

BEYZA AKIN MUTLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

(sol yandaki gibi) olacak.

YÜKSEK LİSANS TEZİ;

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BRCA1 MUTANT OLAN VE OLMAYAN MEME KANSER
HÜCRE HATLARINDA WISP-1 GENