. Luminal A Meme Kanseri.....	20
2.7.2. Luminal B Meme Kanseri.....	20
2.7.3. HER2 Pozitif (+) Meme Kanseri.....	20
2.7.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri / Üçlü Negatif (TNBC).....	21
2.7.5. Normal Benzeri Meme Kanseri.....	22
2.8. Meme Kanserinde Klinik Evreleme.....	22
2.9. Kanser Kök Hücre Biyolojisi.....	23
2.10. Kanser Kök Hücre Hipotezi.....	24
2.11. Kanser Kök Hücre Özellikleri.....	24
2.12. Kanser Kök Hücrelerinde Gelişimsel Sinyal Yolakları.....	26
2.12.1. Klasik Wnt/ $\beta$ -katenin Sinyal Yolağı.....	27
2.12.2. Notch Sinyal Yolağı.....	29
2.12.3. Hedgehog (Hh) Sinyal Yolağı.....	32
2.13. Meme Kanseri Kök Hücreleri.....	34
2.14. MikroRNA'lar (miRNA'lar).....	35
2.14.1. miRNA Biyogenezi.....	36
2.15. Kanserde miRNA'lar.....	41
2.15.1. Meme Kanserinde miRNA'lar.....	42
2.15.2. Meme Kanserinde Bilinen Tümör Baskılayıcı miRNA'lar.....	46
2.15.3. Meme Kanserinde Bilinen Onkogenik miRNA'lar.....	48
2.16. miRNA'lar ve Kanseri Kök Hücreleri.....	50
2.17. miRNA'lar ve Meme Kanseri Kök Hücreleri.....	51
2.18. Meme Kanseri Kök Hücreleri'nde Sinyal Yolaklarını Düzenleyen miRNA'lar.....	56
2.18.1. Wnt/ $\beta$ -Katenin Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	59
2.18.2. Notch Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	62
2.18.3. Hedgehog Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	63



	<b>Sayfa</b>
2.18.4. STAT3 Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	64
2.18.5. TGF-β Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	65
2.18.6. PI3K/Akt Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	66
2.18.7. Apoptotik Sinyal Yolağını Düzenleyen miRNA'lar.....	67
2.19. Biyobelirteç Olarak miRNA'ların Potansiyeli.....	69
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	71
3.1. Hasta Grubu.....	71
3.2. Gereçler.....	71
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	71
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	72
3.3. Yöntemler.....	73
3.3.1. Doku �rneklerinden RNA İzolasyonu.....	73
3.3.2. Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini.....	74
3.3.3. RNA'lardan cDNA Sentezi.....	75
3.3.4. Real-Time PCR (RT-qPCR) ile miRNA Ekspresyon Analizleri.....	75
3.3.5. RT-qPCR Tabanlı miRNA Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.....	79
3.3.6. İstatistiksel Analiz.....	80
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	81
4.1. Hastalara Ait Demografik ve Klinik �zellikler.....	81
4.2. Kontrol Grubuna Göre Meme Kanseri Hasta Grupları Arasındaki Farklar.....	91
4.2.1. Kontrol Grubu ile HER2+ Grubu Arasında Ekspresyon Düzeyleri Fark Analizi Sonuçları.....	91
4.2.2. Kontrol Grubu ile TNBC Grubu Arasında Ekspresyon Düzeyleri Fark Analizi Sonuçları.....	92
4.2.3. Kontrol Grubu ile Luminal A Grubu Arasında Ekspresyon Düzeyleri Fark Analizi Sonuçları.....	94
4.2.4. Kontrol Grubu ile Luminal B Grubu Arasında Ekspresyon Düzeyleri Fark Analizi Sonuçları.....	95
4.3. Meme Kanseri Hasta Grupları Arasındaki Farklar.....	98
4.3.1. HER2(+) ile TNBC Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	98
4.3.2. HER2(+) ile Luminal A Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	99
4.3.3. HER2(+) ile Luminal B Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	101
4.3.4. TNBC ile Luminal A Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	103
4.3.5. TNBC ile Luminal B Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	105
4.3.6. Luminal A ile Luminal B Hasta Gruplarının Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	107
4.3.7. İlımlı (Luminal A + Luminal B) ve Agresif (HER2(+) ve TNBC) Hasta Gruplarının miRNA Ekspresyon Düzeyleri ve Fark Analizi Sonuçları.....	108
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	114
KAYNAKLAR.....	124
ÖZGEÇMİŞ.....	142

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler Açıklama

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\epsilon$	Epsilon
$\gamma$	Gama
$\mu$	Mikro

### Kısaltmalar Açıklama

ABCG1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
ABCG2	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGO2	Argonaute RISC Catalytic Component 2
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKT3	AKT Serin/Treonin Kinaz 3
ALDH	Aldehit Dehidrojenaz
ALH	Atipik Lobüler Hiperplazi
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenozin Trifosfat
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BIM	BCL2-Like 11
BOD1	Biorientation Of Chromosomes In Cell Division 1
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Treonin Kinaz
BRCA1	Meme Kanseri Tip 1
BRCA2	Meme Kanseri Tip 2
BRH	Benign Reaktif Hiperplazi
CBF1	Centromere-Binding Protein 1
CCL21	C-C Motif Chemokine Ligand 21
CCND1	Siklin D1
CCND2	Siklin D2
CCNJ	Cyclin J
CCR7	C-C Motif Chemokine Receptor 7
CDH1	Kaderin 1
CDK6	Siklin Dependent Kinaz 6
cDNA	Komplementer DNA
CHEK2	Kontrol Noktası Kinaz 2
CK1 $\alpha$	Kazein Kinaz 1 Alfa

CK5/6	Sitokeratin 5/6
DCIS	Duktal Karsinoma İn Situ
DGCR8	DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoxynucleotide
DUSP4	Dual Specificity Phosphatase 4
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMD	Epitel-Mezenkimal Değişim
EMSY	BRCA2-interacting Transcriptional Repressor
EpCAM	Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü
ERBB3	ErbB2 Receptör Tirozin Kinaz 3
ERBB4	ErbB2 Receptör Tirozin Kinaz 4
ER	Östrojen Reseptörü
ER $\alpha$	Östrojen Reseptör Alfa
FGFR1	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
FGF $\beta$	Fibroblast Growth Factor Beta
FoCA1	Friend Of Cyclin A
FOXC1	Forkhead Box C1
GSK-3 $\beta$	Glikojen Sentaz Kinaz-3 $\beta$
HDAC	Histon Deasetilaz
HER2	ErbB2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
HIPK1	Homeodomain Interacting Protein Kinase 1
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
HOXD10	Homeobox D10
HRAS	HRAS Proto-Oncogene, GTPaz
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
IDC	İnvaziv Duktal Karsinoma
IGFBP-2	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2
ILC	İnvaziv Lobüler Karsinoma
JAK2	Janus Kinase 2
Ki67	Proliferasyon Markırı Ki-67
KKH	Kanser Kök Hücre
KLF8	Kruppel Like Factor 8
KRAS	KRAS Proto-Onkogen, GTPaz
LCIS	Lobüler Karsinom İn Situ
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LGR	Leucine Rich Repeat Containing G Protein
LRP5	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinle İlişkili Protein 5
MEGF9	Multiple EGF Like Domains 9
MERTK	MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase
miRNA	MikroRNA
MKKH	Meme Kanseri Kök Hücresi

MYC	MYC Proto-Oncogene
NANOG	Nanog Homeobox
NF-K $\beta$	Nükleer Faktör Kappa $\beta$
NPM1	Nükleoposmin 1
OCT4	Octamer Binding Transcription Factor 4
PALB2	Partner And Localizer Of BRCA2
PARP	Poli(ADP-Riboz) Polimeraz 1
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDCD4	Programmed Cell Death 4
PIK3CA	Fosfotidilinozitol-4-5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alfa
PI3K	Fosfotidilinozitol-3-Kinaz
PR	Progesteron Reseptörü
PTCH	Patched
PTEN	Fosfotaz ve Tensin Homoloğu
P63	Tumor Protein P63
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RASSF1A	Ras Association Domain Family Member 1
RHOC	Ras Homolog Family Member C
RNA	Ribo Nükleik Asit
SATB2	SATB Homeobox 2
SHH	Sonic Hedgehog Signaling Molecule
SMO	Smoothened, Frizzled Class Receptor
SNAIL	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNORD48	Small Nucleolar RNA, C/D Box 48
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
SPIN1	Spindlin 1
SPOCK1	Kazal Benzeri Proteoglikan 1
SPRED1	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
STK11	Serin/Treonin Kinaz 11
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TNBC	Üçlü Negatif, Triple Negatif Meme Kanseri
TNM	Tümör, Nod ve Metastaz
TPM1	Tropomyosin 1
TP53	Tümör Protein 53
TWIST	Twist Family BHLH Transcription Factor
UICC	Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği
U6	RNA, U6 Small Nuclear
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor A
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanserin en temel 10 özelliğinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. 2018 yılı tahmini küresel kanser yükü.....	8
Şekil 2.3. Meme kanserinin anatomik ve histolojik kökenleri.....	11
Şekil 2.4. İnaktif (sol panel) ve aktif (sağ panel) WNT sinyal yolları.....	27
Şekil 2.5. Notch sinyal yolağı.....	30
Şekil 2.6. Hedgehog inhibisyonu (sol panel) ve aktivasyonu (sağ panel) sinyal yolları.....	32
Şekil 2.7. miRNA'ların biyogenezi, işlenmesi ve olgunlaşması.....	37
Şekil 2.8. Onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak miRNA'lar.....	4
Şekil 2.9. miRNA'ların meme kanseri kök hücreleri sinyal yollarının düzenlenmesindeki rolü.....	57
Şekil 3.1. RNA izolasyonu şematik gösterimi.....	74
Şekil 3.2. RT-qPCR analizi şematik gösterimi.....	76
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubunun miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon dağılımları.....	88
Şekil 4.2. Meme kanserli hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyonlarının tanısal değerleri için yapılan ROC analizi sonucu.....	89
Şekil 4.3. HER2(+) ve kontrol grubunun miR-15b-5p ekspresyon düzeyi dağılımı.....	92
Şekil 4.4. TNBC ve kontrol grubunun let-7c ve miR-200c ekspresyon düzeylerinin dağılımları.....	93
Şekil 4.5. Luminal A ve kontrol grubunun miR-31 ve miR-15b-5p ekspresyon düzeylerinin dağılımları.....	95
Şekil 4.6. Luminal B ve kontrol grubunun miR31, miR-135a-5p, miR-150-3p ve miR-374a ekspresyon düzeylerinin dağılımları.....	97
Şekil 4.7. HER2(+) ve TNBC hasta gruplarının miR-15b-5p ekspresyon düzeyi arasındaki farklar.....	99
Şekil 4.8. HER2(+) ve Luminal A hasta gruplarının miR-200c ekspresyon düzeyi arasındaki farklar.....	100
Şekil 4.9. HER2(+) ve Luminal B hasta gruplarının miR200c, miR-15b-5p, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar.....	102
Şekil 4.10. TNBC ve Luminal A hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31 ve miR-27a ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar.....	104
Şekil 4.11. TNBC ve Luminal B hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-31, miR-935, miR-374a ve miR-17b-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar.....	106
Şekil 4.12. Luminal A ve Luminal B hasta gruplarının miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-935 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar.....	108
Şekil 4.13. İlımlı (Luminal A ve Luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31, miR-27a, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar.....	111
Şekil 4.14. İlımlı (Luminal A ve Luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta gruplarında miR-200c ve mi-27a ekspresyonlarının tanısal değerleri için yapılan ROC analizi sonucu.....	113

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanserinin moleküler / intrinsik alt tipleri .....	19
Çizelge 2.2. Meme kanserinin anatomik evre grupları .....	23
Çizelge 2.3. Meme kanserinde başlıca tümör baskılayıcı miRNA'lar, hedefleri ve fonksiyonları .....	47
Çizelge 2.4. Meme kanserinde başlıca onkogenik miRNA'lar, hedefleri ve fonksiyonları .....	49
Çizelge 2.5. Meme kanseri kök hücrelerinin fenotipik belirteçlerini hedefleyen miRNA'lar .....	53
Çizelge 2.6. Meme kanseri kök hücrelerinde sinyal yolaklarını hedefleyen miRNA'lar .....	58
Çizelge 3.1. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı .....	75
Çizelge 3.2. cDNA sentezi için PCR koşulları .....	75
Çizelge 3.3. RT-qPCR için reaksiyon koşulları .....	77
Çizelge 3.4. Ekspresyon analizleri gerçekleştirilen 15 miRNA'ya ait özellikler.....	78
Çizelge 3.5. RT-qPCR koşulları .....	78
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarına göre bazı demografik ve klinikopatolojik bulguların dağılımı .....	81
Çizelge 4.2. İlımlı (Luminal A ve Luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) meme kanseri hasta gruplarının demografik ve klinikopatolojik verilerle ilişkisi için yapılan Sperman's rho korelasyon analizi sonuçları .....	85
Çizelge 4.3. Meme kanseri hasta gruplarının dağılımı .....	86
Çizelge 4.4. Tüm meme kanserli hastalar ile kontrol grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları .....	88
Çizelge 4.5. Meme kanserli hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri ile hastalara ait demografik ve klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki için yapılan Sperman's rho korelasyon analizi sonuçları .....	90
Çizelge 4.6. Kontrol grubu ile HER2(+) grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları .....	91
Çizelge 4.7. Kontrol grubu ile TNBC grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları .....	93
Çizelge 4.8. Kontrol grubu ile Luminal A grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları .....	94
Çizelge 4.9. Kontrol grubu ile Luminal B grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları .....	96
Çizelge 4.10. HER2(+) ile TNBC hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	98
Çizelge 4.11. HER2(+) ile Luminal A hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	100
Çizelge 4.12. HER2(+) ile Luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	101
Çizelge 4.13. TNBC ile Luminal A hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	103
Çizelge 4.14. TNBC ile Luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	105
Çizelge 4.15. Luminal A ile Luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	107

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.16. İlimli (Luminal A ve Luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları .....	109
Çizelge 4.17. İlimli (Luminal A ve Luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta grupları arasında anlamlılık saptanan miRNA ekspresyon düzeylerinin multivariate olarak etkinliği için yapılan binary logistik regresyon analizi sonuçları .....	112

## 1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen ve en çok ölüme neden olanıdır. Son yıllardaki önemli gelişmelere rağmen, tanının geç konulması ve tedavideki yetersizliğe bağlı olarak sağkalım oranları düşük seyretmektedir (Adhami ve ark. 2018).

Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserin kök hücre özelliklerini gösteren bir hücre popülasyonu tarafından yönlendirildiği bilinmektedir. Kanser kök hücre (KKH)'leri veya tümör başlatan hücreler olarak adlandırılan bu hücrelerin, sadece tümörün başlatılmasını ve büyümesini sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda tümör metastazına ve terapötik dirence de aracılık ettiği bilinmektedir (Yu ve ark. 2012). Meme kanseri kök hücreleri (MKKH), kök hücre benzeri özellikler sergileyen ve meme kanserinde tümör gelişimi, nüks ve metastazdan sorumlu olarak ortaya çıkan tümör kitlesi içindeki hücrelerin küçük bir alt popülasyonundan oluşmaktadır (Liu ve ark. 2012).

MKKH'de gen ekspresyonunun kontrolünün karmaşıklığına genellikle hücre dışı sinyaller, mutasyonlar ve epigenetik kontrol tarafından tetiklenen sayısız sinyal yolu aracılık etmektedir. Bu yolların anormal aktivasyonu meme kanserinde tümör gelişimine, tümör agresivitesinin artmasına ve tedavi direncine neden olmaktadır. Güncel çalışmalar, meme tümörlerinde kritik rol oynayan bu sinyal yollarının inhibisyonunun etkili tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu göstermektedir (Takebe ve ark. 2011).

MikroRNA (miRNA)'lar, 18-24 nükleotitten oluşan ve kodlama yapmayan RNA'lardır. Hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek veya stabilitesini düzenleyerek; hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, invazyonunu ve apoptozisini kontrol ederler. Son yıllarda ortaya çıkan kanıtlar meme kanserinde miRNA düzensizliğinin, kanser kök hücre ve ilgili sinyal yolları ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark. 2014).

Bu bilgiler doğrultusunda mevcut tez çalışmasında, meme kanserli hastalarda olası etkileri bilinmeyen ve kanser kök hücre sinyal yollarında doğrudan ve/veya dolaylı olarak görev alan 15 miRNA'nın (let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381 ve miR-935) ekspresyon seviyelerindeki değişimler, hastalara ait normal ve tümörlü taze doku örneklerinde incelenmiştir. Bu çalışmanın önemli bir noktası,



kanser kök hücre ile ilişkili sinyal yolaklarında yer alan bazı miRNA'ların meme kanserindeki etkinliklerinin araştırıldığı ilk çalışma olmasıdır. Bu tez çalışmasının sonuçları, meme kanserinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına katkı; klinik açıdan büyük önem taşıyan diagnostik, prognostik ve terapötik hedeflerin keşfedilmesine ve kanser tedavisinde başarı oranını yükseltecek yeni biyobelirteç adaylarının geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

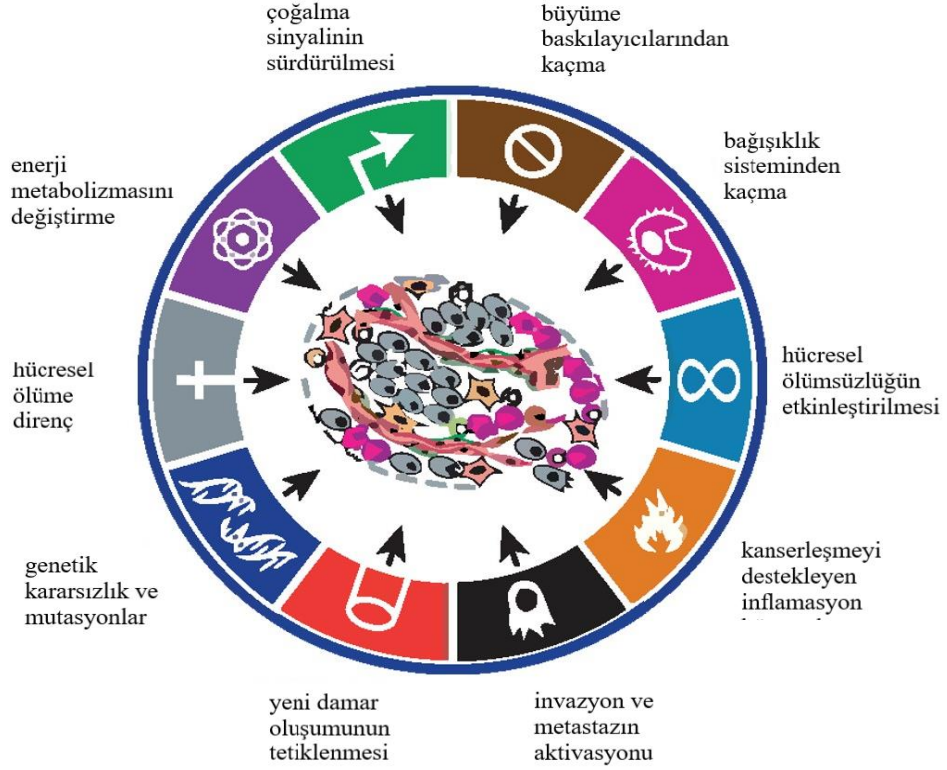
## **2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Kanser**

Kanser tüm dünyada mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biri olup kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en yaygın hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Kanseri en yalın anlamıyla hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesidir (Ames ve ark. 1995). Vücudumuzdaki organ ve dokuları oluşturan sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve hasarlı dokuların tamiri amacıyla belirli bir olgunluğa erişen hücreler bölünebilirler. Hücrenin bölünme talimatları, Deoksiribonükleik asit (DNA)'daki bazı genler tarafından verilir. Ancak hücrelerin bölünebilme yeteneği sınırlıdır. Kromozomların uçlarında bulunan koruyucu telomerler belirli bir kısalığa eriştikten sonra hücre bölünebilme yeteneğini kaybeder ve işlevsiz kalır. Bunun üzerine hücrenin programlı ölümü yani apoptozu gerçekleşir. Bu özellik vücudun iç dengesinin korunması için çok önemlidir (Ames ve ark. 1995). Hücrelerin birbiriyle ilişkilerini kontrol eden genlerin mutasyona uğraması ve dış faktörlerin (ultraviyole, radyasyon, kanserojenler vb.) etkisiyle bu iç denge bozulabilir. Yeni hücrelerin üretilmesine gerek yokken bile hücreler anormal bir şekilde bölünmeye ve büyümeye başlar ve hücrelerin birikmesiyle tümör oluşur. Tümör iyi huylu olursa vücudun diğer kısımlarına yayılmaz ve cerrahi yöntemlerle vücuttan çıkarıldıklarında tekrarlamazlar. Ancak tümör kötü huyluysa normal dokunun arasına sıkışarak o dokunun görevini yerine getirmesine engel olur ve buradan kan damarları ve lenfler yoluyla vücudun başka yerlerine yayılabilir. Vücuttan çıkarılsa bile belirli bir zaman sonra tekrardan nüksedebilir (Lieberman ve ark. 1996). Bilindiği üzere kanser tek bir hastalık değildir. 120'den fazla türü vardır. Kansere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi kanserin temel özelliklerinin tespit edilmesine bağlıdır.

Hanahan ve ark. (2010) yılında kanserin altı temel özelliğini sıralamışlardır. 2011 yılında diğer dört özelliğini de eklemişler ve böylece kanserin 10 temel özelliğini ortaya koymuşlardır (Şekil 2.1) (Hanahan ve Weinberg 2011).

## Kanserin 10 Temel Özelliği



**Şekil 2.1.** Kanserin en temel 10 özelliğinin şematik gösterimi (Hanahan ve Weinberg 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

### 2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

#### 2.2.1. Büyüme sinyallerine sahip olma

Normal hücreler bölünmek için dışarıdan büyüme sinyallerine ihtiyaç duyar. Kanser hücreleri geçirdikleri mutasyonlar sonucunda normal büyüme sinyallerine ihtiyaç duymazlar. Çünkü kendi büyüme sinyallerini üretirler (Hanahan ve Weinberg 2011).

#### 2.2.2. Büyüme engelleyici faktörlerden kaçınma

Normal hücreler iç dengenin korunması amacıyla büyüme engelleyici sinyallere tepki göstererek bölünmezler. Ancak kanser hücreleri büyüme engelleyici sinyallerini aldıkları reseptörleri bozarak bu sistemi atlatırlar (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.3. Bağışıklık hücrelerinden kaçınma**

Vücutun bağışıklık hücreleri kendi hücrelerini yüzey reseptörlerinden tanıyarak öldürmez. Ancak yabancı hücrelerin yüzey reseptörleri normal hücrelerinkine aynı olmadığı için tanımaz ve öldürür. Kanser hücreleri de vücudun kendi hücreleri olduğu için normal hücrelerle aynı yüzey reseptörlerine sahiptir ve dolayısıyla bağışıklık sistemi hücrelerinden kolaylıkla kaçabilir (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.4. Sınırsız bölünme yeteneği**

Vücutumuzdaki hücreler (kök hücreler dışında) sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahiptir. Belirli bir süre bölündükten sonra "senescence" adı verilen yaşlılık dönemine girerler. Bu duruma telomerlerin kısalması sebep olur. Kromozomların uç kısımlarında "telomer" adı verilen diziler bulunur. Her hücre çoğalmasında telomerler kısalır ve böylece genler korunur. Kanser hücreleri telomer kısalmasını engellemek için "telomeraz" adı verilen enzimlerinin aktivitesini artırır. Böylece sınırsız çoğalma yeteneğine sahip olurlar (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.5. Tümör destekleyici iltihap**

Tümör ortamı sadece kanser hücrelerini barındırmaz, aynı zamanda iltihaplanma ile ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerini de içerir. Bu hücreler büyüme faktörleri ve enzimlerin sayısını artırarak kanserin damar oluşturmasını ve yayılmasını destekleyen bir ortam oluşturur. Aynı zamanda reaktif oksijen radikalleri üreterek DNA'nın hasar görmesine ve kanserleşmeye neden olur (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.6. İnvazyon ve metastaz**

Normal hücreler genellikle buldukları konumlardan ayrılmazlar. Kanser hücreleri belirli bir büyüklüğe ulaştıklarında başka doku ve organlara göç ederler. Bu olaya "metastaz" adı verilir. Kansere bağlı yaşam kayıplarının %90'ından metastazlar sorumludur. Hücrelerin birbirlerine veya bir dokuya tutunmasını sağlayan genlerde meydana gelen hasarlar metastazı tetikler (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.7. Anjiyogenez**

Normal hücreler besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılamak için kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Ancak erişkin bireylerde damar oluşumu çok azdır. Kansere hücreleri çok hızlı bölündüklerinden dolayı yüksek oranda besin ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple damar oluşturma yeteneğine sahiptirler (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.8. Gen yapısında mutasyonlar**

DNA hasarlarının birikmesi kanserleşmenin en önemli sebebidir. Aynı zamanda DNA tamirinde görev alan enzim fonksiyonlarının kaybolması gen yapısındaki bozulmaların artmasını destekler (Hanahan ve Weinberg 2011).

### **2.2.9. Apoptozdan kaçınma**

Normal hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde tümör büyümesini baskılayan genler hücre çoğalmasını durdurarak DNA tamir mekanizmalarını başlatır. Ancak DNA'daki hasar tamir edilemeyecek boyutta ise programlı hücre ölümüyle (apoptoz) sorunlu hücreler ortadan kaldırılır. Kansere hücreleri programlı hücre ölümüne karşı direnç gösterecek mekanizmalara sahiptir (Hanahan ve Weinberg 2011).

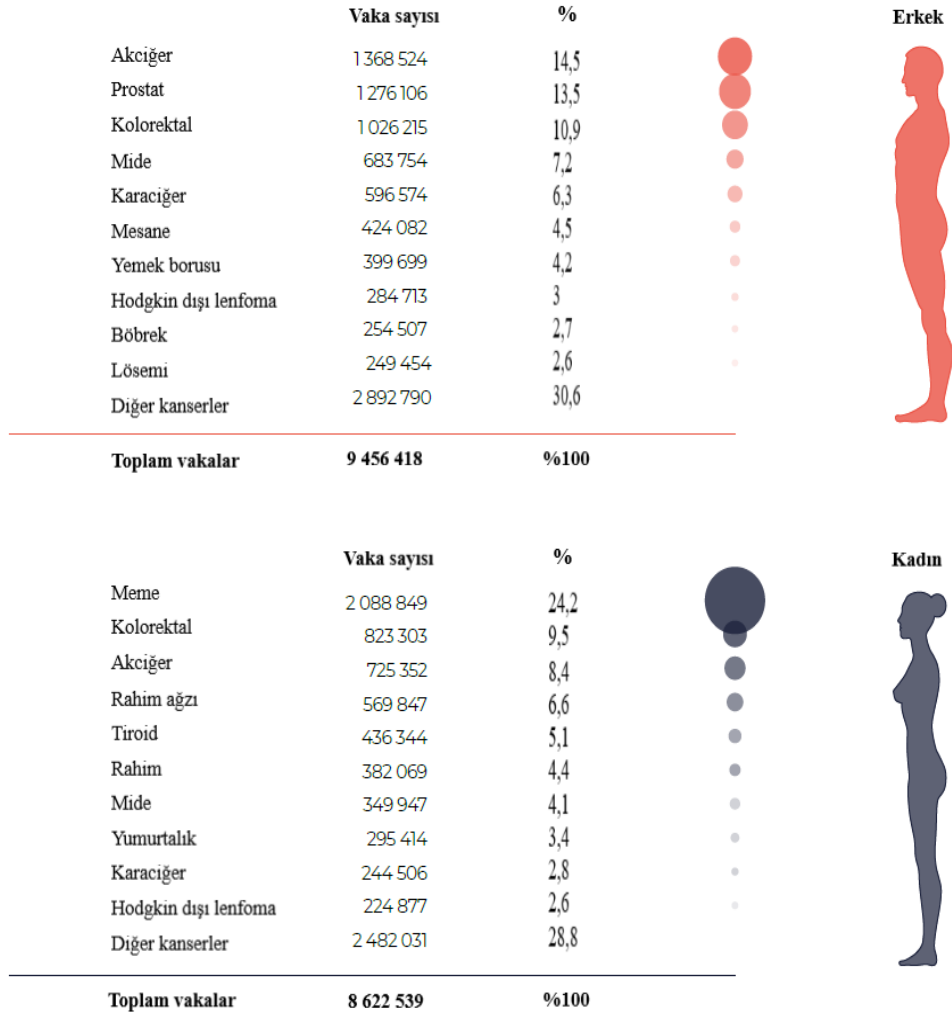
### **2.2.10. Enerji metabolizmasını yeniden düzenleme**

Kansere hücreleri çok hızlı bölünme yeteneğine sahip olduklarından dolayı fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bunun için oksijen varlığına bakmadan glikozu kullanarak sürekli enerji üretirler. Bu duruma "Warburg etkisi" adı verilir (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kansere dokularda sadece kansere hücreleri bulunmaz, farklı birçok hücre ve doku tipi, kansere hücreleri ile bir arada bulunmaktadır. Kansere mikroçevresi olarak tanımlanan, kansere hücrelerini çevreleyen ve normal hücrelerden oluşan oldukça kompleks bir doku tipi ortaya çıkmaktadır. Mikroçevrenin yapısında, kansere hücrelerinin yanı sıra, normal genetik yapıya sahip stromal hücreler (multipotensiyal stromal hücreler/mezenşimal hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve bağışıklık sistemi hücreleri), ekstraselüler matriks ve sekresyon ürünleri (büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler) bulunmaktadır. Kansere hücreleri ile mikroçevre arasındaki sıkı bir ilişki bulunmaktadır.

Kanserli dokuların mikroçevresi; kanserlerin başlamasında, ilerlemesinde, tedaviye cevap oluşturmasında ve metastaz gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Özbilgin ve Gareveran 2016).

Günümüzde en ciddi sağlık sorunlarından biri olan kanserin görölme oranı her geçen yıl artmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) son verilerine göre, 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanserden ölüm gerçekleşmiştir. 2018'de 30 ila 69 yaş arasındaki 15 milyon ölümden 4,5 milyonunun kansere bağlı geliştiği görölmektedir. 2018 yılında en sık teşhis edilen kanser erkeklerde akciğer olmak üzere (%14,5) bunu prostat (%13,5) ve kolorektal kanser (%10,9) izlemiştir. Kadınlarda ise, meme kanseri (%24,2) ölümlerin önde gelen nedenidir, bunu kolorektal (%9,5) ve akciğer kanseri (%8,4) takip etmektedir. En sık görülen 10 kanser, kanser insidansı ve mortalitesinin %60-70'inden sorumludur (Şekil 2.2). Bununla birlikte yaşam beklentisi, epidemiyolojik ve demografik özellikler nedeniyle yeni vaka ve ölümlerin sayısı artmaya devam etmektedir (Ferlay ve ark. 2019).



**Şekil 2.2.** 2018 yılı tahmini küresel kanser yükü (Anonim 2018'den değiştirilerek alınmıştır)

Neredeyse her ülke son on yılda kanser vakalarında bir artış görmüştür ve önümüzdeki 20 yıl içinde kanser oranlarının en az %60 oranında artması beklenmektedir. Birçok düşük ve orta gelirli ülkede, kaliteli tanı ve kapsamlı tedaviye erişimi olmayan çok sayıda kanser hastası bulunmaktadır. 2019'da, yüksek gelirli ülkelerin %90'ından fazlası, düşük gelirli ülkelerin %15'inden azına kıyasla, halk sağlığı sisteminde kanser için tedavi hizmetlerinin mevcut olduğunu bildirmiştir (Bray ve Moller 2006, Ferlay ve ark. 2019).

Ülkelerin %80'inde kanser nedenli erken ölüm oranlarındaki eğilimler, ülkelerin sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşma yolundaki ilerlemeyi engellemektedir.

Öngörülen küresel yük 2040'a kadar yaklaşık 29-37 milyon yeni kanser vakasına yani yaklaşık iki katına çıkacak, düşük ve orta gelirli ülkelerde en büyük artış görülmüş olacaktır. Kanser vakaları ve ölümler eşit olmayan şekilde ortaya çıkmaktadır. Gelirleri daha düşük olan ülkelerde sonuçlar daha kötüdür. Dünyada düşük ekonomik seviyedeki insanlar daha kötü kanser sonuçlarına sahiptir ve finansal zorluklarla karşılaşma olasılıkları çok daha yüksektir (Bray ve ark. 2012).

### **2.3. Meme Kanseri**

Meme kanseri, dünyadaki kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup kadınlarda tespit edilen kanser ölümlerinin ana nedenidir. 2012 yılında, toplam kanser vakalarının %25'ini ve kadınlar arasında toplam kanser ölümlerinin %15'ini oluşturan yaklaşık 1,7 milyon kanser vakası ve 521 900 kanser ölümü rapor edilmiştir (Torre ve ark. 2015). Genel olarak, tüm yaş grupları için hayatta kalma oranları zamanla artmıştır; bununla birlikte, lenf nodlarına veya ötesine tümör metastazı ve tümör boyutu ile ilgili tanıdaki evre ve sağkalım arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Rosso ve ark. 2010, Tryggvadottir ve ark. 2010, Holleczeck ve ark. 2011). Meme kanseri vakaları için, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de 2001 ve 2007 yılları arasındaki 5 yıllık sağkalım oranı, lokalize evre için %98,6 ile bölgesel evre için %83,8 arasında değişmekle birlikte, uzak evre hastalığı için bu oran %23,3'e düşmektedir (Sankaranarayanan ve ark. 2010). Dünyanın diğer ülkelerinden gelen raporlar meme kanseri sağkalım oranları için benzer sonuçlar göstermektedir (Sankaranarayanan ve ark. 2010). WHO'nun yayınladığı verilere göre 2018 yılında Türkiye'de ise 210 537 yeni kanser vakası görülmüş, bu vakaların %56,5'ini erkek hastalar oluşturmuştur. 2018'de kanser nedeniyle ölenlerin sayısı 116 710 olurken hayatını kaybedenlerin yaklaşık %64'ü ise erkek hastalardan oluşmaktadır (Anonim 2018).

Muhtemelen meme dokusu fiziksel olarak bir insanın hayatta kalması için gerekli bir organ olmadığından hastalar daha ölümcül kanserlere kıyasla daha iyi sağkalım sürelerine sahiptir. Yine de cerrahi müdahaleden kaynaklanan zihinsel ve duygusal rahatsızlıkların yanı sıra nüksetme veya metastaz nedeniyle meydana gelen ölümler kadın sağlığını ciddi şekilde tehlikeye atmaktadır. Meme kanserinin Eski Mısır kökenli bilinen ilk tanımlarından beri, insanlar bu hastalığı yok etmek için kendilerini farklı



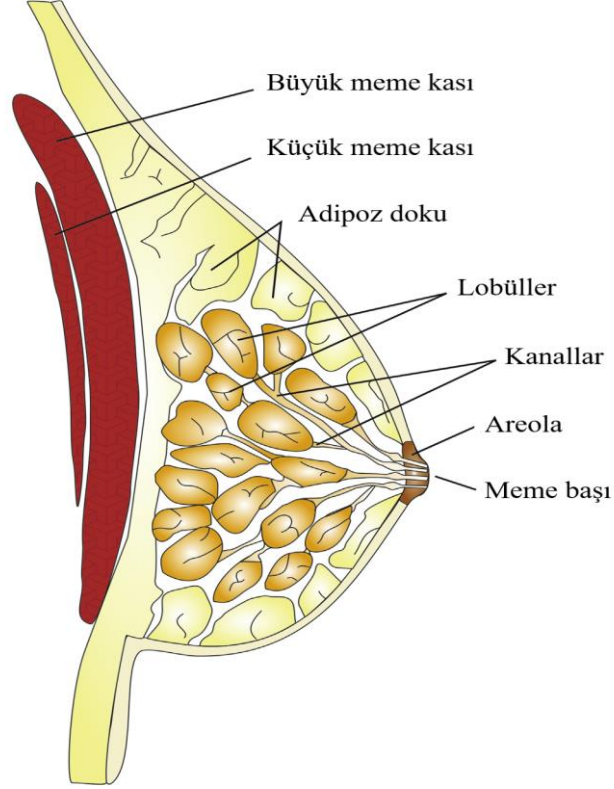
araçlar bulmaya adanmışlardır. Bu sayede özellikle son yıllarda bu alanda sıçramalar ve atılımlar yapılmıştır. Mastektomi ve kemoterapi, meme kanseri hastalarının hayatta kalmasını büyük ölçüde iyileştirmiştir ve tedavi sonrası psikolojik etkiyi en aza indirmek için çok daha iyi cerrahi prosedürler uygulanmaktadır (Cliffon ve Young 1951, Figueiredo ve ark. 2004). Bununla birlikte, altta yatan mekanizma ve patogenezi tam olarak anlamadan, hastalığı önleme ve tedavinin etkinliği her zaman sınırlı olacaktır.

#### **2.4. Meme Anatomisi**

Meme kanserini anlayabilmek için ilk önce memenin yapısını bilmek gerekmektedir. İnsan meme bezi gelişimi embriyonik yaşam boyunca başlayan ilerleyici bir süreçtir (Pandya ve Moore 2011). Meme bezi, karmaşık bir stroma içine gömülü, çok dallı bir epitel ağından oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Huebner ve Ewald 2014). Meme epitelyumu, epidermal plakadan embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkar. Epitelyal mezenkimal etkileşimlerle düzenlenmiş olan plakalar altta yatan mezenkime iner ve meme bezinin temel kanal yapısını üretir (Macias ve Hinck 2012, Huebner ve Ewald 2014). Meme, steroid hormonu ve büyüme faktörü reseptör sinyaline yanıt olarak ergenlik, hamilelik ve emzirme ile ilişkili olarak boyut, şekil ve işlevde dramatik değişikliklere uğramaktadır (Huebner ve Ewald 2014). Memenin benzersiz bir özelliği, meme epitelinin lokal ve sistemik sinyallere karşı oldukça duyarlı olması, ergenlik ve hamilelik sırasında kanal yapılarının önemli morfolojik değişiklikler göstermesidir (Visvader ve Stingl 2014).

Meme kanseri lenf sistemi yoluyla da yayıldığı için lenf yapısını idrak edebilmek önemlidir. Lenf bezleri fasulye şeklinde olan ve lenf damarlarına bağlı olan bağışıklık sisteminin hücreleridir. Lenf damarları ise memeden kan yerine bağışıklık sistemi hücrelerini ve atık maddeleri lenf sıvısını taşımakla görevlidir (Pandya ve Moore 2011). Memedeki lenf dolaşım ağları genelde koltuk altındaki lenf bezlerine bağlanır. Bazıları ise köprücük kemiklerinin alt veya üstlerine ve memeye bağlanır. Meme kanseri lenf damarlarına bağlı olarak gelişebilir. Böyle bir durum baş gösterdiğinde meme kanseri hücrelerinin kan damarlarıyla vücudun diğer kısımlarına metastaz yapma olasılığı yüksektir. Ek olarak, lenf damarlarına yayılmış kanser hücrelerinin miktarı ile diğer

organlara sıçramış olması doğru orantılıdır. Ancak lenf bezlerinde meme kanseri gelişmiş hastaların hepsinde metastaz gelişmez. Lenf bezlerinde kanser gelişmeyen ancak sonradan diğer organlarında metastaz gelişen hastalar da mevcuttur (Pandya ve Moore 2011).



**Şekil 2.3.** Meme kanserinin anatomik ve histolojik kökenleri (Feng ve ark. 2018'den değiştirilerek alınmıştır)

## **2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri**

### **2.5.1. Meme kanserinin önemli risk faktörleri olarak genetik yatkınlıklar**

Meme kanseri için bazı önemli risk faktörleri bireyin kontrolü dışındadır (Anothaisintawee ve ark. 2013, Howell ve ark. 2014, Barnard ve ark. 2015, Kaminska ve ark. 2015). Örneğin, sadece bir kadın olmak meme kanseri için ana risk faktörüdür, çünkü bu hastalığın görülme olasılığı kadınlarda, erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha fazladır. Yaşlanma, çoğu meme kanserinin 55 yaş ve üstü kadınlarda teşhis edildiği gerçeği ile kişinin kaçınılmaz olarak meme kanseri riskini artırır. Meme kanseri ile ilgili olarak cinsiyet ve yaşlanmanın doğasında var olan risklerin ötesinde, bir kadının meme

kanseri teşhisi konmuş birinci derece akrabası (anne, kız kardeşi veya kızı) varsa, meme kanseri gelişme riskinin neredeyse iki katına çıktığı belgelenmiştir (McTiernan 2003).

Meme kanserli ABD'li kadınların yaklaşık %15'inde teşhis konulmuş bir aile üyesi bulunmaktadır (Hulka 1996, Colditz ve ark. 2012). Genel olarak, meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u bir ebeveynden miras alınan gen mutasyonlarına bağlıdır. Kalıtsal meme kanserinin en yaygın nedeni (meme kanseri tip 1) BRCA1 ve/veya (meme kanseri tip 2) BRCA2 geninde kalıtsal bir mutasyondur (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). İstatistiksel olarak, BRCA1 mutasyonu olan kadınlarda yaşam boyu %55-65 oranında meme kanseri gelişme riski vardır. BRCA2 mutasyonu olan kadınlar için, yaşam boyu risk %45'dir. Ortalama olarak, BRCA1 ve/veya BRCA2 gen mutasyonu olan bir kadının 80 yaşına kadar meme kanserine yakalanma olasılığı yaklaşık %70'dir. Mutasyonun etkisi, daha fazla aile üyesi etkilenirse meme kanseri riskini arttırdığından, kaç aile üyesinin meme kanseri olduğu ile ilgilidir. (Hulka 1996, Polyak 2007). ABD'de, BRCA mutasyonları Aşkenazi (Doğu Avrupa) kökenli Yahudi insanlarda diğer ırklara ve etnik gruplara göre daha yaygındır. Bu iki mutasyondan birine sahip kadınlarda, daha genç yaşta meme kanseri teşhisi konması ve her iki memede de kanser gelişme olasılığı daha yüksektir (Veronesi ve ark. 2005, Allison 2012). Bununla birlikte, BRCA1 ve BRCA2 genlerinden herhangi birinde mutasyonlara sahip olmak, yumurtalık kanseri riskinin artmasıyla da ilişkilidir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005). Buna karşılık, BRCA1 mutasyonları erkeklerde meydana gelen meme kanserlerinde daha az bulunurken, BRCA2 mutasyonlarının yaklaşık %6,8'lik kısmı ömür boyu meme kanseri riski ile ilişkilidir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Meme kanseri riskindeki artışlarda BRCA mutasyonlarından daha az yaygın ve daha az şiddetli olmasına rağmen, diğer birçok gendeki kalıtsal mutasyonlar da meme kanseri gelişimine yol açabilir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) (bu genin iki anormal kopyasının kalıtsal olması, ataksi-telanjiektazi hastalığına neden olur), Tümör Protein 53 (TP53) (bu genin kalıtsal mutasyonları, meme kanseri riskinin arttığı Li-Fraumeni sendromunun yanı sıra lösemi, beyin tümörleri ve sarkomlar gibi diğer bazı kanserlere neden olur), Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) (CHEK2 mutasyonu meme kanseri riskini yaklaşık iki kat artırabilir),

Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN) (bu gendeki kalıtsal mutasyonlar, kanserli olan ve olmayan meme tümörleri için daha yüksek bir risk oluşturur ve ayrıca sindirim sistemi, tiroid, rahim ve yumurtalıklarda büyüme ile birlikte Cowden sendromuna neden olabilir), Cadherin 1 (CDH1) (bu gendeki kalıtsal mutasyonlar, yaygın mide kanserine neden olur ve invaziv lobüler meme kanseri riskini artırır), Serine/Threonine Kinase 11 (STK11) (bu gendeki mutasyonlar, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü için daha yüksek riskle Peutz-Jeghers sendromuna yol açabilir) ve Partner And Localizer Of BRCA2 (PALB2) (BRCA2 geni tarafından üretilen bir protein ile etkileşime girer, gende mutasyonlar oluşturur ve meme kanseri riskinin artmasına neden olur) mutasyon belirlenen genlerden bazılarıdır (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.5.2. Meme kanserinin genetik olmayan risk faktörleri**

Meme kanserinde genetik faktörlerin dışında genetik olmayan risk faktörleri de hastalığın gelişimini tetiklemektedir. Bunlar arasında; ailede meme kanseri öyküsünün olması, ırk ve etnik köken, bazı iyi huylu meme hastalıkları (fibroz ve/veya basit kistler, hafif hiperplazi, adenoz, filloid tümör, tek papilloma, duktal ektazi, periduktal fibroz, skuamöz ve apokrin metaplazi, epitelyal ilişkili kalsifikasyonlar, lipoma, hamartom, hemanjiyom, nörofibrom, adenomyoepithelioma veya mastitis (meme iltihabı), bazı proliferatif meme lezyonları (duktal hiperplazi, fibroadenom, sklerozan adenoz, papillomatoz veya radyal skar, atipik duktal hiperplazi (ADH) ve atipik lobüler hiperplazi (ALH), lobüler karsinom in situ (LCIS) veya lobüler neoplazi, meme radyasyon tedavisi, yaşam tarzı ve kişisel davranışlarla ilgili risk faktörleri, doğum kontrolü ve kontraseptifler, menopozdan sonra hormon replasman tedavisi (HRT), aşırı alkol tüketimi, aşırı kilolu veya obez olmak, çocuk sahibi olmama veya emzirmeme, menstrüasyona erken başlamak veya 55 yaşından sonra menopozun durması ve fiziksel aktivite eksikliği sayılabilir (Dupont ve Page 1985, McTiernan 2003, Wang ve ark. 2004, Hartman ve ark. 2005, Collins ve ark. 2006, Polyak 2007, Yang ve ark. 2007, Vogel 2008, Patterson ve ark. 2010, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012, Anothaisintawee ve ark. 2013, Anderson ve ark. 2014, Howell ve ark. 2014, Barnard ve ark. 2015, Kaminska ve ark. 2015).

### 2.5.3. Meme kanserinde epigenetik

Anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik değişikliklerin kansere neden olma, kanserin ilerlemesi ve tedavisinde önemi gittikçe daha fazla artmakta ve kullanılmaktadır (Baylin ve Jones 2011). Ek olarak, epigenetik faktörler, kanser hücresi heterojenliğinin gelişimi için bir mekanizma sağlayabilir. Üç transkripsiyon faktörü Östrojen Reseptör Alfa (ER $\alpha$ ), Friend Of Cyclin A (FoCA1) ve GATA Binding Protein (GATA)'nın bağlanma bölgelerindeki belirgin demetilasyon, östrojen reseptörü (ER) pozitif (+) meme kanserlerinde normal meme dokusuna kıyasla tespit edilmiştir (Boidot ve ark. 2010, Castoria ve ark. 2012, Wahl ve Spike 2017). Bu genlerin yüksek ekspresyonu, normal ve bazal benzeri meme kanserlerinin aksine luminal A ve luminal B tiplerinde de görülmüştür (Wahl ve Spike 2017). ER $\alpha$  bağlanma bölgelerindeki DNA metilasyonu, ER(+) meme kanserleri için tamoksifen gibi anti-östrojen tedavilerine karşı direncin temel bir nedeni olabilir (Choi ve ark. 2018, Stone ve ark. 2015, Wang ve ark. 2018).

Büyük ölçekli tüm genom dizileme ve RNA dizileme tekniklerinde, biyoinformatik analizlerle kombinasyonlarda son zamanlarda kaydedilen hızlı ilerlemeler, insan genomu hakkındaki anlayışımızı derinden değiştirmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, kapsamlı global transkriptomik analizler, insan genomunun %80'ine kadar, %<2'sinin proteinleri kodladığını göstermiştir (Djebali ve ark. 2012, Iyer ve ark. 2015, Meseure ve ark. 2015, Elkon ve Agami 2017). Bu nedenle, memeli transkriptomunun büyük çoğunluğu, gen ekspresyonunda ve diğer biyolojik işlemlerde çeşitli, önemli düzenleyici rol oynayan kodlayıcı olmayan RNA'ları (nkRNA'lar) kapsar (Iyer ve ark. 2015, Lo ve ark. 2016). nkRNA'lar boyut ve yapısal veya düzenleyici özelliklere göre iki kategoriye ayrılır. 200 ntRNA'dan büyük nkRNA'lara uzun kodlama yapmayan RNA'lar veya lncRNA'lar denir, oysa nkRNA'lar <200 nt mikroRNA'ları (veya miRNA'ları), küçük nükleolar RNA'ları (veya snoRNA'ları) ve piwi RNA'ları (veya piRNA'ları) içermektedir (Mercer ve ark. 2009, Taft ve ark. 2010, Lo ve ark. 2016).

miRNA'lar, biyogenezi, fonksiyonu ve tümör oluşumundaki önemi ile karakterize edilen, en iyi incelenen kısa kodlayıcı olmayan RNA'lardır (Iyer ve ark. 2015, Lo ve ark. 2016, Elkon ve Agami 2017). Öte yandan, lncRNA'lar meme kanseri de dahil

olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişiminde rol oynar (Lo ve ark. 2016). LncRNA'lar ve miRNA'lar gibi diğer kodlayıcı olmayan RNA'lar, hem birlikte hem de transkripsiyon sonrası gen düzenlemesini değiştirmek için RNA bağlayıcı protein (RBP)'ler ile çalışmaktadır (Janakiraman ve ark. 2018). Epigenetik modifikasyonlar yoluyla, lncRNA'ların gen baskılayıcı olarak işlev gördüğü birçok durum vardır, ancak lncRNA'ların da gen aktivatörleri olarak işlev görebilmeleri mümkündür (Yoon ve ark. 2013, Nakagawa ve Kageyama 2014).

## **2.6. Meme Kanserinin Sınıflandırılması**

### **2.6.1. Patoloji, invazivlik ve prevalansa dayalı meme kanseri türleri**

Kanallar, lobüller veya aradaki doku gibi memenin farklı bölgelerinin temsil edildiği birçok meme kanseri türü vardır. Meme kanseri türü, etkilenen spesifik hücreler tarafından belirlenir. Hangi hücre kaynağının dahil olduğuna bağlı olarak, meme kanserleri karsinomlar ve sarkomlar olmak üzere iki geniş sınıfa ayrılabilir. Karsinomlar, memenin epitel bileşeninden kaynaklanan ve süt yapımından sorumlu terminal kanalları ve lobülleri oluşturan hücrelerden oluşan meme kanserleridir. Sarkomlar, miyofibroblastları ve kan damarı hücrelerini içeren memenin stromal bileşenlerinden kaynaklanan daha nadir bir meme kanseri formudur (birincil meme kanserinin <math>\%1</math>i). Bu gruplar her zaman yeterli kategoriler değildir, çünkü bazı durumlarda tek bir meme tümörü farklı hücre tiplerinin bir kombinasyonu olabilir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

Çoğu meme kanseri karsinomdur. Karsinomların içinde, primer tümör bölgelerinin invazivliklerine göre tanımlanmış birçok farklı meme kanseri türü vardır. Her biri farklı prognozlara ve tedavi etkilerine sahip olduklarından, çeşitli alt tipler arasında doğru bir şekilde ayırım yapabilmek hayati önem taşımaktadır. Patolojik özellikler ve invazivlik kriterlerine dayanarak, yaygın meme kanserleri üç ana gruba ayrılabilir. Bu gruplar; non-invaziv (veya in situ), invaziv ve metastatik meme kanserleridir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.6.2. İnvaziv Olmayan (veya İn Situ) Meme Kanseri**

### **2.6.3. Duktal karsinoma in situ (DCIS, intraduktal karsinoma)**

En yaygın meme kanseri türlerinden biri olarak, Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS), önceden var olan normal kanalların içinde gelişen, invaziv olmayan veya pre-invaziv bir meme kanseridir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). DCIS'in kendisi invaziv olmasa da, in situ karsinomların invaziv kanser olma potansiyeli yüksektir, bu nedenle hastanın invaziv kanser geliştirmesini önlemek için erken ve uygun tedavi önemlidir.

### **2.6.4. İnvaziv veya infiltratif meme kanseri**

İnvaziv meme kanserleri, çevredeki meme stromal dokusu içine doğru büyüyen, normal meme lobları ve kanallarının dışına yayılan kanser hücrelerine sahiptir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). İnvaziv meme kanseri olan kadınların yaklaşık üçte ikisi, teşhis edildiğinde 55 yaş ve üzerindedir. İnvaziv karsinomlar, lenf düğümleri veya diğer organlar gibi vücudun diğer bölgelerine yayılma ve metastatik meme kanserleri sınıfına giren metastaz oluşturma potansiyeline sahiptir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). İlgili doku ve hücre tiplerine dayanarak, invaziv meme kanserleri ayrıca aşağıdaki iki türe ayrılır:

### **2.6.5. İnvaziv duktal karsinoma (IDC)**

İnvaziv Duktal Karsinoma (IDC) en yaygın meme kanseri türüdür ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %80'i invaziv duktal karsinomlardan oluşur (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Memenin tübüler karsinomu, memenin medüller karsinomu, memenin müsinöz karsinomu, memenin papiller karsinomu ve memenin kribriform karsinomu olmak üzere IDC sınıflandırması birkaç alt tip içermektedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.6.6. İnvaziv lobüler karsinoma (ILC)**

İnvaziv Lobüler Karsinoma (ILC), en yaygın ikinci meme kanseri türüdür ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Her ne kadar ILC, kadınları her yaşta etkileyebilse de yaşlı kadınlarda daha sık görülmektedir. ILC, yaşamda IDC'den daha sonra ortaya çıkma eğilimindedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

Birlikte ele alındığında, tüm meme kanseri vakalarının %90-95'i invaziv alt kategorilere ayrılmaktadır. IDC ve ILC kanserlerinin her biri farklı patolojik özellikler göstermektedir. Lobüler karsinomlar ayrı ayrı, tek veya tabakalar halinde düzenlenmiş hücreler olarak büyür ve onları duktal karsinomlardan ayıran farklı moleküler ve genetik sapmalara sahiptirler. Duktal ve lobüler karsinomlar, farklı prognozlara ve tedavi seçeneklerine sahip olabilirler ve bu nedenle bu türleri birbirlerinden açık bir şekilde ayırt etmek önemlidir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005).

### **2.6.7. Metastatik meme kanseri**

Evre IV veya ileri meme kanseri olarak da bilinen metastatik meme kanserleri, vücuttaki diğer organlara yayılmış geç evre meme kanserleridir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Meme kanserlerinden metastazlar koltuk altındaki lenf düğümlerinde ve/veya akciğer, karaciğer, kemik ve beyin gibi uzak bölgelerde bulunabilir. Primer tümör çıkarıldıktan sonra bile, mikroskobik tümör hücreleri veya mikro-metastazlar vücutta kalabilir ve bu da kanserin geri dönmesine ve yayılmasına neden olur. Klinik olarak, hastalara başlangıçta metastatik hastalık (veya de novo metastatik meme kanseri) teşhisi konabilir veya ilk tedaviyi aldıktan aylar veya yıllar sonra metastazlar gelişebilir. Meme kanserinin geri dönüşü ve metastaz yapma riski, büyük ölçüde tümörün benzersiz moleküler biyolojisine ve tanı anındaki evreye bağlı olarak kişiden kişiye değiştiği için açıkça anlaşılabilir veya öngörülebilir değildir. Ne yazık ki, erken evre meme kanseri teşhisi konan kadınların yaklaşık %30'unda hastalığın metastatik bir formu gelişmektedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).



### **2.6.8. Daha az yaygın meme kanseri türleri**

IDC ve ILC tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %90-95'ini oluştururken, klinik ortamda nadir rastlanılan birkaç meme kanseri türü görülebilir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Bunlar arasında memenin paget hastalığı (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012), memenin anjiyosarkomu (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012), papiller karsinom (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012) ve filloid tümörler (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012) sayılabilir

### **2.6.9. İnflamatuar meme kanserleri (IBC)**

İnflamatuar Meme Kanserleri (IBC), tüm meme kanserlerinin %1-5'ini oluşturan nadir bir invaziv meme kanseri türüdür (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). IBC semptomları, prognozu ve tedavisi diğer meme kanseri türlerinden farklıdır. Tipik IBC semptomları arasında iltihap benzeri meme şişmesi, cildin mor veya kırmızı rengi ve derideki lenf damarlarını bloke eden kanser hücrelerinin neden olduğu meme derisinin çukurlaşması veya kalınlaşması yer alır. IBC sıklıkla bir meme şişmesi ile mevcut değildir ve mamogramlarda tanımlanamayabilir. IBC genç kadınlarda ortaya çıkma eğilimindedir ve Afrikalı-Amerikalı kadınlarda ve aşırı kilolu veya obez kadınlarda daha yaygındır. Dahası IBC, yaygın meme kanseri tiplerinden daha hızlı, daha agresif büyür ve yayılır. IBC genellikle meme kanseri hücrelerinin cilt içine büyüdüğü lokal olarak ileri bir aşamada teşhis edilir. Yaklaşık üçte biri vakada, IBC'ler teşhis sırasında vücudun uzak bölgelerine metastaz yapar ve bu da hastalığın başarılı bir şekilde tedavi edilmesini zorlaştırır (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.6.10. Erkeklerde, çocuklarda ve ergenlerde meme kanserleri**

In situ veya invaziv olabilen erkek meme karsinomları, tüm meme kanseri vakalarının <%1'inden sorumludur (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012,

Colditz ve ark. 2012). Çoğu vaka ER ekspresyonu olan invaziv duktal karsinomlardan oluştuğu için erkek meme kanserleri kadınlarda görülenlerle aynı görünebilir. Erkeklerde en sık görülen meme lezyonu, ya tek taraflı ya da bilateral memeleri içerebilen jinekomasti (veya meme büyütme)'dir. Meme lezyonları çocuklarda ve ergenlerde de nadirdir, ancak ortaya çıkabilir (Polyak 2007, Allison 2012).

## 2.7. Meme Kanserinin Moleküler veya İntrinsik Alt Tipleri

Meme kanseri, heterojen ve fenotipik açıdan farklı bir hastalık grubunu kapsamakta ve tedaviye farklı davranışları ve cevapları olan birkaç biyolojik alt tipten oluşmaktadır. (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Gen ekspresyon çalışmaları, prognoz ve terapötik hedeflerde önemli ölçüde farklılık gösteren birkaç farklı meme kanseri alt tipini tanımlamıştır.

Gen ekspresyon profillemesi tekniklerinin ilerlemesiyle, bu alt tipleri farklılaştıran genlerin listesi, ER ekspresyonu (luminal küme), HER2 ekspresyonu, çoğalmasa ve bazal küme adı verilen birkaç gen kümesinden oluşmaktadır (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Bu anlayış ile meme kanserleri genellikle belirli genlerin ekspresyon profiline dayanan beş intrinsik veya moleküler alt tipe ayrılmaktadır (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.** Meme kanserinin moleküler/intrinsik alt tipleri

Alt tipler	Moleküler işaretler	Özellikler	Tedavi seçenekleri <sup>a</sup>
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, düşük Ki67	~%70, En yaygın, en iyi prognoz	Hormonal tedavi Hedefe yönelik tedavi
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, yüksek Ki67	%10 - %20 Luminal A' dan daha düşük sağkalım	Hormonal tedavi Hedefe yönelik tedavi
HER2+	ER-, PR-, HER2+	%5 - %15	Hedefe yönelik tedavi
Üçlü negatif	ER-, PR-, HER2-	%15 - %20 Siyah kadınlarda daha yaygın, genç yaşta teşhis, en kötü prognoz	Hedefe yönelik sınırlı tedavi
Normal benzeri	ER+, PR±, HER2-, düşük Ki67	Nadir, düşük çoğalma gen kümesi ekspresyonu	Hormonal tedavi Hedefe yönelik tedavi

<sup>a</sup> Geleneksel cerrahi ve cerrahi olmayan tedavinin yanı sıra

### **2.7.1. Luminal A meme kanseri**

Bu alt tip; ER ve/veya PR(+), HER2(-) ve proliferasyon markırı Ki67 (Ki67)'nin düşük seviyelerine sahiptir. Luminal A kanserleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur. Düşük evrelidirler, yavaş büyürler ve en iyi prognoza sahip olma eğilimindedirler. Tedavi tipik olarak hormonal tedaviyi içermektedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.7.2. Luminal B meme kanseri**

Tüm meme kanserlerinin <%20'sini oluşturan bu alt tip, ER ve/veya PR(+), HER2(+) veya (-) ve yüksek Ki67 seviyelerini temsil eder. Luminal B kanserleri, luminal A kanserlerinden biraz daha hızlı büyür ve prognozu biraz daha kötüdür (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

### **2.7.3. HER2 pozitif meme kanseri**

Bu alt tip, meme kanserlerinin % 10-%15'ini oluşturmaktadır. ER ve PR ekspresyonunun olmaması, HER2 ve çoğalmadan sorumlu gen kümelerinin yüksek ekspresyonu ve luminal ve bazal kümelerin düşük ekspresyonu ile karakterizedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). HER2 ile zenginleştirilmiş kanserler luminal kanserlerden daha hızlı büyür ve genellikle daha kötü bir prognoza sahiptir. Bununla birlikte, Herceptin (veya trastuzumab), Perjeta (veya pertuzumab), Tykerb (veya lapatinib) ve Kadcyla (veya T-DM1 veya ado-trastuzumab emtansin) gibi HER2 proteinini hedefleyen terapilerle başarıyla tedavi edilebilir. HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipin klinik olarak HER2(+) meme kanseri ile eş anlamlı olmadığı açıklığa kavuşturulmalıdır. Klinik HER2(+) meme kanserlerinin yaklaşık %50'si HER2 açısından zenginleştirilmişken, geri kalan %50'si herhangi bir moleküler alt tipi içerebilir, ancak çoğunlukla HER2(+) ve luminal alt tiplerdir. Bununla birlikte, HER2 ile zenginleştirilmiş tümörlerin yaklaşık %30'u klinik olarak HER2 negatiftir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012).

#### 2.7.4. Bazal benzeri meme kanseri/üçlü negatif (TNBC)

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan TNBC alt tipi; ER(-), PR(-) ve HER2(-) olarak karakterize edilmektedir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). TNBC, BRCA1 gen mutasyonları olan kadınlarda olduğu kadar, 40 yaşından küçük kadınlar ve Afrikalı-Amerikalılar kadınlar arasında da yaygındır. (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007). TNBC, genellikle diğer meme kanseri tiplerinden daha agresif davranır ve bu da onu ileri evreli meme kanseri yapmaktadır. TNBC'de en sık görülen histoloji, duktal karsinomun infiltrasyonudur, ancak nadir bir histolojik alt tip olan medüller karsinom da genellikle üçlü negatiftir.

TNBC, DNA onarım yolağında BRCA1/2 mutasyonlarını/delesyonlarını; Fosfotidilinozitol-4-5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alfa (PIK3CA) ve AKT Serin/Treonin Kinaz 3 (AKT3) mutasyonları ve/veya amplifikasyonları ve PI3K/mTOR yolağında Fosfotaz ve Tensin Homoloğu (PTEN) ve TSC Complex Subunit 1 (TSC1)'nin delesyonları/mutasyonları; Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1 (FGFR1), Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) amplifikasyonları; ERBB2 (HER2), ErbB2 Receptör Tirozin Kinaz 3 (ERBB3) ve ErbB2 Receptör Tirozin Kinaz 3 (ERBB4) mutasyonları ve B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Treonin Kinaz (BRAF), KRAS Proto-Onkogen, GTPaz (KRAS) ve HRAS Proto-Oncogene, GTPaz (HRAS) amplifikasyonları/mutasyonları; RAS/RAF/MEK yolağının Dual Specificity Phosphatase 4 (DUSP4)'ünün delesyonu; hücre döngüsü kontrol noktalarının Siklin Dependent Kinaz 6 (CDK6), Siklin D1 (CCND1) ve Siklin D2 (CCND2) amplifikasyonları; JAK/STAT yolağında Janus Kinase 2 (JAK2)'nin amplifikasyonu; Notch yolağı, JNK/AP-1 yolağı ve HIF1 $\alpha$ /ARNT yolağı olmak üzere birden çok sinyal yolunda değişikliğe yol açan genleri içeren birden çok kopya sayısı değişikliğine sahiptir (Curtis ve ark. 2012, Kandoth ve ark. 2013, Bianchini ve ark. 2016, Costa ve ark. 2017, Denkert ve ark. 2017, Marotti ve ark. 2017). Bu değişikliklerin çoğu, TNBC'lerde kişiselleştirilmiş hedefe yönelik tedaviler için yeni hedefler olarak kullanılabilir. Kemoterapiye dirençli TNBC'lerin yaklaşık %90'ı bu yolların çoğunda değişiklikler içerdiğinden, Poli(ADP-Riboz) Polimeraz 1 (PARP) inhibitörleri, Fosfotidilinozitol-3-Kinaz (PI3K) inhibitörleri, ısı şok proteini 90 (HSP 90) inhibitörleri

ve histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin yanı sıra bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri şu anda klinik araştırma altındadır (Curtis ve ark. 2012, Kandoth ve ark. 2013, Balko ve ark. 2014, Schadendorf ve ark. 2015, Bianchini ve ark. 2016, Shu ve ark. 2016, Costa ve ark. 2017, Asano ve ark. 2018).

### **2.7.5. Normal benzeri meme kanseri**

Bu alt tip luminal A'ya benzemektedir. ER ve/veya PR(+), HER2(-)'dir ve düşük seviyelerde Ki67 proteinine sahiptir (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Normal benzeri meme kanseri iyi bir prognoza sahip olsa da, prognozu luminal A kanserinin prognozundan biraz daha kötüdür.

Meme kanserlerinin hüresel ve moleküler heterojenliği, yeni nesil genomiklerin ve transkriptomik tekniklerin ortaya çıkmasıyla mümkün kılınan çoklu genetik değişikliklerin analiz edilmesini zorunlu kılar (Hulka 1996, Veronesi ve ark. 2005, Polyak 2007, Allison 2012, Colditz ve ark. 2012). Gen ekspresyon çalışmaları prognozda ve terapötik hedeflerin ekspresyonunda belirgin şekilde farklı olan birkaç farklı meme kanseri alt tipini tanımlamıştır (Perou ve ark. 2000, Sorlie ve ark. 2001, Prat ve ark. 2010). Aslında, içsel alt tipler, hormon reseptörü ile ilişkili genlerin ekspresyonuna karşılık gelen iki ayrı gruba ayrılır. Bu ayrışma, ER(+) ve ER(-) kanserlerin farklı progenitör hücrelerden türetilebilen biyolojik olarak farklı fenotipleri tanımladıklarını gösteren literatür ve klinik deneyimlerle tutarlıdır (Sorlie ve ark. 2001). Ayrıca, genomik analizler ve transkriptomik profillemeye, meme kanserlerinin moleküler sınıflandırmasının nüansları hakkında kritik bilgiler sağlamış, çeşitli teşhis ve prognostik panellerin kurulmasına yardımcı olmuştur (Sotiriou ve ark. 2006).

### **2.8. Meme Kanserinde Klinik Evreleme**

Meme kanseri teşhisi konduktan sonra, hastaların tedavisini etkileyecek olan hastalığın evresini belirlemek için testler yapılmaktadır. Meme kanserinin Evre I, Evre II, Evre III ve Evre IV klinik evrelendirilmesi, Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC) tarafından Tümör, Nod ve Metastaz (TNM) meme kanseri evreleme sistemine göre yapılmaktadır (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** Meme kanserinin anatomik evre grupları

<b>Evreler</b>	<b>Tanımı</b>
Evre 0	İn situ duktal karsinom
Evre I	IA Boyutu $\leq 20$ mm olan primer invaziv tümör, nodal tutulum yok IB $\leq 20$ mm primer tümörü olan veya olmayan nodal mikrometastazlar ( $> 0,2$ mm, $< 2,0$ mm)
Evre II	IIA $\leq 20$ mm primer tümörlü hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazı; veya $> 20$ mm, $\leq 50$ mm nodal tutulumu olmayan tümör IIB $> 20$ mm, $\leq 50$ mm tümörlü hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazı; veya nodal tutulumu olmayan $> 50$ mm tümör
Evre III	IIIA $> 50$ mm tümörlü hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazı; veya sabit ipsilateral seviye I, II herhangi bir boyutta primer tümör veya iç lenf nodu metastazı IIIB Meme duvarı ve / veya deri invazyonlu primer tümör IIIC Supraklaviküler veya ipsilateral seviye III lenf nodu metastazı olan herhangi bir boyutta primer tümör; veya ipsilateral seviye I, II ve internal lenf nodu metastazlı
Evre IV	Uzak organ metastazı olan herhangi bir olgu

İn situ lobüler karsinom meme kanseri evreleme sisteminden çıkarılmış ve iyi huylu olarak kabul edilmiştir

## 2.9. Kanser Kök Hücre Biyolojisi

İlk olarak 1930'lu yıllarda, lösemi oluşturulmuş fare modelinde tek bir hücrenin orjinal parental tümörü oluşturabildiği ancak her bir tek hücrenin tümör oluşturma konusunda başarılı olamadığı dolayısıyla tümör popülasyonu içerisinde az miktarda bulunan bir alt popülasyonun varlığı tanımlanmıştır (Furth ve ark. 1937). 1997 yılında ise "KKH teorisi" ya da "Hiyerarşi modeli" ne dair en kesin ve dikkat çekici gelişme  $CD34^+/CD38^-$  yüzey antijenlerine sahip bir hücre alt grubunun, in vivo koşullarda, tümör oluşturabildiğinin gösterilmesi olmuştur. Ayrıca bu hücrelerin, kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği dahil olmak üzere normal kök hücrelerle benzer özellikleri paylaştıkları rapor edilmiştir (Bonnet ve Dick 1997).

Al-Hajj ve ark. (2003) ilk kez solid bir kanserde (meme kanseri) KKH varlığını ( $CD44^+/CD24^-/Lin^-/düşük$ ) göstermişlerdir. Son on yılda ise, diğer solid tümörler için de KKH'lerinin varlığı tanımlanmıştır (Islam ve ark. 2015). Tümör oluşturma kabiliyetine sahip bu hücre grubunun tümör içerisindeki sayılarının çok az olduğu ve tedavide

kullanılan ilaçlar tarafından elimine edilemediklerinde hastalığın tekrarı ve tedavi direncinden sorumlu oldukları öngörülebilir (Al-Hajj ve ark. 2003).

## **2.10. Kanser Kök Hücre Hipotezi**

Tümörlerin gelişimini açıklamak için iki ayrı ve birbirine zıt model geliştirilmiştir. Klonal evrim modeli (sitokastik model), bir tümör içindeki tüm hücrelerin, tümörün korunmasına değişik derecelerde katkıda bulunduğunu varsaymaktadır. Bu modelde, zaman içinde bir takım genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir, sonuçta en agresif kanser hücrelerinin tümörün ilerlemesini sağlamaktan sorumlu olduğu görülür. Ayrıca, bir dizi genetik mutasyonla, tümör içindeki herhangi bir kanser hücresi invaziv hale gelebilir, metastazların gelişmesine yol açabilir, tedavilere direnç oluşturabilir ve hastalığın tekrarlanmasına katkıda bulunabilir (Bjerkvig ve ark. 2005).

Kanser kök hücre modeli (hiyerarşik model) ise tümör hücrelerinin bir alt kümesini oluşturan kanser kök hücrelerinin, tümörün başlatılması, ilerlemesi ve tekrarlanmasından sorumlu olduğunu öne sürmektedir. Kendini yenileme ve farklılaşma yoluyla, kanser kök hücreleri, çeşitli tümör hücrelerinin üretilmesinden sorumludur ve tümör heterojenitesine katkıda bulunur. Ayrıca, bu hipoteze göre, tümör metastazları ve tedavilere direnç doğrudan kanser kök hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Bjerkvig ve ark. 2005).

## **2.11. Kanser Kök Hücre Özellikleri**

### **2.11.1. Hücre yüzey antijenleri ve yüzey bağımsız büyüme**

Tümörün büyük bir kısmını oluşturan farklılaşmış kanser hücrelerinden farklı olarak KKH'leri, normal kök hücreleri (NKH)'leri ile benzer şekilde, birtakım hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler. Örneğin, meme KKH'leri, CD44 glikoproteini eksprese ederken CD24 proteinini düşük düzeyde eksprese eder veya etmez (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>). Solid tümörlerde; CD44, CD24, CD133, epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM) gibi KKH yüzey belirteçleri bulunmaktadır (Karakas ve ark. 2014).

### **2.11.2. Pasiflik ('quiescence') ve dormansi**

KKH'leri, çoğunlukla hücre siklusunun pasif fazında kalan, dormant veya düşük mitotik indekse sahip hücrelerdir. Kemoterapi ve radyoterapinin proliferen olan hücreleri hedeflediği dikkate alındığında, KKH'lerinin bu özellikleri, onları hızlı bölünen hücreleri hedefleyen tedavilere karşı daha az duyarlı yapmaktadır. Dolayısıyla, bölünen hücrelerin aksine, göreceli olarak pasif olan KKH'leri, çoğu kemoterapötik ilacın etkisinden korunmuş olurlar (Clevers 2011).

### **2.11.3. Apoptotik mekanizmanın düzenlenmesi**

Apoptoz; anti-apoptotik ve pro-apoptotik moleküllerin dengesini sıkıca kontrol eden fizyolojik bir programdır. DNA hasarı, onarılmadığı takdirde programlı hücre ölümü veya apoptozla sonuçlanır ancak kanser hücrelerinde bu denge, DNA onarımı olmadığında dahi sıklıkla apoptozun engellenmesi yönündedir. Kanser hücrelerinin apoptoz direnci klasik şekilde, anti-apoptotik proteinlerin (B-cell lymphoma 2 (BCL2) aile proteinleri, apoptozis inhibitörleri) aşırı ekspresyonu veya BCL2-like 11 (BIM) gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının azalması ile ilişkilendirilir (Letai 2008). Dolayısıyla bu proteinler inhibe edilerek, KKH'leri kemoterapötiklere veya apoptoza duyarlı hale getirilmektedir.

### **2.11.4. Kanser kök hücre plastisitesi ve epitelyal mezenkimal dönüşüm**

Epitel-mezenkimal dönüşüm (EMD), embriyonik gelişim sürecinde epitelyal hücrelerin göç edebilmelerinden sorumlu fizyolojik bir olaydır. Bu süreçte polarize epitelyal hücreler, hücre-hücre bağlantılarının zayıfladığı daha hareketli ve daha invazif karakterli hücrelere dönüşürler. Moleküler düzeyde, epitelyal belirteçlerin (CDH1 ve  $\beta$ -Katenin gibi) ekspresyonu, yerlerini mezenkimal belirteçlere (Vimentin ve Fibronektin gibi) bırakır. Bu genlerin ekspresyonu ise, Twist Family BHLH Transcription Factor (TWIST), Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 (ZEB1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilir (Scheel ve Weinberg 2012).

Plastisite, doku kaynaklı kök hücrelerin, içerisinde yer aldığı dokunun diferansiyel hücre fenotiplerini verme potansiyeline karşılık gelirken, KKH bağlamında, fenotipik



olarak farklılaşmış bir hücrenin de-diferansiye olarak kök hücre karakteristiklerini elde etmesini ifade etmektedir (Singh ve Settleman 2010). EMD-ilişkili kök hücre veya benzeri hücrelerin oluşumu, herhangi bir maruziyet neticesinde yetişkin epitelyal kök hücre havuzunun azalmasına karşın kritik önem taşımaktadır. Ne yazık ki benzer mekanizma ile tümörjenik KKH'leri meydana gelebilir ve bu hücreler TWIST veya Kruppel Like Factor 8 (KLF8) gibi transkripsiyon faktörlerini fazla miktarda ekspres ederler. Yani, EMD geçiren hücreler, KKH-benzeri özellikler kazanırlar veya bir diğer deyişle KKH'leri mezenkimal karaktere sahiplerdir (Mani ve ark. 2008).

### **2.11.5. Otofaji**

KKH'leri, hipoksi, besin azlığı veya toksik ilaçlar gibi birtakım olumsuz koşullara maruz kaldıklarında, canlılıklarını ve metabolik homeostazlarını devam ettirebilmek adına çeşitli katabolik süreçleri aktifleştirilebilirler. Homeostaz devamlılığı için temel mekanizma ise otofaji'dir. Bu süreçte, hücre için gereksiz ve işlevsel olmayan molekül/organeler; lizozomal enzimler aracılığıyla parçalanarak, hücreye enerji ve aminoasitler sağlanır. KKH'lerinde antikanser terapilerin, otofajiyi uyardığı ve sonuç olarak tedavi direncini sağladığı gösterilmiştir. Dolayısıyla otofaji inhibisyonu, tümörleri kemoterapiye karşı duyarlı hale getirir (Ojha ve ark. 2015).

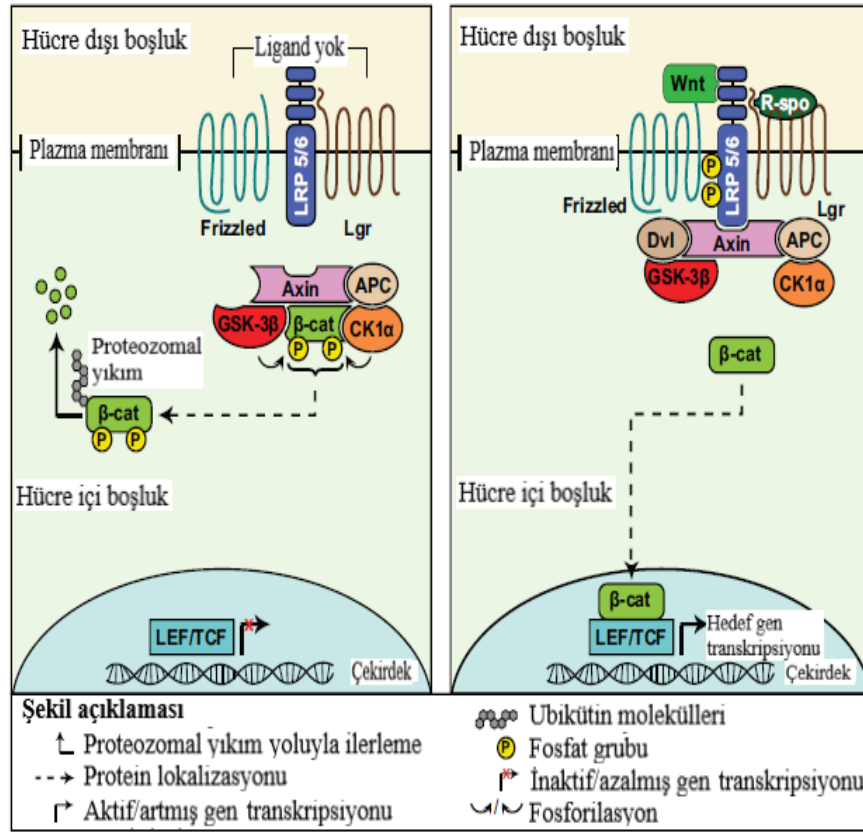
### **2.12. Kanser Kök Hücrelerinde Gelişimsel Sinyal Yolakları**

Normal kök hücreyi kontrol eden moleküler sinyal yolakları homeostazisi oldukça iyi düzenlenmiştir. Ancak bu yolların birçoğu insan kanserlerinde ve deneysel tümör oluşumu modellerinde anormal olarak aktive edilir veya bastırılır. Bu tür anormallikler, KKH'lerin kendini yenileme, çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma özelliklerine katkıda bulunur. Genel olarak, bu yolaklar karmaşıktır, birçok dışsal ve içsel moleküler sinyaller ve düzenleyici elementler yer almaktadır. Bu sinyal yolaklarının birçoğu doğrusal değil, birbirleriyle beslenen sinyal aracılarının iç içe geçmiş ağlarıdır. Bu nedenle, hücre yüzeyi proteinlerinin (örneğin, CD44 ve CD133), hücre içi işaretleyicilerin örneğin, Aldehit dehidrojenaz (ALDH), kök hücre genlerinin örneğin, Octamer Binding Transcription Factor 4 (OCT4) ve SRY-Box Transcription Factor 2 (SOX2) ekspresyonunu ve fenotipik deneyleri örneğin, tümör küresi oluşumu ve seri olarak nakledilebilen in vivo tümörler içeren çeşitli moleküler metodolojiler, kök hücre

karakteri oluşumunu test etmek için kullanılır (Boman ve Wicha 2008, Huang ve ark. 2009, Tang 2012, Ajani ve ark. 2015).

### 2.12.1. Klasik Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı

Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı, 19 Wnt ligandını ve >15 reseptörü kapsayan oldukça karmaşık, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yoludur (Kahn 2014). Geleneksel olarak, Wnt yolunun Kanonik (transkripsiyonel regülatör  $\beta$ -katenin aracılı) ve Kanonik olmayan ( $\beta$ -katenin bağımsız) iki sinyal yolunu kapsadığı düşünülmektedir (Kahn 2014). Kanonik Wnt sinyal yolu, Wnt ligandlarının, Frizzled reseptörlerine ve/veya komşu bir hücre üzerindeki düşük yoğunluklu lipoproteinle ilişkili protein 5 (LRP5) ve LRP6 koreptörlerine bağlanmasıyla aktive edilir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** İnaktif (sol panel) ve aktif (sağ panel) Wnt sinyal yolları (William ve Matsui 2016'dan değiştirilerek alınmıştır)

Son veriler, Leucine Rich Repeat Containing G Protein (LGR)'lere bağılı R-spondin ligandlarının hareketi yoluyla Wnt yolağıının aktive olduğunu göstermiştir (Holland ve ark. 2013, Clevers ve ark. 2014). Wnt ligand bağlanması yokluğunda, bir yıkım kompleksinin hareketi ile transkripsiyonel regülatör  $\beta$ -katenin proteininin hücre içi seviyeleri düşük tutulmaktadır. Kompleks, iskele proteinleri Axin ve Adenomatöz Polipozis Koli (APC) ile kinaz proteinleri Glikojen Sentaz Kinaz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) ve Kazein Kinaz 1 Alfa'yı (CK1 $\alpha$ ) içermektedir. GSK-3 $\beta$  ve CK1 $\alpha$ , übikitinasyon ve proteozomal yıkım için fosforile  $\beta$ -katenini işaretler (Clevers ve ark. 2014, Kahn 2014). Wnt, Frizzled/Lrp'ye bağlandığında, Lrp'nin sitoplazmik alanı fosforile olur, GSK-3 $\beta$  ve Axin ayrılır böylece iskele proteini (Dvl) tek kalır.

Bu yıkım, kompleksin dağılmasına neden olur. Ardından serbest  $\beta$ -katenin çekirdeğe yerleşir, lenfoid arttırıcı faktör (LEF)/T hücre faktörü (TCF), transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve çok sayıda hedef genin transkripsiyonunu aktive eder (Pulvirenti ve ark. 2011, Clevers ve ark. 2014).

Kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolakları yoluyla sinyalizasyon, çok çeşitli dokuların embriyonik gelişimi ve homeostazı için gereklidir (Holland ve ark. 2013, Kahn 2014). Genel olarak, kanonik Wnt yolu çoğalma, hayatta kalma ve hücre kaderi kararlarını düzenler, kanonik olmayan Wnt yolu ise, asimetric hücre bölünmesini, hücre polaritesini ve migrasyonu düzenlemektedir. Ancak bu yolaklar birbirini dışlamaz, etkileşim halindedirler. Wnt yolu araçlarını kodlayan genlerdeki mutasyonlar, medulloblastom, lenfoma ve lösemi ile meme, mide ve kolorektal kanser gibi birçok kanserde yaygındır (Polakis 2012). Dahası, APC tümör baskılayıcı mutasyonları ailesel adenomatöz polipozise ve sporadik kolorektal kanserlerin çoğuna neden olmaktadır (Polakis 2012).

Deneysel kanıtlar; kan, bağırsak, akciğer, meme bezi, sinir sistemi, deri ve idrar yolu kanserleri KKH'lerinin düzenlenmesinde Wnt aktivasyonunun rolünü desteklemektedir (Holland ve ark. 2013). Wnt- $\beta$ -katenin yolağı, meme hücresi gelişiminin birçok evresinde düzenleyici bir rol oynar ve meme kanseri kök hücrelerinin (MKKH) stabilizasyonunda önemli bir işleve sahiptir (Malanchi ve ark. 2008, Incassati ve ark. 2010). İnsan meme kanserlerinde, Wnt yolağı ve aşağı akış hedef genlerinin birçok

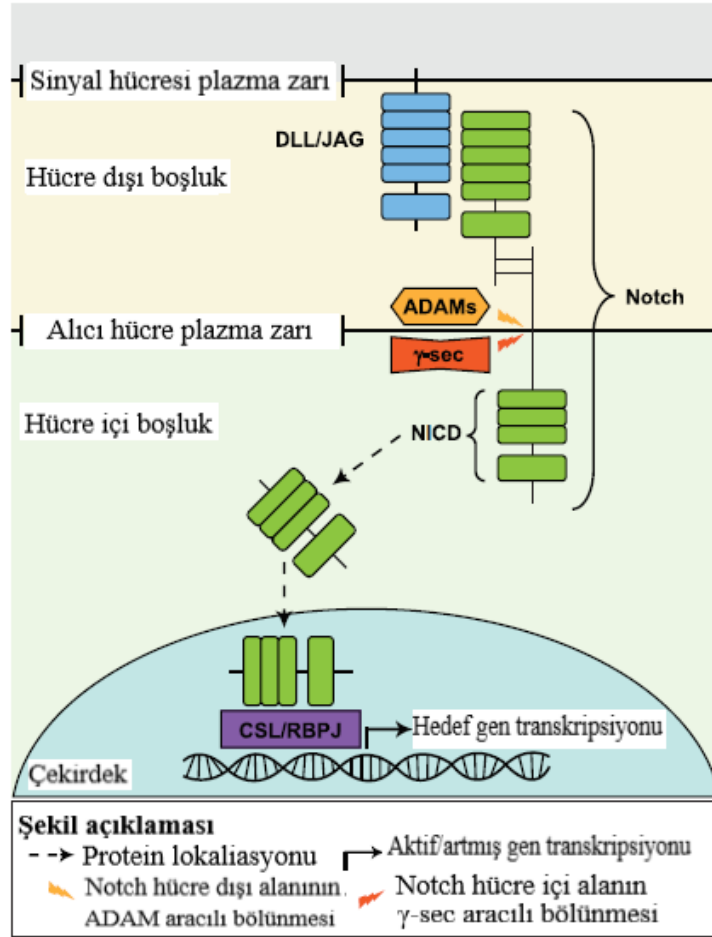
aktivatörü amplifiye edilir veya yukarı regüle edilirken yolağın inhibitörleri inaktive edilir veya epigenetik olarak susturulur (Incassati ve ark. 2010). Meme bezlerinde Wnt1'in konstitütif aşırı ekspresyonunun neden olduğu yerleşik bir meme tümör oluşumunun fare modelinde, meme kök hücreleri kontrole oranla >6 kat daha fazladır (Shackleton ve ark. 2006). Fare modeli meme tümör virüsü (MMTV)-Wnt1 çalışmasında, Lrp5 reseptörünün kaybı hiperplastik büyümeyi ve tümör oluşumunu inhibe etmiş ve salgı bezlerindeki progenitör hücre sayısını azaltmıştır (Lindvall ve ark. 2006). Bunun yanında, farelerde, tümör baskılayıcı APC geninin kaybı bağırsakta hızlı adenom oluşumuna neden olmaktadır. İnsanlarda ise APC geninin kaybı ailesel ve sporadik KKH'lerle sonuçlanmaktadır (Polakis 2012).

Tümör oluşumuna ek olarak, Wnt sinyali KKH aracılı metastaz ve KKH karakterinin korunması ile ilişkilendirilmiştir (Jang ve ark. 2015). Akış sitometri analizi, meme KKH'lerinin, parental hücreler ile karşılaştırıldığında, Wnt sinyal proteinleri Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 (LEF1), siklin D1,  $\beta$ -katenin ve TCF-4 seviyelerini önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde eksprese ettiğini göstermiştir. Benzer şekilde, KKH'lerde Wnt1'in bozulması, CD44 ve ALDH1 kök hücre genlerinin ekspresyonunu, tümör oluşumunu ve meme kanseri hücrelerinin KKH alt popülasyonunu azaltmıştır (Jang ve ark. 2015). Bu veriler, meme kanserinde kanser kök hücre karakterinin korunması için Wnt sinyalinin gerekli olduğunu göstermektedir (Jang ve ark. 2015). Son olarak, metastatik ve metastik olmayan meme KKH'lerinde Wnt genlerinin ekspresyonları anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (Jang ve ark. 2015). Bu veriler, Dvl'yi aşırı eksprese eden ve lenfatik metastaz eğilimi gösteren meme kanseri hücreleri arasında yüksek oranda KKH bulunduğunu göstermekte ayrıca KKH'lerde amplifiye Wnt sinyalinin meme kanseri metastazı için önemli olabileceğini düşündürmektedir (Jang ve ark. 2015).

### **2.12.2. Notch sinyal yolağı**

Notch ligandları (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 ve JAG2) ve reseptörleri (Notch1-4) transmembran proteinleridir. Bu yolak, ligandın, bitişik bir hücrede bir reseptöre bağlanmasıyla aktive edilir (Şekil 2.5) (Karamboulas ve Ailles 2013). Bu etkileşim, önce bir disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM)'ların, daha sonra  $\gamma$ -sekretaz ile

reseptörün sitoplazmik alanının proteolitik bölünmesini başlatır. Bu ikili bölünme ile, Notch hücre içi alanını (NICD) sitoplazmaya bırakır, buradan çekirdeğe taşınır ve Centromere-Binding Protein 1 (CBF1), CSL/RBPJ transkripsiyon faktörü ve Longevity Assurance Gene (LAG) 1 sinyal bağlama proteini yoluyla hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Karamboulas ve Aillles 2013, Takebe ve ark. 2015).



**Şekil 2.5.** Notch sinyal yolağı (Willim ve Matsui 2016'dan değiştirilerek alınmıştır)

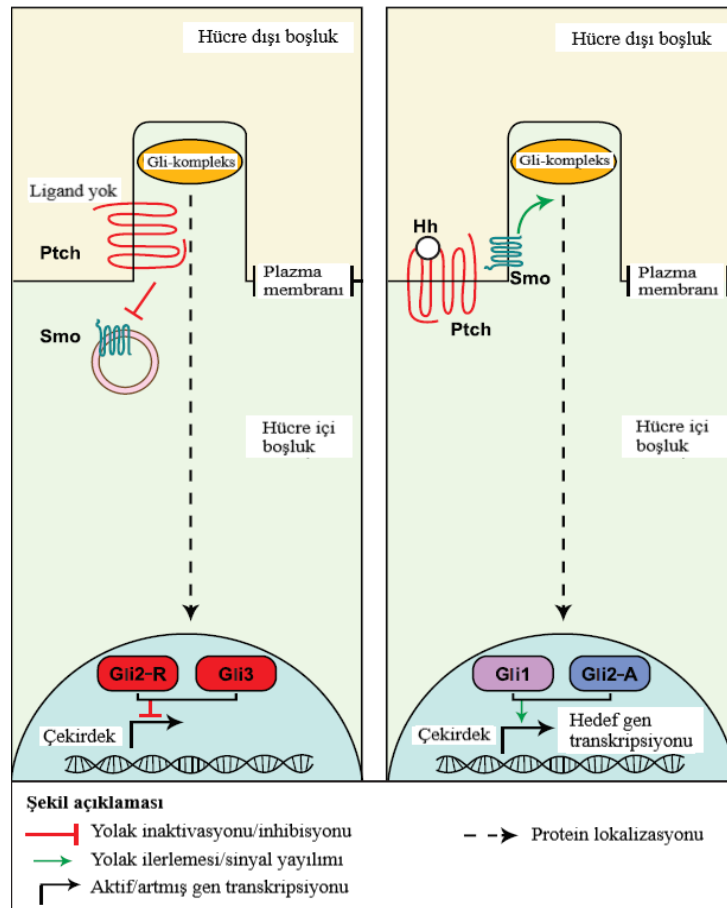
Notch yolağı; embriyonik merkezi sinir ve hematopoietik sistemlerin, vaskülatür, kalp, gözler, pankreas, bağırsak ve diğer organların gelişiminde, hücre kaderi spesifikasyonu ve kök ve progenitör hücrelerin farklılaşmasının düzenlenmesinde oldukça korunmuş ve kritiktir (Chiba 2006, Karamboulas ve Aillles 2013, Takebe ve ark. 2015). Yetişkinlerde, Notch sinyalizasyonunun cilt, hematopoietik sistem, bağırsak ve iskelet kası sistemindeki kök ve progenitör hücre fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir.

Notch yolağının; lösemi, glioblastoma, meme, kolon, pankreas ve akciğer dahil olmak üzere birçok kanserde tümör hücrelerinin özelliklerini düzenlediği gösterilmiştir (Ranganathan ve ark. 2011). Bu sinyal yolağı, meme bezi gelişiminin çeşitli aşamalarında yer alır, meme kanseri patogenezinde önemli rol oynar ve bu nedenle yeni bir terapötik hedefi temsil edebilir (Weng ve ark. 2004). Notch sinyali, MKKH'lerde kendini yenileme, onarım ve apoptozun düzenlenmesinde de görevlidir. Bu nedenle, Notch sinyalizasyonunun veya bileşenlerinin inhibisyonu, Notch aracılı MKKH'lerin oluşumunu ve meme kanseri metastazını azaltmak için çok önemlidir (Weng ve ark. 2004). Bununla birlikte, KKH'lerde Notch sinyalleşmesinin potansiyel rolü açık olmamakla birlikte aktif Notch sinyali farklı dokularda bir tümör promotörü veya baskılayıcısı olarak işlev görebilir (Ranganathan ve ark. 2011). Örneğin, kolorektal kanserdeki APC mutasyonları gibi Notch'te aktive edici mutasyonlar T hücreleri akut lenfoblastik lösemisinin gelişimi için nedenseldir (Weng ve ark. 2004, Ranganathan ve ark. 2011). APC mutasyonlarının sebep olduğu adenomlarda, Notch inhibisyonu adenom hücrelerini goblet hücrelerine farklılaşmaya zorlamıştır, bu da farklılaşmamış KKH durumunu korumak için hem Notch hem de Wnt aktivasyonunun gerekli olabileceğini düşündürmektedir (Van Es ve ark. 2005). Notch'un KKH karakterinin korunmasındaki rolünü araştıran başka bir çalışmada, hastadan türetilen pankreatik KKH'lerin Notch1, Notch3, Jag1, Jag2 ve Notch hedef geni Hes1'i yüksek seviyelerde eksprese ettiği gösterilmiştir (Abel ve ark. 2014). KKH'lerin bir gama sekretaz ( $\gamma$ -sec) inhibitörü ile tedavisi, KKH alt popülasyonunu ve tümör küresi oluşum sıklığını azaltmıştır (Abel ve ark. 2014). Hücre ölümü teknikleri,  $\gamma$ -sekretaz inhibitörü tedavisinin hücre döngüsü ilerlemesini bozduğunu ve apoptozu arttırdığını, bu da Notch sinyalleşmesinin pankreatik KKH karakterini desteklemek için hücre sağkalımını destekleyebileceğini göstermiştir (Abel ve ark. 2014).

Özofagus adenokarsinom hücreleri kullanan ksenograft tümör modellerinde, bir  $\gamma$ -sekretaz inhibitörü ile tedavi yoluyla Notch yolunun inhibisyonu, primer tümör büyümesini büyük ölçüde azaltmıştır. Transplantasyon sırasında sekonder tümör büyümesinin başarısız olması, Notch kaybının, kanseri başlatan hücre popülasyonunun tükenmesine neden olduğunu düşündürmüştür (Wang ve ark. 2014).

### 2.12.3. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı

Hedgehog yolağının bileşenleri arasında Hedgehog ligandları (Sonic, Desert ve Indian) ve bunların ortak kökenli reseptörleri Patched (PTCH), transmembran proteini Smoothed, Frizzled Class Receptor (SMO) ve yolağın aktivasyonunu veya baskılanmasını modüle eden Gli transkripsiyon faktörleri (Gli)'lerden 1-3 bulunmaktadır (Merchant ve Matsui 2010). PTCH reseptörü, ligand tarafından kullanılmadığında SMO'nun temel bir inhibitörü olarak işlev görür. Bu durumda, hedef gen transkripsiyonu Gli3 ve Gli2-R (baskılayıcı formunda Gli2) tarafından bastırılır. PTCH'ye ligand bağlandıktan sonra, hedef genlerin transkripsiyonunu kolaylaştırmak için transkripsiyonel aktivatörler Gli1 ve Gli2-A (aktivatör formunda Gli2) aracılığıyla SMO üzerindeki baskı kalkmış olur (Şekil 2.6) (Merchant ve Matsui 2010).



Şekil 2.6. Hedgehog inhibisyonu (sol panel) ve aktivasyonu (sağ panel) sinyal yollarını (William ve Matsui 2016'dan değiştirilerek alınmıştır)

Hh yolağı; sinir sistemi, iskelet sistemi, akciğer, kalp ve bağırsak da dahil olmak üzere embriyogenez sırasında birçok organın gelişmesi ve uygun şekilde dzenlenmesi için hücresel çoğalmayı, farklılaşmayı ve migrasyonu kontrol etmektedir (Merchant ve Matsui 2010, Petrova ve Joyner 2014). Birçok yolaktan farklı olarak, Hh yolağı, yetişkin merkezi sinir sistemi, cilt, sa ve dişler hariç çoğu postnatal dokuda büyük ölçüde etkisizdir. Son zamanlarda, Hh aktivitesinin yerleşik kök ve/veya progenitör hücre popülasyonlarını dzenlediği gösterilmiştir (Merchant ve Matsui 2010, Petrova ve Joyner 2014). Fare alışmaları, kanser hücre soyları ve hasta örneklerinin in vitro analizleri, bir düzineden fazla kanser türünde anormal Hh sinyalinin varlığını doğrulamıştır (Merchant ve Matsui 2010). KKH fonksiyonunda Hh sinyalinin rolü, bazal hücreli karsinom (BHK), multipl miyelom, glioblastom, kronik miyeloid lösemi (KML) ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde belgelenmiştir (Hutchin ve ark. 2005, Merchant ve Matsui 2010). PTCH1 geninde mutasyon tespit edilen bireyler medulloblastoma geliştirmeye yatkındır. Ayrıca PTCH1 genindeki mutasyonlar, hastaları, ileri BHK'ye yatkın hale getiren bir hastalık olan Gorlin sendromuna neden olmaktadır (Peterson ve ark. 2015). Hh yolağının, multipl miyelom, glioma ve KML'deki KKH'lerin özelliklerini dzenlediği gösterilmiştir (Clement ve ark. 2007, Peacock ve ark. 2007, Zhao ve ark. 2009). İnsan multipl miyelom hücre hattından izole edilen progenitör hücrelerin analizinde, SMO geni aşırı eksprese edilmiş ve parental hücrelere kıyasla yüksek Gli1 transkripsiyonel aktiviteye karşılıklı gelmiştir (Peacock ve ark. 2007). SMO inhibisyonu, KKH'lerde çoğalmanın, kanser kök hücre karakterinin ve kendi kendini yenilemenin zayıflamasına neden olmuştur. İnsan gliomunda KKH'lerin Hh sinyal genleri Gli1, Sonic Hedgehog Signaling Molecule (SHH) ve PATCHED1'i aşırı eksprese ettikleri gözlenmiştir (Clement ve ark. 2007). Glioma KKH'lerinin bir Hh sinyal inhibitörü ile tedavisi, Nanog Homeobox (NANOG), SOX2 ve OCT4 kök hücre genlerinin ekspresyonunun azalması ile birlikte çoğalma, hayatta kalma, kendini yenileme ve klonojenisitede bir azalmayla sonuçlanmıştır (Clement ve ark. 2007). Bu veriler glioma KKH'lerinin fonksiyonel destek için Hh sinyalini gerektirebileceğini göstermektedir (Clement ve ark. 2007). SMO kaybı olan bir KML fare modelinde SMO'nun aşırı ekspresyonu, KKH frekansını 4 kat ve KML ilerlemesini önemli ölçüde arttırmıştır (Zhao ve ark. 2009).



Bununla birlikte, kolon kanseri karaciğer metastazlarından izole edilen hastadan türetilen KKH'lerin, metastatik olmayan kontrollere kıyasla yüksek seviyelerde Hh sinyal genleri Gli1, Gli2 ve HIP eksprese ettiği bulunmuştur (Varnat ve ark. 2009). İlaveten, Gli1 sadece KKH'lerde eksprese edilmiştir (Varnat ve ark. 2009). Bu sonuçlar, tümörün korunmasını ve büyümesini teşvik edebilecek kolon KKH karakteri ve sağkalımı için Hh sinyalinin gerekli olabileceğini düşündürmektedir (Varnat ve ark. 2009). KKH'lerin sıklığının hastalık ilerlemesi ile arttığını gösteren deneylerin sonuçlarıyla birleştiğinde, bu veriler kolon kanseri ilerledikçe Hh sinyal aktivitesinin artabildiğini göstermektedir (Varnat ve ark. 2009). Gerçekten de, karaciğer metastazlarından izole edilen KKH'ler, metastatik olmayan kontrollere kıyasla, Gli1'in hedefi olan Snail Family Transcriptional Repressor 1 (SNAIL1)'i yüksek seviyelerde eksprese etmiştir (Varnat ve ark. 2009). SNAIL1'in, metastazın teşvik edilmesinde yer alan bir süreç olan EMD kolaylaştırdığı düşünüldüğünde, gen transkripsiyonel verileri, Hh sinyallemesinin KKH'lerin prometastatik rolünde önemli olduğunu düşündürmektedir (Varnat ve ark. 2009).

### **2.13. Meme Kanseri Kök Hücreleri**

Son çalışmalar, meme kanseri gelişiminin esas olarak, hücrelerin bir alt popülasyonu olan MKKH'ler tarafından yönlendirildiğini göstermektedir. Bu hücre alt popülasyonu kendi kendini yenileme, farklılaşma, tümör oluşumu, metastaz ve hatta tedaviye direnç gösterebilir (Das ve ark. 2019). Hücre migrasyonunu, farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol etmek için CD44, CD133 gibi yüzey belirteçlerini eksprese etme, kemoterapötik ilaçların atılımı için ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1 (ABCG1) ve ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (ABCG2) gibi transporter proteinlerini yüksek seviyede eksprese etme; oksidatif stresi azaltmak için detoksifiye edici enzim ALDH1 aktivitesi gösterme ve terapötik hasarlardan hemen sonra DNA onarım sürecinde aktive olmaları (Nakanishi ve Ross 2012, Charafe-Jaufret ve ark. 2013, Holohan ve ark. 2013, Das ve ark. 2019) gibi farklı genotip-fenotipik özellikler gösterirler. Bu özellikler onları kemo-radyoterapilere duyarsız kılar (Nakanishi ve Ross 2012, Charafe-Jaufret ve ark. 2013, Holohan ve ark. 2013). Ayrıca, MKKH sayısının geleneksel tedavilerle, tedaviden sonra azalmak yerine arttığı ve bunun da meme

kanserinin nüksetmesine neden olduğu gösterilmiştir (Charafe-Jaufret ve ark. 2013). Ayrıca, ER(+), PR(+), HER2(+) ve üçlü negatif gibi birkaç meme kanseri alt tipinin varlığı meme kanserine karşı spesifik bir tedavi planlamayı zorlaştırır (Das ve ark. 2019). MKKH'ler tüm meme kanseri alt tiplerinde önemli roller oynamaktadır ve bu nedenle meme kanseri riskini ortadan kaldırmak veya en azından tehdidini en aza indirmek için MKKH'leri hedeflemek büyük önem taşımaktadır.

#### **2.14. MikroRNA'lar**

mikroRNA'lar (miRNA'lar), asıl rolü degradasyonuna yol açarak mRNA'yı düzenlemek ve aynı zamanda protein seviyelerini ayarlamak olan 17-25 nükleotitten oluşan küçük, kodlayıcı olmayan bir RNA sınıfını temsil etmektedirler. Önceki çalışmalar, miRNA kodlayan sekansların insan genomunun %1'ini oluşturduğunu göstermiştir (Wang ve ark. 2016, Condrat ve ark. 2020).

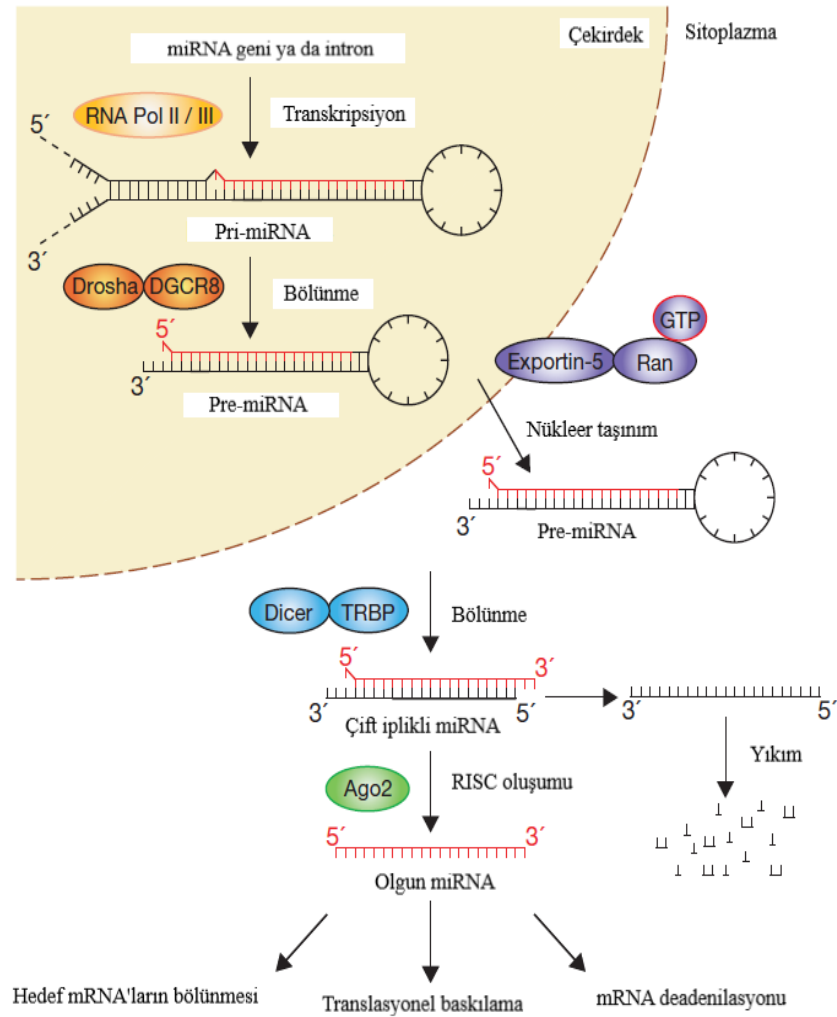
miRNA'lar, 1993 yılında Lee ve çalışma arkadaşları tarafından yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*)'da Lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle keşfedilmişlerdir, ancak miRNA terimi ilk kez 2001 yılında kullanıma girmiştir (Condrat ve ark. 2020). 2000 yılında ise yine yuvarlak solucan *C. elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, canlılığın gelişim zamanlamasını düzenleyen ve Let-7 olarak isimlendirilen bir miRNA, Reinhart ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Reinhart ve ark. 2000). Daha sonraki yıllarda Lin-4 ve Let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiş ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (Kai ve ark. 2018).

İnsan genomunda kodlanan binlerce miRNA vardır ve bu miRNA'ların hedef genlerinin hücre gelişimi, farklılaşma, çoğalma, immünite ve apoptoz ile ilişkili sinyal yollarında düzenleyici rolü bulunmaktadır. Ancak, düzensiz miRNA ekspresyonunun meme kanserini de içine alan birçok hastalık patogeneğinde yer aldığı bildirilmektedir (Kai ve ark. 2018). Bu açıdan bakıldığında, miRNA aracılı gen ekspresyonu önemli ve vazgeçilmez bir mekanizma olarak kabul edilmektedir.

### 2.14.1. miRNA biyogenezi

miRNA'nın biyogenezi, primer miRNA (pri-miRNA)'nın transkripsiyonunun, RNA polimeraz II ve III'ün etkisi altında gerçekleştiği çekirdekte başlar (Lee ve ark. 2004, Krol ve ark. 2010). Ortaya çıkan molekül, bir ucunda ilmek içeren saç tokası benzeri bir yapıdır (Lee ve ark. 2004). Saç tokası yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroşlemci kompleksi tarafından kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda prekürsör miRNA (pre-miRNA)'nın oluşmasına neden olur. PremiRNA, nükleustan Exportin-5 (XPO5) aracılığı ile sitoplazmaya taşınır ve diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda çift iplikli (dubleks) miRNA'ya kesilir. Olgun diziyeye kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC), Argonaute RISC Catalytic Component 2 (Ago2) protein kompleksiyle birleşir. Eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'i indükler ve hedef mRNA'ların bölünmesi, translasyonel baskılama veya deadenilasyon yoluyla susturmaya yönlendirilir (Şekil 2.7) (Condrat ve ark. 2020).

RISC/miRISC kompleksi tarafından mRNA'nın tanınması genelde miRNA'nın 5' ucundaki 2-7 nükleotidin yer aldığı bir çekirdek bölgesine dayanmaktadır (Borchert ve ark. 2006). Ayrıca, çift iplikli miRNA'nın, genellikle kılavuz ipliği olarak bilinen iplerinden biri, RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) entegre edilecekken, yolcu ipliği olarak bilinen diğeri, bazı durumlarda işlevsel olduğu bulunmasına rağmen degrade olur (Kwak ve Tomari 2012). Çoğu zaman, başlangıçta daha az stabil olan 5'ucu veya bir urasil içeren ipliğin kılavuz ipliği olarak seçilmesi daha olasıdır (Borchert ve ark. 2006, Kwak ve Tomari 2012, Ha ve Kim 2014, Meijer ve ark. 2014). Yolcu ipliğin bozulmadığı ve her ikisinin miRISC kompleksine dahil edildiği durumlarda, kılavuz iplikteki olgun miRNA baskın olan olacaktır (Ha ve Kim 2014, Meijer ve ark. 2014, Condrat ve ark. 2020).



**Şekil 2.7.** miRNA'ların biyogenezini, işlenmesini ve olgunlaşmasını (Winter ve ark. 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

miRNA'nın insan vücudundaki ana rolü, mRNA'nın bozulmasına aracılık ederek ve ayrıca kanonik ve kanonik olmayan mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ve translasyonu düzenleyerek gen regülasyonunda rol almalarıdır (Bartel 2009). Kanonik mekanizma, miRNA kılavuz ipliğini içeren miRISC kompleksinin, 3' translasyona uğramayan bölgesi (3'UTR) yoluyla hedef mRNA'ya bağlanarak etkisini gerçekleştirdiği anlamına gelir (Bartel 2009). Bu işlem, 5' uçtan ilk 2-7 nükleotid olan miRNA'nın çekirdek bölgesine uygun olarak gerçekleşir ve bunu mRNA deadenilasyonu, translasyonel baskı ve son olarak degradasyon izler (Lee ve ark. 2003, Winter ve ark. 2009, Li ve ark. 2012). Bununla birlikte, insan hücrelerinde, miRISC kompleksi ve mRNA arasındaki etkileşimlerin yaklaşık %60'ı kanonik değildir bu da

zincirlerinin her zaman tamamen tamamlayıcı olmadığı anlamına gelir (Kwak ve ark. 2010, Lin ve Gregory 2015). Bu, tek bir miRNA'nın potansiyel olarak çok sayıda mRNA'yı hedefleyebileceği fikrine yol açarken, aynı zamanda bir mRNA, miRNA'lar için birden fazla bağlanma yeri içerebilir ve bu da, bu etkileşimle çok sayıda biyolojik sürecin düzenlenebileceği olasılığına dönüşür (Bartel 2009, Winter ve ark. 2009, Lin ve Gregory 2015).

miRNA'nın oynadığı bir diğer önemli rol, hücreler arası sinyalizasyondur. miRNA'ların çoğu hücre içinde bulunmasına rağmen, göç eden ve vücut sıvılarında bulunabilen büyük bir oran vardır (Qu ve ark. 2011, Shen ve ark. 2013, Ashby ve ark. 2014). Bunlar dolaşımdaki miRNA'lar olarak adlandırılır ve kan, idrar, tükürük, seminal sıvı, anne sütü (Qu ve ark. 2011, Shen ve ark. 2013) ve diğer sıvılarda bulunurlar. Bu miRNA'lar, doku hasarı, apoptoz ve nekroz yoluyla veya bir proteine bağlanarak, mikroveziküllerde, eksozomlarda aktif taşıma yoluyla boşaltılırlar (Qu ve ark. 2011, Bertoli ve ark. 2015). Önceki çalışmalar, dolaşımdaki miRNA'ların yaklaşık % 10'unun eksozomlarda bulunduğunu, diğer % 90'ının Ago2, Nükleoposmin 1 (NPM1) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) gibi proteinlerle kompleksler oluşturduğunu göstermiştir (Shen ve ark. 2013, Bertoli ve ark. 2015). Bu tür bir paketlenme, vücut sıvılarında bulunduğu bilinen RNazlar tarafından miRNA'nın sindirimini önlemek için gereklidir (Bertoli ve ark. 2015, Condrat ve ark. 2020).

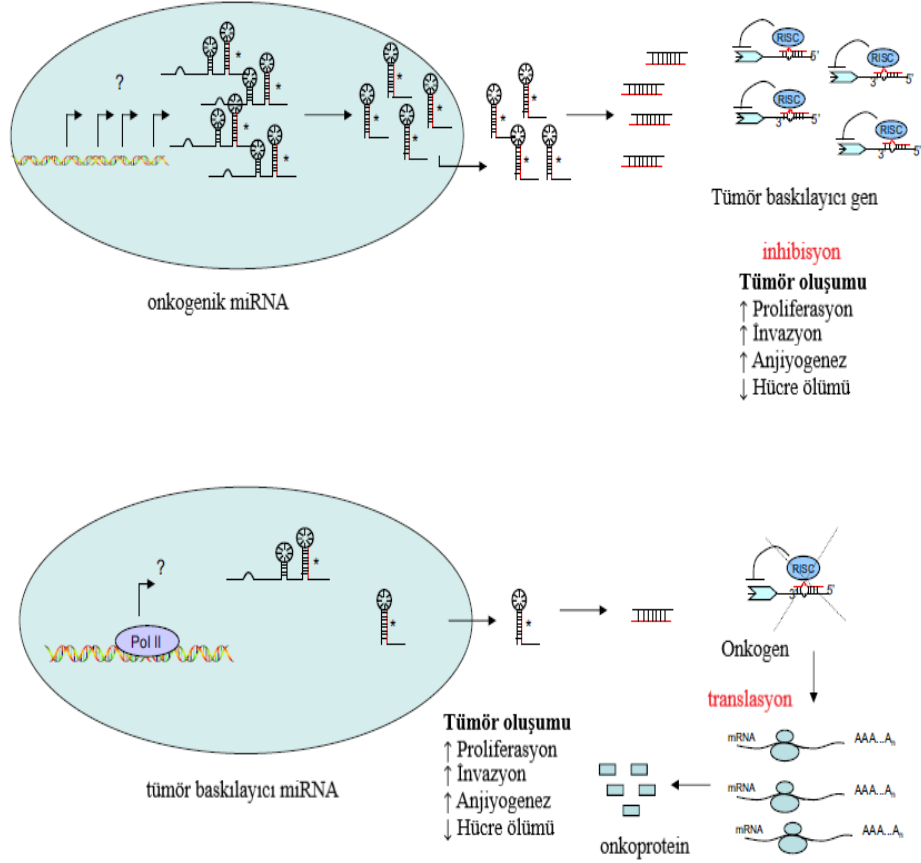
50-100 nm'lik bir çapa sahip olan eksozomlar, miRNA içeren, zar ile kaynaşmış, endozomdan türetilmiş mikrotaneciklerdir. Hem in vitro hem de in vivo çok sayıda hücre tarafından salgılanırlar ve vücuttaki sıvıların çoğunda görülebilirler (Qu ve ark. 2011, Shen ve ark. 2013, Ashby ve ark. 2014, Bertoli ve ark. 2015). Son bulgular tarafından desteklenen bir hipotez, bu veziküllerde bulunan miRNA çeşidinin köken aldığı hücreden farklı olma eğilimi nedeniyle miRNA'ların belirli eksozomlara seçici olarak tanımlı olabileceğini belirtmektedir (Qu ve ark. 2011, Shen ve ark. 2013, Ashby ve ark. 2014, Bertoli ve ark. 2015). Daha önce belirtildiği gibi, dolaşımdaki miRNA'ların % 90'ının bir proteininin yardımıyla taşındığı tahmin edilmektedir. Bazı çalışmalar bu tip taşınmanın adenosin trifosfat (ATP)'ye bağımlı olabileceğini öne sürerken diğerleri kompleksin hücre dışı boşluğa ulaşması için iyi bilinen proteine özgü mekanizmaya benzer bir taşıyıcıya ihtiyaç duyduğunu belirtmektedir (Bertoli ve ark.

2015, Condrat ve ark. 2020). Bu hipotezlerin her ikisinin de doğru olduğu kanıtlanmadan önce daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bununla birlikte, muhtemelen miRNA'ların en umut verici rolü potansiyel bir biyobelirteç adayı olmalarıdır. Bu yönleri ile miRNA'lar çok sayıda araştırmacı tarafından çeşitli tıbbi alanlarda araştırılmıştır. Kanıtlar, eksozom-aracılı hücreler arası iletişim yoluyla kanserde, Alzheimer hastalığının tanı ve prognozu için nörolojide, omurilik yaralanması, epilepsi veya nörodejeneratif hastalıklarda biyobelirteçler olarak önemli bir rol oynayabileceklerini göstermektedir (Condrat ve ark. 2020). Ayrıca kardiyoloji gibi diğer alanlarda, akut kardiyovasküler hastalık veya kalp yetmezliği ve sepsis tanısı için bulaşıcı hastalıklar söz konusu olduğunda daha hızlı ve daha doğru tanı aracı olarak kullanılabilirler (Zhou ve ark. 2018, Condrat ve ark. 2020).

miRNA'ların insan kanserlerine katılımının ilk kanıtı, Batı dünyasındaki en yaygın insan lösemi türü Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)'de, özellikle kromozom 13q14'teki tümör baskılayıcıları tanımlamak amacıyla yapılan çalışmalardan türetilmiştir. Sitogenetik çalışmalar, KLL'lerin yaklaşık %50'si kromozom 13q14'te delesyonları ve yaklaşık %70'i heterozigotluk kaybını (LOH) göstermektedir. Kromozomal translokasyonlarından ve küçük delesyonlardan yararlanarak, Calin ve ark. 13q14'ün kritik bölgesinin herhangi bir protein kodlayıcı tümör baskılayıcı gen içermediğini, ancak aynı polistronik RNA'da eksprese edilen miR-15a ve miR-16-1 olmak üzere iki miRNA geni içerdiğini bulmuşlardır (Calin ve ark. 2002). Bu sonuç, 13q14 delesyonunun, bu iki miRNA'nın kaybına neden olduğunu göstermiştir. Bu da miRNA'ların insan kanseri patogenezinde rol oynayabileceğine dair ilk kanıttır (Calin ve ark. 2002). Araştırmacılar, bu ilk gözlemlerden hemen sonra, bilinen tüm miRNA genlerini haritalamışlar ve bunların çoğunun, farklı insan tümörlerinde tümör baskılayıcı genlerin veya onkogenlerin olduğu delesyon veya amplifikasyon gibi kromozomal değişikliklere katılan genom bölgelerinde bulunduğunu saptamışlardır. Gerçekten de, kanser gelişiminde, bilinen bir tümör baskılayıcısının negatif regülasyonunda yer alan miRNA'ları kapsayan kromozomal bölgeler amplifiye edilebilir. Bu amplifikasyon, miRNA'nın artan ekspresyonu ve bunun sonucu olarak tümör baskılayıcı genin susturulması ile sonuçlanır. Bunun tersine, onkogenleri inhibe edebilen miRNA'lar genellikle genomun kırılğan bölgelerinde bulunur ve burada hedef

onkogenin aşırı ekspresyonundan sorumlu olabilirler (Şekil 2.8) (Croce ve Calin 2005, Iorio ve Croce 2009).



**Şekil 2.8.** Onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak miRNA'lar (Iorio ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

miRNA'lan insan kanseri patogenezindeki rolünü gösteren çalışmalardan sonra, Iorio ve ark. normal ve hastalıklı dokulardaki miRNA'ların küresel ekspresyonunu değerlendirmek için platformlar geliştirmiş ve insan kanserlerinde miRNA düzensizliğini değerlendirmek için profillemeye çalışmaları yapmışlardır. Bu yaklaşım miRNA profillemesinin; tümör sınıflandırması, tanı ve prognoz için kullanılıp kullanılmayacağını belirleme girişimidir (Calin ve Croce 2006). Ayrıca, küçük boyutlu miRNA'lar mRNA'lara kıyasla kesinlikle daha yüksek bir stabiliteye sahiptir ve sabit dokularda veya diğer biyolojik materyallerde ekspresyonlarının incelenmesi çok daha kolaydır. Böylece yeni, minimal invaziv ve güçlü biyobelirteçler olarak olası

kullanımları desteklenmektedir. Gerçekten de miRNA'ların parafine gömülü dokulardan, kandan (total kan, plazma veya serum) ve dolaşımdaki eksozomlardan nasıl güvenilir bir şekilde ekstrakte edilebildiği ve tespit edilebileceği yakın zamanda tarif edilmiştir (Iorio ve ark. 2011). Ayrıca, farklı neoplazilerden etkilenen bireylerin dolaşımdaki miRNA profillerinin, tümör dokularında gözlenen paterni yansıttığı ve kanıtların dolaşımdaki miRNA'ların özellikle erken teşhis için kolayca saptanabilir tümör biyobelirteçleri olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Iorio ve ark. 2011).

### **2.15. Kanserde miRNA'lar**

Dünya çapında en önemli mortalite nedenlerinden biri olan kanserin erken evrelerinde tespiti, hastanın hayatta kalması için daha iyi bir sonuç sağlasa da, maalesef geç tespit günümüzde önemli bir endişe kaynağı olup, kötü prognoz ve yüksek mortalite oranına yol açmaktadır (Condrat ve ark. 2020). Kişiselleştirilmiş tıp çağında bu sorunun üstesinden gelebilmek için, biyobelirteçler gibi yeni ve daha hassas teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Yıllar boyunca, kanser hastalarının doku, plazma ve serumlarında sağlıklı kişilerin örnekleri ile karşılaştırıldığında, ekspresyon seviyelerinde düzensizlik olan çok sayıda miRNA rapor edilmiştir ve daha birçok çalışma, ilgili miRNA'ları kanserin tanı ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak belirlemiştir (He ve ark. 2015, Condrat ve ark. 2020). miRNA'lar kanserde onkogenleri (tümör baskılayıcı miRNA'lar aracılığıyla elde edilir) ve tümör baskılayıcıları (onkomiR'ler aracılığıyla) kontrol etmektedirler (Schwarzenbach ve ark. 2014). miRNA'ların işlevlerinin inhibisyonu veya indüklenmesi yoluyla deneysel olarak yapılan çalışmalarda, genellikle, onkomiR'ler daha fazla temsil edilme eğiliminde iken tümör baskılayıcı fonksiyonu olan miRNA'lar daha az ifade edilmektedir (Baffa ve ark. 2009, He ve ark. 2015). Bununla birlikte hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik olarak işlev görebilen miRNA'lar; lenfoma, pankreas, melanom, mide ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde ortaya çıkmaktadır (Baffa ve ark. 2009, He ve ark. 2015, Schwarzenbach ve ark. 2014, Condrat ve ark. 2020).

İnsan miRNA'larının anormal ekspresyonunun çeşitli nedenleri vardır. miRNA kodlayan genlerin yaklaşık %50'si genomun kanserle ilişkili bölgelerinden, fragil bölgelerinden, malignitelerde yer değiştiren veya çoğaltılan bölgelerinden



kodlanmaktadır (Calin ve ark. 2004). Diğer bir neden, Drosha ve Dicer gibi miRNA'nın biyosentezinde yer alan enzimlerin fonksiyonundaki varyasyonlardır (Catto ve ark. 2009). Mesane ve yumurtalık kanserlerinde bu enzimlerin seviyelerinde bir azalma bildirilirken, mide ve servikal yassı epitel hücreli neoplazmlarda yüksek seviyelerine rastlanmaktadır. Son olarak, kanserde miRNA ekspresyonlarındaki düzensizliğe, pri-miRNA'nın transkripsiyonel hataları da neden olabilir (Calin ve ark. 2004, Catto ve ark. 2009, Lin ve Gregory 2015, Condrat ve ark. 2020).

### **2.15.1. Meme kanserinde miRNA'lar**

Meme kanseri, kadınları en sık etkileyen neoplazmdır ve dünya çapında önemli bir mortalite nedenidir (Tao ve ark. 2015). ER, PR, HER2 reseptörleri gibi çeşitli hormon reseptörlerinin varlığına ve/veya yokluğuna bağlı olarak, hastalık en agresif olan alt tiplerde sınıflandırılabilir (Dai ve ark. 2015). Son zamanlarda, teşhis sürecini ve tedaviyi geliştirebilecek miRNA biyobelirteçlerini bulmak için çaba sarf edilmiştir. Araştırılan diğer malignitelere olduğu gibi, miRNA'ların meme kanseri hücreleri üzerinde tümörojenik veya baskılayıcı etkileri olabilir (O'Bryan ve ark. 2017). Hangi miRNA'ların meme malignitesine dahil olduğunu ve hangi rolü oynadıklarını bilmek, sadece hastalığın teşhisinde ve hastaların risk gruplarının doğru şekilde sınıflandırılmasında yardımcı olmaz, aynı zamanda yeni terapötik ajanların geliştirilmesine de yardımcı olabilir.

miRNA ekspresyonu için profillenen ilk katı tümörlerden biri 2005 yılında meme kanseri olmuştur. Gerçekten, tümör ve normal dokuları %100 doğrulukla ayırt edebilen 13 miRNA'nın tanımlanması, Iorio ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve meme karsinomunun ilk miRNA imza özelliğini bu araştırmacılar tanımlamıştır (Iorio ve ark. 2005). Farklı seviyelerde eksprese edilen en önemli miRNA'ların bazıları, ilk keşiflerinden bu yana kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve meme kanseri biyolojisinde önemli bir rol ortaya koymuştur. Meme karsinomunda aşırı eksprese edilen miR-21; PTEN, Programmed Cell Death 4 (PDCD4) ve Tropomyosin 1 (TPM1) tümör baskılayıcı genlerini doğrudan hedef alan, hücre sağkalımına ve çoğalmasına aracılık ettiği belirlenen bir miRNA'dır (Yan ve ark. 2008). Gebelikle ilişkili meme kanseri (PABC); ileri klinik evre, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir

(Walter ve ark. 2011). miR-21, yumurtalık kanserinde sirküle veya eksozomlarda serbestçe bulunan dolaşımdaki miRNA olarak da tespit edilmiştir (Yan ve ark. 2008). Ota ve arkadaşları, meme kanseri hastalarının kemik iliğinde artmış miR-21 ekspresyonunu belirlemişler, miR-21 ve hedefi PDCD4 seviyesinin prognostik bir değere sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Ota ve ark. 2011). Ayrıca, açıklanan ilk kanser miRNA'larından biri olan miR-21'in, glioblastom, yumurtalık, akciğer gibi diğer malignitelerde de aşırı eksprese edildiği saptanmıştır. Kolorektal kanserde, pankreas endokrin ve ekzokrin tümöründe, miR-21'in aşırı ekspresyonunun ayrıca kötü sağkalım ve kötü terapötik sonuç ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Schetter ve ark. 2008). Tersine, aşağı regüle edilmiş miRNA'lar, miR-125a ve b, tirozin kinaz reseptörleri HER2 ve HER3'ü hedefler (Volinia ve ark. 2006). Başlangıçta *C. elegans*'da bulunan tümör baskılayıcı bir miRNA olan let-7, akciğer kanseri hücrelerinde RAS, High Mobility Group AT-Hook 2 (HMGA2) ve MYC Proto-Oncogene (MYC)'i hedef alan ve meme kanseri hücrelerinin kendini yenilemesinin ve tümör oluşumunun yeni bir düzenleyicisi olarak tanımlanan bir miRNA'dır (Yu ve ark. 2007). Ayrıca let-7 miRNA ailesinin aşırı ekspresyonu, meme ve akciğer kanseri fare modellerinde tümör gelişimini baskılayabilmektedir (Yu ve ark. 2007).

Meme kanserinde hastalığın derecesi ve evresi, vasküler invazyon, proliferasyon indeksi ve hormon reseptörlerinin ekspresyonu gibi spesifik biyopatolojik özelliklere göre farklı düzeyde eksprese edilen miRNA'lar belirlenebilmektedir (Iorio ve ark. 2005). Iorio ve ark. çalışmalarında, ER(-) meme kanserli hastalar ile karşılaştırıldığında, ER(+)'lerde miR-191 ve miR-26 en belirgin olarak aşırı seviyede eksprese edilmiş ve miR-206 anlamlı düzeyde aşağı modüle edilmiştir. miR-206'nın doğrudan ER $\alpha$ 'yı hedeflediği de başka bir grup tarafından gösterilmiştir (Iorio ve ark. 2005). Foekens ve ark. son yıllarda, ER(+) luminal tip ile önemli ölçüde ilişkili olan ve özellikle meme kanseri agresifliği ile ilgili dört miRNA'yı tanımlayan bir miRNA alt kümesini tanımlamışlardır (Foekens ve ark. 2008). Iorio ve ark. miR-221 ve miR-222'nin, reseptörü doğrudan hedefleyebilen ER $\alpha$  ile olumsuz bir geri bildirim düzenlemesinde yer aldığını göstermişlerdir (Zhao ve ark. 2008, Iorio ve ark. 2011) bu da iki miRNA'nın promotör sekansları üzerindeki duyarlı elementlere doğrudan bağlanarak transkripsiyonu bastırdığını göstermektedir (Zhao ve ark. 2008). Ayrıca

diğer gruplar, miR-221 ve miR-222'nin aşırı ekspresyonunun, tamoksifen ve fulvestran gibi anti-östrojenik tedavilere karşı dirençten sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Zhao ve ark. 2008, Rao ve ark. 2011).

miRNA'ların sadece hücre döngüsü ve çoğalmada yer alan sinyal yollarını düzenleyerek primer tümör büyümesini kontrol etmede değil, aynı zamanda migrasyon, invazyon ve mikroçevre ile etkileşimin modüle edilmesinde de belirleyici rolleri olduğu gösterilmiştir. Daha agresif bir fenotip ve metastatik sürecin başlangıcını teşvik etme ile ilgili mekanizmaların temsilinde metastatik miRNA'lar ortaya çıkmıştır. Bu anlamda meme kanserinde en çok araştırılan miRNA'lardan biri, normal örneklerle karşılaştırıldığında malign dokularda düşük regüle olduğuna inanılan miR-10b'dir (Iorio ve ark. 2005). Bununla birlikte, daha sonraki araştırmalar aslında ilgili miRNA'nın aşırı eksprese edildiğini, ancak bunun sadece metastatik hastalıkta olduğunu kanıtlamıştır (Ma ve ark. 2007). Metastatik olmayan hastalıkta, ilgili miRNA'nın ekspresyonu bilinen bir onkogen olan Ras Homolog Family Member C (RHOC) ekspresyonunu arttırarak hücre invazyonunu ve metastazını indüklemiştir (Ma ve ark. 2007). Ayrıca saptanan miR-10b miktarı, hastalığın ilerlemesi ile pozitif korelasyon göstermiştir (Ma ve ark. 2007). ER(-) meme kanserinde miR-10b ekspresyon seviyeleri yüksek tespit edilmiştir bu da kötü hastalık sonucu ile ilişkilidir (Iorio ve ark. 2005).

Bununla birlikte, miR-10b'nin yüksek ekspresyonu ile miR-126 ve miR-335'in ekspresyon kaybı, meme kanseri metastazının gelişimiyle nedensel olarak bağlantılıdır (Ma ve ark. 2007). Ayrıca miR-10b, EMT geçişini indüklediği bilinen bir transkripsiyon faktörü olan TWIST1'in önemli bir aşağı akış efektörüdür (Ma ve ark. 2007). miR-335 ise, yakın zamanda meme kanseri metastazında silinmiş veya epigenetik olarak susturulmuştur (Png ve ark. 2011). Bir diğeri miR-126'da, embriyogenez ve doğum sonrası neo-anjiyogenez sırasında endotel fonksiyonu için gereklidir (Fish ve ark. 2008) ve Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1 (SPRED1) anjiyogenik sinyalinin hücre içi inhibitörünü hedefleyerek, Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) veya Fibroblast Growth Factor Beta (FGFβ)'ye duyarlılığı düzenler. Ayrıca miR17~92 kümesi, klasik bir anti-anjiyogenik molekül olan TSP1'i aşağı regüle ederek anjiyogenik yanıtı kolaylaştırmakla ilişkilendirilmiştir (Dews

ve ark. 2006). Son zamanlarda yapılan bir araştırma, meme kanseri dahil olmak üzere sayısız malignitede rol oynadığı bilinen miR-196a'nın meme kanserinde prognostik bir biyobelirteç olabilitesi ile ilgilidir (Milevskiy ve ark. 2019). miR-196a'nın malign tümörlerin oluşumunda rol oynayan iki mekanizma olan anjiyogenezi ve apoptozu değiştirdiği bulunmuştur (Milevskiy ve ark. 2019). Ayrıca ilaca dirençli ER(+) meme kanserinde yüksek miR-196a seviyeleri saptanmış ve bu sonucun ise, ilerlemiş ve menopoz sonrası hastalık için geçerli bir prognostik araç gibi görüldüğü belirlenmiştir (Milevskiy ve ark. 2019).

Başka bir hastalık biyobelirteci, özellikle kötü prognozla alakalı üçlü negatif meme kanserinde tespit edilen miR-4417'dir (Wong ve ark. 2019). Kromozom 1p36 üzerinde bulunan miR-4417'nin, TNBC'de, hücrelerin malign aşamaya geçişi ile eşzamanlı olarak düşük regüle olduğu bulunmuş; bunun da, hastalığın işleyişi için kötü prognoz ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Wong ve ark. 2019). Ayrıca, in vitroda aşırı eksprese edildiğinde, miR-4417'nin TNBC hücrelerinin migrasyonu ve tümörjenik rollerini inhibe ettiği ve gelecekteki tedavi ajanlarından biri olma olasılığını arttırdığı gözlenmiştir (Wong ve ark. 2019).

Öte yandan miRNA'lar ve ilaç direnci arasındaki ilişki son zamanlarda kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Gerçekleştirilen bir çalışmada, içinde dosetaksel, paklitaksel, tivantinib ve veliparib olan 34 ilaç ile ilişkili 36 meme kanseri hücre hattında eksprese olan 411 miRNA belirlenmiştir (Uhr ve ark. 2019). miR-187-5p ve miR-106a-3p'nin hem dosetaksel hem de paklitaksele karşı ilaç direncinin göstergesi olduğunu ve miR-556-5p'nin sadece paklitaksele duyarlılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (Uhr ve ark. 2019). let-7d-5p ve miR-18a-5p tivantinib'e, let-7a-5p bortezoneb'e, miR-135a-3p JNJ-707'ye ve miR-185-3p panabinostat'a gibi diğer çeşitli miRNA'lar da, ilaç hassasiyeti ile ilişkilendirilmiştir (Uhr ve ark. 2019). İlaç direnci ile ilgili olarak bulunan diğer miRNA'lar; miR-637 ile tivantinib, miR-182-5p ile valiparib ve miR-629-5p ile tipifarnib'tir (Uhr ve ark. 2019).

Bunlardan başka, tümör mikroçevresinde spesifik miRNA'ların indüklendiği bir başka mekanizma hipoksidir. Özellikle miR-210, olumsuz bir prognostik belirteci temsil eden HIF-1 $\alpha$  ile indüklenir (Camps ve ark. 2008). Iorio ve ark. (2011), özellikle meme

kanseri biyolojisinde miR-205 tutulumu üzerine odaklanmıştır (Iorio ve ark. 2011). Önceki çalışmalar, miR-205'in insan meme kanserinde ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu ve vasküler invazyonun yokluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir, ancak yumurtalık kanseri gibi diğer tümör tiplerinde ise yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Iorio ve ark. 2009). Yakın zamanda miR-205'in, doğrudan HER3 reseptörünü hedefleyerek ve böylece akış aşağı aracı Akt'yi inhibe ederek HER reseptör ailesi ile ilişkili sağkalım yoluna müdahale edebildiği gösterilmiştir (Iorio ve ark. 2009). Ek olarak, diğer çalışmalar miR-205'in, ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörlerini hedefleyen, metastaz sürecinin erken bir aşaması olan EMT'in negatif bir regülatörü olduğunu ve miR-205 ekspresyonunun mezenkimal meme kanseri hücre hatlarında ve üçlü negatif meme kanserinde kaybolduğunu göstermektedir (Wu ve ark. 2009). Ayrıca miR-205, invazyon ve metastaz sürecinde anahtar rol oynayan bir faktör olan VEGF-A'yı da hedef almaktadır (Wu ve ark. 2009). Yapılan bir çalışmada, miR-205'in, üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında düşük eksprese edildiği ve bu sonucun sadece hücre çoğalmasını, hücre döngüsü ilerlemesini ve klonojenik potansiyeli in vitro azaltmakla kalmayıp aynı zamanda in vivo tümör büyümesini de azaltması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Iorio ve ark. 2011).

### **2.15.2. Meme kanserinde bilinen tümör baskılayıcı miRNA'lar**

Tümör baskılayıcı miRNA'lar çeşitli onkogenlerin mRNA'larını hedefler ve bunların düzensizliği karsinogenezde kritiktir (Lee ve ark. 2004). Meme kanserinde en sık karşılaşılan tümör baskılayıcı miRNA'lar Çizelge 2.3'de verilmiştir. Let-7 miRNA ailesi ilk tespit edilen tümör baskılayıcı miRNA'lardandır. Bu miRNA ailesi 12 üye içerir (Yu ve ark. 2007). Çeşitli çalışmalar, let-7 ailesi üyelerinin ekspresyonunun, sağlıklı dokulara kıyasla malign meme hücrelerinde aşağı regüle edildiğini göstermiştir (Yu ve ark. 2007 Cunningham ve ark. 2010). Onkogenler RAS ve HMGA2, let-7'nin doğrudan hedefleri olarak bulunmuştur (Yu ve ark. 2007). Let-7'nin artan ekspresyonu, MKKH'ler tarafından hücre çoğalmasını, mamosfer oluşumunu ve ayrıca in vivo metastazı azaltır (Yu ve ark. 2007). Başka bir çalışma, let-7a'nın C-C Motif Chemokine Receptor 7 (CCR7) geninin UTR bölgesine doğrudan bağlandığını ortaya koymuştur. CCR7 ve ligandı C-C Motif Chemokine Ligand 21 (CCL21)'in

sinyalizasyonunun kanser ilerlemesi ve metastazında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Cunningham ve ark. 2010).

**Çizelge 2.3.** Meme kanserinde başlıca tümör baskılayıcı miRNA'lar, hedefleri ve fonksiyonları

miRNA	Hedef mRNA	Fonksiyon
Let-7	RAS, HMGA2	Çoğalma ve metastazı inhibe etmek
miR-15a/16	HER2	Çoğalmayı inhibe etmek
miR-31	RHOA, ITGA5, RDX	İnvazyon ve metastazı inhibe etmek
miR-34a	BCL-2	Migrasyon, invazyon ve metastazı inhibe etmek
miR-103/107	CDK5	Migrasyonu inhibe etmek
miR-125a/b	BAK1, ERA, HER2, CRAF, RTKN, MUC1, SIKLIN J	Çoğalma ve invazyonu inhibe etmek
miR-200 ailesi	ZEB1, ZEB2	EMT ve metastazı inhibe etmek
miR-205	ZEB, ZEB3, HER3	Çoğalma, EMT ve metastazı inhibe etmek
miR-206	SIKLIN D2	İnvazyon ve anjiyogenezi inhibe etmek
miR-335	SOX4, TNC	İnvazyon ve metastazı inhibe etmek
miR-3	HER2	Çoğalmayı inhibe etmek
miR-519c	HIF-1 $\alpha$	Anjiyogenezi inhibe etmek

Birçok meme kanseri hücre hattında ve meme kanseri hasta örneklerinde, miR-125a ve miR-125b ekspresyon seviyelerinin büyük ölçüde aşağı regülasyon gösterdiği bulunmuştur. miR-125b doğrudan ETS'yi, HER2 ve HER3'ü hedefler ve bir tümör baskılayıcı miRNA olarak işlev görür (Zhang ve ark. 2011). Ayrıca, HER2 reseptörünü aşırı eksprese eden hücrelerde hem miR-125a hem de miR-125b'nin aşağı regüle edildiği gösterilmiştir. miR-125'in SKBR3 hücrelerinde ekspresyonu, daha yavaş hücre büyümesine ve azalmış invaziviteye yol açan HER2 transkriptlerinin baskılanmasına yol açar (Scott ve ark. 2007). Son zamanlarda, tümör oluşumundaki rolleri henüz yeni ortaya çıkan Cyclin J (CCNJ) ve Multiple EGF Like Domains 9 (MEGF9) gibi çeşitli onkogenlerin miR-125b'nin doğrudan hedefleri olduğu bulunmuştur (Feliciano ve ark. 2013).

Meme kanserinde sıklıkla aşağı regüle edilen başka bir tümör baskılayıcı miRNA, EMT ve metastazın negatif regülatörü olduğu düşünülen miR-205'dir (Iorio ve ark. 2005). miR-200 ailesi üyeleri gibi miR-205'de, hücrelerin EMT geçişini önlemek için ZEB1 ve ZEB2'yi hedefler. miR-200 ve miR-205 benzer işlevselliğe sahip olsa da,

ekspresyon seviyeleri normal meme bezi ve MKKH'de farklılık göstermektedir. miR-205 ekspresyonunun yüksek olduğu bulunurken, normal meme bezi kök hücrelerinde ve MKKH'de miR-200 ailesi üyelerinin ekspresyonu azalmıştır (Iorio ve ark. 2005). Bu sonuç, miR-205'in meme kanserinde benzersiz işlevselliğini göstermektedir. miR-335, meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı miRNA olarak işlev görür çünkü ekspresyonu migrasyon, invazyon ve metastazı baskılamıştır (Png ve ark. 2011). Aynı zamanda miR-335'in transkripsiyon faktörü SOX4 ve matris proteini TNC'yi hedeflediği bulunmuştur (Png ve ark. 2011). Hem SOX4 hem de TNC'nin son zamanlarda pankreas ve karaciğer kanserlerinde metastazı arttırdığı da keşfedilmiştir. Ayrıca son zamanlarda miR-31 miRNA'sının meme kanseri metastatik yolunda yer alan RHOA, ITGA5 gibi çoklu genleri hedeflediği ortaya çıkmıştır. miR-31 aşırı eksprese edildiğinde üç hedef genin de ekspresyonu azalır ve hücreler daha az invaziv ve metastatik hale gelir. Aynı zamanda MDA-MB-231 ve SUM-159 hücre hatlarında miR-31'in ektopik ekspresyonu görülmüştür (Augoff ve ark. 2011). miR-519c'nin anti-tümör aktivitesi, anjiyogenezi düzenleme yeteneğine dayanmaktadır. Bir çalışmada miR-519c, VEGF, İnterlökin 8 (IL-8) ve bazik fibroblast büyüme faktörünü (bFGF) aktive ederek anjiyogenezi düzenleyen Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha (HIF-1 $\alpha$ )'yı doğrudan hedeflemiştir. miR-519c'nin ektopik ekspresyonu, çıplak bir fare modelinde HIF-1 $\alpha$ 'yı ve anjiyogenezi azaltmıştır (Cha ve ark. 2010). Ayrıca, miR-519a/b/c ekspresyonu, sağlıklı örneklerle kıyasla yumurtalık, böbrek ve akciğer tümör örneklerinde azalmaktadır (Cha ve ark. 2010).

### **2.15.3. Meme kanserinde bilinen onkogenik miRNA'lar**

miRNA'lar, çeşitli insan kanser türlerinde tümör baskılayıcı mRNA'ları kararsızlaştırarak veya bozarak onkogenezi teşvik eder (Tang ve ark. 2012). Onkogenezi ve/veya metastazı etkileyen miRNA'lar onkogenik miRNA'lar olarak sınıflandırılır. Meme kanserinde bu tür onkogenik potansiyele sahip birçok miRNA tanımlanmıştır. Onkogenik miRNA'lar hücre çoğalmasını, tümör oluşumunu ve/veya metastazını teşvik ederek, anjiyogenezi veya epigenetik değişiklikleri indükleyerek onkogenik potansiyellerini sergilerler (Tang ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2013). Çizelge 2.4, meme kanserinde en yaygın deregülasyona sahip onkogenik miRNA'ların bazılarını özetlemektedir.

**Çizelge 2.4.** Meme kanserinde başlıca onkogenik miRNA'lar, hedefleri ve fonksiyonları

miRNA	Hedef mRNA	Fonksiyon
miR-7	HOXB3	Tümör baskılayıcı genlerin epigenetik modifikasyonu
miR-9	SOX5, E-KADERIN	Metastazi indüklemek
miR-10b	HOX10, ROC1, ZEB1, PIK3CA	Çoğalma, metastaz ve anjiyogenezi teşvik etmek
miR-21	PTEN, PCDC4, TPM1, TIMP3	Çoğalma, tümör büyümesi ve metastazi teşvik etmek
miR-126	IGFBP2, MERK, PITPNC	Anjiyogenezi teşvik etmek
miR-155	TP53INP, SOX1, FOXO, RHO	Çoğalmayı teşvik etmek
miR-1	ROC1	Tümör büyümesini teşvik etmek
miR-196a	XA1	Anjiyogenezi teşvik etmek
miR-196b	HOXD10	Anjiyogenezi teşvik etmek
miR-221/miR-222	P27KIP, p57, TR1, PTEN	Metastazi indüklemek
miR-37	CD44	Metastazi indüklemek
miR-375	RASD1	Tümör baskılayıcı genlerin epigenetik modifikasyonu
miR-520c	CD4	Metastazi indüklemek

miR-10b'nin meme kanseri hücrelerinde yukarı regüle olduğu ve artan hücre migrasyonu ve metastazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2013). miR-10b'nin aşırı ekspresyonu, Homeobox D10 (HOXD10) mRNA'sını deregüle eder, bu da çoğalma ve metastazi arttırdığı bilinen RHOC ekspresyonunun artmasına neden olur (Ma ve ark. 2007). Birkaç çalışma, miR-155'in onkogenik bir miRNA olduğunu ileri sürerek, yukarı regülasyonunun meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ile sonuçlandığını göstermiştir (Zhang ve ark. 2013). miR-155, hem in vitro hem in vivo da, SOX1 protein ekspresyonunu baskılaması yoluyla onkogenik yeteneğini sergiler (Jiang ve ark. 2010). SOX1'in inhibisyonu, pro-tümörigenez ile ters orantılıdır. miR-155 ayrıca meme kanserinde tümör baskılayıcı bir gen olan Forkhead Box O3 Alfa (FOXO3 $\alpha$ ) ekspresyonunu bastırır (Jiang ve ark. 2010). Benzer şekilde miR-21'in meme kanseri hücrelerinde yukarı regüle edildiği ve ayrıca onkogenik miRNA olarak kabul edildiği gösterilmiştir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, miR-21'in TIMP3, PDCD4 ve TPM1 gibi çeşitli tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Qi ve ark. 2009, Qian ve ark. 2009). İlâveten, miR-203'ün meme kanseri hücrelerinde SOX3 ekspresyonunu inhibe ettiği



gösterilmiştir (Ru ve ark. 2011). miR-203'ün inhibisyonu, p53, Bax ve p21 dahil olmak üzere çeşitli tümör baskılayıcı proteinlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (Ru ve ark. 2011). miR-9, miR-221, 222, miR-373 ve miR-520c gibi onkogenik miRNA'ların meme kanserinde metastazı arttırdığı bilinmektedir (Yang ve ark. 2009). miR-520c ve miR-373'ün, CD44 ekspresyonunu hedefleyerek hem in vitro hem de in vivo migrasyon ve invazyonu arttırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark. 2009). miR-221 ve 222, TRPS1'i hedefleyerek metastazı indüklemektedir (Miller ve ark. 2008). miR-9'un, CDH1'i metastazı teşvik etmesi için hedefleyerek, meme kanserinde önemli ölçüde yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Ma ve ark. 2010). Bundan başka bir çalışmada, miR-632'nin HSP40 ailesi üyesi DNAJB6'yı aşağı doğru düzenleyerek meme kanserinde metastazı uyardığını göstermiştir (Mitra ve ark. 2012).

Birkaç onkogenik miRNA'nın da anjiyogenezi düzensizleştirdiği bilinmektedir. miR-126 ekspresyonunun birçok meme kanseri hücresinde yukarı regüle olduğu görülmüştür (Tang ve ark. 2012). Son çalışmalar, miR-126'nın; IGFBP-2, MERTK ve PTPN11'in protein sentezini inhibe ederek anjiyogenezi etkilediğini göstermektedir. miR-10b ve miR-196b'nin ayrıca HOXD10 yoluyla VEGF'yi hedefleyen anjiyogenezi düzenlediği gösterilmiştir (Li ve ark. 2012). Bazı miRNA'ların epigenetik değişiklikleri etkileyerek tümör baskılayıcı genleri inhibe ettiği bilinmektedir. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında miR-7 ve miR-218'in, HOXB3'ü hedefleyerek histon modifikasyonunu ve DNA metilasyonunu etkilediği saptanmıştır. Bu da, RASSF1A ve CLDN6 ekspresyonunun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Li ve ark. 2012).

## **2.16. miRNA'lar ve Kanser Kök Hücreleri**

Yaklaşık on yıl önce, kök benzeri özelliklere sahip küçük bir kanser hücresi alt kümesinin tümör gelişiminde anahtar faktör olabileceği ve çeşitli kanser türlerinde metastaz oluşturabileceği öne sürülmüştür (Magee ve ark. 2012). KKH'leri kemoterapiye direnç geliştirmedeki rolü nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür (Magee ve ark. 2012). Meme kanserinde (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/Lin<sup>-</sup>/<sup>düşük</sup>) veya yüksek ALDH1 ekspresyonu MKKH'lerinin tipik özellikleridir. Son araştırmalar MKKH'lerde spesifik miRNA'ların ekspresyon profilinin normal meme hücrelerine göre farklı olduğunu göstermiştir (Yu ve ark. 2007). miRNA'ların düzensizliği, MKKH'lerin kendini

yenilemesine ve kanser ilerlemesine katkıda bulunabilir (Yu ve ark. 2007).

### **2.17. miRNA'lar ve Meme Kanseri Kök Hücreleri**

Son çalışmalar, meme kanseri gelişiminin esas olarak, hücrelerin bir alt popülasyonu olan MKKH'ler tarafından yönlendirildiğini göstermektedir. Bu hücre alt popülasyonu kendi kendini yenileme, farklılaşma, tümör oluşumu, metastaz ve hatta tedaviye direnç gösterebilir (Das ve ark. 2019). Hücre migrasyonunu, farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol etmek için CD44, CD133 gibi yüzey belirteçlerini ve kemoterapötik ilaçlara karşı hücrel direnci sağlayan ABCG2 gibi ilaç taşıyıcı proteinleri eksprese etme, oksidatif stresi azaltmak için detoksifiye edici enzim ALDH1 aktivitesi gösterme ve terapötik hasarlardan hemen sonra DNA onarım mekanizmasında aktive olma gibi farklı genotipik-fenotipik özellikler gösterirler ve bu özellikler onları kemoradyoterapilere duyarsız kılar (Nakanishi ve ark. 2012, Charafe-Jauffret ve ark. 2013). Ayrıca, MKKH sayısının geleneksel tedavilerle, tedaviden sonra azalmak yerine arttığı ve bunun da meme kanserinin nüksetmesine neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2008). İlâveten, birkaç meme kanseri alt tipinin varlığı, örneğin, ER(+), PR(+), HER2(+) ve üçlü negatif alt tipleri, meme kanserine karşı spesifik bir tedavi planlamayı zorlaştırır. Bu alt tipler arasında üçlü negatif, meme kanserinin en agresif şeklidir ve spesifik reseptörleri hedef alan spesifik hormonal tedavilerin hedeflerinden yoksundur (Das ve ark. 2019). MKKH'ler tüm meme kanseri alt tiplerinde önemli roller oynamaktadır ve bu nedenle meme kanseri riskini ortadan kaldırmak veya en azından tehdidini en aza indirmek için MKKH'leri hedeflemek büyük önem taşımaktadır.

miRNA'lar, KKH'lerin oluşumu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve bu nedenle meme kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinin gelişiminde yer alırlar (Das ve ark. 2020). Örneğin, miRNA fonksiyonunun hem kaybının hem de kazanımının, çeşitli hedef genlerin yukarı regülasyonu veya aşağı regülasyonu ile meme kanseri gelişimini kolaylaştırdığı kaydedilmiştir (Zhang ve ark. 2007, Wang ve ark. 2010). Potansiyel onkogenik ve anti-onkogenik proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler, belirli bir kanserle ilişkili miRNA'ların ekspresyonunun değişmesinden kaynaklanmış olabilir, bu da miRNA'ların meme kanserinde yararlı terapötik hedefler olduğunu düşündürmektedir (Takahashi ve ark. 2015).

miRNA'ların düzensizliği, MKKH'lerin oluşumuna yol açar ve meme kanseri patogeneğinde ve ilerlemesinde hayati bir rol oynayabilir (Vahidian ve ark. 2019, Das ve ark. 2020). Bu nedenle, miRNA'lar ve MKKH'ler arasındaki ilişki, mevcut meme kanseri araştırmalarında yoğun bir şekilde incelenen bir konu haline gelmiştir. miR-21, miR-22, miR-140 ve miR-221/222 gibi miRNA'ların ekspresyonunun MKKH üretimi ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Shimono ve ark. 2015, Takahashi ve ark. 2015). Ayrıca miRNA'ların, MKKH'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşması ile ilişkili sinyal kaskadında önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (Shimono ve ark. 2015, Takahashi ve ark. 2015). Ek olarak miRNA'lar, CD44, CD133 ve hücre içi enzim ALDH1 aktivitesi gibi yüzey markerlerini hedefleyerek MKKH çoğalmasını zayıflatır (Shimono ve ark. 2015). Ayrıca, miRNA'lar MKKH oluşum sürecini kontrol etmek için, kök hücre ile ilişkili KLF4, EZH2 ve BMI1 vb. genleri hedefler (Shimono ve ark. 2015, Das ve ark. 2020). Genel olarak miRNA'lar, hücre davranışlarında yer alan hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek MKKH oluşumunda, çoğalmasında ve farklılaşmasında kritik roller oynarlar. Bu nedenle miRNA'lar, hedeflerinin ekspresyonunu modüle ederek MKKH'lerin kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma ve terapi direncini etkileyebilir.

### **2.17.1. Meme kanseri kök hücrelerinin fenotipik belirteçlerini düzenleyen miRNA'lar**

CD44, CD24, CD133, EpCAM, CD49F, ALDH1 ve ABCG2 gibi belirteçlerin ekspresyonu, MKKH'lerin fenotipik bir özelliğidir; bu nedenle MKKH'lerin tanımlanması ve izolasyonları için kullanılabilirler (Ginestier ve ark. 2007, Collina ve ark. 2015). Bu belirteçler; hücre adezyon, çoğalma, farklılaşma ve sağkalım gibi birçok hücre fonksiyonunda yer alırlar (Ginestier ve ark. 2007). miRNA'lar, MKKH oluşumundaki rolünü daha açık bir şekilde ortaya koyan MKKH belirteçlerinin ekspresyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Pham ve ark. 2011) MKKH'lerin fenotipik belirteçlerini hedefleyen miRNA'lar Çizelge 2.5'de verilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Meme kanseri kök hücrelerinin fenotipik belirteçlerini hedefleyen miRNA'lar

miRNA	Hedef (ler)	Hedef mRNA'lar	Fonksiyon
miR-142-3p	CD44, CD133,ALDH1,BOD1, BRCA2	Bilinmiyor	Kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu inhibe ederek meme mamosfer oluşumunu ve MKKH büyümesini önemli ölçüde azaltır.
miR-10b	ALDH1, SOX9	Doğrudan /fiziksel	ALDH1 ve SOX9'u regüle eder k in vivo MKKH büyümesini engeller.
miR-146a	CD44, ALDH1	Doğrudan /fiziksel	NOTCH sinyal inhibitörü NUMB'u inhibe ederek KLF8 ile indüklenmiş MKKH'leri teşvik eder.
miR-27b	ABCG1, ABCG2	Doğrudan /fiziksel	ABCG2'nin ekspresyonunu ve lokalizasyonunu arttıran ENPP1'i hedefleyerek MKKH'lerin özelliklerini düzenler.
miR-140-5p	VEGF-A, MMP-9	Doğrudan /fiziksel	MMP-9 proteininin aşağı regülasyonu ile birlikte VEGF-A ekspresyonunun baskılanmasıyla MKKH'lerin hücresel canlılığını, koloni oluşumunu ve invazyon yeteneğini azaltır.
miR-373	CD44	Doğrudan /fiziksel	CD44 gen transkriptlerini hedefler ve daha sonra iki önemli EMT indükleyicisini HIF-1 $\alpha$ ve TWIST1'i aktive eder.
miR-221/ 22	E-KADERIN	Dolaylı/korelasyon	EMT'yi indükleyerek MKKH oluşumuna ve tedavi direncine neden olur.
miR-495	JAM-A	Doğrudan /fiziksel	JAM-A'nın aşağı regülasyonu yoluyla MKKH migrasyonunu teşvik eder.
miR-205	ALDH, CD44	Bilinmiyor	Kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu azaltarak MKKH'lerin meme mamosferi oluşumunu engeller.

Örneğin, miR-142-3p, MKKH'lerin kök hücre ve radyoterapiye direnç özelliklerini etkilemektedir (Troschel ve ark. 2018). miR-142-3p'nin MDA-MB-468, HCC1806 ve MCF-7 hücrelerinde, kök hücre belirteçleri CD44, CD133 ve ALDH1'in ekspresyonunu düzenlediği ve meme mamosfer oluşumunu etkilediği bildirilmiştir (Troschel ve ark. 2018). Düşük miR-142-3p ekspresyonu, MKKH'lerde CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, BOD1, OCT4 ve

KLF4'ün aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Bununla birlikte, miR-142-3p'nin aşırı ekspresyonu, CD44, CD133, ALDH1, Biorientation Of Chromosomes In Cell Division 1 (BOD1) ve BRCA2 ekspresyonu ile in vitro mamosfer oluşumu gibi MKKH özelliklerinde önemli bir azalmayla sonuçlanmıştır. Bu nedenle miR-142-3p, MKKH'lere karşı terapötik bir araç olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilir (Troschel ve ark. 2018).

Bir başka miRNA, miR-140, ALDH1'i ve SOX9'u in vivo hedefleyerek MKKH oluşumunda hayati bir rol oynayabilir (Li ve ark. 2014). DCIS, kök hücre benzeri hücreler içeren ve malign transformasyona yol açabilecek en erken meme kanseri formudur. DCIS, kök hücre benzeri hücrelerde miR-140 aşağı regüle edilir, bu da esas olarak SOX9 ve ALDH1 ekspresyonunu azaltarak MKKH oluşumunu inhibe eder (Çizelge 2.5) (Li ve ark. 2014). Mevcut kemoterapiler sadece ER(+) DCIS kök hücre benzeri hücreleri yok edebilir. İlginç bir şekilde, DCIS hücreleri gibi, DCIS ER- bazal benzeri meme kanserinde, miR-140'ın aşırı ekspresyonu, in vivo tümör büyümesini azaltan SOX9 ve ALDH1 ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile sonuçlandığı gözlenmiştir (Li ve ark. 2014). Bu sonuçlar, miR-140'ın DCIS bazal benzeri hücrelere karşı umut verici bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

Aksine miR-146a, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve ALDH(+) ekspresyon seviyelerinde bir artışa neden olarak MKKH özelliklerini ortaya çıkartmaktadır (Çizelge 2.5) (Wang ve ark. 2013). miR-146a'nın meme kanseri kök hücrelerinde NOTCH sinyalizasyonunu hem in vitro hem de in vivo aktive ederek KLF8 kaynaklı KKH özelliklerini teşvik ettiği kaydedilmiştir (Wang ve ark. 2013). miR-146a, invaziv insan meme kanseri hücrelerinde anormal şekilde KLF8 ile birlikte aşırı eksprese edilir (Wang ve ark. 2013). Ek olarak, KLF8'in ektopik ekspresyonunun, miR-146a inhibitörü ile muameleden sonra MCF-10A hücrelerinde kök hücre özelliklerini indüklemek için yeterli olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, miR-146a'nın tek başına aşırı ekspresyonu, MCF-10A hücrelerinde kök hücre özelliklerini indükleyebilmektedir (Wang ve ark. 2013).

miRNA'lar, meme kanserinde kök benzeri hücreler olarak işlev gördüğü bildirilen tümör başlatma kapasitesine sahip hücrelerin bir alt popülasyonu olan yan popülasyon

hücrelerinin (SP fraksiyonu) zenginleştirilmesini düzenlerler (Takahashi ve ark. 2015). Örneğin, miR-27b, ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz ailesi üyesi 1'i (ENPP1) kodlayan geni hedefleyerek SP fraksiyonunun oluşumunu düzenler (Çizelge 2.5) (Takahashi ve ark. 2015). ENPP1, MKKH'lerin ilaç taşıyıcısı ABCG2'nin ekspresyonunu arttırarak ve hücre yüzeyi lokalizasyonunu değiştirerek SP fraksiyonunun oluşturulmasını teşvik eder (Takahashi ve ark. 2015). ENPP1'in sitozolik alanının, ABCG2 ile etkileşimde hayati olduğu bulunmuştur. MKKH'lerde, ENPP1 ekspresyonunun stabilizasyonu için miR-27b'nin aşağı regülasyonu gereklidir. Bununla birlikte, antidiyabetik bir ilaç olan metformin, miR-27b aracılı ENPP1'in baskılanması ve ABCG2 ile etkileşimin inhibisyonu yoluyla SP fraksiyonunun oluşumunu engeller (Takahashi ve ark. 2015). Bu nedenle, MKKH'lerin ilaç direnci büyük bir endişe kaynağı olduğundan, ektopik miR-27b aşırı ekspresyonu yoluyla ABCG2'yi hedeflemek, meme kanserine karşı yeni bir tedavinin tasarımında yararlı olabilir.

Başka bir miRNA, miR-140-5p, potansiyel olarak yeni bir miRNA-hedefleyici antikanser terapisi sağlamaktadır (Çizelge 2.5). MKKH'lerde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A (VEGF-A) ve Matris Metallopeptidaz 9'un (MMP-9) hedeflenmesi, başka bir MKKH markeri olan CD31'in ekspresyonunu inhibe eder, böylece meme kanseri hücrelerinin hem in vivo hem de in vitro invazyon ve anjiyogenezini baskılar (Chen ve ark. 2015). Üçlü negatif meme kanserinden türetilen kök hücrelerde, miR-373 yukarı regüle edilir ve MKKH belirteci CD44'ü hedefler ve daha sonra iki önemli EMT indükleyicisini, HIF1 $\alpha$  ve TWIST1'i etkinleştirir (Çizelge 2.5) (Chen ve ark. 2015). miR-373'ün aşağı regülasyonu, hücre migrasyonunun inhibisyonuna ve MKKH'lerin hem in vivo hem de in vitro invazivliğine neden olmaktadır (Huang ve ark. 2008). miR-373'ün yukarı regülasyonu, meme kanserli hastalarda kötü hastalık sonucu ile ilişkilidir (Chen ve ark. 2015). Bu nedenle miR-373 aktivasyonu, meme kanserine karşı potansiyel bir terapötik hedef olarak hizmet edebilir.

Başka bir miRNA grubu, miR-221/222'nin de üçlü negatif meme kanserinde yukarı regüle edildiği bildirilmektedir (Çizelge 2.5) (Stinson ve ark. 2011). miR-221'in aşırı ekspresyonu, MKKH'lerde EMT'nin epitelyal bir belirteci olan CDH1'in aşağı regülasyonuna yol açmaktadır (Stinson ve ark. 2011). Hücrelerin bütünlüğünü korumak için CDH1 ekspresyonu gereklidir; bununla birlikte, CDH1 ekspresyonunun kaybı

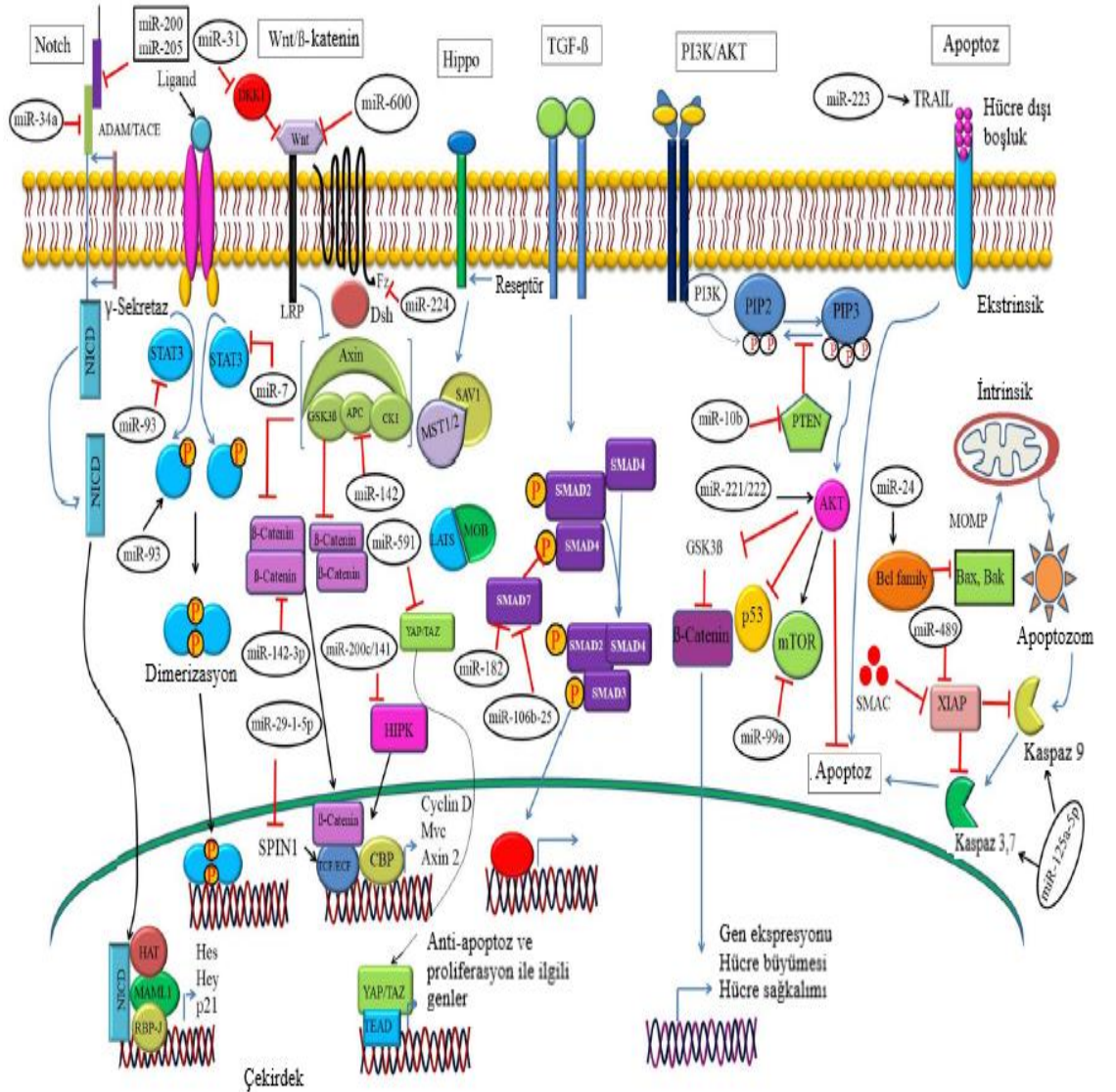
EMT başlangıcını uyarır, bu da MKKH'lerin oluşumu ile ilişkilidir, böylece tedavi direncine neden olmaktadır (Singh ve ark. 2010). Ek olarak, EMT indüksiyonu, özellikle tümör stromal bileşenleri yoluyla meme kanserinde KKH'lerin ortaya çıkmasına kısmen katkıda bulunur (Stinson ve ark. 2011). MCF-10 hücrelerinde miR-221'in aşırı ekspresyonu EMT'yi indükler ve NFκB ve JAK2/sinyal dönüştürücünün aktivasyonu ve transkripsiyon 3 (STAT3) sinyal yollarının aktivatörü yoluyla hücre migrasyonu ve invazyonunu artırır (Singh ve ark. 2010). Buna göre miR-221'in susturulması, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonuna, apoptozun indüklenmesine ve çoğalmanın inhibisyonuna, bununla birlikte CDH1 ekspresyonunun artmasına ve üçlü negatif meme kanseri dokularında SNAİL ve SLUG ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır (Singh ve ark. 2010, Hwang ve ark. 2013).

Tip I transmembran glikoproteini ve hücre adezyon proteini JAM-A, meme epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların korunmasına katılır ve kanser hücresi migrasyonu ile negatif ilişkilidir (Cao ve ark. 2014). miR-495'in MCF-7 ve MDAMB-231 hücre hatlarında yukarı regüle edildiği ve JAM-A'yı hedefleyerek MKKH'lerin hareketliliğini arttırdığı kaydedilmiştir (Cao ve ark. 2014). Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatları, invaziv ve kanser kök benzeri hücreler içerir ve meme kanseri çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılır. miR-495'in aşırı ekspresyonu, daha sonra meme epitel hücreleri arasındaki bağlantıları gevşeterek JAM-A'nın aşağı regülasyonuna ve MKKH'lerin daha fazla migrasyonuna neden olur (Çizelge 2.5) (Cao ve ark. 2014).

Tümüyle, MKKH'lerin fenotipik belirteçlerini spesifik miRNA'lar veya miRNA paneli yoluyla hedeflemek, bu hücre popülasyonunu ortadan kaldırma potansiyeline sahip olabilir ve bu da klinik ortamlarda daha iyi bir sonuç ortaya çıkarabilir. Ancak, MKKH belirteçlerini hedeflemek oldukça zordur; Birincisi, bu belirteçlerin bazıları normal kök hücrelerde ifade edilmektedir ve ikincisi, bir miRNA'nın birkaç farklı gen üzerinde etkili olabileceği göz önüne alındığında, çeşitli yan etkilere yol açabilecek özgüllükten yoksundurlar.

## 2.18. Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Sinyal Yolaklarını Düzenleyen miRNA'lar

Biriken kanıtlar miRNA'ların, MKKH kendi kendini yenileme ve tedaviye direnç ile doğrudan ilişkili olan sinyal yollarındaki hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek MKKH'lerde önemli rol oynadığını göstermektedir (El ve ark. 2017, Zheng ve ark. 2019). MKKH'lerde WNT/ $\beta$ -KATENİN, NOTCH, HEDGEHOG, STAT3 ve AKT/ERK1/2 sinyal yolları miRNA'ların ekspresyonu ile düzenlenir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6).



**Şekil 2.9.** miRNA'ların meme kanseri kök hücre sinyal yollarının düzenlenmesindeki rolü (Das ve ark. 2020'den değiştirilerek alınmıştır)



**Çizelge 2.6.** Meme kanseri kök hücrelerinde sinyal yollarını hedefleyen miRNA'lar

miRNA	Sinyal yolağı	Hedef mRNA'lar ile etkileşim	Fonksiyon
miR-600	Wnt/ $\beta$ -katenin	Doğrudan/fiziksel	Wnt yolunun devamlılığında lipit ile modifiye edilmiş Wnt protei[n]leri üretmek için gerekli olan CD1 enzimini inhibe eder.
miR-29b-1-5p	Wnt/ $\beta$ -katenin	Doğrudan/fiziksel	SPIN1'i hedefleyerek MKKH'lerin mamosfer oluşumunu, göçünü ve invazivliğini engeller.
miR-200c/141	Wnt/ $\beta$ -katenin	Doğrudan/fiziksel	Wnt/HIPK1 sinyal eksenini hedefleyerek MKKH'lerin tümörjenisitesini artırır.
miR-142-3p	Wnt/ $\beta$ -katenin	Bilinmiyor	$\beta$ -katenin ekspresyonunu azaltır.
miR-31	Wnt/ $\beta$ -katenin	Doğrudan/fiziksel	$\beta$ -katenin antagonisti Dkk1'i bastırarak tümörjenez[i] teşvik eder ve daha[sonra] $\beta$ -katenin hedef gen ekspresyonunu artırır.
miR-224	Wnt/ $\beta$ -katenin	Doğrudan/fiziksel	Frizzled 5 reseptör ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile MKKH'lerin çoğalmasını ve göçünü engeller.
miR-12	Wnt/ $\beta$ -katenin	Dolaylı/korelasyon	APC proteini inhibisyonu ile MKKH'lerin çoğalmasını teşvik eder.
miR-34	Notch	Doğrudan/fiziksel	Notch 1 reseptörünün aşağı regülasyonu ile MKKH'lerin NK hücrelerine duyarlılığını artırır, MKKH'lerin paklitaksele karşı duyarlılığını da indükler.
miR-205	Notc	Dolaylı/korelasyon	miR-205'in susturulması EMT'yi uyarır, epitelial hücre polaritesini bozar ve kök hücre çoğalmasını artırır.
miR-200	Notch	Dolaylı/korelasyon	Jagged2 ligandı ile ters ilişkilidir. Jagged2'nin bozulması KKH özelliklerini ve paklitakseli inhibe ederken miR-200 ekspresyonunu yu[şa]rı regüle eder.
miR-9	Notch	Dolaylı/korelasyon	Notch 1 reseptörünün aşırı kspresyonu, MKKH'lerin metastatik davranışını azaltan miR-9 ekspresyonu tarafından bastırılır.
miR-93	STAT3	Doğrudan/fiziksel	STAT3 genini aşağı regüle ederek MET'i indükler.
miR-7	STAT4	Doğrudan/fiziksel	İnvazyon ve metastazı az[altır] ve doğ[ru] dan onkogen SETDB1'i hedefleyerek EMT'yi kısmen tersine[çevirir].
miR-203	STAT5	Dolaylı/korelasyon	pSTAT3'ün yukarı regülasyonu ile MKKH proliferasyonunu teşvik eder.
miR-21	TGF- $\beta$	Doğrudan/fiziksel	MKKH'lerin HIF-1 $\alpha$ [k]spresyonunu ve hücre göçünü ve invazyonunu artırır.
miR 106b-25	TGF- $\beta$	Doğrudan/fiziksel	SMAD7'yi hedefleyerek EMT ve tümör başlatma özelliklerini teşvik eder.

**Çizelge 2.6.** Meme kanseri kök hücrelerinde sinyal yollarını hedefleyen miRNA'lar (devam)

miR-10b	P13K/AKT	Doğrudan / fiziksel	PTEN kontrolünü engelleyerek kendi kendini yenilemeyi teşvik eder.
miR-221/222	P13K/AKT	Doğrudan / fiziksel	PTEN'i inhibe ederek MKKH oluşumunu artırır.
miR-99a	P13K/AKT	Doğrudan / fiziksel	MKKH'lerin agresif fenotipini tersine çevirmek için Akt sinyalleme yolunun aşağı akış faktörünü (rapamisin kinaz) ve aşağı akış aşağı genini (HIF-1 $\alpha$ alt birimi) hedefler.
miR-489	Apoptozis	Dolaylı / korelasyon	MKKH'lerde XIAP aracılı apoptozu indükler ve sonuç olarak MKKH'leri 5-florourasile daha duyarlı hale getirir. Anti-apoptotik protein BimL ekspresyone ederek meme kanseri hücrelerinin stemness özelliğini artırır.
miR-24	Apoptozis	Doğrudan / fiziksel	Nanog, Oct3/4 ve Vimentin dahil olmak üzere kök hücre ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırır.
miR-125a-5p	Apoptozis	Dolaylı / korelasyon	Kaspaz 3 ve 9'u aktive eder, HDACi aracılı apoptoza katılır.
miR-223	Apoptozis	Doğrudan / fiziksel	TRAIL kaynaklı apoptozu teşvik eder. HAX-1 geninin aşağı regülasyonu ile apoptozu indükler, sisplatin ve doksorubisinin etkilerini artırır.

### 2.18.1. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar

Wnt/ $\beta$ -katenin yolu, meme hücresi gelişiminin birçok evresinde düzenleyici bir rol oynar ve MKKH'lerin stabilizasyonunda önemli bir işleve sahiptir (El ve ark. 2017, Lv ve ark. 2017, Zheng ve ark. 2019). Birkaç miRNA, örneğin, miR-600, miR-29b ve miR-200c/141, MKKH'lerin Wnt/ $\beta$ -katenin aracılı kendi kendini yenileme, ilerleme, metastaz ve tedavi direncinde rol oynar (El ve ark. 2017, Liu ve ark. 2018). Bu nedenle miRNA–Wnt/ $\beta$ -katenin ekseni, meme kanserine karşı başarılı bir tedavinin geliştirilmesinde potansiyel bir hedef olmalıdır. Örneğin, miR-600, Wnt/ $\beta$ -katenin ekseni ile etkileşerek MKKH'lerin farklılaşmasını teşvik eder (El ve ark. 2017). miR-600'ün susturulmasının, MKKH gelişimine neden olduğu gözlenirken, aşırı ekspresyonu, hastadan türetilen bir ksenograft modelinde MKKH'lerin kendi kendini yenilemesinin inhibisyonuna yol açmıştır (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). miR-600'ün aşırı ekspresyonu, Wnt proteinlerinin üretilmesi için gerekli bir enzim olan stearoil desaturaz 1'i (SCD1) hedefler, böylece Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini etkisiz hale getirir (El ve ark. 2017). miR-29 ailesinin bir üyesi olan miR-29-1-5p, MDA-MB-231 ve BT-20

hücrelerinden türetilen MKKH'lerin Wnt/ $\beta$ -katenin ve Akt sinyal yollarını etkisiz hale getirerek mamosfer oluşumu, migrasyon ve invazivliği inhibe eder (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Drago-Ferrante ve ark. 2017). Ek olarak miR-29-1-5p, üçlü negatif meme kanseri dokularında ve hücrelerinde aşırı eksprese edilen Spindlin 1 (SPIN1) 'in ekspresyonunu düzenler. SPIN/SSTY gen ailesinin yeni bir üyesi olan SPIN1, Wnt/TCF sinyalini teşvik eder ve MKKH çoğalmasını uyarır. MKKH'lerde yüksek oranda eksprese edilen başka bir miRNA, miR-200c/141 kümesi, Wnt/HIPK1 sinyal eksenini hedefleyerek MKKH'lerin tümör oluşumunu teşvik eder (Şekil 2.9) (Liu ve ark. 2018). Homeodomain Interacting Protein Kinase 1 (HIPK1), Wnt/ $\beta$ -katenin hedef genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesi de dahil olmak üzere DSH'ye bağlı sinyalizasyon aktivitelerine katkıda bulunur (Liu ve ark. 2018). MKKH ilerlemesinin HIPK1'e bağlı inhibisyonunun, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalinin inhibisyonu ile kolaylaştırıldığı bulunmuştur. Ayrıca Wnt/ $\beta$ -katenin, miR-200c/141 kümesinin delesyonu ile aktive edilmiştir. Böylece miR-200c/141'in, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini modüle ederek MKKH büyümesini ve çoğalmasını düzenlediği düşünülmektedir (Liu ve ark. 2018).

Bununla birlikte son zamanlarda, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyallemesini hedefleyerek kendi kendini yenileme ve normal meme fizyolojisi dahil MKKH özelliklerini kontrol eden tümör baskılayıcı miR-34a'nın rolü araştırılmıştır (Bonetti ve ark. 2019). miR-34a'nın MKKH'lerin insülin benzeri büyüme faktörü II (IGFII) mRNA bağlayıcı protein (IMP3) ile indüklenen kök hücre özellikleri ile TNBC hücreleri ve dokularındaki tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Huang ve ark. 2018). Lin ve ark., miR-34a'nın nanoformülasyonunun miR-34a'nın doğrudan ve fonksiyonel bir hedefi olarak işlev gören C22ORF28'i hedefleyerek MKKH'nin in vitro ve in vivo tümör başlatan özelliklerini belirgin şekilde bastırıldığını ve MKKH'leri başarılı bir şekilde uzaklaştırdığını göstermişlerdir (Lin ve ark. 2017). miR-34a'ya bağlı sinyal yollarının yukarı regülasyonunun hedeflenmesi, MKKH'lerin ortadan kaldırılması için ideal bir yaklaşım olabilir (Bonetti ve ark. 2019).

Bir başka çalışmada miRNA let-7'nin, MKKH'lerin kök benzeri özelliklerini düzenleyerek endokrin tedavisinin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, Wnt sinyal yollarını hedefleyerek MKKH'lerin ve tümör oluşumunun büyümesini ve kök hücre benzeri özelliklerini baskılayarak tamoksifenin antikanser potansiyelini

arttırır (Sun ve ark. 2018). Bundan başka miR-155, meme kanseri hasta numuneleri de dahil olmak üzere çoğu insan malignitesinde ve hücre hatlarında sıklıkla düzensiz olan onkogenik bir miRNA'dır. Çeşitli deneysel yaklaşımlar, miR-155'in inhibisyonunun, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca miR-155'in aşağı regülasyonu, ABCG2, CD44 ve CD90 gibi MKKH'lerin belirteçlerini azaltır ve TNBC hücrelerini doksorubisine duyarlı hale getirir (Zuo ve ark. 2018). Hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı etkilere sahip olan miR-205'in, büyük olasılıkla STAT3 sinyal yollarını modüle ederek MKKH özelliklerinin yenilenmesini engellediğinden, SUM159PT'de üçlü negatif meme kanseri kök hücre özelliklerinin korunmasında hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir (Mayoral-Varo ve ark. 2017).

MKKH'lerin katkıda bulunduğu radyoterapiye direnç, meme kanseri tedavisinde önemli bir sorundur. miR-142-3p, MKKH'lerin kök hücre özelliklerini zayıflatır ve Wnt sinyalinin rolünü bastırarak radyoterapiye duyarlılığı arttırır (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) miR- (Troschel ve ark. 2018). 142-3p'nin aşırı ekspresyonu, MKKH'lerde  $\beta$ -katenin ekspresyonunda önemli bir azalmaya neden olmuştur (Troschel ve ark. 2018).  $\beta$ -katenin'in meme kanseri hastalarının sağkalımı ile negatif ilişkili olduğu bilindiğinden, miR-142-3p kullanarak  $\beta$ -katenin hedeflenmesi potansiyel bir terapötik seçenek olabilir. Ayrıca miR-27a'nın, CDC27'yi hedefleyerek üçlü negatif meme kanseri hücrelerini radyasyon tedavisine duyarlı hale getirdiği bilinmektedir (Ren ve ark. 2015). miR-31, MKKH'lerinde yüksek oranda eksprese edilir, Wnt sinyalinin antagonistlerini (örneğin, DKK1) baskılayarak meme kanseri tümörjenezini arttırır (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Lv ve ark. 2017). miR-31 inhibisyonu, bir fare modelinde tümör büyümesinin, koloni oluşumunun, tümör başlatma yeteneklerinin ve MKKH'lerin metastazının inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (Lv ve ark. 2017). Ayrıca, miR-31'in aşırı ekspresyonu  $\beta$ -katenin'in nükleer lokalizasyonunu arttırır, bu da AXİN 2 ekspresyonunu arttırarak, MKKH'lerin kendi kendini yenileme ve çoğalmasını indükler (Lv ve ark. 2017). Bir diğer miRNA, miR-224, kanonik Wnt yolunda Frizzled 5 reseptörünün ekspresyonunu aşağı regüle ederek MKKH benzeri hücrelerin çoğalmasını ve migrasyonunu engeller (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Liu ve ark. 2016). Bununla birlikte miR-224 inhibisyonu, MCF-7 hücrelerinde KKH çoğalmasını ve

migrasyonunu arttırmıştır (Liu ve ark. 2016). miRNA ailesinin bir başka üyesi olan miR-142, kanonik Wnt yolunun aktivasyonu ile MKKH çoğalmasını düzenler (Isobe ve ark. 2014). miR-142, Wnt sinyal yolunu aktive ederek MKKH'ler üzerindeki etkisini göstermiştir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). miR-142 ayrıca APC proteinini hedefleyerek MKKH'lerin çoğalmasında artışa neden olmuştur (Isobe ve ark. 2014). APC, Wnt sinyal yolunu engelleyerek kök hücrelerin kendini yenileme özelliğini inhibe eden bir proteindir. Artmış miR-142 miktarları ayrıca miR-150'nin aşırı ekspresyonuna neden olur ve hem miR-142 hem de miR-150'nin yüksek ekspresyonu aşırı tümör büyümesine neden olur. Bununla birlikte, miR-142'nin susturulması MKKH oluşumunu inhibe eder ve in vivo tümör büyümesini yavaşlatır (Isobe ve ark. 2014). miR-221/222, MDA-MB-231 hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve PTEN sinyallemesini hedefleyerek MKKH'lerin büyümesi ve sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir. miR-221/222'in ekspresyonu ve PTEN inhibisyonu, MKKH zenginleşmesini ve tümör büyümesini arttırmıştır (Li ve ark. 2017). Tüm kanıtlar birlikte ele alındığında, Wnt/ $\beta$ -katenin'in miRNA'lar yoluyla MKKH'lerin kendi kendini yenileme, metastaz ve tedaviye direncini düzenlediği açıktır. Bu nedenle, miRNA'ları hedefleyen stratejiler MKKH'lere karşı potansiyel terapötiklerin geliştirilmesinde yararlı olabilir.

### **2.18.2. Notch sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

Notch sinyali, MKKH'lerde kendi kendini yenileme, onarım ve apoptozun düzenlenmesinde yer alan bir diğer hayati sinyal yoludur (Takebe ve ark. 2011, Lv ve ark. 2017). Bu sinyal yolu meme bezi gelişiminin çeşitli aşamalarında yer alır ve kanser ilerlemesinde rol oynar (Takebe ve ark. 2011). Bu nedenle, Notch sinyalizasyonunun veya bileşenlerinin inhibisyonu, Notch aracılı MKKH'lerin oluşumunu ve meme kanseri metastazını azaltmak için çok önemlidir (Takebe ve ark. 2011). Örneğin, miR-34a tarafından MCF-7 hücrelerinde NOTCH 1 reseptörünün aşağı regülasyonu, meme kanserinin kök hücre özelliğini inhibe eder ve MKKH'leri paklitakसे daha duyarlı hale getirir (Kang ve ark. 2015). Başka bir çalışma, fare meme kanseri hücre hattı 4T1'de miR-34a'nın NOTCH 1 reseptörünün aracılık ettiği aşağı regülasyonunun MKKH'lerin NK hücrelerine duyarlılığını arttırabileceğini bildirmiştir (Zhang ve ark. 2016). Ayrıca miR-34a ve paklitaksel ile tedavi sonrasında mamosfer oluşumu ve kök hücre faktörlerinin azaldığı saptanmıştır (Kang ve ark. 2015). miR-205, EMT'nin kritik

regülatörlerinden biri olan ZEB1/2 ekspresyonunu düzenler, böylece EMT sürecine engel olur ve farklılaşmış hücre durumunu korur (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Meme epitel hücrelerinde miR-205'in susturulması EMT'yi uyarır, epitel hücre polaritesini bozar ve kök hücre çoğalmasını artırır (Chao ve ark. 2014). Bununla birlikte, stroma-kaynaklı faktör olan Jagged1'in (Notch ligandı), miR-205'in ekspresyonunu bastırdığı ve böylece KKH benzeri fenotipi teşvik ettiği kaydedilmiştir. Bu nedenle, miR-205'in ekspresyonu MKKH'lerin kök hücre özellikleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğundan, baskılayıcı Jagged1'i hedeflemenin MKKH'lerin kök hücre özelliklerinin ortadan kaldırılmasında yararlı bir rolü olabilir (Chao ve ark. 2014). Bir başka Notch ligandı olan Jagged2, üçlü negatif meme kanserinde yüksek oranda eksprese edilir ve miR-200 ekspresyonunu yukarı regüle ederek paklitaksele ve kemoterapiye direnci artırır (Li ve ark. 2018). Jagged2'nin bozulması, miR-200 ekspresyonunu düzenlerken, KKH özelliklerinin ve paklitaksel direncinin inhibisyonuna neden olur (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Ancak miR-200 bozulduğunda KKH özellikleri ve paklitaksel direnci yeniden kazanılır (Li ve ark. 2018). Ayrıca Notch sinyalinin aşırı ekspresyonu, üçlü negatif meme kanserinde metastatik davranışları azaltmak için miR-9 indüksiyonu ile baskılanabilir (Mohammadi-Yeganeh ve ark. 2015).

### **2.18.3. Hedgehog sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

Hedgehog sinyal yolağı transkripsiyon faktörü GLI1, birçok dokuda kök hücre belirteçidir ve yukarı regülasyonu, MKKH çoğalması için anahtar rol üstlenmektedir (Cochrane ve ark. 2015). Bunun yanında, KKH'lerde SOX2 ve OCT4 ekspresyonunu yukarı regüle etme kapasitesine sahiptir (Zhou ve ark. 2016). GLI1, MKKH'lerinde Hh ligandlarından bağımsız olarak Nükleer faktör kapp $\beta$ , nuclear factor kapp $\beta$  (NF-K $\beta$ ) ve Forkhead Box C1 (FOXC1) tarafından yukarı regüle edilir (Colavito ve ark. 2014). NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu, çeşitli meme kanseri hücre hatlarında (BT549, HS578T, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-436 ve MCF10A) GLI1 ekspresyonunu azaltır (Colavito ve ark. 2014). Hedgehog sinyal yolağı protein ailesinden SHH'nin KKH'lerin çoğalması üzerindeki etkisinin, GLI'ye bağlı kanonik yolun aktivasyonuna bağlı olduğu ve buna kısmen BMI1'in aracılık ettiği gösterilmiştir. Liu ve arkadaşları, MCF-7 hücrelerinde miR-1471'in MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-metastatik fonksiyonlarını belirlemişler, miR-1471 aracılı SHH ve GLI1'in aşağı regülasyonunun EMT sürecinin

baskılanmasına neden olduğunu saptamışlardır. SHH ve GLI1'in yukarı regülasyonu ise, ters etkileri uygulamıştır.

2019 yılına ait bir çalışmada, meme kanserinde Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 2 (PIEZO2) ekspresyonu, prognozu ve altta yatan mekanizmaları araştırılmıştır. Yapılan analizlerde kontrole kıyasla meme kanserinde PIEZO2 ekspresyonunun azaldığını belirlenmiş ve PIEZO2 ekspresyonunun ER, PR durumu ile pozitif; HER2 durumu, bazal benzeri durum ve üçlü negatif durumu ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ardından PIEZO2 genini hedefleyen 182 miRNA tespit edilmiş ve bu miRNA'lar arasında, beş miRNA (miR-130b-3p, miR-196a-5p, miR-301a-3p, miR421 ve miR-454-3p)'nin PIEZO2'nin hedeflenmesinde en büyük potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Bir sonraki adımda yapılan yolak analizlerinde bu miRNA'ların MKKH ile ilişkili Hedgehog sinyal yolağında zenginleştiği kaydedilmiştir. Tüm bu bulgular, Hedgehog sinyal yolağının aktivasyonu sonucu PIEZO2 ekspresyonu azalmasının, miR-130b-3p, miR-196a-5p, miR-301a-3p, miR421 ve miR-454-3p miRNA'ları aracılığıyla gerçekleştiği ve bunun meme kanserinde prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Lou ve ark. 2019).

Bir başka çalışmada, SHH, SMO ve PATCHED1 genlerinin translasyonel düzenlenmesinin, progenitör hücrelerde Lin28a tarafından düzenlenen let-7 miRNA'sı ile kontrol edildiği belirtilmiştir (Kaur ve ark. 2018). Bundan başka, miR-214'ün Hedgehog sinyal yolağının negatif regülatörü SUFU geninin ekspresyonunu bastırıldığı ve Hedgehog sinyalinin düzenlenmesinde bu miRNA'nın hedef alınabileceği ifade edilmiştir (Alimirah ve ark. 2016).

#### **2.18.4. STAT3 sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

STAT3 sinyalinin aktivasyonu, hücrel büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz ile ilişkilidir (Leeman ve ark. 2006). Bu sinyalizasyonun üçlü negatif meme kanseri dahil olmak üzere birçok malignitede aktif olduğu bulunmuştur (Qin ve ark.2019). İlginç bir şekilde, birkaç miRNA, bu sinyalizasyonda STAT3 ve/veya bileşenlerinin ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.9). Örneğin, miR-93 STAT3'ü hedefleyerek MKKH'lerin büyümesini ve çoğalmasını engeller. Ek olarak miR-93, STAT3'ü aşağı

regüle ederek claudin düşük SUM159 hücrelerinde MET'i indükler, bu da MKKH'lerin azalmasına neden olur (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Başka bir miRNA, miR-7, hücrelerin invazyonunu ve metastazını inhibe ederek ve MKKH popülasyonlarını azaltmıştır (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Zhang ve ark. 2014). Ayrıca, STAT3 sinyal yolunu aşağı regüle ederek EMT'yi kısmen tersine çevirmiştir (Zhang ve ark. 2014). miR-7, MKKH'lerde aşağı regüle edilir ve fonksiyonlarını doğrudan onkogen SETDB1'i hedefleyerek yürütür. SETDB1, STAT3'ün promotör bölgesine bağlanarak MKKH'lerin STAT3 aracılı çoğalmasını indükler (Zhang ve ark. 2019). Böylece, miR-7-SETDB1 aracılı inaktivasyon STAT3 ekspresyonunun azalmasına neden olur ve onkogenik transkripsiyon faktörü c-MYC ve TWIST inaktivasyonu meydana gelir. miR-7'nin aksine, miR-203 meme kanseri dokularında ve ER(+) meme kanseri hücre hattı MCF-7'de yüksek ekspresyon göstermektedir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Muhammad ve ark. 2016). miR-203'ün anti-miR-203 ile aşağı regülasyonunun, fosforile STAT3'ün (pSTAT3) baskılanmasıyla sonuçlandığı ve bunun da in vitro olarak MKKH çoğalmasının inhibisyonuna neden olduğu kaydedilmiştir (Muhammad ve ark. 2016). miRNA'lar STAT3 sinyal yolağını sadece STAT3'ü doğrudan hedefleyerek değil, aynı zamanda IL-6/JAK/STAT3 sinyal eksenini ve bileşenlerini modüle ederek de etkiler. Örneğin, miR-155 ve miR-203, IL-6/JAK/STAT3 sinyalini inhibe etmek için dolaylı olarak JAK'ı hedefler. Hem miR-155 hem de miR-203, SOX baskılayıcısının ekspresyonunu düzenleyerek STAT3 sinyaline yönelik etkilerini gösterir (Zhang ve ark. 2017). Bu nedenle miRNA'lar, özellikle MKKH'leri hedef alan meme kanserine karşı yeni bir terapötik hedef olarak kullanılabilir.

#### **2.18.5. TGF- $\beta$ sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) yolağı, EMT ve MKKH'lerin metastazında önemli rol oynamaktadır (Han ve ark. 2012, Piasecka ve ark. 2018). Sinyalizasyon kaskadı, ligandların TGF- $\beta$  tip II reseptörlerine bağlanmasıyla başlar (Şekil 2.9). TGF- $\beta$  tip II reseptörleri, sırasıyla fosforilat ve SMAD'ı fosforile etmek ve aktive etmek için tip I reseptörlerini toplar (Şekil 2.9). Aktive edilmiş SMAD daha sonra çekirdeğe taşınır ve transkripsiyonel düzenleme için spesifik genlerle bağlanır. Bu nedenle, TGF- $\beta$  sinyalizasyonunun düzensizleşmesi meme kanserinde birçok patolojik değişikliğe yol açabilir (Han ve ark. 2012, Smith ve ark. 2012). Bazı miRNA'lar bu sinyal yolunun



bileşenlerinin ekspresyonunu ve MKKH'lerde aktivitesini düzenler (Han ve ark. 2012, Smith ve ark. 2012). Örneğin, miR-21, MKKH'lerde aşırı eksprese edilir ve sfer oluşturan KKH benzeri hücreler, miR-21'in özellikle EMT'nin düzenlenmesindeki etkisini incelemek için MCF-7 ebeveyn hücrelerinden izole edilmiştir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Açık olarak, TGF- $\beta$  stimülasyonu meme kanseri hücrelerinde miR-21 ekspresyonunu artırır, bu da EMT sürecini desteklemektedir (Han ve ark. 2012). Bu, daha sonra MKKH benzeri bir fenotipi indükler ve HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu artırır. MKKH'lerin EMT'ye maruz kaldıklarında EMT'ye maruz kalmayan kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek miR-21 eksprese ettikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte, MKKH'lerde miR-21'in aşağı regülasyonu MET ile sonuçlanır, HIF1 $\alpha$  ekspresyonu azalır ve böylece hücre migrasyon ve invazyonunun inhibisyonu gerçekleşir (Han ve ark. 2012). Böylece spesifik miRNA'lar, meme kanseri hücrelerinin biyolojisinde önemli roller oynayabilir ve hastalığın ilerlemesini ve tedavi yanıtını düzenleyebilir (Piasecka ve ark. 2018). Benzer şekilde miR-106b-25 kümesi, TGF- $\beta$  sinyalini aktive eden ve dolayısıyla SMAD ailesi üyesi 7 (SMAD7)'yi hedefleyerek EMT ve tümör başlatma özelliklerini destekleyen MKKH'lerinde yukarı regüle edilir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Smith ve ark. 2012).

#### **2.18.6. PI3K/Akt sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT yolu, MKKH'lerin metastazında, hücre sağkalımında ve kendi kendini yenilemesinde rol oynar (Yang ve ark. 2014, Bahena-Ocampo ve ark. 2016, Li ve ark. 2016). Bir tümör baskılayıcı olan PTEN, akış aşağı molekülü PI3K'yi hedefleyerek kanser oluşumunu inhibe eder ve PI3K/Akt yolunun inaktivasyonuna neden olur (Li ve ark. 2016). miR-10b, PTEN ekspresyonunu negatif olarak kontrol eder ve Akt sinyalini artırarak MKKH'lerin kendi kendini yenilemesini destekler (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). miR-10b'nin MCF-7'den türetilen MKKH'lerde yukarı regüle edildiği ve kendi kendini yenileme ve migrasyonu teşvik ettiği kaydedilmiştir (Bahena-Ocampo ve ark. 2016). Başka bir miRNA, miR-221/222, MKKH popülasyonunu ve meme tümörlerinin kanser oluşturma yeteneğini artırabilir (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Li ve ark. 2016). miR-221/222'nin aşırı ekspresyonu, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> MKKH'lerin oranını zenginleştirir ve PTEN/Akt yolunu hedefleyerek mamosfer oluşumu kapasitesini artırır (Li ve ark. 2016). Buna göre, miR-221/222'nin

ekspresyonunun azalması Akt fosforilasyonunun inhibisyonuna ve ardından kanser kök hücre özellikleri ediniminin tersine dönmesine neden olur (Li ve ark. 2016). Benzer şekilde miR-99a, Akt sinyal yolunun aşağı akış faktörlerini (rapamisin kinaz) ve HIF-1 $\alpha$  aşağı akış genini ve de MKKH'lerin ters agresif fenotipini hedefler (Şekil 2.9) (Yang ve ark. 2014). SP fraksiyonundaki miR-99a ekspresyonu (MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilir) meme kanserinde aşağı regüle edilir, bununla birlikte artan miR-99a ekspresyonu, in vitro meme SP hücrelerinin migrasyonunu, invazyon ve sfer oluşumunu inhibe eder ve in vivo tümör büyümesini baskılar (Yang ve ark. 2014).

### **2.18.7. Apoptotik sinyal yolağını düzenleyen miRNA'lar**

miRNA'lar hedef genlerinin translasyonunu inhibe etme veya indüklemeye önemli rol oynadıkları için, apoptozun ana düzenleyicileri olarak hareket edebilirler (Flanagan ve ark. 2015, Roscigno ve ark. 2017, Wang ve ark. 2017). Önemli bir anti-apoptotik protein olan X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP), meme kanseri hücrelerinde apoptozu baskılar (Şekil 2.9). XIAP bu baskılamayı, kaspazlar ve SMAC/DIABLO gibi apoptotik düzenleyici genleri kontrol ederek gerçekleştirir (Flanagan ve ark. 2015). Bununla birlikte miR-489, kaspazların ve SMAC/DIABLO'nun ekspresyonunu kontrol etmek için XIAP'yi hedefler ve inhibe eder (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Flanagan ve ark. 2015). XIAP'ın aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinin 5-florourasil gibi kemoterapötik ilaçlara karşı direncine katkıda bulunur. Bununla birlikte, rekombinant vektör yoluyla miR-489'un ekspresyonu, XIAP'ın T-47D ve SKBR3 meme kanseri hücre hatlarından izole edilen MKKH'lerde 5-florourasil direncini tersine çevirme etkisini ortadan kaldırmıştır (Wang ve ark. 2017). Ayrıca, XIAP'a özgü bir inhibitör olan embelinin, miR-489'a benzer şekilde MKKH'leri 5-florourasile duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (Wang ve ark. 2017). Bu nedenle miR-489, 5-florourasilin terapötik potansiyelini arttırmak için kullanılabilir. Öte yandan miR-24, anti-apoptotik protein BIM1'i eksprese ederek meme kanseri hücrelerinin kök hücre özelliklerini arttırmaktadır (Roscigno ve ark. 2017). miR-24'ün aşırı ekspresyonunun T-47D, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının mamosfer oluşumunu arttırdığı kaydedilmiştir. Ek olarak, miR-24 aşırı eksprese edildiğinde NANOG, OCT3/4 ve VİMENTİN gibi kök hücre ile ilişkili genler yukarı regüle edilir (Roscigno ve ark. 2017). Ayrıca miR-24, MKKH'lerin cisplatine karşı direncini indüklemek için BIML ekspresyonunu düzenler. Açıkça, miR-24'ün yukarı

regülasyonu yoluyla BIM1'nin aşağı regülasyonu MKKH tedavisi direncine neden olmuştur (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Bir başka miRNA, miR-125a-5p'nin de MKKH'lerin apoptozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6) (Hsieh ve ark. 2015). miR-125a-5p aşırı ekspresyonu, kaspaz 3 ve 9 aktivitesinde artışa neden olur ve daha sonra hem R2N1d hem de MDA-MB-231 hücrelerinden türetilen MKKH'lerde apoptozu aktive eder. Hem R2N1d hem de MDA-MB-231 hücre hatları yüksek derecede tümörjeniktir ve kök hücre benzeri hücreler içerir. Bundan başka miR-223'ün üçlü negatif meme kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sun ve ark. 2016). miR-223 ekspresyonu, CD44<sup>+</sup> ve CD24<sup>-</sup> MKKH'lerde, MKKH olmayanlara kıyasla aşağı regüle edilmektedir (Mandujano-Tinoco ve ark. 2017). Ayrıca miR-223'ün aşırı ekspresyonu, MKKH'lerde tümör nekroz faktörüne bağlı apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ile uyarılan apoptoz ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.9) (Çizelge 2.6). Bununla birlikte miR-223'ün, HCLS1 ile ilişkili X-1 protein (HAX-1) geninin aşağı regülasyonu yoluyla apoptozu indüklediği kaydedilmiştir (Sun ve ark. 2016). HAX-1 mitokondride bulunur ve doğrudan MDA-MB-231 hücrelerinde miR-223 tarafından düzenlenen bir anti-apoptotik protein görevi görür. Ayrıca, miR-223 aşırı ekspresyonunun, mitokondri/ROS yolağı yoluyla TRAIL ile indüklenen apoptozu teşvik ettiği ortaya konmuştur (Sun ve ark. 2016). İlaveten miR-223 ekspresyonu, cisplatin ve doksorubisinin üçlü negatif MKKH'lere karşı etkisini artırır (Sun ve ark. 2016). Ayrıca miRNA'ların düzensizliği, çok hücreli tümör sfer oluşumu ile ilişkilidir (Mandujano-Tinoco ve ark. 2017). Örneğin, miR-221-3p ve miR-187-3p'nin ekspresyonlarının düzensizliği, çok hücreli meme kanseri sferoidlerinin oluşumuyla bağlantılı olduğu bilinen hücresel çoğalma, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz ile ilişkilidir. Açıkça, MCF-7 hücrelerinin pre-miR-187-3p ile transfeksiyonu, G1 fazında hücre döngüsü durması ile sonuçlanmış; öte yandan, anti-miR-221-3p transfeksiyonu apoptotik hücrelerde önemli bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, her iki miRNA'nın birlikte transfeksiyonu, canlı hücrelerin azalması ve apoptotik hücrelerin artması ile sonuçlanmıştır (Mandujano-Tinoco ve ark. 2017). miRNA'ların MKKH'lerde apoptoz ile ilişkisi göz önüne alındığında, miRNA'lar MKKH'lerin apoptozunu indüklemek için terapötik bir araç olarak kullanılabilir.

## 2.19. Biyobelirteç Olarak miRNA'ların Potansiyeli

Biyobelirteç, farklı türlerde sağlığın veya hastalığın nesnel göstergelerini tanımlayan bir terimdir. Tarih boyunca ve teknolojik gelişmeler ile bu göstergeler giderek daha hassas ve güvenilir hale gelmiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda, yeni ve geliştirilmiş protein biyobelirteçlerinin saptanması, klinik olarak önemli proteinlerin düşük miktarı, yapılarının karmaşıklığı ve doğru tespit yöntemleri belirleme mücadelesi nedeniyle zaman alıcı ve pahalı bir işlem haline gelmiştir.

Kişiselleştirilmiş tıbbın hedeflerine ulaşmak için yeni ve daha doğru biyobelirteçlerin keşfedilmesi gerekir ki ideal bir biyobelirteç belirli kriterlere uymalıdır. Her şeyden önce, kolayca erişilebilir olması gerekir, bu da minimal invaziv prosedürlerle keşfedilmesi ve ölçülmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Bir başka önemli kriter, incelenen patolojiye özgüllüktür, ardından duyarlılık gelir (varlığı, tercihen klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce tespit edilmeli ve hastalığın ilerlemesine veya tedaviye yanıtı göre değişmelidir). Son ve aynı derecede önemli olarak, araştırmadan sonra kliniğe uyarlanabilir olmalıdır (Taylor 2019).

miRNA'lar ilk kez 2008 yılında Lawrie ve ark. tarafından hastaların serum örneklerinde yaygın bulunan büyük B hücreli lenfomaların incelenmesi için kullanılmıştır ve o zamandan beri biyobelirteç olarak potansiyel kullanımları literatürde sayısız hastalık için belirtilmiştir (Lawrie ve ark. 2008). miRNA'lar çeşitli hastalıklarda biyobelirteçler için ideal adaylara dönüşebilecek bir dizi avantaja sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi, ideal biyobelirteç kolayca erişilebilir olmalıdır, bu durum kan, idrar ve diğer vücut sıvılarından sıvı biyopsiler yoluyla kolayca ekstrakte edilebilen miRNA'lar için de geçerlidir. Aynı zamanda doku veya hücre kökeni için yüksek bir özgüllüğe sahiptir ve çeşitli çalışmalarda kanser evrelerinin farklılaşması ve hatta tedaviye yanıtın ölçülmesi için kullanılmaktadır (Lan ve ark. 2015). Dahası, nükleik asitlerin tespiti için teknolojiler zaten mevcuttur ve yeni deneylerin geliştirilmesi, protein biyobelirteçleri için yeni antikolar üretmeye kıyasla daha az zaman ve daha düşük maliyet gerektirir.

miRNA'ların bir başka avantajı; doğru tanı, tedavi ve de tedaviye yanıt verme yeteneğini değerlendirmek için çok belirteçli modeller olarak kullanılma potansiyellerinin olmasıdır. Birçok protein belirteci çalıştırmak hem pahalı hem de

zaman alıcı olabilirken, çok sayıda miRNA'dan oluşan çok belirteçli panellerin kullanılması hastalık ilerlemesinin tanısı ve tahmini için invazif olmayan bir yöntem sağlayabilir. Bu, özellikle çok belirteçli bir yaklaşımın tercih edileceği, tamamen heterojen bir hastalık olan kanserde önemlidir. Bu kapsamda, meme karsinomu için spesifik miRNA'lardan oluşan panellerin meme kanseri tanı, tedavi ve prognozunun güvenilirliğini önemli ölçüde arttırdığı, ayrıca miRNA ekspresyon profillerindeki değişimlerden meme kanserinin de içinde bulunduğu birçok kanser türünün tedavisinin takibinde biyobelirteç olarak yararlanılabileceği gösterilmiştir (Xiong ve ark. 2017). Bununla birlikte, miRNA'ların biyobelirteç olarak araştırılması hala ilk aşamalarındadır, bu nedenle şu anda bulgular genellikle tekrarlanabilirlikten yoksundur. Aynı tümörleri analiz eden farklı çalışmalar arasında bildirilen çeşitli uyumsuzluklar vardır (Zhang ve ark. 2012).

En önemli sorunlardan biri olarak da, çeşitli hücrel sinyal yolları ile bağlantılı gen ekspresyonlarının meme kanseri ve MKKH'de farklılık göstermesidir. Özellikle KKH ile ilişkili hücrel sinyal yollarında yer alan genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde miRNA'ların önemli rol oynadıkları açıktır. Bilindiği üzere, miRNA'lar hedef mRNA'larına farklı seviyelerde ve süreçlerde etki ederek işlev göstermektedirler. Ancak, miRNA'ların etkinlikleri, ilgili genlerin ekspresyonlarını nasıl ve ne şekilde düzenledikleri henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Bu nedenle meme kanserinde KKH sinyal iletim yollarını doğrudan ve/veya dolaylı olarak etkileyen miRNA'ların araştırılması gerekmektedir. Bu sorunu çözmek için bugüne kadar yapılan araştırmalardan ve elde edilen bulgulardan yola çıkarak mevcut tez çalışmasında, farklı moleküler alt tiplere ait meme kanserli hastaların normal ve tümörlü taze doku örneklerinde, meme kanserlerinde etkileri bilinmeyen ve kanser kök hücre ile ilişkili hücrel sinyal yollarında doğrudan ya da dolaylı şekilde görev alan 15 miRNA'nın (let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381 ve miR-935) ekspresyon seviyesindeki olası farklılıklar incelenecek ve ilgili miRNA'ların meme kanseri ve KKH sinyal yollarındaki rolleri aydınlatılmaya çalışılacaktır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Hasta Grubu**

Çalışmaya, Bursa Uludağ Üniversitesi (BUÜ) Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran meme kanseri tanısı almış 50 hastanın cerrahi girişim sırasında çıkarılan işlem görmemiş, taze meme tümör dokusu ve tümör dokulardan elde edilecek veriler ile karşılaştırma yapabilmek için aynı hastaların operasyon sırasında çıkarılan normal meme dokularından 20'si dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların normal ve tümör doku materyallerinin teminine; BUÜ, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2019-21/20 no'lu kararı ile uygun bulunduktan sonra başlandı. Klinik araştırmalar ile ilgili açıklamaları içeren Etik Kurul onaylı gönüllü olur formu ile tüm bireyler bilgilendirildi ve bireylerin onayları alındıktan sonra örnekleri projeye dahil edildi. Elde edilen tüm materyaller -80°C'deki derin dondurucuda biriktirildi. Hastaların demografik ve klinikopatolojik özelliklerine ilişkin bilgiler BUÜ Tıp Fak. Genel Cerrahi ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edildi. Tümörlere ait histolojik ve patolojik özellikler değerlendirildi ve tümörlerin histolojik alt tipleri belirlendi. Planlanan tez ile ilgili olarak oluşturulan doktora destek projesi, BUÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı'nca DDP(F)-2020/5 sayılı proje ile desteklendi.

Araştırmada, meme kanserli hastalara ait normal ve tümörlü taze doku örneklerinde kanser kök hücre ile ilişkili sinyal yolaklarında doğrudan ve/veya dolaylı olarak etkili olan 15 miRNA'nın (let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381 ve miR-935) ekspresyon analizleri gerçekleştirildi.

#### **3.2. Gereçler**

##### **3.2.1. Kullanılan aletler**

- ABI SimpliAmp ThermalCycler PCR, Applied Biosystems, ABD.
- MagNA Lyser homojenizatör, Roche, İsviçre.
- LightCycler® 480 II Real Time PCR, Roche, İsviçre.
- Soğutmalı santrifüj (Mikro 200R), Hettich, Almanya.

- Plate santrifüj (Allegra X-15R), Beckman Coulter, Almanya.
- Su banyosu (NB 20), Nüve, İstanbul, Türkiye.
- Yatay Elektroforez Sistemi, Consort, Belçika.
- DNA/RNA UV kabini (Sınıf II), ESCO, Singapur.
- + 4°C Buzdolabı, Arçelik, İstanbul, Türkiye.
- -20°C Buzdolabı, Arçelik, İstanbul, Türkiye.
- -80°C Buzdolabı, Thermo Scientific, ABD.
- Nanodrop (Nanodrop 8000), Thermo Scientific, ABD.
- Isıtıcı blok, Thermo Scientific, ABD.
- Pipet seti (0,5 - 10, 10-100, 100-1000 µl), Axygen Scientific, ABD.
- Karıştırıcı (Vortex), VWR, ABD.
- 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpü, ISOLAB GmbH, Almanya.
- Nitril eldiven, Beybi, İstanbul, Türkiye.
- MAGNA Lyser Green Beads, Roche, İsviçre.
- Filtreli pipet uçları (10,100,1000 µl), ISOLAB GmbH, Almanya.

### 3.2.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

- TriPure Isolation Reagent, Roche, İsviçre.
- Kloroform, Merck, Almanya.
- Izopropanol, Merck, Almanya.
- Etanol, Merck, Almanya.
- UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, ABD.
- miRCURY LNA Universal RT cDNA Synthesis Kit, Qiagen, Almanya.
- miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Almanya.
- microRNA LNA primers, Qiagen, Almanya.
- 0,2 mL PCR tüpü, Thermo Scientific, ABD.
- 480 Multiwell Plate 96 (White), Roche, İsviçre.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Doku örneklerinden RNA izolasyonu

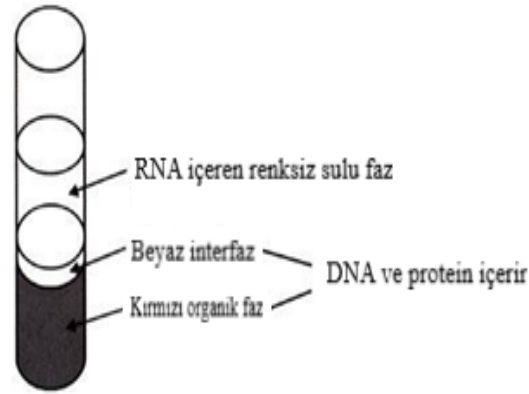
Total RNA izolasyonu, "TriPure Isolation Reagent (Roche)" kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

- 2 ml tüplere alınan doku örneklerinin üzerine, 1 ml tripure solüsyonu eklendi ve tüpler 45 saniye vorteksledi. Ardından dokular magna lyser yardımı ile seramik bead'ler kullanılarak homojenize edildi. Tripure; pembe renkli bir solüsyon olup içeriğindeki fenol ve guanidin tiyosiyanat bileşenleri ile birçok numuneden yüksek kalitede total RNA elde edilmesini sağlar. Ekstraksiyon (Liziz) işlemi sırasında TriPure izolasyon reaktifi, hücreleri parçalar ve nükleazları denatüre eder, böylece numunedeki RNA ve DNA'nın bütünlüğünü korur.
- Böylece tüpteki hücreler homojen bir görünüm alarak parçalandı ve tripure solüsyonu etkisiyle de pembe bir renk görünümünü aldı.
- Ardından vortekslenen tüpler buza alındı ve 2 dakika bekletildi. Vortekste o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvuruldu.
- 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Tüplere 200 µl kloroform eklendi ve 5 dakika beklendi. Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir.
- 12.000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüj sonunda 3 faz oluştu:

1. Faz (Sulu faz): RNA içerir (Renksizdir).
2. Faz: DNA içerir (Beyaz renklidir).
3. Faz (Organik faz): Protein içerir (Kırmızı renktedir) (Şekil 3.1).





**Şekil 3.1.** RNA izolasyonu şematik gösterimi (TriPure Isolation Reagent (Versiyon 08) 2018 protokolünden değiştirilerek alınmıştır)

- RNA izolasyonu için renksiz olan 1. faz yeni tüpe aktarıldı.
- Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklendi. Ardından oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İzopropanol RNA'yı, DNA ve diğer moleküllerden arındırmak için kullanıldı.
- 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Oluşan pellet üzerine 1 ml %75'lik Etil alkol (EtOH) eklendi.
- 7.500 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda süpernatant atıldı.
- 57°C'de EtOH uçuruldu.
- Kalan çökelege 50-100 µl RNAz içermeyen su eklenerek pipetaj yapıldı.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi.

### 3.3.2. Elde edilen RNA'ların miktar ve kalite tayini

Çalışmada izole edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirildi. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları, Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edildi. İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın  $A_{260}/A_{280}$  absorban oranının 1,8-2,0 olması beklenir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle (Consort, Belçika) gerçekleştirilebilir.

### 3.3.3. RNA'lardan cDNA sentezi

cDNA sentezi "Universal cDNA synthesis kit (Exiqon)" kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Her örnek için 5 ng/ $\mu$ l RNA stokları hazırlandı ve cDNA'da bu stoklar kullanıldı. 0,2 ml'lik PCR tüplerine, kit içerisindeki malzemeler aşağıdaki çizelgede belirtilen oranlarda kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

Bileşenler	Tek reaksiyon için gerekli hacim (20 $\mu$ l)
RNA örneği (5ng/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
Nükleaz içermeyen su	9 $\mu$ l
5x Reaksiyon Karışımı	4 $\mu$ l
Kontrol karışımı	1 $\mu$ l
Enzim karışımı	2 $\mu$ l
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Hazırlanan 02, ml'lik PCR tüpleri, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek aşağıdaki hazırlanmış programa uygun şekilde cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** cDNA sentezi için PCR koşulları

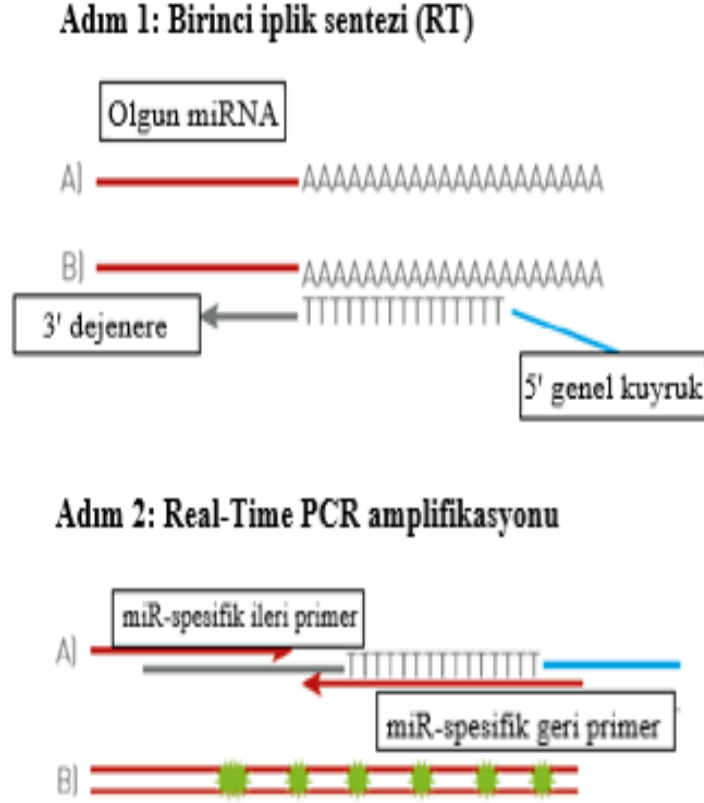
Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
cDNA sentezi	42°C	60 dakika	1
	95°C	5 dakika	
	4°C	Bekleme	

cDNA sentez işlemi bittikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

### 3.3.4. Real-time PCR (RT-qPCR) ile miRNA ekspresyon analizleri

Çalışmada, miRNA'ya özgül LNA temelli, Exiqon firmasına ait "miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA system" kiti kullanıldı. Bu kit ile, total RNA'dan tek sarmal cDNA sentezlemek, sentezlenen cDNA'yı kalıp olarak kullanıp, özel LNA primerler ve

SYBR green boya eşliğinde seçilen miRNA'ların gerçek zamanlı (Real-Time) kantitatif/nicel PCR analizini gerçekleştirmek mümkündür (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** RT-qPCR analizi şematik gösterimi (miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA system 2017 protokolünden değiştirilerek alınmıştır)

Elde edilen cDNA'lar öncelikle 80x seyreltildi (5 µl cDNA+395 µl su). Housekeeping gen ve cDNA'lar, kontrol primerleri ile gözden geçirildi. Çalışmada housekeeping gen olarak SNORD48 ve U6 kullanıldı. SNORD48 ve U6 primerlerini içeren karışım aşağıdaki şekilde kullanıldı ve yine aşağıda belirtilen protokolle Real-Time qPCR'da yürütüldü. Tüm çalışmalar buz üzerinde ve RNaz'lardan arındırılmış malzeme ile gerçekleştirildi.

cDNA'ların Small Nucleolar RNA C/D Box 48 (SNORD48), RNA U6 Small Nuclear (U6) ve kontrol sonuçları Ct değerleri açısından değerlendirildiğinde, Ct değerleri 15-29 arasında olanlar, aşağıda belirtilen miRNA'lar için miRNA LNA<sup>TM</sup> primer setleri (Exiqon), (miRNA primerler; let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-

34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381 ve miR-935) kullanılarak ve aşağıdaki karışım ve cihaz protokolleri ile çalışıldı (izelge 3.3). Ekspresyon analizleri gerçekleştirilen 15 miRNA'ya ait özellikler izelge 3.4'de verildi.

**Çizelge 3.3.** RT-qPCR için reaksiyon karışımı

<b>Bileşenler</b>	<b>Tek reaksiyon için gerekli hacim (10 µl)</b>
cDNA	4 µl
Primer karışımları	1 µl
Enzim ve dNTP karışımı (PCR Tampon karışımı)	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µl</b>

miRNA primerleri için, liyofilize primer tüplerine 220 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra vorteks ve spin edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Primerler 10 µl reaksiyon hacminde olup 200 reaksiyonluktur.

- Reaksiyon tüpüne, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklendi ve reaksiyon sayısı kadar konup, reaksiyon karışımı hazırlandı.
- Karışım spin ettirildi ve plate'lere her bir reaksiyon için 6 µl reaksiyon karışımından transfer edildi.
- 4 µl cDNA örnek veya kontrol her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ilave edildi.
- Hazırlanan plateler (karışım ilave edildikten sonra) 2000 rpm'de 15 saniye santrifüjlendi. Ardından aşağıda belirtilen cihaz protokolüne uygun olarak LightCycler® 480 II Real Time PCR (Roche, İsviçre) cihazı ile çalışma gerçekleştirildi (izelge 3.5).

**Çizelge 3.4.** Ekspresyon analizleri gerçekleştirilen 15 miRNA'ya ait özellikler

No	ID	Sekans dizisi	Accession numarası	Referans
1	hsa-miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	MIMAT0000255	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000268">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000268</a>
2	hsa-miR-142	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	MIMAT0000433	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000458">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000458</a>
3	hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	MIMAT0000064	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000064">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000064</a>
4	hsa-miR-125b	UCCCUGAGACCCUAAUCUUGUGA	MIMAT0000423	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000446">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000446</a>
5	hsa-miR-200c	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUGG	MIMAT0004657	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000650">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000650</a>
6	hsa-miR-340	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	MIMAT0004692	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000802">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000802</a>
7	hsa-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	MIMAT0000089	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000089">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000089</a>
8	hsa-miR-27a	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	MIMAT0004501	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000085">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000085</a>
9	hsa-miR-135a-5p	UAUGGCUUUUAUCCUAUGUGA	MIMAT0000428	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?acc=MIMAT0000428">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?acc=MIMAT0000428</a>
10	hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUACA	MIMAT0000417	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000438">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000438</a>
11	hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	MIMAT0004978	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0005757">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0005757</a>
12	hsa-miR-150-3p	CUGGUACAGGCCUGGGGACAG	MIMAT0004610	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000479">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000479</a>
13	hsa-miR-374a	UUAUAAUACAACCUGAUAAAGUG	MIMAT0000727	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000782">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000782</a>
14	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	MIMAT0000070	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000071">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000071</a>
15	hsa-miR-381	AGCGAGGUUGCCCUUGUAUUAU	MIMAT0022862	<a href="http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000789">http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000789</a>

**Çizelge 3.5.** RT-qPCR koşulları

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon		Erime Eğrisi Analizi			Soğutma
<b>Parametre</b>							
<b>Analiz Modu</b>	Yok	Kuantifikasyon modu		Erime eğrisi modu			Yok
<b>Döngü Sayısı</b>	1	45		1			1
<b>Hedef Sıcaklık [°C]</b>	95	95	60	95	60	95	40
<b>Süre</b>	00:10:00	00:00:10	00:01:00	00:00:10	00:00:10	00:00:00	00:00:30
<b>Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]</b>	4,4	4,4	1,6	4,4	1,6	0,2	4,4
<b>Okuma Modu</b>	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Sürekli	Yok

### 3.3.5. RT-qPCR tabanlı miRNA ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlarda relatif kantitasyon yapılabilmek için  $\Delta\Delta C_t$  metodu kullanıldı. Bu metod ile miRNA  $C_t$  değerleri SNORD48 ve U6 housekeeping genleri ile normalize edildi (Bu değer  $\Delta C_t$  olarak ifade edilir). Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldıktan sonra elde edilen sonuçlar  $\Delta\Delta C_t$ 'yi vermektedir. Orijinal Ekspresyon Seviyesi (L) her bir miRNA için aşağıdaki gibi belirtilmiştir.

Şu şekildedir;

$$L = 2^{-C_t} \quad (3.1)$$

Normalizasyon için hedef miRNA'nın housekeeping miRNA'ya oranlanması gerekmektedir. Bu da,

$$\frac{2^{-C_t(\text{GOI})}}{2^{-C_t(\text{HKG})}} = 2^{-[C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})]} = 2^{-\Delta C_t} \quad (3.2)$$

şeklinde betimlenir. İki farklı koşuldaki aynı miRNA'nın oranı ise,

$$\frac{2^{-\Delta C_t \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t \text{ kontrol}}} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.3)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{örnek}) - \Delta C_t (\text{kontrol}) \quad (3.4)$$

Buradan da son hesaplanacak olan oran şu şekilde ortaya çıkar,

$$\frac{\frac{2^{-\Delta C_t(\text{GOI}) \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t(\text{HKG}) \text{ örnek}}}}{\frac{2^{-\Delta C_t(\text{GOI}) \text{ kontrol}}}{2^{-\Delta C_t(\text{HKG}) \text{ kontrol}}}} = \frac{2^{-[C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})] \text{ örnek}}}{2^{-[C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})] \text{ kontrol}}} = \frac{2^{-\Delta C_t \text{ örnek}}}{2^{-\Delta C_t \text{ kontrol}}} = 2^{-\Delta \Delta C_t} \quad (3.5)$$

Buradan çıkan sonuç, iki farklı koşulda bulunan miRNA'nın ne kadar değişim gösterdiğidir.

### 3.3.6. İstatistiksel analiz

Çalışmada, nominal ve ordinal veriler frekans analiziyle, ölçüm ve ekspresyon düzeyleri ise ortalama ve standart sapma değerleri ile tanımlandı. Nominal ve ordinal veriler arasındaki fark analizlerinde Ki-Kare Benzerlik oranı ve Ki-Kare testleri kullanıldı. Ekspresyon düzeylerinin ve ölçüm parametrelerinin fark analizlerinden önce, normal dağılıma uygunluk için Kolmogorov Smirnov testi yapıldı. Normal dağılıma uyan ekspresyon düzeyi parametrelerinin ikili grup farklarında Bağımsız Örneklem T-Testi ile Tukey testi, normal dağılıma uymayan parametrelerin ikili grup farkları için ise Mann Whitney U testi uygulandı. Ekspresyon düzeylerinin hasta-kontrol kıyaslamalarında, kontrol grubunun referans olması nedeniyle, hedef/referans (Target/Reference) değerleri, hasta gruplarının kendi aralarında ikili kıyaslamalarında ise fold change (değişim, delta CT) değerleri kullanıldı. İlişkisel tarama analizlerinde Spearman's rho korelasyon analizi yapıldı. Anlamlı çıkan parametrelerin ileri analizlerinde binary logistic regresyon analizi ve tanısal değer ölçümünde ROC analizi uygulandı. Tüm analizler %95 güven aralığı alt sınırında, 0,05 anlamlılık düzeyinde ve SPSS 17.0 for windows programında gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya; HER2(+), TNBC, luminal A ve luminal B olmak üzere meme tümörlerinin farklı alt gruplarına ait toplamda 50 meme kanserli hastanın cerrahi operasyon sırasında çıkarılan taze meme tümör dokuları ve bu hastaların 20'sinin sağlıklı dokuları dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 50 meme kanserli vakanın yaşları 26 ile 76 arasında değişmekte olup, ortalama yaş  $55,46 \pm 12,31$ 'dir. Hastalara ait takip süresi 1 yıl ile 10 yıl arasında değişmektedir. Ortalama takip süresi ise ~5 yıldır.

### 4.1. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Özellikler

Değerlendirilen hastalara ait demografik ve klinikopatolojik özellikler Çizelge 4.1'de verildi.

**Çizelge 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarına göre bazı demografik ve klinikopatolojik bulguların dağılımı

Değişken	Hasta (n=50)		Kontrol (n=20)		p
	n	%	n	%	
<b>Tümör alt tipi</b>					
HER2(+)	7	14	5	25	0,379 <sup>a</sup>
TNBC	7	14	5	25	
Luminal A	20	40	5	25	
Luminal B	16	32	5	25	
<b>Cinsiyet</b>					
Kadın	48	96	18	90	0,352 <sup>a</sup>
Erkek	2	4	2	10	
<b>BRCA</b>					
Yok	36	90	14	82,4	0,434 <sup>a</sup>
Var	4	10	3	17,6	
<b>EGFR</b>					
Negatif	32	78	11	64,7	0,299 <sup>a</sup>
Pozitif	9	22	6	35,3	
<b>P53</b>					
Negatif	35	70	14	70	>0,05
Pozitif	15	30	6	30	
<b>P63</b>					
Negatif	21	44,7	9	50	0,700 <sup>b</sup>
Pozitif	26	55,3	9	50	
<b>Kalponin</b>					
Negatif	24	51,1	11	61,1	0,467 <sup>b</sup>
Pozitif	23	48,9	7	38,9	
<b>E-Kaderin</b>					
Negatif	1	2	1	5	0,517 <sup>a</sup>
Pozitif	49	98	19	95	



**Çizelge 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarına göre bazı demografik ve klinikopatolojik bulguların dağılımı (devam)

<b>CK 5/6</b>					
Negatif	22	50	10	55,6	0,691 <sup>b</sup>
Pozitif	22	50	8	44,4	
<b>CD 10</b>					
Negatif	2	50	-	-	0,148 <sup>a</sup>
Pozitif	2	50	2	100	
<b>PanCK</b>					
Negatif	3	21,4	1	16,7	0,805 <sup>a</sup>
Pozitif	11	78,6	5	83,3	
<b>Neoadjuvant Tedavi</b>					
KT Almış	17	34	7	35	
KT, RT Almamış	6	12	3	15	0,803 <sup>a</sup>
KT, RT, Herceptin	2	4	0		
Yok	25	50	10	50	
<b>Adjuvant Tedavi</b>					
Hormon Tedavi	1	2	0		
KT Almış	3	6	1	5	0,973 <sup>a</sup>
KT, RT Almış	11	22	5	25	
KT, RT, Herceptin	1	2	0		
KT, RT Alacak	1	2	1	5	
KT, RT Almamış	1	2	1	5	
RT Alacak	1	2	1	5	
RT Almış	14	28	5	25	
Yok	17	34	6	30	
<b>Hormon Tedavi</b>					
Yok	47	94	19	95	0,869 <sup>a</sup>
Herceptin	3	6	1	5	
<b>İHK Sonuç</b>					
ER:- PER:- HER-2:-	7	14	5	25	
ER:- PER:- HER-2:+	6	12	4	20	
ER:+ PER:- HER-2:-	2	4	0		0,493 <sup>a</sup>
ER:+ PER:- HER-2:+	1	2	0		
ER:+ PER:+ HER-2:-	28	56	8	40	
ER:+ PER:+ HER-2:+	6	12	3	15	
<b>Tümör Lokalizasyonu</b>					
Sağ	25	50	10	50	>0,05
Sol	25	50	10	50	
<b>Evre</b>					
1	5	10	3	15	
2	29	58	9	45	0,735 <sup>a</sup>
3	15	30	7	35	
4	1	2	1	5	
<b>İnsitu Komponent</b>					
25>	8	22,9	4	28,6	0,677 <sup>a</sup>
25<	27	77,1	10	71,4	
<b>Nekroz</b>					
Yok	41	82	15	75	0,515 <sup>a</sup>
Var	9	18	5	25	
<b>Lenfatik İnvazyon</b>					
Yok	38	76	15	75	0,930 <sup>a</sup>
Var	12	24	5	25	

**Çizelge 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarına göre bazı demografik ve klinikopatolojik bulguların dağılımı (devam)

	Ortalama	SS	Ortalama	SS	p
<b>Perinoral İnvazyon</b>					
Yok	38	76	16	80	0,716 <sup>a</sup>
Var	12	24	4	20	
<b>Venöz Vasküler İnvazyon</b>					
Yok	46	92	19	95	0,649 <sup>a</sup>
Var	4	8	1	5	
<b>Mikrokalsifikasyon</b>					
Yok	25	50	10	50	>0,05
Var	25	50	10	50	
	<b>Ortalama</b>	<b>SS</b>	<b>Ortalama</b>	<b>SS</b>	<b>p</b>
Yaş	55,46	12,31	56,95	14,45	0,665 <sup>c</sup>
Tümör Çapı	2,16	1,29	2,26	0,89	0,348 <sup>d</sup>
Metastatik Karsinoma	2,29	2,35	2,25	1,39	0,594 <sup>d</sup>
BRH	4,16	3,47	4,57	3,15	0,699 <sup>c</sup>
Ki67	178,68	164,2	203,94	138,98	0,566 <sup>c</sup>

a. Ki-Kare Benzerlik Oranı (Likelihood Ratio), b. Ki-Kare Testi, c. Bağımsız Örneklem T-Testi, d. Mann Whitney U Testi.

Çizelge 4.1'de kontrol grubu için verilen değerler, sağlıklı dokunun alındığı hastalara ilişkin özellikler olup, kontrol grubunun 50 kişilik hasta grubu içerisinde hangi özelliklere göre randomize edildiğini göstermektedir. Tümör alt tipi hasta grubunda dağılım %14 HER2(+), %14 TNBC, %40 luminal A ve %32 luminal B şeklinde olup, sağlıklı meme dokusu her gruptan %25 örnek olacak şekilde eşit alındı. Hasta grubunun %96'sı, kontrol grubunun %90'ı kadın olup, hasta grubunun %10'unda, kontrol grubunun %17,6'sında BRCA pozitif bulundu. Hasta grubunun test bakılmış olanlar içerisinde %22,2'sinde EGFR, %30'unda P53, %55,3'ünde Tümör Protein P63 (P63), %48,9'unda Kalponin, %98'inde E-Kaderin, %50'sinde Sitokeratin 5/6 (CK 5/6), %50'sinde CD 10 ve %78,6'sında Pan Cytokeratin (PanCK) pozitif, kontrol grubunun test bakılmış olanlar içerisinde %35,3'ünde EGFR, %30'unda P53, %50'sinde P63, %38,9'unda Kalponin, %95'inde E-Kaderin, %44,4'ünde CK 5/6, %100'ünde CD 10 ve %83,3'ünde PanCK pozitif tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm meme kanserli hasta ve kontrol örneklerinin %50'sinde neoadjuvant tedavi alınmamış olup, adjuvant tedavi ise hasta grubunun %64'ünde, kontrol grubunun %70'inde alındığı belirlendi. Hormon tedavi alan hastalar 3, kontrolde 1 kişi olarak tanımlandı. Her iki grupta da immünohistokimyasal (İHK) sonucu

çoğunlukla ER:(+), PER:(+), HER2:(-) olup, sırasıyla oranlar %56 ve %40 olarak bulundu. Tümör lokalizasyonu hem hasta, hem de kontrol grubunda %50 sağ ve %50 sol şeklinde görüldü. Her iki grupta da örneklerin çoğunluğu 2. evrede olup, hasta grubunda bu oran %58 ve kontrol grubunda %45 şeklinde belirlendi. İnsitu komponentin hasta grubunda %77,1 ve kontrol grubunda %71,4 oranla 25'in üzerinde olduğu saptandı. Hasta grubunun %18'inde nekroz, %24'ünde lenfatik invazyon, %24'ünde perinoral invazyon, %8'inde venöz vasküler invazyon ve %50'sinde mikrokalsifikasyon, kontrol grubunun %25'inde nekroz, %25'inde lenfatik invazyon, %20'sinde perinoral invazyon, %5'inde venöz vasküler invazyon ve %50'sinde ise mikrokalsifikasyon gözlemlendi.

Hastaların yaş ortalaması dağılımı  $55,46 \pm 12,31$ , kontrol grubunun  $56,95 \pm 14,45$  şeklinde tespit edildi. Tümör çapı  $2,26 \pm 0,89$  ortalama ile kontrol grubunda daha yüksek bulundu. Metastatik karsinoma  $2,29 \pm 2,35$  ortalama ile hasta grubunda daha yüksek düzeyde belirlendi. Benign Reaktif Hiperplazi (BRH) ve Ki67 ortalamalarının ise kontrol grubunda daha yüksek olduğu görüldü. Öte yandan hasta ve kontrol grubunun tüm demografik ve klinikopatolojik verilerinin farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Çalışmaya dahil edilen hasta grubu içinden ılımlı (luminal A ve B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) meme kanseri hastalarının tamamının demografik ve klinikopatolojik verilerle ilişkisini gösteren korelasyon sonuçları ise Çizelge 4.2'de verildi.

**Çizelge 4.2.** İlimli ve agresif meme kanseri hasta gruplarının demografik ve klinikopatolojik verilerle ilişkisi için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları

<b>Değişken</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Cinsiyet	-0,1	0,49
BRCA	-0,168	0,3
<b>EGFR</b>	<b>-0,436**</b>	<b>0,004</b>
P53	0,019	0,893
P63	0,21	0,157
<b>Kalponin</b>	<b>0,320*</b>	<b>0,028</b>
E-Kaderin	-0,089	0,538
CK 5/6	0,102	0,51
CD 10	-0,577	0,423
PanCK	0,055	0,852
Neoadjuvant KT	-0,154	0,285
<b>Neoadjuvant RT</b>	<b>-0,327*</b>	<b>0,02</b>
Adjuvant KT	-0,175	0,224
Adjuvant RT	-0,064	0,658
Hormon Tedavi	-0,218	0,129
Yaş	0,216	0,132
Tümör Lokalizasyonu	0,000	10,000
<b>Tümör Evresi</b>	<b>-0,315*</b>	<b>0,026</b>
Tümör Çapı	-0,162	0,26
<b>Metastatik Karsinoma</b>	<b>-0,524**</b>	<b>0,009</b>
BRH	-0,179	0,282
İnsitu Komponent	-0,102	0,56
<b>Nekroz Durumu</b>	<b>-0,403**</b>	<b>0,004</b>
<b>Ki67</b>	<b>-0,386**</b>	<b>0,007</b>
Lenfatik İnvazyon	-0,275	0,053
Perinoral İnvazyon	0,246	0,085
Venöz Vasküler İnvazyon	-0,144	0,317
Mikrokalsifikasyon	-0,089	0,538

\*p<0,05 \*\*p<0,01

Analiz sonuçlarına göre, tümörün luminal tipte durumuyla EGFR, neoadjuvant RT alımı, hastalığın evresi, metastatik karsinoma ve nekroz durumu ve de Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde korelasyon tespit edildi (p<0,05, p<0,01). Agresif hasta grubundan, ılımlı hasta grubuna geçişte bu değerlerin tamamında azalma saptandı. Ayrıca, tümörün luminal A veya B tipinde olma durumuyla kalponin arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki belirlendi (p<0,05).

Çalışmada, meme kanserinin farklı alt gruplarına ait toplamda 50 meme kanserli hastanın ve bu hastalardan 20'sinin taze tümör ve normal dokularında let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381 ve miR-935 miRNA'larının ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular, hastalara ait demografik ve klinikopatolojik özellikler ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Değerlendirilen doku örneklerinin içeriği ve hasta gruplarının dağılımı Çizelge 4.3'de sunuldu.

**Çizelge 4.3. Meme Kanseri Hasta Gruplarının Dağılımı**

Hasta	Moleküler alt tip	Histolojik alt tip	Doku tipi		Hasta	Moleküler alt tip	Histolojik alt tip	Doku tipi	
1	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	26	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
2	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	27	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
3	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	28	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
4	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	29	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
5	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	30	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
6	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		31	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
7	HER2(+)	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		32	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
8	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	33	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
9	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	34	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
10	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	35	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal
11	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	36	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal
12	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	37	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal
13	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		38	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal

**Çizelge 4.3. Meme Kanseri Hasta Gruplarının Dağılımı (devam)**

14	TNBC	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		39	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal
15	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	40	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
16	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	41	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
17	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	42	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
18	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	43	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
19	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	Normal	44	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
20	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		45	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
21	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		46	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
22	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		47	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
23	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		48	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
24	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		49	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	
25	LUMİNAL A	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör		50	LUMİNAL B	İnvaziv Duktal Karsinoma	Tümör	

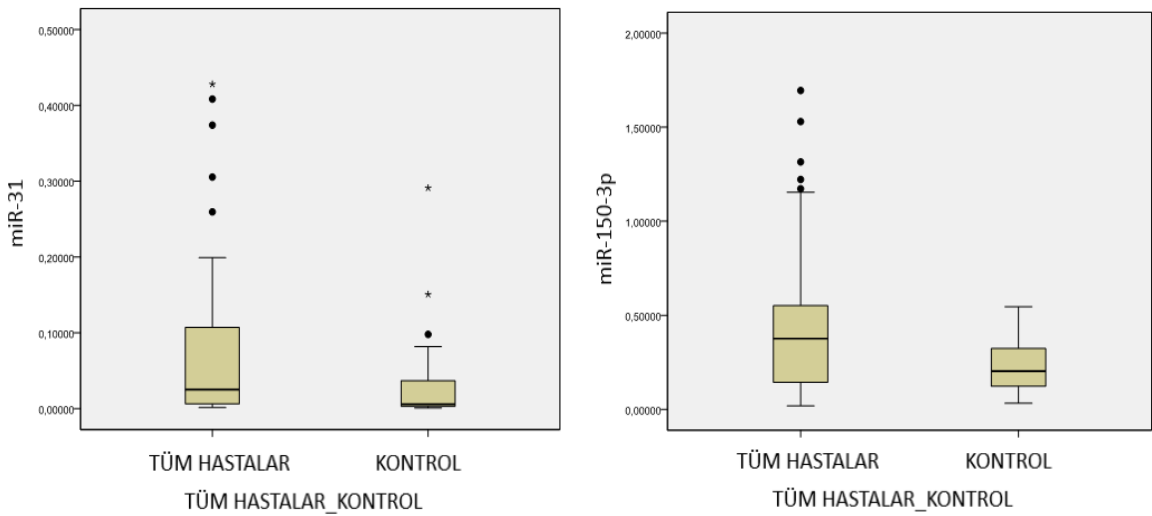
Elde edilen miRNA ekspresyon seviyeleri, tüm hasta grubunda ve hasta grupları arasında karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Buna göre, çalışmaya dahil edilen tüm meme kanserli hastalarda miR-31 ( $p=0,034$ ) ve miR-150-3p ( $p=0,034$ ) ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bir bulundu ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.4). Diğer miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin tüm hasta ve kontrol grubu arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 4.4.** Tüm meme kanserli hastalar ile kontrol grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

miRNA'lar	Hasta (n=50)		Kontrol (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a TR	0,00995	0,01143	0,01715	0,03361	0,266 <sup>a</sup>
miR-142 TR	0,00148	0,00329	0,00115	0,00162	0,398 <sup>a</sup>
Let-7c TR	0,00101	0,00130	0,00378	0,00892	0,943 <sup>a</sup>
miR-125b TR	0,00105	0,00205	0,00219	0,00552	0,275 <sup>a</sup>
miR-200c TR	0,03776	0,05214	0,08659	0,21482	0,830 <sup>a</sup>
miR-340 TR	0,00333	0,00475	0,00861	0,01885	0,765 <sup>a</sup>
miR-31 TR	<b>0,07532</b>	<b>0,10919</b>	0,03818	0,07190	<b>0,034<sup>a</sup></b>
miR-27a TR	0,00832	0,01192	0,01022	0,01789	0,413 <sup>a</sup>
miR-135a-5p TR	0,00117	0,00207	0,00131	0,00225	0,149 <sup>a</sup>
miR-15b-5p TR	0,00090	0,00155	0,00190	0,00377	0,079 <sup>a</sup>
miR-935 TR	0,01222	0,01372	0,03115	0,05616	0,326 <sup>a</sup>
miR-150-3p TR	<b>0,46107</b>	<b>0,41631</b>	0,22862	0,15489	<b>0,034<sup>a</sup></b>
miR-374a TR	0,00190	0,00205	0,00441	0,01083	0,210 <sup>a</sup>
miR-17-5p TR	0,00389	0,00642	0,00716	0,01351	0,380 <sup>a</sup>
miR-381 TR	0,00620	0,00731	0,01139	0,02444	0,750 <sup>a</sup>

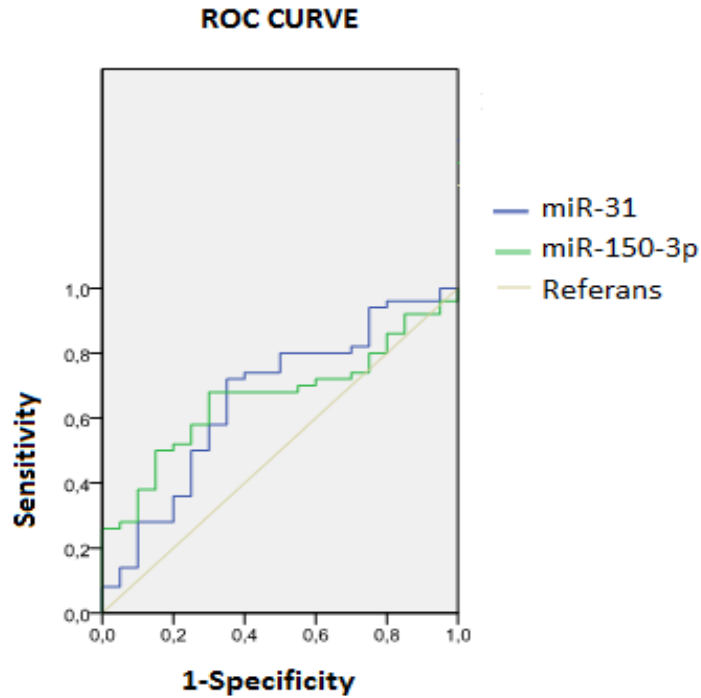
a. Mann Whitney U Testi, TR: Target/Referans Değeri.

Çalışmaya dahil edilen hastaların miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon dağılımları Şekil 4.1'de gösterildi.



**Şekil 4.1.** Hasta ve kontrol grubunun miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon dağılımları

Tüm hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon düzeylerinin hem daha yüksek ortalamaya, hem daha fazla değişim aralığına, hem de daha fazla uç değerlere sahip olduğu belirlendi. Diğer bir ifadeyle, hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyonlarının daha düzensiz olduğu görüldü. Ardından anlamlılık belirlenen bu iki miRNA'nın hastalığın tanısındaki yeterliliği ise ROC analizi ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol gruplarının miR-31 ve miR-150-3p ekspresyonu tanısal değeri için yapılan ROC analizi sonucu Şekil 4.2'de verildi.



**Şekil 4.2.** Meme kanserli hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyonlarının tanısal değerleri için yapılan ROC analizi sonucu

ROC analizi sonuçlarına göre, miR-31 ve miR-150-3p ekspresyonlarının tanısal değerleri %66,3 olup, istatistiksel olarak anlamlı saptandı (AUC: 0,663;  $p < 0,05$ ). Ekspresyon cut off değeri 0,24157 olarak alındığında, sensitivite %68 ve spesivite %70 olarak belirlendi.

Devamında, istatistiksel olarak anlamlı bulunan miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri, Spearman's rho korelasyon analizi ile hastalara ait demografik ve



klınıkopatolojik veriler ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.5). Elde edilen bulgular doğrultusunda, miR-31 ekspresyon düzeyi CK5/6 ile istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde; metastatik karsinoma durumu, insitu komponent ve Ki67 ile istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişkili bulundu ( $p<0,05$ ). Yine korelasyon analizi sonuçlarına göre, miR-150-3p ekspresyonunun P63 ile istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde; neoadjuvant KT alımı ve insitu komponent ile istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişkili olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Meme kanserli hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri ile demografik ve klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları

<b>Değişken</b>	<b>miR-31</b>	<b>miR-150-3p</b>
Cinsiyet	0,122	0,143
BRCA	-0,120	-0,039
EGFR	0,022	0,187
P53	-0,035	0,109
P63	0,156	<b>0,288*</b>
Kalponin	0,160	0,234
E-Kaderin	-0,136	-0,064
CK 5/6	<b>0,283*</b>	0,038
CD 10	0,207	0,207
PanCK	0,412	0,369
Neoadjuvant KT	-0,120	<b>-0,258*</b>
Neoadjuvant RT	-0,055	-0,034
Adjuvant KT	0,066	0,191
Adjuvant RT	0,024	0,086
Hormon Tedavi	-0,204	-0,131
Yaş	0,151	0,051
Tümör Lokalizasyonu	0,030	0,108
Evre	-0,172	-0,112
Tümör Çapı	-0,080	-0,126
Metastatik Karsinoma	<b>-0,423*</b>	-0,218
BRH	-0,031	-0,063
İnsitu Komponent	<b>-0,326*</b>	<b>-0,326*</b>
Nekroz	-0,051	0,078
Ki67	<b>-0,275*</b>	0,036
Lenfatik İnvazyon	-0,073	-0,014
Perinoral İnvazyon	0,114	-0,029
Venöz Vasküler İnvazyon	-0,144	-0,086
Mikrokalsifikasyon	0,045	0,139

\* $p<0,05$

## 4.2. Kontrol Grubuna Göre Meme Kanseri Hasta Grupları Arasındaki Farklar

Elde edilen miRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre; HER2(+), TNBC, luminal A ve luminal B grupları ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

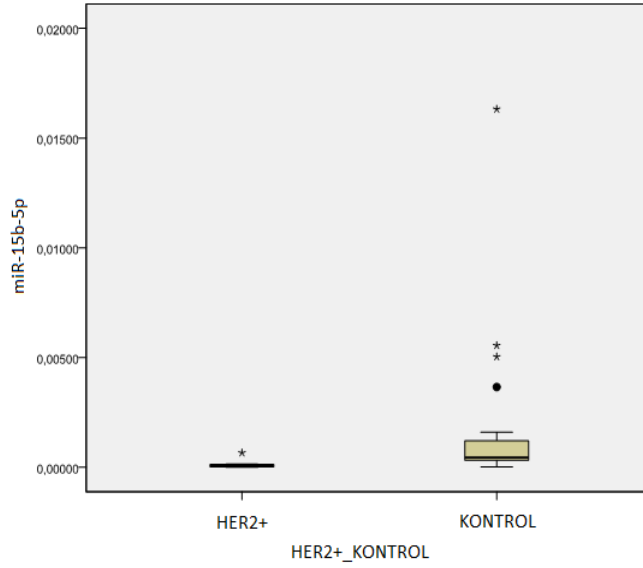
### 4.2.1. Kontrol grubu ile HER2(+) grubu arasında ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

HER2(+) hasta grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında, miR-15b-5p ekspresyon düzeyindeki düşüşte istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.6). miR-15b-5p dışındaki miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin HER2(+) grubundaki değişim farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). HER2(+) ve kontrol gruplarının miR-15b-5p ekspresyon düzeylerinin dağılımları Şekil 4.3'de gösterildi.

**Çizelge 4.6.** Kontrol grubu ile HER2(+) grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

miRNA'lar	HER2(+) (n=7)		Kontrol (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a TR	0,0116	0,0188	0,0172	0,0336	0,498 <sup>a</sup>
miR-142 TR	0,0006	0,0007	0,0011	0,0016	0,935 <sup>a</sup>
Let-7c TR	0,0005	0,0007	0,0038	0,0089	0,263 <sup>a</sup>
miR-125b TR	0,0002	0,0001	0,0022	0,0055	0,130 <sup>a</sup>
miR-200c TR	0,0105	0,0044	0,0866	0,2148	0,341 <sup>a</sup>
miR-340 TR	0,0019	0,0029	0,0086	0,0188	0,850 <sup>a</sup>
miR-31 TR	0,0278	0,0414	0,0382	0,0719	0,766 <sup>a</sup>
miR-27a TR	0,0049	0,0062	0,0102	0,0179	0,850 <sup>a</sup>
miR-135a-5p TR	0,0008	0,0009	0,0013	0,0022	0,725 <sup>a</sup>
miR-15b-5p TR	0,0002	0,0002	<b>0,0019</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,005<sup>a</sup></b>
miR-935 TR	0,0052	0,0039	0,0312	0,0562	0,935 <sup>a</sup>
miR-150-3p TR	0,3446	0,2575	0,2286	0,1549	0,431 <sup>a</sup>
miR-374a TR	0,0006	0,0008	0,0044	0,0108	0,850 <sup>a</sup>
miR-17-5p TR	0,0011	0,0011	0,0072	0,0135	0,766 <sup>a</sup>
miR-381 TR	0,0054	0,0068	0,0114	0,0244	>0,05

a. Mann Whitney U Testi, TR: Target/Referans Değeri



**Şekil 4.3.** HER2(+) ve kontrol grubunun miR-15b-5p ekspresyon düzeyi dağılımı

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, kontrol grubunun miR-15b-5p ekspresyon düzeyi daha yüksek saptandı. Aynı zamanda kontrol grubunda değişim aralığı ve uç değerler de, HER2(+) grubuna göre daha fazla belirlendi. Diğer bir ifadeyle, kontrol grubundaki hastaların miR-15b-5p ekspresyon düzeyleri birbirine daha fazla uzak, HER2(+) grubundakilerin ise birbirine daha yakın olduğu tespit edildi.

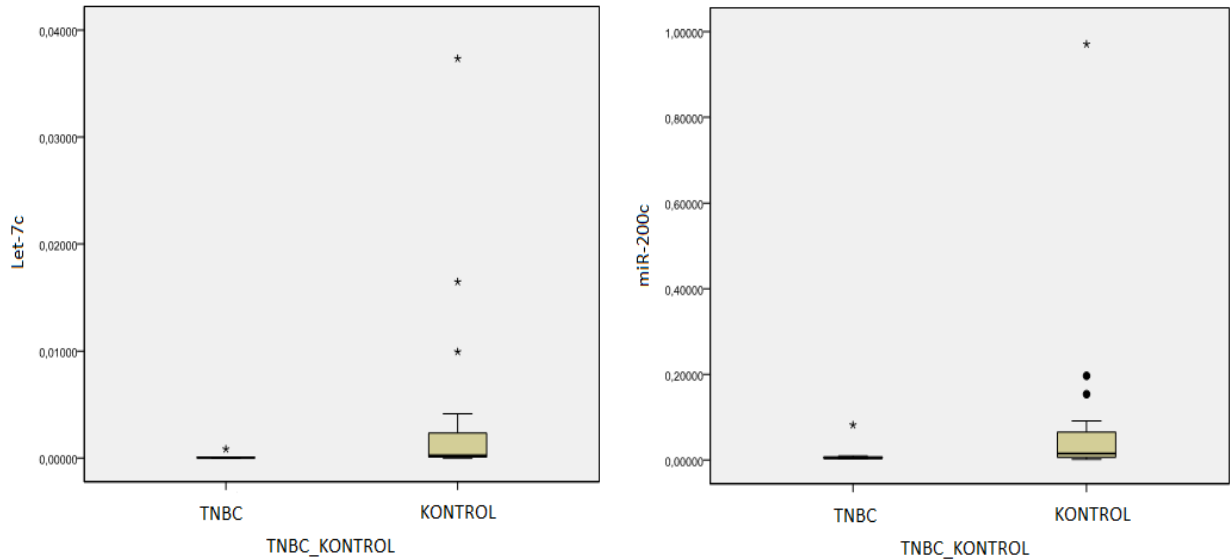
#### **4.2.2. Kontrol grubu ile TNBC grubu arasında ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları**

Fark analizi sonuçlarına göre, let-7c ve miR-200c ekspresyon düzeyleri TNBC hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.7). Diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin TNBC ve kontrol grubu arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). TNBC ve kontrol grubunun let-7c ve miR-200c ekspresyon düzeylerinin dağılımları Şekil 4.4'de verildi.

**Çizelge 4.7.** Kontrol grubu ile TNBC grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

miRNA'lar	TNBC (n=7)		Kontrol (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a TR	0,0031	0,0056	0,0172	0,0336	0,063 <sup>a</sup>
miR-142 TR	0,0008	0,0010	0,0011	0,0016	0,978 <sup>a</sup>
Let-7c TR	0,0001	0,0003	<b>0,0038</b>	<b>0,0089</b>	<b>0,013<sup>a</sup></b>
miR-125b TR	0,0003	0,0003	0,0022	0,0055	0,162 <sup>a</sup>
miR-200c TR	0,0162	0,0291	<b>0,0866</b>	<b>0,2148</b>	<b>0,048<sup>a</sup></b>
miR-340 TR	0,0008	0,0009	0,0086	0,0188	0,288 <sup>a</sup>
miR-31 TR	0,0122	0,0247	0,0382	0,0719	0,198 <sup>a</sup>
miR-27a TR	0,0064	0,0138	0,0102	0,0179	0,370 <sup>a</sup>
miR-135a-5p TR	0,0026	0,0050	0,0013	0,0022	0,341 <sup>a</sup>
miR-15b-5p TR	0,0015	0,0023	0,0019	0,0038	0,850 <sup>a</sup>
miR-935 TR	0,0064	0,0090	0,0312	0,0562	0,808 <sup>a</sup>
miR-150-3p TR	0,3467	0,3426	0,2286	0,1549	0,685 <sup>a</sup>
miR-374a TR	0,0007	0,0011	0,0044	0,0108	0,766 <sup>a</sup>
miR-17-5p TR	0,0017	0,0029	0,0072	0,0135	0,893 <sup>a</sup>
miR-381 TR	0,0032	0,0049	0,0114	0,0244	0,533 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, TR: Target/Referans Değeri



**Şekil 4.4.** TNBC ve kontrol grubunun let-7c ve miR-200c ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Her iki miRNA'nın ekspresyon değeri TNBC hasta grubunda daha düşük düzeyde belirlendi.

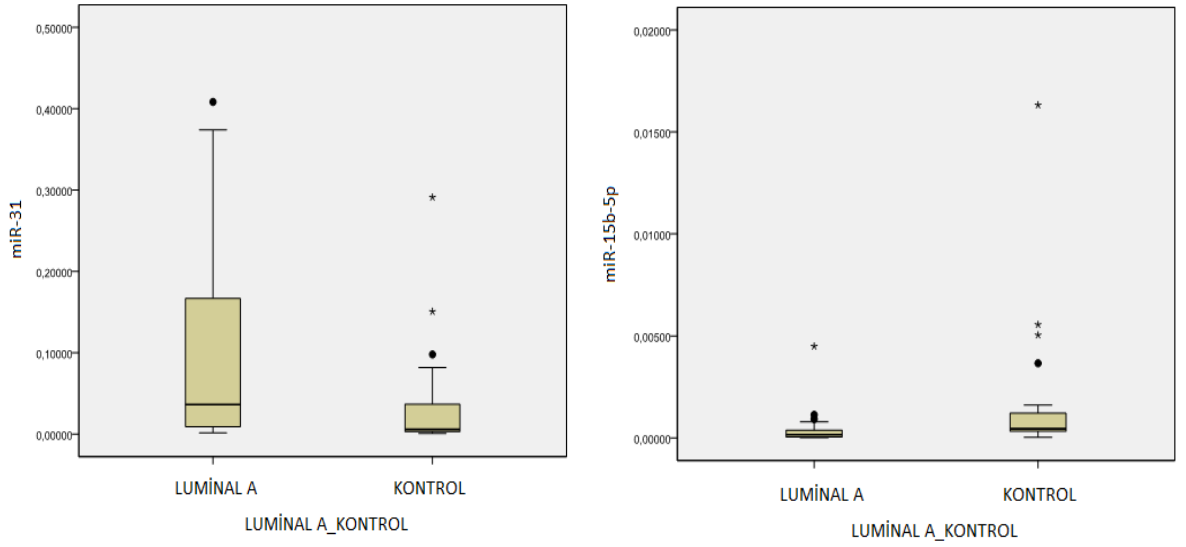
#### 4.2.3. Kontrol grubu ile luminal A grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

Luminal A hasta grubunda miR-31 ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artış, miR-15b-5p ekspresyon düzeyi ise istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.8). Diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin luminal A ve kontrol grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Luminal A ve kontrol gruplarının miR-31 ve miR-15b-5p ekspresyon düzeylerinin dağılımları Şekil 4.5'de verildi.

**Çizelge 4.8.** Kontrol grubu ile luminal A grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

miRNA'lar	Luminal A (n=20)		Kontrol (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a TR	0,0114	0,0120	0,0172	0,0336	0,102 <sup>a</sup>
miR-142 TR	0,0023	0,0049	0,0011	0,0016	0,142 <sup>a</sup>
Let-7c TR	0,0015	0,0018	0,0038	0,0089	0,602 <sup>a</sup>
miR-125b TR	0,0010	0,0024	0,0022	0,0055	0,301 <sup>a</sup>
miR-200c TR	0,0375	0,0566	0,0866	0,2148	0,841 <sup>a</sup>
miR-340 TR	0,0040	0,0059	0,0086	0,0188	0,565 <sup>a</sup>
miR-31 TR	<b>0,1063</b>	<b>0,1287</b>	0,0382	0,0719	<b>0,006<sup>a</sup></b>
miR-27a TR	0,0083	0,0110	0,0102	0,0179	0,165 <sup>a</sup>
miR-135a-5p TR	0,0006	0,0008	0,0013	0,0022	0,565 <sup>a</sup>
miR-15b-5p TR	0,0005	0,0010	<b>0,0019</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,010<sup>a</sup></b>
miR-935 TR	0,0082	0,0102	0,0312	0,0562	0,841 <sup>a</sup>
miR-150-3p TR	0,3787	0,4014	0,2286	0,1549	0,211 <sup>a</sup>
miR-374a TR	0,0018	0,0022	0,0044	0,0108	0,265 <sup>a</sup>
miR-17-5p TR	0,0044	0,0087	0,0072	0,0135	0,461 <sup>a</sup>
miR-381 TR	0,0074	0,0098	0,0114	0,0244	0,738 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, TR: Target/Referans Değeri



**Şekil 4.5.** Luminal A ve kontrol grubunun miR-31 ve miR-15b-5p ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Elde edilen bulgulara göre, miR-31 ekspresyon düzeyi luminal A grubunda daha geniş değişim aralığına ve ortalamaya sahipken, miR-15b-5p'nin kontrol grubunda daha fazla ortalama ve değişim aralığına sahip olduğu belirlendi. Uç değerler ya da ortalamadan sapan hasta sayısı her iki miRNA'nın ekspresyonları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda daha fazla olduğu tespit edildi.

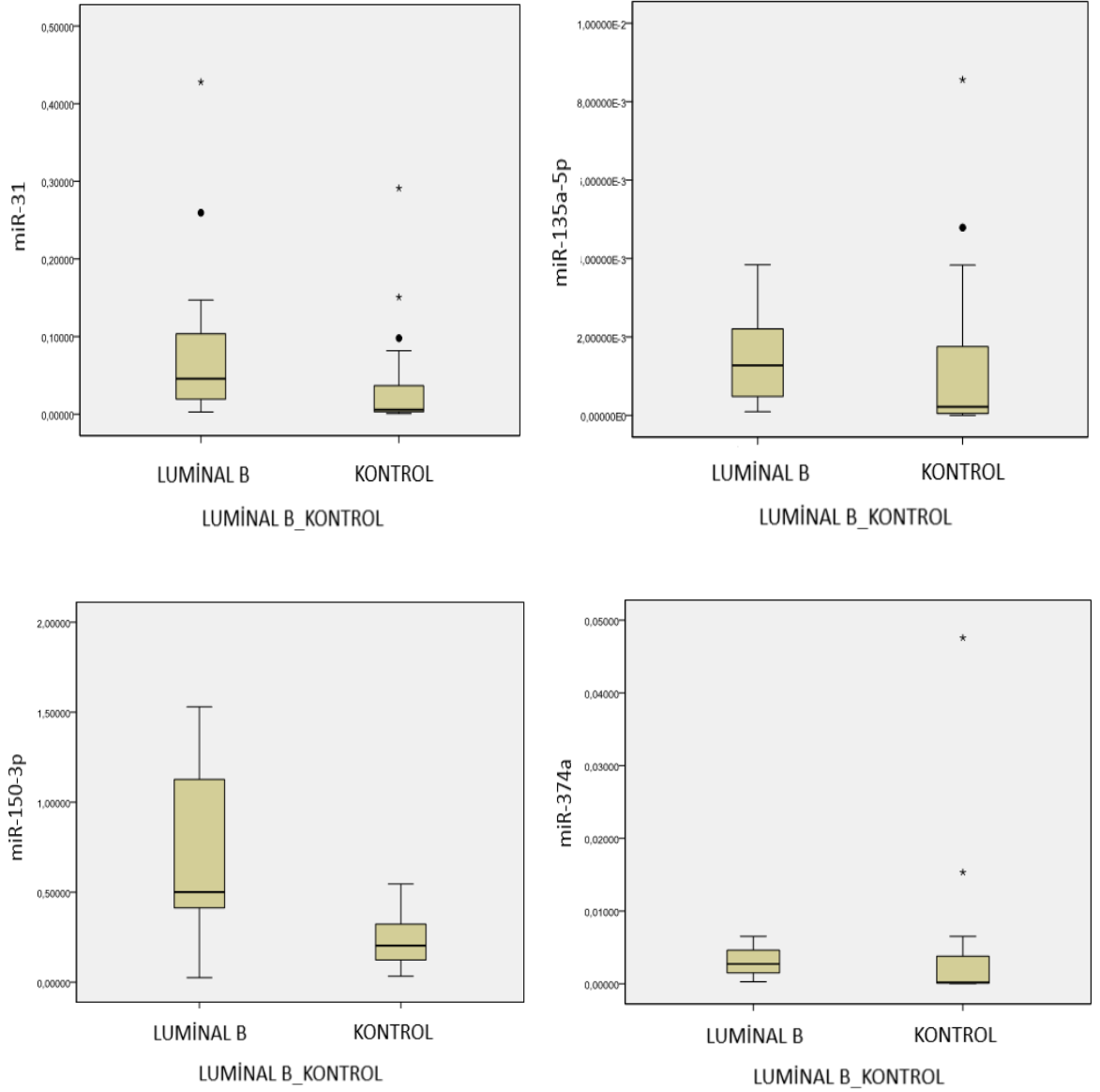
#### **4.2.4. Kontrol grubu ile luminal B grubu arasında ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları**

Luminal B hasta grubunda miR-31, miR-135a-5p, miR-150-3p ve miR-374a ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.9). Diğer miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin luminal B ile kontrol grubu arasındaki farklarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). Luminal B ve kontrol gruplarında anlamlı çıkan miRNA ekspresyon düzeylerinin dağılımı Şekil 4.6'da belirtildi.

**Çizelge 4.9.** Kontrol grubu ile luminal B grubu arasında miRNA ekspresyon düzeyleri fark analizi sonuçları

miRNA'lar	Luminal B (n=16)		Kontrol (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a TR	0,0103	0,0081	0,0172	0,0336	0,158 <sup>a</sup>
miR-142 TR	0,0011	0,0016	0,0011	0,0016	0,814 <sup>a</sup>
Let-7c TR	0,0010	0,0007	0,0038	0,0089	0,211 <sup>a</sup>
miR-125b TR	0,0018	0,0023	0,0022	0,0055	0,814 <sup>a</sup>
miR-200c TR	0,0595	0,0583	0,0866	0,2148	0,352 <sup>a</sup>
miR-340 TR	0,0042	0,0045	0,0086	0,0188	0,440 <sup>a</sup>
miR-31 TR	<b>0,0850</b>	<b>0,1129</b>	0,0382	0,0719	<b>0,009<sup>a</sup></b>
miR-27a TR	0,0107	0,0144	0,0102	0,0179	0,459 <sup>a</sup>
miR-135a-5p TR	<b>0,0014</b>	<b>0,0011</b>	0,0013	0,0022	<b>0,039<sup>a</sup></b>
miR-15b-5p TR	0,0015	0,0019	0,0019	0,0038	0,888 <sup>a</sup>
miR-935 TR	0,0229	0,0162	0,0312	0,0562	0,053 <sup>a</sup>
miR-150-3p TR	<b>0,6649</b>	<b>0,4720</b>	0,2286	0,1549	<b>0,002<sup>a</sup></b>
miR-374a TR	<b>0,0044</b>	<b>0,0108</b>	0,0031	0,0019	<b>0,039<sup>a</sup></b>
miR-17-5p TR	0,0054	0,0051	0,0072	0,0135	0,124 <sup>a</sup>
miR-381 TR	0,0064	0,0042	0,0114	0,0244	0,459 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, TR: Target/Referans Değeri



**Şekil 4.6.** Luminal B ve kontrol grubunun miR-31, miR-135a-5p, miR-150-3p ve miR-374a ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Edinilen bulgular incelendiğinde, miR-31, miR-135a-5p ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri luminal B grubunda, miR-374a ekspresyon düzeyinin ise kontrol grubunda daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlendi. Değişim aralıklarının luminal B grubunda genel olarak daha yüksek düzeyde olduğu saptandı.



### 4.3. Meme Kanseri Hasta Grupları Arasındaki Farklar

Elde edilen miRNA ekspresyon seviyeleri, çalışmaya dahil edilen tüm hasta grupları arasında karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

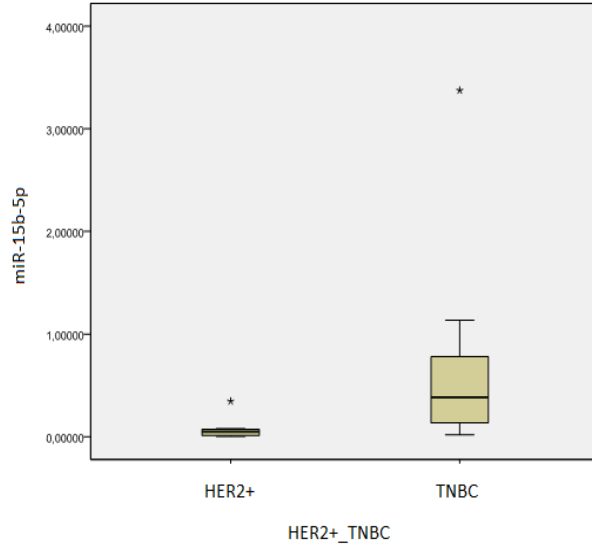
#### 4.3.1. HER2(+) ile TNBC hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

Fark analizi sonuçlarına göre, miR-15b-5p ekspresyon düzeyi TNBC hasta grubunda, HER2(+) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek tespit edildi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.10). Bunun dışında çalışmada incelenen diğer miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin HER2(+) ve TNBC grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). HER2(+) ve TNBC gruplarının miR-15b-5p ekspresyon düzeyi dağılımları Şekil 4.7'de verildi.

**Çizelge 4.10.** HER2(+) ile TNBC hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	HER2(+) (n=7)		TNBC (n=7)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	0,67684	1,09349	0,18088	0,32373	0,073 <sup>a</sup>
miR-142 FC	0,56078	0,58666	0,65876	0,84555	0,902 <sup>a</sup>
Let-7c FC	0,12635	0,18898	0,03793	0,08019	0,259 <sup>a</sup>
miR-125b FC	0,08764	0,06170	0,12005	0,12670	0,902 <sup>a</sup>
miR-200c FC	0,12130	0,05114	0,18693	0,33567	0,209 <sup>a</sup>
miR-340 FC	0,22495	0,33556	0,08838	0,10445	0,209 <sup>a</sup>
miR-31 FC	0,72680	1,08549	0,32019	0,64800	0,165 <sup>a</sup>
miR-27a FC	0,47752	0,60462	0,63076	1,34670	0,259 <sup>a</sup>
miR-135a-5p FC	0,57540	0,66196	1,96911	3,85883	0,710 <sup>a</sup>
miR-15b-5p FC	0,08024	0,12058	<b>0,80057</b>	<b>1,19468</b>	<b>0,038<sup>a</sup></b>
miR-935 FC	0,16745	0,12505	0,20430	0,28916	>0,05
miR-150-3p FC	1,50748	1,12622	1,51654	1,49879	0,710 <sup>a</sup>
miR-374a FC	0,14553	0,19151	0,15446	0,25503	>0,05 <sup>b</sup>
miR-17-5p FC	0,15032	0,14709	0,23042	0,40926	0,902 <sup>a</sup>
miR-381 FC	0,47160	0,59953	0,28045	0,43358	0,383 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change



**Şekil 4.7.** HER2(+) ve TNBC hasta gruplarının miR-15b-5p ekspresyon düzeyi arasındaki farklar

Elde edilen veriler doğrultusunda, TNBC grubunda miR-15b-5p ekspresyonu ortalaması ve değişim aralığının daha yüksek, HER2(+) grubunda ise daha düşük olduğu belirlendi.

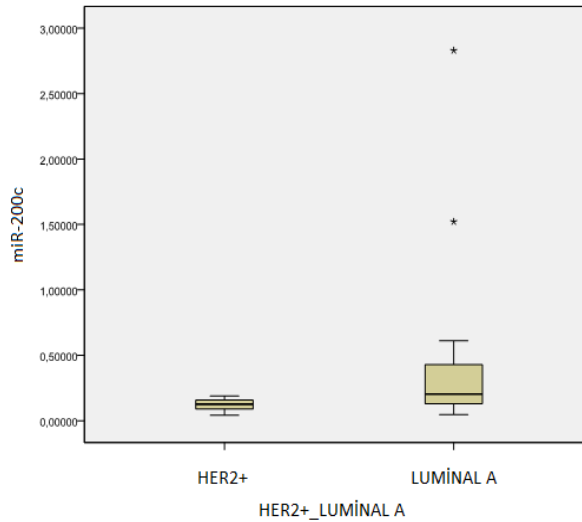
#### **4.3.2. HER2(+) ile luminal A hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları**

miR-200c ekspresyon düzeyi luminal A grubunda, HER2(+) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.11). Diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin HER2(+) ve luminal A grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). HER2(+) ve luminal A hasta gruplarının miR-200c ekspresyon düzeyi arasındaki farklar Şekil 4.8'de belirtildi.

**Çizelge 4.11.** HER2(+) ile Luminal A hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	HER2(+) (n=7)		Luminal A (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	0,67684	1,09349	0,66694	0,69939	0,570 <sup>a</sup>
miR-142 FC	0,56078	0,58666	1,99787	4,28499	0,263 <sup>a</sup>
Let-7c FC	0,12635	0,18898	0,39254	0,47403	0,116 <sup>a</sup>
miR-125b FC	0,08764	0,06170	0,47113	1,08736	0,431 <sup>a</sup>
miR-200c FC	0,12130	0,05114	<b>0,43273</b>	<b>0,65410</b>	<b>0,041<sup>a</sup></b>
miR-340 FC	0,22495	0,33556	0,46787	0,68695	0,533 <sup>a</sup>
miR-31 FC	0,72680	1,08549	2,78342	3,37098	0,081 <sup>a</sup>
miR-27a FC	0,47752	0,60462	0,81188	1,07748	0,145 <sup>a</sup>
miR-135a-5p FC	0,57540	0,66196	0,47049	0,64725	0,570 <sup>a</sup>
miR-15b-5p FC	0,08024	0,12058	0,25375	0,52522	0,314 <sup>a</sup>
miR-935 FC	0,16745	0,12505	0,26186	0,32729	0,850 <sup>a</sup>
miR-150-3p FC	1,50748	1,12622	1,65667	1,75600	0,850 <sup>a</sup>
miR-374a FC	0,14553	0,19151	0,40778	0,50090	0,502 <sup>b</sup>
miR-17-5p FC	0,15032	0,14709	0,61835	1,21182	0,400 <sup>a</sup>
miR-381 FC	0,47160	0,59953	0,64716	0,86216	0,808 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change



**Şekil 4.8.** HER2(+) ve luminal A hasta gruplarının miR-200c ekspresyon düzeyi arasındaki farklar

Luminal A hasta grubunda miR-200c ekspresyon ortalaması ve değişim aralığının daha yüksek, HER2(+) grubunda ise daha düşük olduğu görüldü.

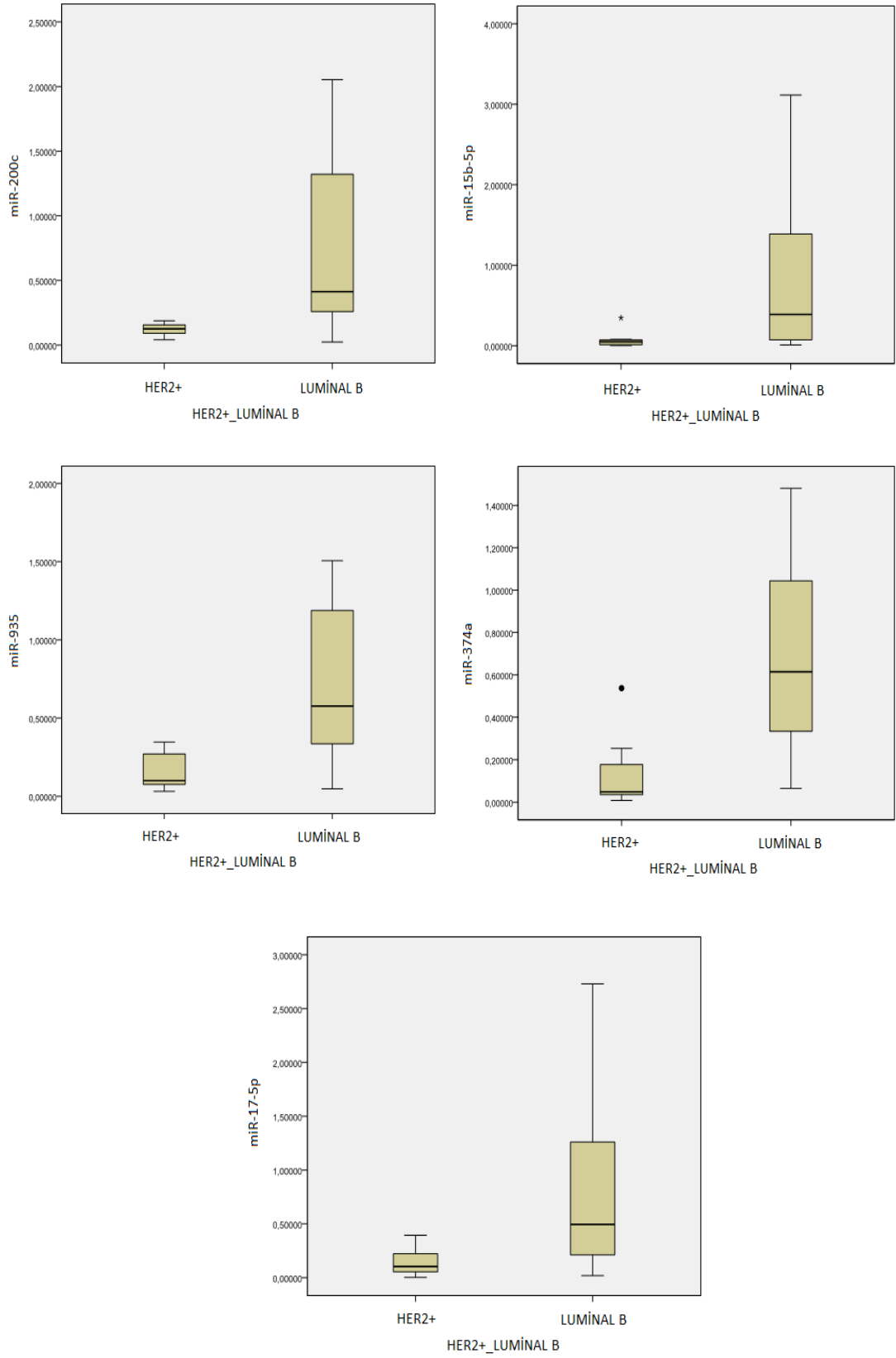
#### 4.3.3. HER2(+) ile luminal B hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre, miR-200c, miR-15b-5p, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeylerinin luminal B hastalarında HER2(+) hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.12). Bunun dışında araştırmada incelenen miRNA ekspresyon düzeylerinin HER2(+) ve luminal B hastaları arasındaki farklarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ( $p > 0,05$ ). HER2(+) ve luminal B vakaları arasındaki miR-200c, miR-15b-5p, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri farkları Şekil 4.9'da gösterildi.

**Çizelge 4.12.** HER2(+) ile luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	HER2(+) (n=7)		Luminal B (n=16)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	0,67684	1,09349	0,60300	0,46981	0,452 <sup>a</sup>
miR-142 FC	0,56078	0,58666	0,99564	1,40075	0,974 <sup>a</sup>
Let-7c FC	0,12635	0,18898	0,27514	0,17356	0,055 <sup>a</sup>
miR-125b FC	0,08764	0,06170	0,81680	1,04920	0,175 <sup>a</sup>
<b>miR-200c FC</b>	<b>0,12130</b>	<b>0,05114</b>	<b>0,68706</b>	<b>0,67370</b>	<b>0,015<sup>a</sup></b>
miR-340 FC	0,22495	0,33556	0,48642	0,52339	0,341 <sup>a</sup>
miR-31 FC	0,72680	1,08549	2,22748	2,95629	0,089 <sup>a</sup>
miR-27a FC	0,47752	0,60462	1,04555	1,40552	0,413 <sup>a</sup>
miR-135a-5p FC	0,57540	0,66196	1,10117	0,83782	0,154 <sup>a</sup>
<b>miR-15b-5p FC</b>	<b>0,08024</b>	<b>0,12058</b>	<b>0,78566</b>	<b>0,98583</b>	<b>0,018<sup>a</sup></b>
<b>miR-935 FC</b>	<b>0,16745</b>	<b>0,12505</b>	<b>0,73551</b>	<b>0,51926</b>	<b>0,008<sup>a</sup></b>
miR-150-3p FC	1,50748	1,12622	2,90860	2,06441	0,249 <sup>a</sup>
<b>miR-374a FC</b>	<b>0,14553</b>	<b>0,19151</b>	<b>0,70088</b>	<b>0,44127</b>	<b>0,029<sup>b</sup></b>
<b>miR-17-5p FC</b>	<b>0,15032</b>	<b>0,14709</b>	<b>0,75860</b>	<b>0,71753</b>	<b>0,018<sup>a</sup></b>
miR-381 FC	0,47160	0,59953	0,56249	0,36808	0,535 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change



**Şekil 4.9.** HER2(+) ve luminal B hasta gruplarının miR-200c, miR-15b-5p, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar

Luminal B hastalarında; miR-200c, miR-15b-5p, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon ortalamaları ve değişim aralığının daha yüksek, HER2+ hasta grubunda ise daha düşük olduğu belirlendi.

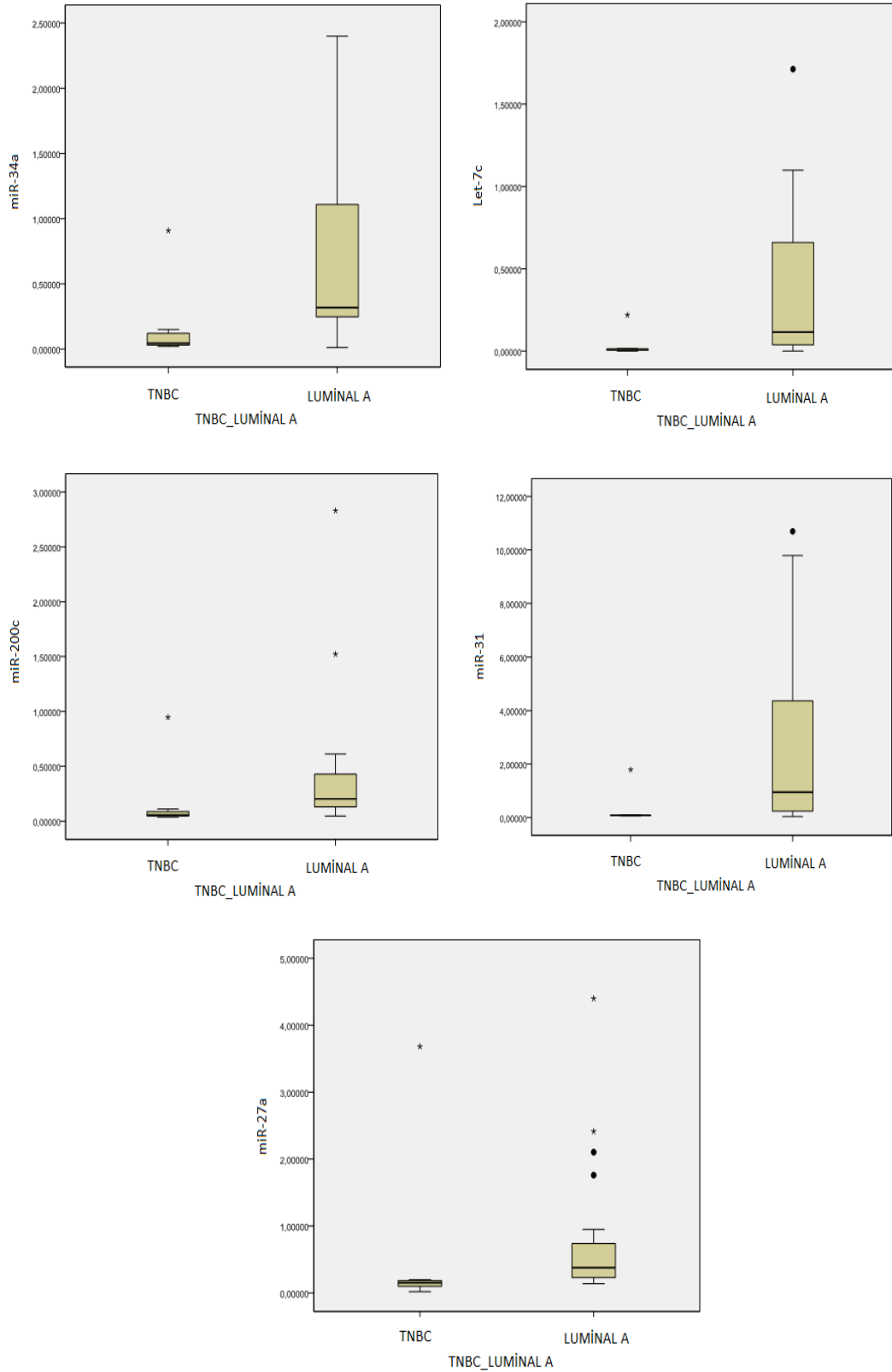
#### 4.3.4. TNBC ile luminal A hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31 ve miR-27a ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde luminal A grubunda daha yüksek düzeyde tespit edildi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.13). Araştırmada incelenen diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin TNBC ve luminal A grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). TNBC ve luminal A grupları arasındaki miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31 ve miR-27a ekspresyon düzeyleri farkları Şekil 4.10'da sunuldu.

**Çizelge 4.13.** TNBC ile luminal A hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	TNBC (n=7)		Luminal A (n=20)		p
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	<b>0,18088</b>	<b>0,32373</b>	<b>0,66694</b>	<b>0,69939</b>	<b>0,011<sup>a</sup></b>
miR-142 FC	0,65876	0,84555	1,99787	4,28499	0,240 <sup>a</sup>
Let-7c FC	<b>0,03793</b>	<b>0,08019</b>	<b>0,39254</b>	<b>0,47403</b>	<b>0,009<sup>a</sup></b>
miR-125b FC	0,12005	0,12670	0,47113	1,08736	0,533 <sup>a</sup>
miR-200c FC	<b>0,18693</b>	<b>0,33567</b>	<b>0,43273</b>	<b>0,65410</b>	<b>0,031<sup>a</sup></b>
miR-340 FC	0,08838	0,10445	0,46787	0,68695	0,072 <sup>a</sup>
miR-31 FC	<b>0,32019</b>	<b>0,64800</b>	<b>2,78342</b>	<b>3,37098</b>	<b>0,003<sup>a</sup></b>
miR-27a FC	<b>0,63076</b>	<b>1,34670</b>	<b>0,81188</b>	<b>1,07748</b>	<b>0,013<sup>a</sup></b>
miR-135a-5p FC	1,96911	3,85883	0,47049	0,64725	0,431 <sup>a</sup>
miR-15b-5p FC	0,80057	1,19468	0,25375	0,52522	0,072 <sup>a</sup>
miR-935 FC	0,20430	0,28916	0,26186	0,32729	0,533 <sup>a</sup>
miR-150-3p FC	1,51654	1,49879	1,65667	1,75600	0,808 <sup>a</sup>
miR-374a FC	0,15446	0,25503	0,40778	0,50090	0,532 <sup>b</sup>
miR-17-5p FC	0,23042	0,40926	0,61835	1,21182	0,145 <sup>a</sup>
miR-381 FC	0,28045	0,43358	0,64716	0,86216	0,314 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change



**Şekil 4.10.** TNBC ve luminal A hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31 ve miR-27a ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar

Luminal A hastalarında miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31 ve miR-27a ekspresyon düzeylerinin daha geniş bir aralıkta değişim gösterdiği belirlendi. TNBC hastalarında ise miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin birbirine daha yakın değerler aldığı görüldü.

#### 4.3.5. TNBC ile luminal B hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

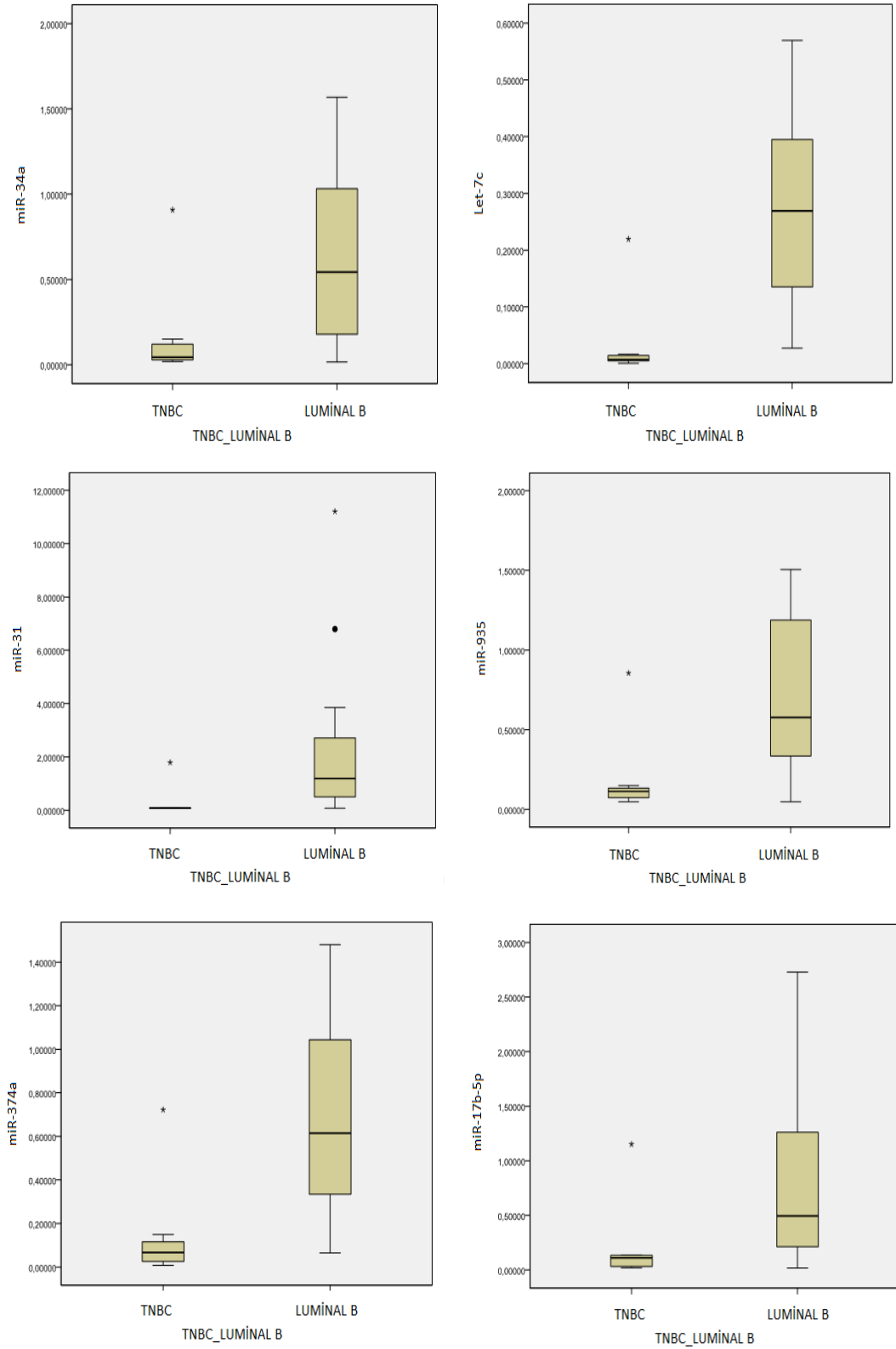
Elde edilen bulgular bağlamında, miR-34a, let-7c, miR-31, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde luminal B grubunda daha yüksek düzeyde saptandı ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.14). Çalışmada değerlendirilen diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin TNBC ve luminal B grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ( $p > 0,05$ ). TNBC ve luminal B hastaları arasındaki miR-34a, let-7c, miR-31, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri farkları Şekil 4.11'de verildi.

**Çizelge 4.14.** TNBC ile luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	TNBC (n=7)		Luminal B (n=16)		P
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	0,18088	0,32373	<b>0,60300</b>	<b>0,46981</b>	<b>0,018<sup>a</sup></b>
miR-142 FC	0,65876	0,84555	0,99564	1,40075	0,820 <sup>a</sup>
Let-7c FC	0,03793	0,08019	<b>0,27514</b>	<b>0,17356</b>	<b>0,000<sup>a</sup></b>
miR-125b FC	0,12005	0,12670	0,81680	1,04920	0,278 <sup>a</sup>
miR-200c FC	0,18693	0,33567	0,68706	0,67370	0,055 <sup>a</sup>
miR-340 FC	0,08838	0,10445	0,48642	0,52339	0,055 <sup>a</sup>
miR-31 FC	0,32019	0,64800	<b>2,22748</b>	<b>2,95629</b>	<b>0,004<sup>a</sup></b>
miR-27a FC	0,63076	1,34670	1,04555	1,40552	0,103 <sup>a</sup>
miR-135a-5p FC	1,96911	3,85883	1,10117	0,83782	0,376 <sup>a</sup>
miR-15b-5p FC	0,80057	1,19468	0,78566	0,98583	>0,05
miR-935 FC	0,20430	0,28916	<b>0,73551</b>	<b>0,51926</b>	<b>0,008<sup>a</sup></b>
miR-150-3p FC	1,51654	1,49879	2,90860	2,06441	0,118 <sup>a</sup>
miR-374a FC	0,15446	0,25503	<b>0,70088</b>	<b>0,44127</b>	<b>0,033<sup>b</sup></b>
miR-17-5p FC	0,23042	0,40926	<b>0,75860</b>	<b>0,71753</b>	<b>0,033<sup>a</sup></b>
miR-381 FC	0,28045	0,43358	0,56249	0,36808	0,198 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change





**Şekil 4.11.** TNBC ve luminal B hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-31, miR-935, miR-374a ve miR-17b-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar

Luminal A ile TNBC hastaları kıyaslamasında olduğu gibi burada da, Luminal B hastalarının miR-34a, let-7c, miR-31, miR-935, miR-374a ve miR-17b-5p ekspresyon düzeylerinin daha fazla değişim aralığına sahip olduğu belirlendi. TNBC hastalarında ise miRNA'ların ekspresyon düzeyleri birbirine daha yakın görüldü.

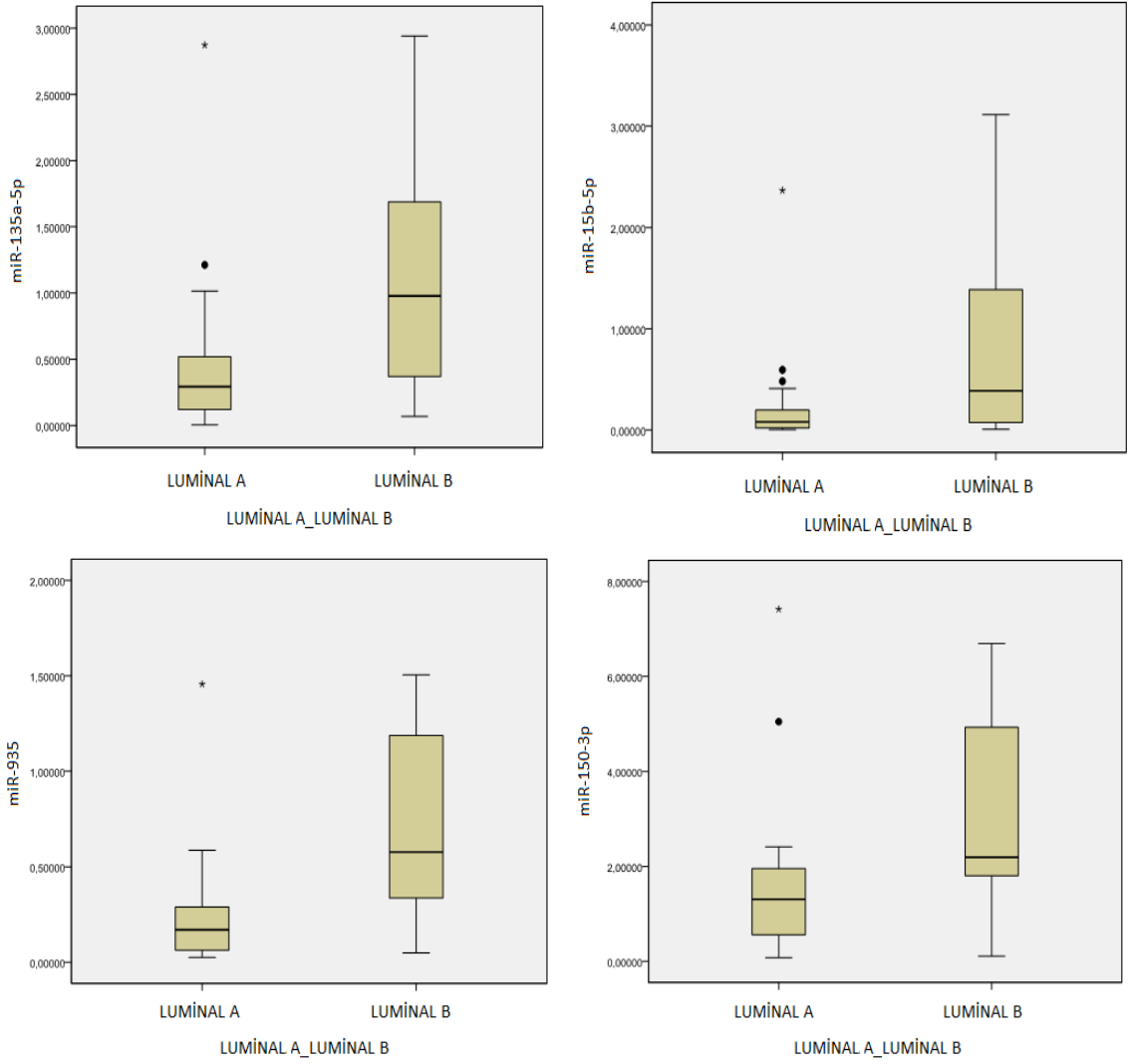
#### 4.3.6. Luminal A ile luminal B hasta gruplarının ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-935 ve miR-150-3p ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde luminal B grubunda daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi. ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.15). Çalışmada incelenen diğer miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin luminal A ve luminal B hasta grupları arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Luminal A ve luminal B hastaları arasındaki miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-935 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri farkları Şekil 4.12'de gösterildi.

**Çizelge 4.15.** Luminal A ile luminal B hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	Luminal A (n=20)		Luminal B (n=16)		P
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
miR-34a FC	0,66694	0,69939	0,60300	0,46981	0,937 <sup>a</sup>
miR-142 FC	1,99787	4,28499	0,99564	1,40075	0,404 <sup>a</sup>
Let-7c FC	0,39254	0,47403	0,27514	0,17356	0,888 <sup>a</sup>
miR-125b FC	0,47113	1,08736	0,81680	1,04920	0,290 <sup>a</sup>
miR-200c FC	0,43273	0,65410	0,68706	0,67370	0,158 <sup>a</sup>
miR-340 FC	0,46787	0,68695	0,48642	0,52339	0,838 <sup>a</sup>
miR-31 FC	2,78342	3,37098	2,22748	2,95629	0,962 <sup>a</sup>
miR-27a FC	0,81188	1,07748	1,04555	1,40552	0,814 <sup>a</sup>
miR-135a-5p FC	0,47049	0,64725	<b>1,10117</b>	<b>0,83782</b>	<b>0,006<sup>a</sup></b>
miR-15b-5p FC	0,25375	0,52522	<b>0,78566</b>	<b>0,98583</b>	<b>0,049<sup>a</sup></b>
miR-935 FC	0,26186	0,32729	<b>0,73551</b>	<b>0,51926</b>	<b>0,002<sup>a</sup></b>
miR-150-3p FC	1,65667	1,75600	<b>2,90860</b>	<b>2,06441</b>	<b>0,021<sup>a</sup></b>
miR-374a FC	0,40778	0,50090	0,70088	0,44127	0,182 <sup>b</sup>
miR-17-5p FC	0,61835	1,21182	0,75860	0,71753	0,067 <sup>a</sup>
hsa miR 381 FC	0,64716	0,86216	0,56249	0,36808	0,765 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change



**Şekil 4.12.** Luminal A ve luminal B hasta gruplarının miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-935 ve miR-150-3p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar

Luminal A hasta grubundaki tüm anlamlı çıkan miRNA ekspresyon düzeylerinde, Luminal B hasta grubuna göre daha dar bir değişim aralığı görüldü ve miRNA'ların değer aralıkları Luminal A grubunda birbirine daha yakın olarak belirlendi.

#### **4.3.7. İlımlı (luminal A ve luminal B) ve agresif (HER2(+)) ve TNBC) hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları**

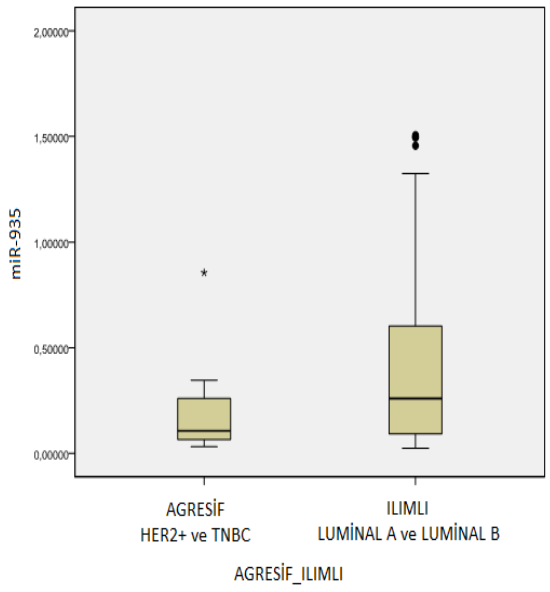
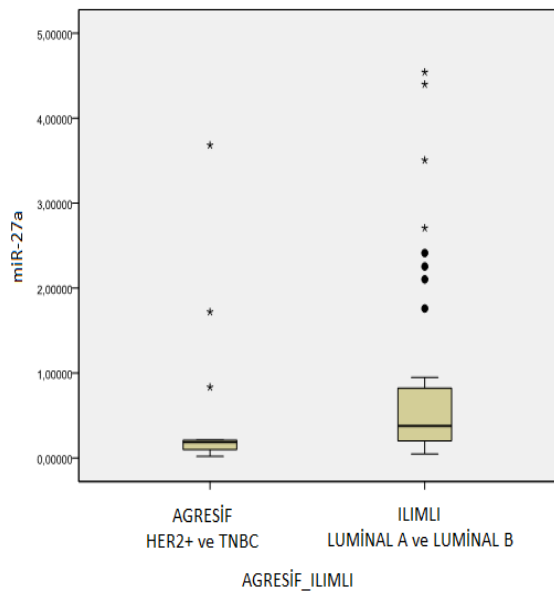
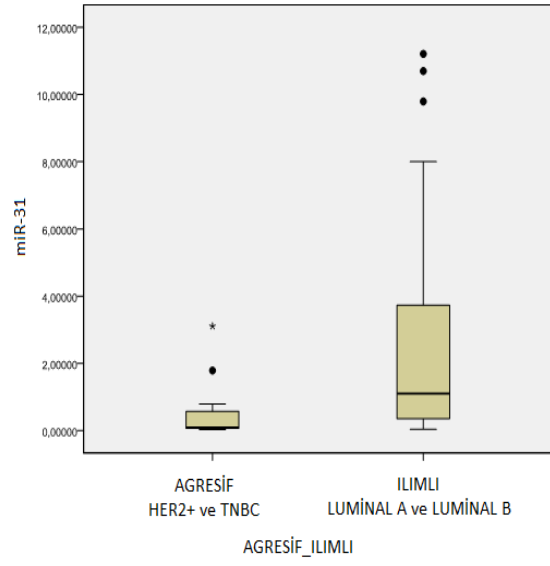
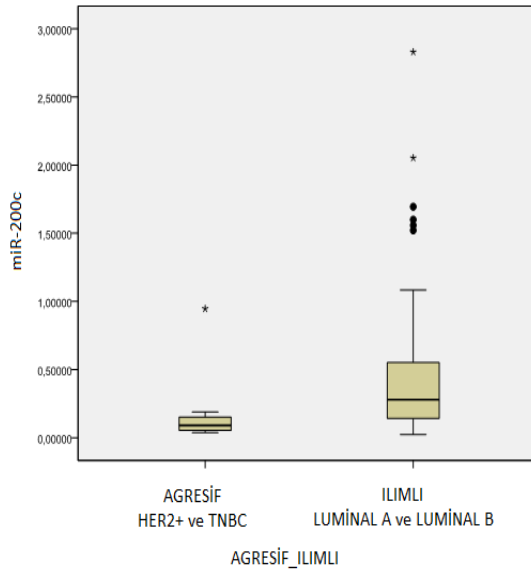
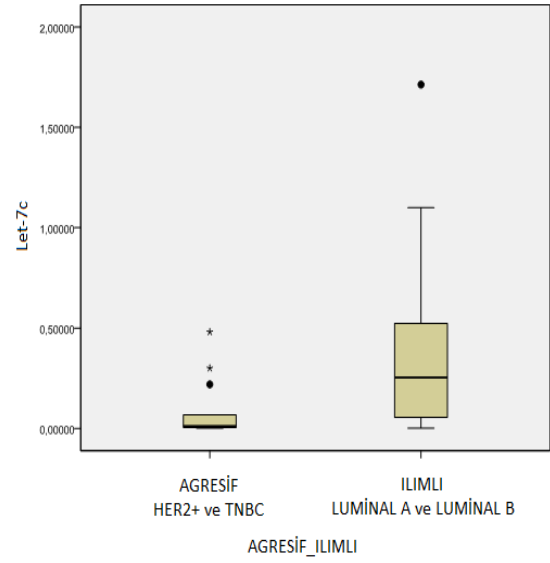
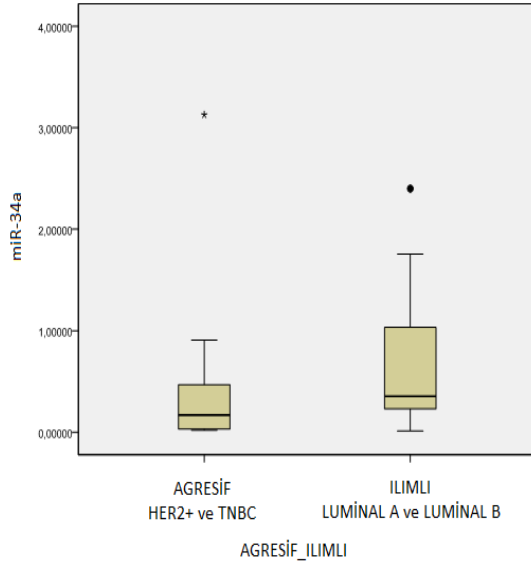
İlımlı hasta grubunda miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31, miR-27a, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.16). Diğer miRNA'ların ekspresyon

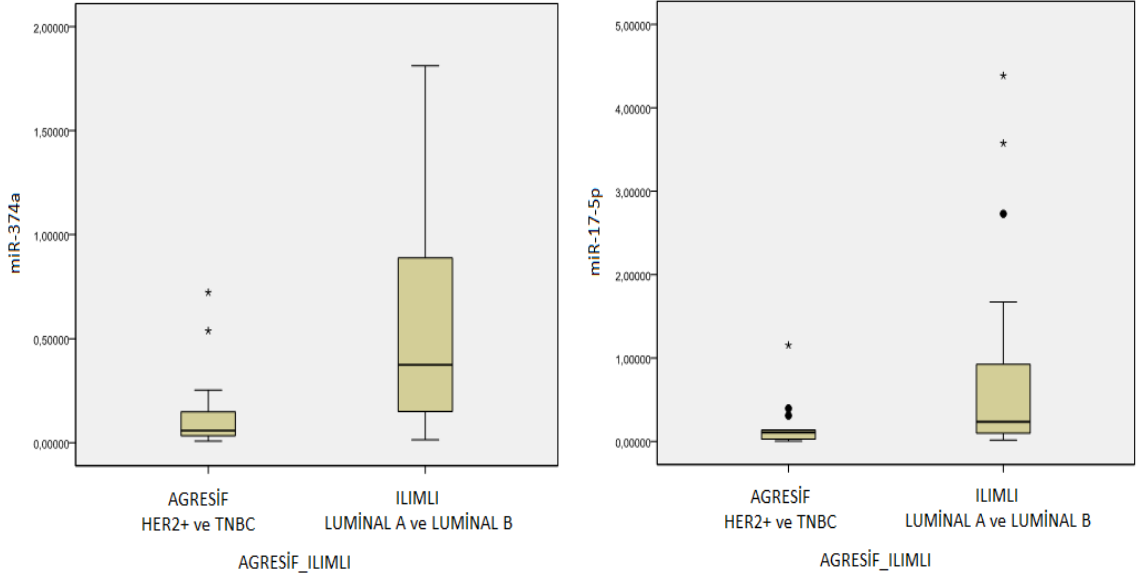
düzeylerinin gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Ilımlı grupta miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31, miR-27a, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeylerinin dağılımı Şekil 4.13'de verildi.

**Çizelge 4.16.** Ilımlı (luminal A ve luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri ve fark analizi sonuçları

miRNA'lar	Agresif Grup (n=14)		Ilımlı Grup (n=36)		P
	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	
<b>miR-34a FC</b>	<b>0,42886</b>	<b>0,81638</b>	<b>0,63852</b>	<b>0,60098</b>	<b>0,026<sup>a</sup></b>
miR-142 FC	0,60977	0,70101	1,55243	3,32618	0,300 <sup>a</sup>
<b>Let-7c FC</b>	<b>0,08214</b>	<b>0,14682</b>	<b>0,34036</b>	<b>0,37201</b>	<b>0,001<sup>a</sup></b>
miR-125b FC	0,10384	0,09721	0,62476	1,06957	0,160 <sup>a</sup>
<b>miR-200c FC</b>	<b>0,15411</b>	<b>0,23317</b>	<b>0,54577</b>	<b>0,66573</b>	<b>0,002<sup>a</sup></b>
miR-340 FC	0,15667	0,24905	0,47611	0,61128	0,054 <sup>a</sup>
<b>miR-31 FC</b>	<b>0,52350</b>	<b>0,88438</b>	<b>2,53634</b>	<b>3,16114</b>	<b>0,001<sup>a</sup></b>
<b>miR-27a FC</b>	<b>0,55414</b>	<b>1,00603</b>	<b>0,91573</b>	<b>1,22096</b>	<b>0,019<sup>a</sup></b>
miR-135a-5p FC	1,27225	2,75640	0,75079	0,79326	0,829 <sup>a</sup>
miR-15b-5p FC	0,44040	0,89730	0,49016	0,79882	0,650 <sup>a</sup>
<b>miR-935 FC</b>	<b>0,18588</b>	<b>0,21488</b>	<b>0,47237</b>	<b>0,48030</b>	<b>0,042<sup>a</sup></b>
miR-150-3p FC	1,51201	1,27366	2,21308	1,97445	0,353 <sup>a</sup>
<b>miR-374a FC</b>	<b>0,15000</b>	<b>0,21672</b>	<b>0,53805</b>	<b>0,49140</b>	<b>0,000<sup>b</sup></b>
<b>miR-17-5p FC</b>	<b>0,19037</b>	<b>0,29836</b>	<b>0,68069</b>	<b>1,01135</b>	<b>0,017<sup>a</sup></b>
miR-381 FC	0,37602	0,51234	0,60953	0,68074	0,243 <sup>a</sup>

a. Mann Whitney U Testi, b. Tukey Testi, FC: Fold Change





**Şekil 4.13.** İlımlı (luminal A + luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta gruplarının miR-34a, let-7c, miR-200c, miR-31, miR-27a, miR-935, miR-374a ve miR-17-5p ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar

Şekilde belirtildiği gibi, genel olarak ılımlı hasta grubunda miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin, agresif gruba göre daha geniş değişim aralığına sahip olduğu belirlendi. Agresif hasta grubunda miRNA ekspresyon düzeylerinin dağılımı birbirine daha yakın değerlerde olup, daha az çeşitlilik gösterdiği tespit edildi.

Ardından, bu grupta anlamlı olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ve Çizelge 4.2'de prognostik faktör olarak bulunan EGFR, kalponin, neoadjuvant RT alımı, hastalığın evresi, metastatik karsinoma durumu ve nekroz durumu ve de Ki67 parametrelerinin multivariate olarak etkinliği için yapılan binary logistic regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.17'de gösterildi.

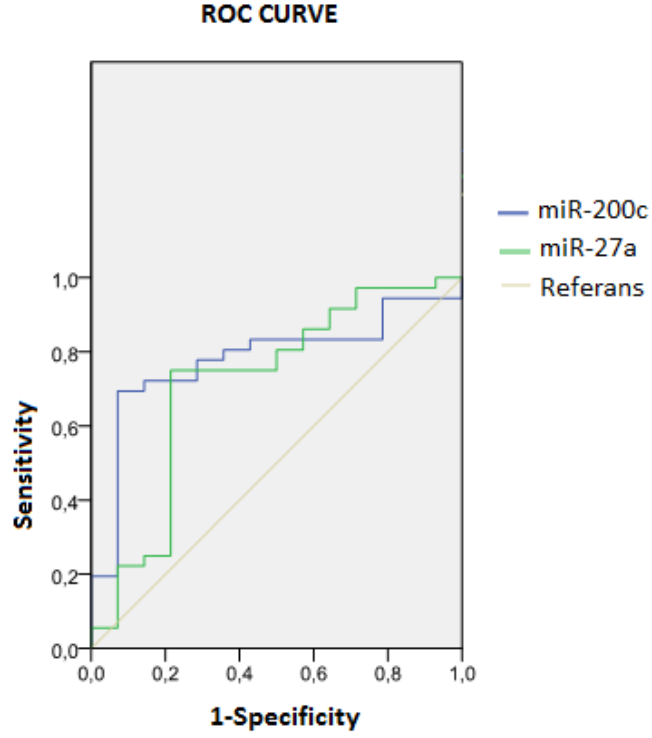
**Çizelge 4.17.** ılımlı (luminal A ve luminal B) ve agresif (HER2(+)) ve TNBC) hasta grupları arasında anlamlılık saptanan miRNA ekspresyon düzeylerinin multivariate olarak etkinliği için yapılan binary logistic regresyon analizi sonuçları

	<b>B</b>	<b>S.E.</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>
miR-34a FC	,160	,697	,052	,819	1,173
Let-7c FC	,556	2,760	,041	,840	1,743
<b>miR-200c FC</b>	<b>12,026</b>	<b>5,818</b>	<b>4,272</b>	<b>,039</b>	<b>167011,057</b>
miR-31 FC	1,271	1,065	1,424	,233	3,565
<b>miR-27a FC</b>	<b>-4,799</b>	<b>2,031</b>	<b>5,583</b>	<b>,018</b>	<b>,008</b>
miR-935 FC	-4,825	4,830	,998	,318	,008
miR-374a FC	3,984	3,567	1,248	,264	53,742
miR-17-5p FC	3,386	4,540	,556	,456	29,535
Constant	-1,015	,664	2,336	,126	,362

-2 log likelihood: 31,012; Cox & Snell R<sup>2</sup>: 0,432; Nagelkerke R<sup>2</sup>: 0,622

FC: Fold Change

Logistic regresyon analizi sonuçlarına göre, anlamlı fark olan miRNA ekspresyonlarının etkileri bir arada değerlendirildiğinde, sadece miR-200c ve miR-27a ekspresyonlarının etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Regresyon analizi yapılırken, hiyerarşik regresyon (stepwise) yapılarak; EGFR, kalponin, neoadjuvant RT alımı, hastalığın evresi, metastatik karsinoma nekroz durumu ve de Ki67 parametreleri önce tek tek, sonra birlikte (enter yöntemi ile) regresyona dahil edildi. Ancak her bir basamakta, miRNA ekspresyonu dışında parametre eklenen regresyon analizinde kovaryans matrisi oluşmadı. Mikro ortama makro değişkenlerin etki etmediğini ortaya koyan bu bulgunun ışığında, miR-200c ve miR-27a parametrelerinin meme kanserinin ılımlı ya da agresif özellikte olma durumunu belirlemede etkili olabileceği görülmektedir. Bunun için yapılan ROC analizi sonuçları Şekil 4.14'de verildi.



**Şekil 4.14.** İlimli (luminal A ve B) ve agresif (HER2(+)) ve TNBC) hasta gruplarında miR-200c ve miR-27a ekspresyonlarının tanısal değerleri için yapılan ROC analizi sonucu

Tümörün ılımlı ya da agresif özellikte olup olmama durumunu değerlendirmede miR-200c ekspresyonunun tanısal gücü %78 olarak bulundu (AUC: 0,780;  $p < 0,02$ ). miR-200c ekspresyonunun 0,116125 cut off değeri için sensitivite %80,6 ve spesivite %64,3 olarak belirlendi. miR-27a ekspresyonunun ise tanısal değeri %71,6 olarak tespit edildi (AUC: 0,716;  $p < 0,05$ ). miR-27a ekspresyonunun 0,2141400 cut off değeri için sensitivite %75 ve spesivite %78,6 olarak saptandı.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri dünya çapında kadın popülasyonunda en sık görülen kanser formu olup, kanser teşhisi konan hastaların yaklaşık %25'i (1,7 milyon) ve tüm kansere yakalananların %15'i (0,5 milyondan fazla) dahil olmak üzere dünyadaki kadınların yaklaşık %12'sini etkilemektedir (Torre ve ark. 2015, Hosseini ve ark. 2018, Vahidian ve ark. 2019). Meme tümörleri heterojendir ve IHC boyama ile anahtar proteinlerin (ER, PR ve ERBB2 olarak da adlandırılan HER2) ekspresyonlarına göre patolojik olarak sınıflandırılır. Hormon reseptörleri pozitif olan grup, HER2 ve Ki67 ekspresyonuna dayanarak luminal A ve luminal B olan iki alt türe ayrılır. Luminal A tümörleri %23,7'lik bir prevalansa sahip olup, HER2 ve Ki67 proliferasyon indeksi negatiftir ve hormonal tedaviye yanıt verirler. Luminal B alt tipi ise, %38,8 prevalansı ile HER2(-), Ki67(+) ve %14 prevalansı ve kötü sonucu ile HER2(+), Ki67(+) olarak bölünmüştür. Hormon reseptörleri negatif grup; HER2(+), EGFR ve CK5/6 pozitif olan bazal veya TNBC ve klaudin düşük olarak bölünmüştür; bunlar sırasıyla %11,2, 25 ve 14'lük bir prevalansa sahiptir ve yüksek derecede heterojen olmaları, daha yüksek nüks oranları ve daha kötü prognozları ile karakterize edilir (Dai ve ark. 2015, Mandujano-Tinoco ve ark. 2017). Primer meme tümörlerinin çoğu ER (+)/PR(+)/HER2(-)'dir ve hastalar cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve hormon tedavileri (anti-östrojen terapileri olarak da adlandırılır) ile tedavi edilir. Ne yazık ki, hastaların %30-40'ında mevcut tedavilere direnç ve metastatik hastalık gelişmektedir (Klinge 2018, Piggott 2018). Bu nedenle meme kanserinde, günümüz tedavilerinin yeterli etkinlikte sağlanamamasının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

Meme kanseri klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır (Waterworth 2003, Ponti ve ark. 2006, Duru ve ark. 2012) ve hastalarda en büyük ölüm nedeni meme kanseri metastatik tümörlerdir (Kang ve ark. 2003, Ma ve ark. 2007, Park ve ark. 2007, Gjerdrum ve ark. 2010). Biriken çalışmalar ve kanıtlar, meme kanseri tümörlerinin çoğunun, "tümör başlatan hücreler" veya KKH'ler olarak tanımlanan kök hücrelerin genel özelliklerini açıklayan bir hücre alt grubundan alınan heterojen bir tümör hücre kütlesi içerdiğini göstermektedir (Wicha 2006). Bu hücrelerin, sadece tümörün başlatılmasını ve büyümesini sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda tümör metastazına ve terapötik dirence de aracılık ettiği bilinmektedir. 2003 yılında ilk kez

(CD44+/CD24-/Lin-/düşük) fenotipli hücreler MKKH olarak tanımlanmıştır (Wicha, 2006). O zamandan beri, güvenilir bir fenotip olan CD44+/CD24- ve daha yakın zamanlarda ise ALDH ekspresyonu, MKKH'lerin izolasyonu ve belirlenmesi için kullanılmıştır (Ponti ve ark. 2006, Perrone ve ark. 2012). MKKH'ler; kendi kendini yenileme, tümör oluşumu, nüks, metastaz, kemoterapiye direnç ve kanser hücrelerinin heterojen sınıflarını üretme yeteneği gibi entegre özelliklere sahip küçük hücrelerin alt türleridir (Clarke ve ark. 2006). MKKH'lerin spesifik belirteçleri, tümörün gelişiminden metastaza kadar olan tüm basamaklarda görev alabilmektedir. MKKH'lerin bu fonksiyonlarını yerine getirmesinde sinyal yollarının kendine has düzenlenmesi de kritik rol oynamaktadır. MKKH'lerde Wnt, Notch, Hedgehog gibi gelişimsel sinyal yollarının bir veya birkaçının anormal düzenlenmesi diğer sinyal yollarının da anormalliğine sebep olarak farklı fizyolojik sonuçlara yol açmaktadır (Takebe ve ark. 2011). MKKH'lerin sistemik tedavinin etkinliğini düşürmesi sebebiyle güncel çalışmalar bu sinyal yollarını hedefleyebilecek özellikte yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine odaklanmış haldedir.

miRNA'lar, çoklu sinyal yollarını düzenleyen ve ilişkili genleri hedefleyerek kanser ilerlemesini etkileyen, küçük, kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA'lar, genin 3'UTR bölgesine bağlanarak hedef mRNA'ların bozulmasını indükleyebilir veya engelleyebilir (Gupta ve ark. 2009, Visvader ve Lindeman 2012, Fan ve ark. 2017). miRNA'ların kanserle ilişkisini ortaya koyan ilk ipuçları arasında, sıklıkla minimal amplifikasyon bölgeleri, heterozigotluk kaybı, kırılma bölgeler ve onkogenler veya tümör baskılayıcı genler içindeki veya yakınındaki ortak kırılma bölgeleri içeren kansere bağlı genomik bölgelerde bulunmalarıdır (Calin ve ark. 2004, Fabbri ve ark. 2008). miRNA'lar meme kanseri de dahil olmak üzere birçok insan kanserinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynar. Bununla birlikte ortaya çıkan kanıtlar, miRNA'ların, onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin hedeflenmesi yoluyla MKKH'lerin karakteristikleri üzerinde etkilerinin olduğunu göstermektedir. MKKH'lerin tümör olmayan meme kanseri hücrelerine kıyasla farklı bir miRNA ekspresyon profili sergilediğini göstermiştir. Anormal miRNA ekspresyonu, çeşitli sinyal yolları aracılığıyla MKKH'lerin karsinogenezine ve kendi kendini yenilemesine katkıda bulunabilir. İlavenen, kök hücre düzenleyici genlerin ekspresyonuna etki ederek farklılaşmada önemli rol oynayabilir

(Fabbri ve ark. 2008, Schwarzenbacher ve ark. 2013, Fan ve ark. 2017). Bu nedenle, kanser kök hücre ile ilişkili kilit sinyal yollarında görevli miRNA'ların ekspresyonlarının meme tümörlerinin prognozu, tedavi takibi ve yanıtında biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağına araştırılması gerekmektedir.

Bu doğrultuda, mevcut tez çalışmasında, meme kanserli hasta örneklerinde KKH sinyal yollarında görev alan let-7c, miR-15b-5p, miR-17-5p, miR-27a, miR-31, miR-34a, miR-125b, miR-135a-5p, miR-142, miR-150-3p, miR-200c, miR-340, miR-374a, miR-381, miR-935 miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların ve olası etkilerinin açığa çıkarılması hedeflendi. Yapılan analizler sonucunda, çalışmaya dahil edilen tüm meme kanserli vakaların tümör örneklerinde miR-31 ( $p=0.034$ ) ve miR-150-3p ( $p=0.034$ ) ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Anlamlı iki miRNA'dan miR-31'in, meme kanseri ile ilişkisini ortaya koyan literatürde az sayıda çalışma bulunması, miR-150-3p ile ilgili literatürde meme kanseriyle ilişkili herhangi bir çalışma bulunmaması ve çalışmada değerlendirilen hasta örneklerinin meme tümörlerinin alt tiplerini içeriyor olması elde edilen bulguların özgünlüğünü oluşturmaktadır.

miR-31, meme kanserinde bir anti-metastatik miRNA olarak bilinmektedir. miR-31, prometastatik genlerin ekspresyonunu inhibe ederek birden fazla aşamada metastazı önlemektedir. miR-31'in metastazı inhibe etme kabiliyeti, İntegrin Alfa (5) (ITGA5), Radixin (RDX) ve RhoA içeren prometastatik hedef genlerden oluşan bir kohortun baskılanması yoluyla ilişkilendirilmiştir. miR-31 aracılı RhoA baskılanması, hem lokal invazyonu hem de erken invazyon olaylarını etkilemektedir. Artmış miR-31 ekspresyonunun onkojenik NF- $\kappa$ B yolağını inhibe ettiği ve bu nedenle bir tümör baskılayıcı miRNA olarak işlev gördüğü ifade edilmiştir (Lv ve ark. 2017). Bununla birlikte, onkogen EMSY, transkripsiyon faktörü ETS-1 ve KDM5B ile işbirliği yoluyla miR-31'i hedefleyerek, bu miRNA'nın transkripsiyonel baskılanmasına ve çok sayıda fenotipik etkiye neden olmaktadır (Mulrane ve ark. 2014). Bir araştırmada, Protein kinaz C epsilon (PRKCE geni tarafından kodlanan PKC $\epsilon$ ) miR-31'in yeni bir doğrudan hedefi olarak belirlenmiş ve PKC $\epsilon$ 'nin aşağı regülasyonunun, bozulmuş NF- $\kappa$ B sinyalleşmesi, gelişmiş apoptoz ile sonuçlandığı, MCF10A ve MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyona ve ayrıca kemoterapötiklerle

tedaviye duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (Körner ve ark. 2013). İlâveten miR-31, kanserde invazyon-metastaz kaskadına katılan birkaç kritik genin anahtar düzenleyicisidir. miR-31'in, kanser hücresi invazyon ve metastazının temel yönlerini düzenlemek için birkaç integrin alt birimini spesifik olarak hedefleyebildiği gösterilmiştir (Augoff ve ark. 2011).

Schmittgen (2010) çalışmasında, miR-31'in, meme kanseri hücreleri ve dokularında metastaz ile ilgili bir dizi geni düzenlediğini belirlemiştir. Çeşitli yaklaşımlar kullanılarak, miR-31'in hücresele seviyelerinin, hücrenin invazyon ve metastaz yapma yeteneği ile ilişkili olduğunu; artmış miR-31 seviyesine sahip hücrelerin daha az metastatik olduğunu saptamıştır. Daha yüksek miR-31 ekspresyonu veya miR-31 hedef genlerinin daha düşük ekspresyonu olan meme kanseri hastalarının uzun süreli sağkalım gösterdiğini belirleyerek çalışmasını, hasta dokularına genişletmiştir. Sonucunda, invazyon ve metastazı düzenlemek için miR-31 miRNA'sını tanımlamış ve bu miRNA'nın meme kanserinde metastazın terapötik müdahalesi için yol gösterici olduğunu ifade etmiştir (Schmittgen 2010).

Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, miR-31 ekspresyonunun TNBC dokusu ve hücre hattında aşağı regüle edildiği bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattı, 5-aza-2'-deoksisitidin (5-AZA-CdR) ile tedavi edildikten sonra miR-31 ekspresyonu arttırılmıştır. miR-31 ekspresyonunu arttırmak, MDA-MB-231 hücre göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bunun yanında miR-31 ekspresyonunun aşağı regülasyonunun, MCF-7 hücre göçünü ve invazyonunu arttırabileceği ifade edilmiştir. Tümör proliferasyonu ve invazyonu ile ilişkili, adenin ve timin açısından zengin dizi içeren SATB Homeobox 2 (SATB2)'nin ekspresyonu, miR-31 ile negatif korelasyon göstermiş ve MCF-7 ve MDA-MB-231'de yukarı regüle edilmiştir. SATB2 ekspresyonunun susturulması, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. Lusiferaz deneyi, SATB2'nin miR-31'in doğrudan bir hedefi olduğunu göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar miR-31'in SATB2 ekspresyonunu baskılayarak TNBC hücrelerinin göçünü ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (Luo ve ark. 2016).

Başka bir çalışmada araştırmacılar, tanımlanan 1098 meme kanseri hastasının miRNA sekans dizilerini ve ilgili klinikopatolojik verileri TCGA veri tabanından indirmişler, tam karakterize edilmiş miRNA profilleri olan 253 hastayı analiz için belirlemişlerdir. 3 miRNA'nın (miR-31, miR-16-2, ve miR-484) hasta prognozu ile anlamlı ve bağımsız bir şekilde ilişkili olduğu ve iyi stabilite ile gerçekleştirildiğini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, miR-484'ün yüksek ekspresyonunun kötü prognozu gösterdiği, miR-31 ve miR-16-2'nin yüksek ekspresyonunun daha iyi prognozu gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle bazal benzeri ve hormon reseptörü pozitif meme kanseri alt tiplerinde meme kanseri prognozunu doğru olarak tahmin edebilen 3 miRNA imzası gösterilmiştir. Ayrıca, ilave deneyler bu miRNA ekspresyon farklılıklarının meme kanseri hücre döngüsü ve proliferasyonu ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır (Shi 2019).

Mevcut tez çalışmasında, meme kanserinin moleküler alt gruplarına (HER(+), TNBC, luminal A ve luminal B) göre ayrılan hastalar arasında gerçekleştirilen ekspresyon analizleri sonucunda, miR-31'in değerlendirilen diğer hasta gruplarına kıyasla sadece luminal A ve luminal B hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla,  $p=0.006$ ,  $p=0.009$ ). Ayrıca meme kanserli hastaları ılımlı (luminal A ve luminal B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) grup olarak ayırıp, miRNA ekspresyon farklılıklarını incelediğimizde de, miR-31 ılımlı (luminal A ve luminal B) hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ( $p=0.001$ ). miR-31, meme kanseri metastazının potansiyel düzenleyicisi olarak dikkat çekmekte ve çoklu genleri hedefleyerek meme kanseri metastazını inhibe edebilmektedir. miR-31'in yukarı regülasyonu luminal olanlar gibi daha az agresif meme kanseri alt tipleri ile ilişkili olup, aşağı regülasyonu TNBC gibi daha agresif meme kanseri alt tipleri ile ilişkilidir. Bu bağlamda elde edilen bu bulgu, literatürü destekler nitelikte olup luminal tip meme kanserli hastalarda miR-31 ekspresyon seviyesi değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi sahibi olunabilir. Böylece hastaya uygulanacak bireye özgü tedavi protokollerine katkı sağlanabilir. Bu durum hastalıkla daha etkin şekilde mücadele etmeyi ve daha iyi bir klinik iyileşmeyi beraberinde getirir ve ilgili hasta grubunun yaşam kalitesini yükseltir.

Çalışmada, tüm meme kanserli hastalarda istatistiksel anlamlılık saptanan bir diğer miRNA, miR-150-3p'nin meme kanseri ile ilişkisini gösteren literatürde herhangi bir

çalışma bulunmamaktadır. Diğer kanser türleri ile bağlantısı incelendiğinde, 2018 yılında Koshizuka ve arkadaşları, baş ve boyun yassı epitel hücreli karsinomda (HNSCC), miR-150-5p ve miR-150-3p'nin her ikisinin de önemli ölçüde düşük regüle edildiğini ve bu miRNA'ların HNSCC hücrelerinde antitümör miRNA'lar olarak işlev gördüğünü saptamışlardır. Toplam 19 gen, miR-150-5p ve miR-150-3p'nin hedefleri arasında olup, bunlar arasında SPARC (Osteonectin) ve kazal benzeri proteoglikan 1 (SPOCK1) doğrudan HNSCC hücrelerindeki her iki miRNA tarafından düzenlenmiştir. SPOCK1 ekspresyonunun HNSCC hücre agresifliğini arttırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, miR-150-5p ve miR-150-3p'nin aşağı regülasyonu ve SPOCK1'in aşırı ekspresyonunun, HNSCC'nin agresifliğine katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Koshizuka ve ark. 2018). Bir diğer çalışmada, miR-150, miR-150-5p ve miR-150-3p'nin özofagus yassı epitel hücreli karsinomdaki (ESCC) onkojenik hedefleri nasıl düzenlediği araştırılmış, hem miR-150-5p hem de miR-150-3p'nin ESCC kanser hücresi göçünü ve invazyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu da her iki miRNA'nın antitümör miRNA'lar olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Birlikte ele alındığında, miR-150-5p hem de miR-150-3p'nin aşağı regülasyonu ve SPOCK1'in aşırı ekspresyonunun, HNSCC'de olduğu gibi ESCC patogenezinde de rol oynadığı ifade edilmiştir (Osako ve ark. 2017).

Başka bir çalışmada, prostat kanseri (PCa) ve kastrasyona dirençli prostat kanserinde (CRPC), miR-150-5p ve miR-150-3p'nin fonksiyonel önemi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, her iki miRNA'nın kanser hücresi göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. SPOCK1'in, doğrudan miR-150-5p ve miR-150-3p'nin hedefi olduğunun bilinmesi ve SPOCK1'in siRNA tarafından susturulması, kanser hücresi agresivitesini inhibe etmiştir. Bununla birlikte, PCa ve CRPC dokularında SPOCK1'in aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Özetle, miR-150-5p ve miR-150-3p'nin HNSCC'de ve ESCC'de olduğu gibi PCa ve CRPC hücrelerinde de antitümör miRNA'lar olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Okato ve ark. 2017).

Elde edilen bulgulardan yola çıkarak, literatürdeki diğer kanser türlerinde miR-150-3p'nin antitümör özelliğinde bir miRNA olduğunun belirlenmesi, yüksek ekspresyonunun hücre göçü ve invazyonu baskıladığı, düşük ekspresyonunun hücre agresifliğine katkıda bulunduğunun bildirilmesi, meme kanserinde elde ettiğimiz

sonuçların, literatürdeki diğer kanser tipleriyle orantılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmada, miR-150-3p ekspresyonu artışı, diğer alt tiplere kıyasla luminal B alt tipinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.002$ ). Luminal A ve B kendi arasında karşılaştırıldığında ise luminal B alt tipindeki artışta yine anlamlılık saptanmıştır ( $p=0.021$ ). Mevcut bulgu ile luminal B tip meme kanserli hastalarda miR-150-3p ekspresyon düzeyinin analizi, hastalığın seyri ile ilgili bilgi verilebilmesine ve tedavi seçeneklerinin genişletilebilmesine katkı sağlayabilir niteliktedir.

Ardından, meme kanserli hastalarda miR-31 ve miR-150-3p ekspresyon düzeylerindeki değişimler ile demografik ve klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki değerlendirildi ve miR-31 ekspresyon düzeyi CK5/6 ile istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde; metastatik karsinoma durumu, insitu komponent ve Ki67 ile istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişkili bulundu ( $p<0,05$ ). Yine korelasyon analizi sonuçlarına göre, miR-150-3p ekspresyonunun P53 ile istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde; neoadjuvant KT alımı ve insitu komponent ile istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişkili olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). miR-31'in anti-metastatik bir miRNA olduğunun bilinmesi, yüksek ekspresyonunun hastalığın prognozunu işaret eden parametreler (metastatik karsinoma durumu, insitu komponent ve Ki67) ile negatif korelasyon göstermesi elde ettiğimiz ilk bulguyu destekler niteliktedir. Özellikle, miR-31 ekspresyonunda artış belirlenen vakalarda, Ki67 değeri daha küçüktür. Ki67 değişkeninin; tümör büyüklüğü, hastalığın evresi ve invazyon ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir ve yüksek Ki67 oranı kötü prognostik faktör olarak ifade edilir (Trihia ve ark. 2003). miR-150-3p ekspresyon seviyesindeki artışın P53 ile pozitif yönde, insitu komponent ile negatif yönde bir anlamlılık göstermesi de, elde ettiğimiz sonucu doğrulamaktadır. Bu bilgiler ışığında; miR-31 ekspresyon düzeyindeki değişim ile Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlılık elde edilmesi ve miR-150-3p'nin hastalığın seyrini ifade eden değişkenlerle anlamlı korelasyon göstermesi, ilgili miRNA'ların meme kanserinde prognoz takibinde kullanılabilir birer biyobelirteç adayı olabileceğini göstermektedir. Devamında, miR-31 ve miR-150-3p'nin tanısal gücünü incelemek için ROC analizleri gerçekleştirildi ve her iki miRNA'nın meme kanseri tanısında orta duyarlılıkta birer biyobelirteç adayı olabileceği belirlendi (sırasıyla  $AUC=0,663$ ,  $AUC=0,663$ ).

Çalışmada, moleküler alt tiplere göre ayırdığımız ılımlı (luminal A ve B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise, ılımlı hasta grubunda miR-34a (p=0,026), let-7c (p=0,001), miR-200c (p=0,002), miR-31 (p=0,001), miR-27a (p=0,019), miR-935 (p=0,042), miR-374a (p=0,000) ve miR-17-5p (p=0,017) ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi. Daha sonra, ılımlı ve agresif meme kanseri hasta gruplarının demografik ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisine bakıldı ve tümörün luminal tipte olması ile EGFR, neoadjuvant RT alımı, hastalığın evresi, metastatik karsinoma, nekroz durumu ve de Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde korelasyon tespit edildi (p<0,05). Ayrıca, tümörün luminal A veya B tipinde olma durumuyla kalponin arasında anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki belirlendi (p<0,05) ve agresif hasta grubundan, ılımlı hasta grubuna geçişte bu değerlerin tamamında azalma saptandı. İstatistiksel anlamlılık belirlenen bu parametreler ile luminal tipteki meme kanserlerinin prognoz açısından takibi değerlendirilebilir. Devamında ılımlı (luminal A ve B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) hasta grupları arasında anlamlı olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin, prognostik faktör olarak değerlendirilebilecek EGFR, kalponin, neoadjuvant RT alımı, hastalığın evresi, metastatik karsinoma durumu ve nekroz durumu ve de Ki67 parametrelerinin etkinliği incelendiğinde, sadece miR-200c (p=0,039) ve miR-27a (p=0,008) ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi. Ardından, tümörün ılımlı ya da agresif özellikte olup olmama durumunu değerlendirmede miR-200c ve miR-27a ekspresyonlarının tanısal performansları tespit edildi (sırasıyla, AUC=0,78, AUC=0,716). miR-200c'nin meme kanseri de dahil olmak üzere birçok katı tümörde belirgin tümör baskılayıcı fonksiyon gösterdiği bilinmektedir (Song ve ark. 2015). Öte yandan, miR-27a meme kanserlerinde tümör büyümesini ve metastazını destekleyen onkogenik özellikte bir miRNA'dır (Teoh ve Das 2017). Elde edilen bu sonuç ile miR-200c ve miR-27a ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların meme kanserinin ılımlı ya da agresif özellikte olma durumunu belirlemede etkili, prediktif değerde birer belirteç olabileceği görülmektedir.

Araştırmada, HER2(+) hasta grubunda miR-15b-5p (p=0.005), TNBC hasta grubunda let-7c (p=0.013) ve miR-200c (p=0.048), luminal A hasta grubunda miR-31 (p=0.006) ve miR-15b-5p (p=0.010), luminal B hasta grubunda ise miR-31 (p=0.009), miR-135a-



5p (p=0.039), miR-150-3p (p=0.002) ve miR-374a (p=0.039) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. miR-15b-5p; kolorektal, mide, karaciğer ve meme kanserinin de içinde bulunduğu birçok kanserde yukarı regülasyon göstermekte ve bunun da meme kanserinde tümör büyümesi ve metastazı, diğer kanserlerde hücre proliferasyonu ve invazyonunu desteklediği bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2017, Dong ve ark. 2019, Wu ve ark. 2020). Çalışmada, HER2(+) ve luminal A hasta gruplarında miR-15b-5p ekspresyonunun düşük seyretmesi ve ilgili miRNA'nın yukarı regülasyonunun meme kanserlerinde tümör büyümesini teşvik ettiği düşünüldüğünde, HER2(+) ve luminal A tipi meme kanserli hastalarda miR-15b-5p'nin ekspresyon düzeyindeki farklılık ile tümörün agresifliği hakkında fikir sahibi olunabilir. TNBC hasta grubunda anlamlılık saptanan ve meme kanserlerinde tümör baskılayıcı özellik gösteren let-7c ve miR-200c'nin düşük ekspresyonu, meme kanserlerinin agresif alt tiplerinde kötü prognoz, lenf nodu pozitifliği, metastaz ve daha kısa sağkalım ile koreledir (Kim ve ark. 2012, Liu ve ark. 2018). let-7c ve miR-200c, TNBC dokularının terapötik müdahalesi için çekici bir hedef olabilir ancak TNBC hastalarının metastaz ile ilişkili rolünü açıklığa kavuşturmada her iki miRNA ekspresyonunun daha büyük bir grupta değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı, bir diğer anlamlı miRNA, miR-374a'yı eksprese eden metastatik meme kanseri hücrelerinde hiperaktifdir. Meme kanseri hücre hatlarında, miR-374a'nın aşırı ekspresyonu hem in vitro hem de in vivo EMT ve metastazı arttırmaktadır. Ayrıca miR-374a, WNT İnhibitör Faktör1 (WIF1), PTEN ve WNT5A dahil olmak üzere Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal kaskadının çoklu negatif regülatörlerini doğrudan hedefler ve bastırır. Özellikle miR-374a, uzak metastazlı hastalardan alınan primer tümör örneklerinde belirgin şekilde yukarı regüle edilmiş ve zayıf metastazsız sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Cai ve ark. 2013). Çalışmada, luminal A tipine göre daha agresif ve daha yüksek proliferasyon hızına sahip olan luminal B tip hastalarında miR-374a'nın yukarı regülasyonunda anlamlılık saptanması, bu grup hastalarda ilgili miRNA'nın erken metastatik meme kanseri için terapötik bir hedefi temsil edebileceği düşünülebilir.

Tüm veriler bir araya getirilerek değerlendirildiğinde, miR-31 ve miR-150-3p miRNA'ları meme kanseri prognozu ve metastaz oluşumunun önemli birer belirleyicisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bilgi, klinik anlamda hastanın takip ve tedavisine etki

etme potansiyeli bulunan yararlı bir bilgidir ve bu bilgiyi destekleyecek daha fazla sayıda örnek ve miRNA'yı kapsayan çalışmalar yapılması uygun olacaktır. Bununla birlikte, ılımlı (luminal A ve B) ve agresif (HER2(+) ve TNBC) meme kanserlerinin ayırımında prediktif ve prognostik potansiyeli olan miR-200c ve miR-27a'nın ümit verici yeni birer terapötik aday olarak kullanılabilceği düşünölmektedir. Araştırmadan elde edilen bulgular, gerçekleştirilmesi planlanan ileri fonksiyonel çalışmalara yol göstericidir. Bu bağlamda çalışma çıktılarının gerçekleştirilmesi, ulusal ve/veya uluslararası literatüre yapacağı katkı açısından oldukça değerli olacaktır. İlgili miRNA'ların klinik kullanıma girebilmesi için bu konuda daha fazla sayıda ve uzun takipli çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abel, E.V., Kim, E.J., Wu, J., Hynes, M., Bednar, F., Proctor, E., Wang, L., Dziubinski, M.L., Simeone, D.M. 2014. The Notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PLoS One*, 9(3): 91-98.
- Adhami, M., Haghdoost, A.A., Sadeghi, B., Malekpour, Afshar R. 2018. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer*, 25(2): 198-205.
- Ajani, J.A., Song, S., Hochster, H.S., Steinberg, I.B. 2015. Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol*, 42(1): 3-17.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100(7): 3983-3988.
- Alimirah, F., Peng, X., Gupta, A., Yuan, L., Welsh, J., Cleary, M., Mehta, R.G. 2016. Crosstalk between the vitamin D receptor (VDR) and miR-214 in regulating SuFu, a hedgehog pathway inhibitor in breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 349(1): 15-22.
- Allison, K.H. 2012. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *Am J Clin Pathol*, 138(6): 770-780.
- Ames, B.N., Gold, L.S., and Willett, W.C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12): 5258-5265.
- Anderson, W.F., Rosenberg, P.S., Prat, A., Perou, C.M., Sherman, M.E. 2014. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst*, 106(8): 165-172.
- Anonim, 2018. World Health Statistics. Monitoring health for the SDGs. [https://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2018/en/](https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/).
- Anothaisintaweei, T., Wiratkapun, C., Lerdsitthichai, P., Kasamesup, V., Wongwaisayawan, S., Srinakaran, J., Hirunpat, S., Woodtichartpreecha, P., Boonlikit, S., Teerawattananon, Y., Thakkinstian, A. 2013. Risk factors of breast cancer: a systematic review and metaanalysis. *Asia Pac J Publ Health*, 25(5): 368-387.
- Asano, Y., Kashiwagi, S., Goto, W., Takada, K., Takahashi, K., Morisaki, T., Fujita, H., Takashima, T., Tomita, S., Ohsawa, M., Hirakawa, K., Ohira, M. 2018. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. *J Transl Med*, 16(1): 87-94.
- Ashby, J., Flack, K., Jimenez, L.A., Duan, Y., Khatib, A.K., Somlo, G., Wang, S.E., Cui, X., Zhong, W. 2014. Distribution profiling of circulating microRNAs in serum. *Anal Chem*, 86(18): 9343-9349.
- Augoff, K., Das, M., Bialkowska, K., McCue, B., Plow, E.F., Sossey-Alaoui, K. 2011. miR-31 is a broad regulator of  $\beta$ 1-integrin expression and function in cancer cells. *Mol Cancer Res*, 9(11): 1500-1508.
- Baffa, R., Fassan, M., Volinia, S., O'Hara, B., Liu, C.G., Palazzo, J.P., Gardiman, M., Rugge, M., Gomella, L.G., Croce, C.M., Rosenberg, A. 2009. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol*, 219(2): 214-221.

- Bahena-Ocampo, I., Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Lizarraga, F., Campos-Arroyo, D., Schwarz, A., Garcia-Lopez, P., Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J. 2016.** miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation. *EMBO Rep*, 17(5): 648-658.
- Balko, J.M., Giltneane, J.M., Wang, K., Schwarz, L.J., Young, C.D., Cook, R.S., Owens, P., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Sánchez, V., Kurupi, R., Moore, P.D., Pinto, J.A., Doimi, F.D., Gómez, H., Horiuchi, D., Goga, A., Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Pietenpol, J.A., Ross, J.S., Palmer, G.A., Yelensky, R., Cronin, M., Miller, V.A., Stephens, P.J., Arteaga, C.L. 2014.** Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov*, 4(2): 232-245.
- Barnard, M.E., Boeke, C.E., Tamimi, R.M. 2015.** Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta*, 1856(1): 73-85.
- Bartel, D.P. 2009.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215-233.
- Baylin, S.B., Jones, P.A. 2011.** A decade of exploring the cancer epigenome biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 11(10): 726-734.
- Bertoli, G., Cava, C., Castiglioni, I. 2015.** MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10): 1122-1143.
- Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., Gianni, L. 2016.** Triple negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(11): 674-690.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., Terzis, A.J A. 2005.** The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5(11): 899-904.
- Boidot, R., Végran, F., Jacob, D., Chevrier, S., Cadouot, M., Feron, O., Solary, E., Lizard-Nacol, S. 2010.** The transcription factor GATA-1 is overexpressed in breast carcinomas and contributes to survivin upregulation via a promoter polymorphism. *Oncogene*, 29(17): 2577-2584.
- Boman, B.M., Wicha, M.S. 2008.** Cancer stem cells: a step toward the cure. *J Clin Oncol*, 26(17): 2795-2799.
- Bonetti, P., Climent, M., Panebianco, F., Tordonato, C., Santoro, A., Marzi, M.J., Pelicci, P.G., Ventura, A., Nicassio, F. 2019.** Dual role for mir-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer. *Oncogene*, 38(3): 360-374.
- Bonnet, D., Dick, J.E. 1997.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7): 730-737.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L. 2006.** RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1097-1101.
- Bray, F., Moller, B. 2006.** Predicting the future burden of cancer. *Nature Rev Cancer*, 6 (1): 63-74.
- 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 Oncol*, 13(8): 790-801.

**Cai, J., Guan, H., Fang, L., Yang, Y., Zhu, X., Yuan, J., Wu, J., Li, M. 2013.** MicroRNA-374a activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest*, 123(2): 566-579.

**Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. 2002.** Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 299(24): 15524-15529.

**Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce CM. 2004.** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(9): 2999-3004.

**Calin, G.A., Croce, C.M. 2006.** MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11): 857-866.

**Camps, C., Buffa, F.M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., Harris, A.L., Gleadle, J.M., Ragoussis, J. 2008.** hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1(14): 1340-1348.

**Cao, M., Nie, W., Li, J., Zhang, Y., Yan, X., Guan, X., Chen, X., Zen, K., Zhang, C.Y., Jiang, X., Hou, D. 2014.** MicroRNA-495 induces breast cancer cell migration by targeting JAM-A. *Protein Cell*, 5(11): 862-872.

**Castoria, G., Giovannelli, P., Lombardi, M., Rosa, C.D., Giraldi, T., Falco, A.D., Barone, M.V., Abbondanza, C., Migliaccio, A., Auricchio, F. 2012.** Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene*, 31(46): 4868-4877.

**Catto, J.W., Miah, S., Owen, H.C., Bryant, H., Myers, K., Dudzic, E., Larre, S., Milo, M., Rehman, I., Rosario, D.J.; Martino, D., Knowles, M.A., Meuth, M., Harris, A.L., Hamdy, F.C. 2009.** Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*, 69(21): 8472-8481.

**Cha, S.T., Chen, P.S., Johansson, G., Chu, C.Y., Wang, M.Y., Jeng, Y.M., Yu, S.L., Chen, J.S., Chang, K.J., Jee, S.H., Tan, C.T., Lin, M.T., Kuo, M.L. 2010.** MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 70(7): 2675-2685.

**Charafe-Jaufret, E., Ginestier, C., Bertucci, F. 2013.** ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res*, 73(24): 7290-7300.

**Chao, C.H., Chang, C.C., Wu, M.J., Ko, H.W., Wang, D., Hung, M.C., Yang, J.Y., Chang, C.J. 2014.** MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis. *J Clin Invest*, 124(7): 3093-3106.

**Chen, D., Dang, B.L., Huang, J.Z., Chen, M., Wu, D., Xu, M.L., Li, R., Yan, G.R. 2015.** MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-TXNIP-HIF1 $\alpha$ -TWIST signaling axis in breast cancer. *Oncotarget*, 6(32): 32701-32712.

**Chiba, S. 2006.** Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells*, 24(11): 2437-2447.

**Choi, H.J., Joo, H.S., Won, H.Y. 2018.** Role of RBP2-induced ER and IGF1R-ErbB signaling in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 110(4): 207-211.

**Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D L., Wahl, G.M. 2006.** Cancer stem cells—Perspectives on current status and future

directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19): 9339-9344.

**Clement, V., Sanchez, P., Tribolet, N., Radovanovic, I., Altaba, A.R. 2007.** HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, 17(2):165-172.

**Clevers, H. 2011.** The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3): 313-319.

**Clevers, H., Loh, K.M., Nusse, R. 2014.** Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 346(6205): 124-128.

**Cliffton, E.E., Young, L.E. 1951.** Carcinoma of the breast; five to twenty-year follow-up following radical mastectomy. *Am J Surg*, 82(2): 185-190.

**Cochrane, C., Szczepny, A., Watkins, D., Cain, J. 2015.** Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*, 7(3): 1554-1585.

**Colavito, S.A., Zou, M.R., Yan, Q., Nguyen, D.X., Stern, D.F. 2014.** Significance of glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) expression in claudin-low breast cancer and crosstalk with the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF\_κB) pathway. *Breast Cancer Res*, 16(5): 444-450.

**Colditz, G.A., Kaphingst, K.A., Hankinson, S.E., Rosner, B. 2012.** Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res Treat*, 133(3): 1097-1104.

**Collina, F., Di Bonito, M., Li Bergolis, V. 2015.** Prognostic value of cancer stem cells markers in triple-negative breast cancer. *Biomed Res Int*, 2015:158682.

**Collins, L.C., Baer, H.J., Tamimi, R.M., Connolly, J.L., Colditz, G.A., Schnitt, S.J. 2006.** The influence of family history on breast cancer risk in women with biopsy-confirmed benign breast disease: results from the Nurses. *Health Study Cancer*, 107(6): 1240-1247.

**Condrat, C.E., Thompson, D.C., Barbu, M.G., Bugnar, O.L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S.M., Voinea, S.C. 2020.** miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, 9(2): 276.

**Costa, R., Shah, A.N., Santa-Maria, C.A. 2017.** Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in triple negative breast cancer: new discoveries and practical insights for drug development. *Cancer Treat Rev*, 53: 111-119.

**Croce, C.M., Calin, G.A. 2005.** miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 122(1): 6-7.

**Cunningham, H.D., Shannon, L.A., Calloway, P.A., Fassold, B.C., Dunwiddie, I., Vielhauer, G., Zhang, M., Vines, C.M. 2010.** Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice. *Transl Oncol*, 3(6): 354-361.

**Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F. 2012.** The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403): 346-352.

**Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., Shi, B. 2015.** Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*, 5(10), 2929-2943.

**Das, P.K., AbdurRakib, M., Khanam, J.A., Pillai, S., Islam, F. 2019.** Novel therapeutics against breast cancer stem cells by targeting surface markers and signaling pathways. *Curr Stem Cell Res Ther*, 14(8): 669-682.

- Das, P.K., Zahan, T., AbdurRakib, M., Khanam, J.A., Pillai, S., Islam, F. 2019.** Natural compounds targeting cancer stem cells: a promising resource for chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 19(15): 1796-1808.
- Das, P.K., Siddika, A., Asha, S.Y., Aktar, S., Rakib, A., Khanam, J.A., Pillai, S., Islam F. 2020.** MicroRNAs, a Promising Target for Breast Cancer Stem Cells. *Mol Diagn Ther*, 24(1): 69-83.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., von Minckwitz, G. 2017.** Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet*, 389(10087): 2430-2442.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E. 2006.** Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*, 38(9):1060-1065.
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A. 2012.** Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414): 101-108.
- Dong, Y., Zhang, N., Zhao, S., Chen, X., Li, F., Tao, X. 2019.** miR-221-3p and miR-15b-5p promote cell proliferation and invasion by targeting Axin2 in liver cancer. *Oncol Lett*, 18(6): 6491-6500.
- Drago-Ferrante, R., Pentimalli, F., Carlisi, D. 2017.** Suppressive role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation. *Oncotarget*, 8(17): 28939-289358.
- Dupont, W.D., Page, D.L. 1985.** Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*, 312(3): 146-151.
- Duru, N., Fan, M., Candas, D., Mena, C., Liu, H.C., Nantajit, D., Li, J.J. 2012.** HER2 associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2 negative breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 18(24): 6634-6647.
- El, H.R., Pinna, G., Cabaud, O. 2017.** miR-600 acts as a bimodal switch that regulates breast cancer stem cell fate through WNT signaling. *Cell Rep*, 18(9): 2256-2268.
- Elkon, R., Agami, R. 2017.** Characterization of noncoding regulatory DNA in the human genome. *Nat Biotechnol*, 35(8): 732-746.
- Fabbri, M., Croce, C.M., Calin, G.A. 2008.** MicroRNAs. *Cancer J*, 14(1):1-6.
- Fan, X., Chen, W., Fu, Z., Zeng, L., Yin, Y., Yuan, H. 2017.** MicroRNAs, a subpopulation of regulators, are involved in breast cancer progression through regulating breast cancer stem cells (Review). *Oncology Letters*, 14(5): 5069-5076.
- Feliciano, A., Castellvi, J., Artero-Castro, A., Leal, J.A., Romagosa, C., Hernández-Losa, J., Peg, V., Fabra, A., Vidal, F., Kondoh, H., Ramón, Y., Cajal, S., Leonart, M.E. 2013.** miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9. *PLoS One*, 8(10): e76247.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X. 2018.** Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*, 5(2):77-106.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M. 2019.** Global Cancer Observatory: cancer tomorrow: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Lyon. 2019.
- Figueiredo, M.I., Cullen, J., Hwang, Y.T., Rowland, J.H., Mandelblatt, J.S. 2004.** Breast cancer treatment in older women: does getting what you want improve your long-term body image and mental health? *J Clin Oncol*, 22(19): 4002-4009.

**Fish, J.E., Santoro, M.M., Morton, S.U., Yu, S., Yeh, R.F., Wythe, J.D. 2008.** miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, 15(2): 272-284.

**Flanagan, L., Kehoe, J., Fay, J., Bacon, O., Lindner, A.U., Kay, E.W., Deasy, J., McNamara, D.A., Prehn, J.H. 2015.** High levels of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP) are indicative of radio chemotherapy resistance in rectal cancer. *Radiat Oncol*, 10:131.

**Foekens, J.A., Sieuwerts, A.M., Smid, M., Look, M.P., de W, V. 2008.** Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptorpositive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2;105(35): 13021-13026.

**Furth, J., Kahn, M.C., Breedis, C. 1937.** The transmission of leukemia of mice with a single cell. *American Journal of Cancer*, 31(2): 276-282.

**Ginestier, C, Hur, MH, Charafe-Jauffret, E, Monville, F, Dutcher, J, Brown, M, Jacquemier, J, Viens, P, Kleer, CG, Liu, S. 2007.** ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5): 555-567.

**Gjerdrum, C., Tiron, C., Hoiby, T., Stefansson, I., Haugen, H., Sandal, T., Lorens, J.B. 2010.** Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3): 1124-1129.

**Gupta, P.B., Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. 2009.** Cancer stem cells: Mirage or reality? *Nat Med*, 15(9): 1010-1012.

**Ha, M., Kim, V.N. 2014.** Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(8): 509-524.

**Han, M., Wang, Y., Liu, M., Bi, X., Bao, J., Zeng, N., Zhu, Z., Mo, Z., Wu, C., Chen, X. 2012.** MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in thirdsphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci*, 103(6): 1058-1064.

**Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

**Hartmann, L.C., Sellers, T.A., Frost, M.H. 2005.** Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 353(3): 229-237.

**He, Y., Lin, J., Kong, D., Huang, M., Xu, C., Kim, T.K., Etheridge, A., Luo, Y., Ding, Y., Wang, K. 2015.** Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clin Chem*, 61(9), 1138-1155.

**Holland, J.D., Klaus, A., Garratt, A.N. 2013.** Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 25(2): 254-264.

**Holleczek, B.A.V., Stegmaier, C., Brenner, H. 2011.** Trends in breast cancer survival in Germany from 1976 to 2008—a period analysis by age and stage. *Cancer Epidemiol*, 35(5): 399-406.

**Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G. 2013.** Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13(10): 714-726.

**Hosseinali, N., Aghapour, M., Duijf, P.H.G., Baradaran, B. 2018.** Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8): 5574-5588.

**Howell, A., Anderson, A.S., Clarke, R.B. 2014.** Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 16(5): 446.

**Hsieh, T.H., Hsu, C.Y., Tsai, C.F., Long, C.Y., Wu, C.H., Wu, D.C., Lee, J.N., Chang, W.C., Tsai, E.M. 2015.** HDAC inhibitors target HDAC5, upregulate



microRNA-125a-5p, and induce apoptosis in breast cancer cells. *Mol Ther*, 23(4): 656-666.

**Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M. 2008.** The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*, 10(2): 202-210.

**Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T. 2009.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 69(8): 3382-3389.

**Huang, Q.D., Zheng, S.R., Cai, Y.J., Chen, D.L., Shen, Y.Y., Lin, C.Q., Hu, X.Q., Wang, X.H., Shi, H., Guo, G.L. 2018.** Imp3 promotes tnbc stem cell property through mirna-34a regulation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(9): 2688-2696.

**Huebner, R.J., Ewald, A.J. 2014.** Cellular foundations of mammary tubulogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 31: 124-131.

**Hulka, B.S. 1996.** Epidemiology of susceptibility to breast cancer. *Prog Clin Biol Res*, 395: 159-174.

**Hutchin, M.E., Kariapper, M.S., Grachtchouk M. 2005.** Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev*, 19(2): 214-223.

**Hwang, M.S., Yu, N., Stinson, S.Y. 2013.** miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One*, 8(6): e66502.

**Incassati, A., Chandramouli, A., Eelkema, R. 2010.** Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast Cancer Res*, 12(6): 213.

**Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S. 2005.** MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65(16): 7065-7070.

**Iorio, M.V., Casalini, P., Piovan, C., Di Leva, G., Merlo, A., Triulzi, T. 2009.** microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res*, 69(6): 2195-2200.

**Iorio, M.V., Croce, C.M. 2009.** microRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*, 27(34): 5848-5856.

**Iorio, M.V., Casalini, P., Piovan, C., Braccioli, L., Tagliabue, E. 2011.** Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*, 20(3): 63-70.

**Islam, F., Qiao, B., Smith, R.A., Gopalan, V., Lam, A.K.Y. 2015.** Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2): 184-191.

**Isobe, T., Hisamori, S., Hogan, D.J., Zabala, M., Hendrickson, D.G., Dalerba, P., Cai, S., Scheeren, F., Kuo, A.H., Sikandar, S.S., Lam, J.S., Qian, D., Dirbas, F.M., Somlo, G., Lao, K., Brown, P.O., Clarke, M.F., Shimono, Y. 2014.** miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. *Elife*, 3: e01977.

**Iyer, MK, Niknafs, YS, Malik, R. 2015.** The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*, 47(3): 199-208.

**Janakiraman, H., House, R.P., Gangaraju, V.K., Diehl, J.A., Howe, P.H., Palanisamy, V. 2018.** The long (lncRNA) and short (miRNA) of it: TGFbeta-mediated control of RNA-binding proteins and noncoding RNAs. *Mol Cancer Res*, 16(4): 567-579.

**Jang, G.B., Kim, J.Y., Cho, S.D. 2015.** Blockade of Wnt/beta-catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci Rep*, 5: 12465.

- Jiang, S., Zhang, H.W., Lu, M.H., He, X.H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.F., Wang, E.D. 2010.** MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*, 70(8): 3119-3127.
- Kahn, M. 2014.** Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*, 13(7): 513-532.
- Kai, K., Dittmar, R.L., Sen, S. 2018.** Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 78: 22-36.
- Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P., Staroslawska, E. 2015.** Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*, 14(3): 196e202.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F. 2013.** Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471): 333-339.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordón-Cardo, C., Massagué, J. 2003.** A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6): 537-549.
- Kang, L., Mao, J., Tao, Y. 2015.** MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci*, 106(6): 700-708.
- Karakas, D., Cevatemre, B., Ulukaya, E. 2014.** Cancer stem cells: emerging actors in both basic and clinical cancer research. *Turkish Journal of Biology*, 38(6): 829-838.
- Karamboulas, C., Ailles, L. 2013.** Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta*, 1830(2): 2481-2495.
- Kaur, S., Gupta, S., Chaudhary, M., Khursheed, M.A., Mitra, S., Kurup, A.J., Ramachandran, R. 2018.** let-7 MicroRNA-Mediated Regulation of Shh Signaling and the Gene Regulatory Network Is Essential for Retina Regeneration. *Cell Rep*, 23(5): 1409-1423.
- Kim, S.J., Shin, J.Y., Lee, K.D., Bae, Y.K., Sung, K.W., Nam, S.J., Chun, K.H. 2012.** MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Research*, 14(1): 14-28.
- Klinge, C.M. 2018.** Non-Coding RNAs in Breast Cancer: Intracellular and Intercellular Communication. *Noncoding RNA*, 4(4): 40.
- Koshizuka, K., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Katada, K., Okato, A., Arai, T., Idichi, T., Osako, Y., Okamoto, Y., Seki, N. 2018.** Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 45(4): 854-865.
- Körner, C., Keklikoglou, I., Bender, C., Wörner, A., Münstermann, E., Wiemann, S. 2013.** MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon). *J Biol Chem*, 288(12): 8750-8761.
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. 2010.** The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11(9): 597-610.
- Kwak, P.B., Iwasaki, S., Tomari, Y. 2010.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, 101(11): 2309-2315.
- Kwak, P.B., Tomari, Y. 2012.** The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 19(2): 145-151.
- Lan, H., Lu, H., Wang, X., Jin, H. 2015.** MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. *Biomed Res Int*, 2015, 125094.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulton, J., Wainscoat, J.S. 2008.** Detection of

elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141(5): 672-675.

**Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J. 2003.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956): 415-419.

**Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. 2004.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20): 4051-4060.

**Leeman, R.J., Lui, V.W.Y., Grandis, J.R. 2006.** STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 6(3): 231-241.

**Letai, A.G. 2008.** Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8(2): 121-132.

**Li, X., Lewis, M.T., Huang, J. 2008.** Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 100(9): 672-679.

**Li, L., Xiao, B., Tong, H., Xie, F., Zhang, Z., Xiao, G.G. 2012.** Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. *Expert Rev Proteomics*, 9(6): 615-625.

**Li, Q., Zhu, F., Chen, P. 2012.** miR-7 and miR-218 epigenetically control tumor suppressor genes RASSF1A and Claudin-6 by targeting HoxB3 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(1): 28-33.

**Li, Q., Yao, Y., Eades, G., Liu, Z., Zhang, Y., Zhou, Q. 2014.** Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer. *Oncogene*, 33(20): 2589-2600.

**Li, B., Lu, Y., Wang, H. 2016.** miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway. *Biomed Pharmacother*, 79: 93-101.

**Li, B., Lu, Y., Yu, L., Han, X., Wang, H., Mao, J., Shen, J., Wang, B., Tang, J., Li, C. 2017.** Mir-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting pten and sustained akt/nf-kappaB/cox-2 activation. *Chem Biol Interact*, 277: 33-42.

**Li, C.Y., Miao, K.L., Chen, Y., Liu, L.Y., Zhao, G.B., Lin, M.H., Jiang, C. 2018.** Jagged2 promotes cancer stem cell properties of triple negative breast cancer cells and paclitaxel resistance via regulating micro-RNA-200. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(18): 6008-6014.

**Liberman, L., Bonaccio, E., Hamele-Bena, D., Abramson, A.F., Cohen, M.A., Dershaw, D.D. 1996.** Benign and malignant phyllodes tumors: mammographic and sonographic findings. *Radiology*, 198(1): 121-124.

**Lin, S., Gregory, R.I. 2015.** MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(6): 321-333.

**Lin, X., Chen, W., Wei, F., Zhou, B.P., Hung, M.C., Xie, X. 2017.** Nanoparticle delivery of mir-34a eradicates long-term-cultured breast cancer stem cells via targeting c22orf28 directly. *Theranostics*, 7(19): 4805-4824.

**Lindvall, C., Evans, N.C., Zylstra, C.R. 2006.** The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 281(46): 35081-35087.

**Liu, S., Clouthier, S.G., Wicha, M.S. 2012.** Role of microRNAs in the regulation of breast cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 17(1): 15-21.

**Liu, F., Liu, Y., Shen, J., Zhang, G., Han, J. 2016.** MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating Fizzled 5 expression. *Oncotarget*, 7(31): 49130-49142.

- Liu, B., Du, R., Zhou, L., Xu, J., Chen, S., Chen, J., Yang, X., Liu, D.X., Shao, Z.M., Zhang, L., Yu, Z., Xie, N., Guan, J.L., Liu, S. 2018.** miR-200c/141 regulates breast cancer stem cell heterogeneity via targeting HIPK1/ $\beta$ -catenin axis. *Theranostics*, 8(21): 5801-5813.
- Lo, P.K., Wolfson, B., Zhou, X., Duru, N., Gernapudi, R., Zhou, Q. 2016.** Noncoding RNAs in breast cancer. *Brief Funct Genomics*, 15(3): 200-221.
- Lou, W., Liu, J., Ding, B., Jin, L., Xu, L., Li, X., Chen, J., Fan, W. 2019.** Five miRNAs-mediated PIEZO2 downregulation, accompanied with activation of Hedgehog signaling pathway, predicts poor prognosis of breast cancer. *Aging (Albany NY)*, 11(9): 2628-2652.
- Luo, L.J., Yang, F., Ding, J.J., Yan, D.L., Wang, D.D., Yang, S.J., Ding, L., Li, J., Chen, D., Ma, R., Wu, J.Z., Tang, J.H. 2016.** miR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer. *Gene*, 594(1): 47-58.
- Lv, C., Li, F., Li, X., Tian, Y., Zhang, Y., Sheng, X., Song, Y. 2017.** MiR-31 promotes mammary stem cell expansion and breast tumorigenesis by suppressing Wnt signaling antagonists. *Nat Commun*, 8(1): 1036.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Weinberg, R.A. 2007.** Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449(7163): 682-688.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F. 2010.** miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 12(3): 247-256.
- Macias, H., Hinck, L. 2012.** Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1(4): 533-557.
- Magee, J.A., Piskounova, E., Morrison, S.J. 2012.** Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3): 283-296.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D. 2008.** Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, 452(7187): 650-653.
- Mandujano-Tinoco, E.A., Garcia-Venzor, A., Muñoz-Galindo, L., Lizarraga-Sanchez, F., Favela-Orozco, A., Chavez-Gutierrez, E. 2017.** miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(10): 1642-1655.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R.A. 2008.** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4): 704-715.
- Marotti, J.D., de Abreu, F.B., Wells, W.A., Tsongalis, G.J. 2017.** Triple negative breast cancer: next-generation sequencing for target identification. *Am J Pathol*, 187(10): 2133-2138.
- Mayoral-Varo, V., Calcabrini, A., Sanchez-Bailon, M.P., Martin-Perez, J. 2017.** Mir205 inhibits stem cell renewal in sum159pt breast cancer cells. *PLoS ONE*, 12(11): e0188637.
- McTiernan, A. 2003.** Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist*, 8(4): 326-334.
- Meijer, H.A., Smith, E.M., Bushell, M. 2014.** Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? *Biochem Soc Trans*, 42(4): 1135-1140.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S. 2009.** Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10(3): 155-159.

- Merchant, A.A., Matsui, W. 2010.** Targeting Hedgehog—a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*, 16(12): 3130-3140.
- Meseure, D., Drak Alsibai, K., Nicolas, A., Bieche, I., Morillon, A. 2015.** Long noncoding RNAs as new architects in cancer epigenetics, prognostic biomarkers, and potential therapeutic targets. *BioMed Res Int*, 2015: 320214.
- Milevskiy, M.J.G., Gujral, U., Del Lama Marques, C., Stone, A., Northwood, K., Burke, L.J., Gee, J.M.W., Nephew, K., Clark, S., Brown, M.A. 2019.** MicroRNA-196a is regulated by ER and is a prognostic biomarker in ER+ breast cancer. *Br J Cancer*, 120(6): 621-632.
- Miller, T.E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C.L., Jacob, S., Majumder, S. 2008.** MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, 283(44): 29897-29903.
- Mitra, A., Rostas, J.W., Dyess, D.L., Shevde, L.A., Samant, R.S. 2012.** Micro-RNA-632 downregulates DNAJB6 in breast cancer. *Lab Invest*, 92(9): 1310-1317.
- Mohammadi-Yeganeh, S., Mansouri, A., Paryan, M. 2015.** Targeting of miR9/NOTCH1 interaction reduces metastatic behavior in triple-negative breast cancer. *Chem Biol Drug Des*, 86(5): 1185-1191.
- Muhammad, N., Bhattacharya, S., Steele, R., Ray, R.B. 2016.** Anti-miR-203 suppresses ER-positive breast cancer growth and stemness by targeting SOCS3. *Oncotarget*, 7(36): 58595-58605.
- Mulrane, L., Gallagher, W.M., O'Connor, D.P. 2014.** A novel mechanism of regulation of the anti-metastatic miR-31 by EMSY in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 16(6): 467.
- Nakagawa, S., Kageyama, Y. 2014.** Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3): 215-222.
- Nakanishi, T., Ross, D.D. 2012.** Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer*, 31(2): 73-99.
- O'Bryan, S., Dong, S., Mathis, J.M., Alahari, S.K. 2017.** The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. *Eur J Cancer*, 72: 1-11.
- Okato, A., Arai, T., Kojima, S., Koshizuka, K., Osako, Y., Idichi, T., Kurozumi, A. 2017.** Dual strands of pre-miR-150 (miR-150-5p and miR-150-3p) act as antitumor miRNAs targeting SPOCK1 in naïve and castration-resistant prostate cancer. *Int J Oncol*, 51(1): 245-256.
- Ojha, R., Bhattacharyya, S., Singh, S. K. 2015.** Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis. *BioResearch Open Access*, 4(1): 97-108.
- Osako, Y., Seki, N., Koshizuka, K., Okato, A., Idichi, T., Arai, T. 2017.** Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*, 62(11): 935-944.
- Ota, D., Mimori, K., Yokobori, T., Iwatsuki, M., Kataoka, A., Masuda, N. 2011.** Identification of recurrence-related microRNAs in the bone marrow of breast cancer patients. *Int J Oncol*, 38(4): 955-962.
- Özbilgin, M.K., Gareveran, M.S. 2016.** Kanser ve Metastaz Gelişiminde Mikroçevre. *Türkiye Klinikleri Radyasyon Onkolojisi - Özel Konular*, 2(1): 56-64.
- Pandya, S., and Moore, R.G. 2011.** Breast development and anatomy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(1): 91-95.

- Park, B. K., Zhang, H., Zeng, Q., Dai, J., Keller, E.T., Giordano, T., Wang, C.Y. 2007.** NF- $\kappa$ B in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nature Medicine*, 13(1): 62-69.
- Patterson, R.E., Cadmus, L.A., Emond, J.A., Pierce, J.P. 2010.** Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: a review of the epidemiologic literature. *Maturitas*, 66(1): 5-15.
- Peacock, C.D., Wang, Q., Gesell, G.S. 2007.** Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10): 4048-4053.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B. 2000.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797): 747-752.
- Perrone, G., Gaeta, L.M., Zagami, M., Nasorri, F., Coppola, R., Borzomati, D., Muda, A.O. 2012.** In situ identification of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> cancer cells in primary human breast carcinomas. *PLoS One*, 7(9): e43110.
- Peterson, S.C., Eberl, M., Vagnozzi, A.N. 2015.** Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Stem Cell*, 16(4): 400-412.
- Petrova, R., Joyner, A.L. 2014.** Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*, 141(18): 3445-3457.
- Piasecka, D., Braun, M., Kordek, R., Sadej, R., Romanska, H. 2018.** Micro-RNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144(8): 1401-1411.
- Piggott, L., da Silva, A.M., Robinson, T., Santiago-Gómez, A., Simões, B.M., Becker, M., Fichtner, I., Andera, L., Piva, M., Vivanco, M.D. 2018.** Acquired resistance of ER-positive breast cancer to endocrine treatment confers an adaptive sensitivity to TRAIL through post-translational downregulation of c-FLIP. *Clin Cancer Res*, 24(10), 2452-2463.
- Pham, P.V., Phan, N.L., Nguyen, N.T. 2011.** Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *J Transl Med*, 9: 209.
- Png, K.J., Yoshida, M., Zhang, X.H., Shu, W., Lee, H., Rimner, A. 2011.** MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev*, 25(3): 226-231.
- Polakis, P. 2012.** Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5): a0008052.
- Polyak, K. 2007.** Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 117(11): 3155-3163.
- Ponti, D., Zaffaroni, N., Capelli, C., & Daidone, M. G. 2006.** Breast cancer stem cells: An overview. *European Journal of Cancer*, 42(9): 1219-1224.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O. 2010.** Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12(5):R68.
- Pulvirenti, T., Van Der Heijden, M., Droms, L.A. 2011.** Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer Res*, 71(23): 7280-7290.
- Qi, L., Bart, J., Tan, L.P., Platteel, I., Sluis, T.V., Huitema, S., Harms, G., Fu, L., Hollema, H., Berg, A.V. 2009.** Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer*, 9: 163.

- Qian, B., Katsaros, D., Lu, L., Preti, M., Durando, A., Arisio, R., Mu, L., Yu, H. 2009.** High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat*, 117(1): 131-140.
- Qin, J.J., Yan, L., Zhang, J., Zhang, W.D. 2019.** STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1): 195.
- Qu, H., Xu, W., Huang, Y., Yang, S. 2011.** Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(5): 1117-1125.
- Ranganathan, P., Weaver, K.L., Capobianco, A.J. 2011.** Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*, 11: 338-351.
- Rao, X., Di, L.G., Li, M., Fang, F., Devlin, C., Hartman-Frey, C. 2011.** MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene*, 30(9): 1082-1097.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E. 2000.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901.
- Ren, Y.Q., Fu, F., Han, J. 2015.** Mir-27a modulates radiosensitivity of triple-negative breast cancer (tnbc) cells by targeting *cdc27*. *Med Sci Monit*, 21: 1297-1303.
- Roscigno, G., Puoti, I., Giordano, I., Donnarumma, E., Russo, V. 2017.** MiR-24 induces chemotherapy resistance and hypoxic advantage in breast cancer. *Oncotarget*, 8(12): 19507-19521.
- Rosso, S.G.A., Zanetti, R., Bray, F., Zakej, M., Zagar, T. 2010.** Up-to-date estimates of breast cancer survival for the years 2000–2004 in 11 European countries: the role of screening and a comparison with data from the United States. *Eur J Cancer*, 46: 3351-3357.
- Ru, P., Steele, R., Hsueh, E.C., Ray, R.B. 2011.** Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 Expression in Breast Cancer Cells and Enhances Cisplatin Chemosensitivity. *Genes Cancer*, 2: 720-727.
- Sankaranarayanan, R.S.R., Brenner, H., Chen, K., Chia, K.S., Chen, J.G. 2010.** Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study. *Lancet Oncol*, 11: 165-173.
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C. 2015.** Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 33(17): 1889-1894.
- Scheel, C., Weinberg, R.A. 2012.** Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. *In Seminars in Cancer Biology*, 22(5): 396-403.
- Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N. 2008.** MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299(4): 425-436.
- Schmittgen, T.D. 2010.** miR-31: a master regulator of metastasis? *Future Oncol*, 6(1): 17-20.
- Schwarzenbacher, D., Balic, M., Pichler, M. 2013.** The role of microRNAs in breast cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14712-14723.
- Schwarzenbach, H.; Nishida, N.; Calin, G.A.; Pantel, K. 2014.** Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(3): 145-156.

**Scott, G.K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C.E., Sullivan, C.S., Benz, C.C. 2007.** Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*, 282(2): 1479-1486.

**Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J. 2006.** Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072): 84-88.

**Shen, J., Stass, S.A., Jiang, F. 2013.** MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett*, 329(2): 125-136.

**Shi, W. 2019.** Construction of prognostic microRNA signature for human invasive breast cancer by integrated analysis. *Oncotargets Ther*, 12: 1979-2010.

**Shimono, Y., Mukohyama, J., Nakamura, S.I. 2015.** MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. *J Clin Med*, 5(1): 2.

**Shu, S., Lin, C.Y., He, H.H. 2016.** Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature*, 529(7586): 413-417.

**Singh, A., Settleman, J. 2010.** EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34): 4741-4751.

**Smith, A.L., Iwanaga, R., Drasin, D.J., Micalizzi, D.S. 2012.** The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- $\beta$  signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene*, 31(50): 5162-5171.

**Song, C, Liu, LZ, Pei, XQ, Liu, X, Yang, L. 2015.** miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget*, 6(33): 34968-34978.

**Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani R. 2001.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(19): 10869-10874.

**Sotiriou, C., Wirapati, P., Loi, S. 2006.** Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 98(4): 262-272.

**Stinson, S., Lackner, M.R., Adai, A.T. 2011.** miR-221/222 targeting of trichorhinophalangeal 1 (TRPS1) promotes epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal*, 4(186): pt5.

**Stone, A., Zotenko, E., Locke, W.J. 2015.** DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. *Nat Commun*, 6: 7758.

**Sun, X., Li, Y., Zheng, M., Zuo, W., Zheng, W. 2016.** MicroRNA-223 increases the sensitivity of triple-negative breast cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis by targeting HAX-1. *PLoS One*, 11(9): e0162754.

**Sun, X., Xu, C., Xiao, G., Meng, J., Wang, J., Tang, S.C., Qin, S., Du, N., Li, G., Ren, H. 2018.** Breast cancer stem-like cells are sensitized to tamoxifen induction of self-renewal inhibition with enforced let-7c dependent on wnt blocking. *Int J Mol Med*, 41(4): 1967-1975.

**Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S. 2010.** Non-coding RNAs: Regulators of disease. *J Pathol*, 220(2): 126-139.

**Takahashi, R.U., Miyazaki, H., Ochiya, T. 2015.** The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers (Basel)*, 7(2): 598-616.

**Takahashi, R.U., Miyazaki, H., Takeshita, F., Yamamoto, Y., Minoura, K., Ono, M., Kodaira, M., Tamura, K., Mori, M., Ochiya, T. 2015.** Loss of microRNA-27b contributes to breast cancer stem cell generation by activating ENPP1. *Nat Commun*, 6: 7318.



- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., Ivy, S.P. 2011.** Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(2): 97-106.
- Takebe, N., Warren, R.Q., Ivy, S.P. 2011.** Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*, 13(3): 211.
- Takebe, N., Miele, L., Harris, P.J. 2015.** Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(8): 445-464.
- Tang, D.G. 2012.** Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res*, 22(3): 457-472.
- Tang, J., Ahmad, A., Sarkar, F.H. 2012.** The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis. *Int J Mol Sci*, 13(10): 13414-13437.
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., Zhao, J. 2015.** Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*, 72(2): 333-338.
- Taylor, C.R. 2019.** Introduction to Predictive Biomarkers: Definitions and Characteristics. In *Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine*; Badve, S., Kumar, G.L., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019, 3-18 pp.
- Teoh, S.L., Das, S. 2017.** The Role of MicroRNAs in Diagnosis, Prognosis, Metastasis and Resistant Cases in Breast Cancer. *Curr Pharm Des*, 23(12): 1845-1859.
- Torre, L.A., Siegel, R.L., Jacques, F., Joannie L.T., Ahmedin J. 2015.** Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2): 87-108.
- Trihia, H., Murray, S., Price, K., Gelber, R.D., Golouh, R., Goldhirsch, A., Coates, A.S., Collins, J., Castiglione-Gertsch, M., Gusterson, B.A. 2003.** Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters and other prognostic factors-a surrogate marker? *Cancer*, 97(5): 1321-1331.
- Troschel, F.M., Böhly, N., Borrmann, K., Braun, T., Schwickert, A., Kiesel, L. 2018.** miR-142-3p attenuates breast cancer stem cell characteristics and decreases radioresistance in vitro. *Tumour Biol*, 40(8): 1010428318791887.
- Tryggvadottir, L.G.M., Bray, F., Klint, A., Hakulinen, T., Storm, H.H. 2010.** Trends in the survival of patients diagnosed with breast cancer in the Nordic countries 1964–2003 followed up to the end of 2006. *Acta Oncol*, 49(5): 624-631.
- Uhr, K., Prager-van der Smissen, W.J.C., Heine, A.A.J., Ozturk, B. 2019.** MicroRNAs as possible indicators of drug sensitivity in breast cancer cell lines. *PLoS ONE*, 14(5): e0216400.
- Vahidian, F., Mohammadi, H., Ali-Hasanzadeh, M., Derakhshani, A., Mostaan, M., Hemmatzadeh, M., Baradaran, B. 2019.** MicroRNAs and breast cancer stem cells: potential role in breast cancer therapy. *J Cell Physiol*, 234(4): 3294-3306.
- Van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O. 2005.** Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044): 959-963.
- Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M. 2009.** Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*, 1(6-7): 338-351.
- Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., Viale, G. 2005.** Breast cancer. *Lancet*, 365(9472): 1727e-1741.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. 2012.** Cancer stem cells: Current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10(6): 717-728.

**Visvader, J.E., Sting, J. 2014.** Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev*, 28(11): 1143-1158.

**Vogel, V.G. 2008.** Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. *Menopause*, 15(4): 782-789.

**Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F. 2006.** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7): 2257-2261.

**Wahl, G.M., Spike, B.T. 2017.** Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. *NPJ Breast Cancer*, 3: 14.

**Walter, B.A., Gomez-Macias, G., Valera, V.A., Sobel, M., Merino, M.J. 2011.** miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis. *J Cancer*, 2: 67-75.

**Wang, J., Costantino, J.P., Tan-Chiu, E., Wickerham, D.L., Paik, S., Wolmark, N. 2004.** Lower-category benign breast disease and the risk of invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96(8): 616-620

**Wang, D., Qiu, C., Zhang, H., Wang, J., Cui, Q., Yin, Y. 2010.** Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One*, 5(9): e13067.

**Wang, X., Lu, H., Li, T., Yu, L., Liu, G., Peng, X., Zhao, J. 2013.** Krüppel-like factor 8 promotes tumorigenic mammary stem cell induction by targeting miR-146a. *Am J Cancer Res*, 3(4): 356-373.

**Wang, Z., Da Silva, T.G., Jin, K. 2014.** Notch signaling drives stemness and tumorigenicity of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 74(21): 6364-6374.

**Wang, J., Chen, J., Sen, S. 2016.** MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*, 231(1), 25-30.

**Wang, X., Wang, X., Gu, J., Zhou, M., He, Z., Wang, X., Ferrone, S. 2017.** Overexpression of miR-489 enhances efficacy of 5-fluorouracilbased treatment in breast cancer stem cells by targeting XIAP. *Oncotarget*, 8(69): 113837-113846.

**Wang, Z., Yang, B., Zhang, M. 2018.** lncRNA epigenetic landscape analysis identifies EPIC1 as an oncogenic lncRNA that interacts with MYC and promotes cell-cycle progression in cancer. *Cancer Cell*, 33(4): 706-720.

**Waterworth, A. 2003.** Introducing the concept of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Research*, 6(1): 53-54.

**Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W. 2004.** Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694): 269-271.

**Wicha, M.S. 2006.** Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds. *Clinical Cancer Research*, 12(19), 5606-5607.

**William, H., Matsui, M.D. 2016.** Cancer stem cell signaling pathway *Medicine*, 95: S1(e4765).

**Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S. 2009.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3): 228-234.

**Wong, C.K.; Gromisch, C.; Ozturk, S.; Papageorgis, P.; Abdolmaleky, H.M.; Reinhard, B.M.; Thiagalingam, A.; Thiagalingam, S. 2019.** MicroRNA-4417 is a tumor suppressor and prognostic biomarker for triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 20(8): 1113-1120.

**Wu, H., Zhu, S., Mo, Y.Y. 2009.** Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res*, 19(4): 439-448.

Wu, B., Liu, G., Jin, Y., Yang, T., Zhang, D., Ding, L., Zhou, F., Pan, Y., Wei, Y. 2020. miR-15b-5p Promotes Growth and Metastasis in Breast Cancer by Targeting HPSE2. *Front Oncol*, 10: 108.

Xiong, D.D., Lv, J., Wei, K.L., Feng, Z.B., Chen, J.T., Liu, K.C., Chen, G., Luo, D.Z. 2017. A nine-miRNA signature as a potential diagnostic marker for breast carcinoma: An integrated study of 1,110 cases. *Oncol Rep*, 37(6): 3297-3304.

Yan, L.X., Huang, X.F., Shao, Q., Huang, M.Y., Deng, L., Wu, Q.L. 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, 14(11): 2348-2360.

Yang, X.R., Sherman M.E., Rimm D.L. 2007. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 16(3): 439-443.

Yang, K., Handorean, A.M., Iczkowski, K.A. 2009. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*, 2(4): 361-369.

Yang, Z., Han, Y., Cheng, K. 2014. miR-99a directly targets the mTOR signalling pathway in breast cancer side population cells. *Cell Prolif*, 47(6): 587-595.

Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. 2013. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol*, 425(19): 3723-3730.

Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C. 2007. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131(6):1109-1123.

Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., Pestell, R.G. 2012. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(12): 2144-2151.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., Anderson, T.A. 2007. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302(1): 1-12.

Zhang, Y., Yan, L.X., Wu, Q.N., Du, Z.M., Chen, J., Liao, D.Z., Huang, M.Y., Hou, J.H., Wu, Q.L., Zeng, M.S. 2011. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer Res*, 71(10): 3552-3562.

Zhang, J.; Zhao, H.; Gao, Y.; Zhang, W. 2012. Secretory miRNAs as novel cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*, 1826(1): 32-43.

Zhang, C.M., Zhao, J., Deng, H.Y. 2013. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci*, 20(1): 79.

Zhang, H., Cai, K., Wang, J., Wang, X., Cheng, K., Shi, F., Jiang, L., Zhang, Y., Dou, J. 2014. MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells*, 32(11): 2858-2868.

Zhang, K., Zhang, Y., Liu, C., Xiong, Y., Zhang, J. 2014. MicroRNAs in the Diagnosis and Prognosis of Breast Cancer and Their Therapeutic Potential (Review). *Int J Oncol*, 45(3): 950-958.

Zhang, H., Li, N., Zhang, J., Jin, F., Shan, M., Qin, J., Wang, Y. 2016. The influence of miR-34a expression on stemness and cytotoxic susceptibility of breast cancer stem cells. *Cancer Biol Ther*, 17(6): 614-624.

Zhang, L., Li, J., Wang, Q., Meng, G., Lv, X., Zhou, H., Li, W., Zhang, J. 2017. The relationship between microRNAs and the STAT3-related signaling pathway in cancer. *Tumour Biol*, 39(7): 1010428317719869.

- Zhao, J.J., Lin, J., Yang, H., Kong, W., He, L., Ma, X. 2008.** MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem*, 283(45): 31079-31086.
- Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H. 2009.** Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*, 458(7239): 776-779.
- Zhao, C., Li, Y., Chen, G., Wang, F., Shen, Z., Zhou, R. 2017.** Overexpression of miR-15b-5p promotes gastric cancer metastasis by regulating PAQR3. *Oncol Rep*, 38(1): 352-358.
- Zheng, A., Song, X., Zhang, L., Zhao, L., Mao, X., Wei, M., Jin, F. 2019.** Long non-coding RNA LUCAT1/miR-5582-3p/TCF7L2 axis regulates breast cancer stemness via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1): 305.
- Zhou, M., Hou, Y., Yang, G., Zhang, H., Tu, G., Du, Y., Wen, S., Xu, L., Tang, X., Tang, S. 2016.** LncRNA-Hh Strengthen Cancer Stem Cells Generation in Twist-Positive Breast Cancer via Activation of Hedgehog Signaling Pathway. *Stem Cells*, 34(1): 55-66.
- Zhou, S.S., Jin, J.P., Wang, J.Q., Zhang, Z.G., Freedman, J.H., Zheng, Y., Cai, L. 2018.** miRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin*, 39(7): 1073-1084.
- Zuo, J., Yu, Y., Zhu, M., Jing, W., Yu, M., Chai, H., Liang, C., Tu, J. 2018.** Inhibition of mir-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation. *Cancer Biomark*, 21(2): 383-392.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif ERTÜRK  
Doğum Yeri : Bursa  
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu  
Lise : Bursa Atatürk Anadolu Lisesi  
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen/Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji  
Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek  
Yüksekokulu, Öğretim Görevlisi

İletişim (e-posta) : [eliferturk@gmail.com](mailto:eliferturk@gmail.com), [eliferturk@uludag.edu.tr](mailto:eliferturk@uludag.edu.tr)

Yayınları :

**Aztopal, N., Erkisa, M., Erturk, E., Ulukaya, E., Tokullugil, A.H., Ari, F. 2018.** Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chem Biol Interact*, 280: 51-58.

**Cecener, G., Ak, S., Eskiler, G.G., Demirdogen, E., Erturk, E., Gokgoz, S., Polatkan, V., Egeli, U., Tunca, B., Tezcan, G., Topal, U., Tolunay, S., Tasdelen, I. 2016.** Circulating miR-195 as a Therapeutic Biomarker in Turkish Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(9): 4241-4246.

**Cecener, G., Egeli, U., Tunca, B., Erturk, E., Ak, S., Gokgoz, S., Tasdelen, I., Tezcan, G., Demirdogen, E., Bayram, N., Avci, N., Evrensel, T. 2014.** BRCA1/2 germline mutations and their clinical importance in Turkish breast cancer patients. *Cancer Invest*, 32(8): 375-387.

**Erturk, E., Cecener, G., Tezcan, G., Egeli, U., Tunca, B., Gokgoz, S., Tolunay, S., Tasdelen, I. 2015.** BRCA mutations cause reduction in miR-200c expression in triple negative breast cancer. *Gene*, 556(2): 163-169.

**Erturk, E., Cecener, G., Egeli, U., Tunca, B., Tezcan, G., Gokgoz, S., Tolunay, S., Tasdelen, I. 2014.** Expression status of let-7a and miR-335 among breast tumors in patients with and without germ-line BRCA mutations. *Mol Cell Biochem*, 395(1-2): 77-88.

**Ak, S., Tunca, B., Yilmazlar, T., Tezcan, G., Cecener, G., Egeli, U., Ozturk, E., Yerci, O., Ertürk, E., Zorluoglu, A. 2013.** Microsatellite instability status affects gene expression profiles in early onset colorectal cancer patients. *J Surg Res*, 185(2): 626-637.

**Avci, N., Cecener, G., Deligonul, A., Erturk, E., Tunca, B., Egeli, U., Tezcan, G., Akyildiz, E.U., Bayram, A.S., Gebitekin, C., Kurt, E., Evrensel, T. 2014.** Molecular markers for patients with thymic malignancies: not feasible at present? *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(8): 3457-3460.

**Tunca, B., Egeli, U., Cecener, G., Tezcan, G., Gökgöz, S., Tasdelen, I., Bayram, N., Tolunay, S., Umut, G., Demirdogen, E., Erturk, E., Ak, S., Cetintas, S., Evrensel, T. 2012.** CK19, CK20, EGFR and HER2 status of circulating tumor cells in patients with breast cancer. *Tumori*, 98(2): 243-251.

**Erturk, E., Cecener, G., Polatkan, V., Gokgoz, S., Egeli, U., Tunca, B., Tezcan, G., Demirdogen, E., Ak, S., Tasdelen, I. 2014.** Evaluation of genetic variations in miRNA-binding sites of BRCA1 and BRCA2 genes as risk factors for the development of early-onset and/or familial breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(19): 8319-8324.

**Cecener, G., Tunca, B., Egeli, U., Bekar, A., Tezcan, G., Erturk, E., Bayram, N., Tolunay, S. 2012.** The promoter hypermethylation status of GATA6, MGMT, and FHIT in glioblastoma. *Cell Mol Neurobiol*, 32(2): 237-244.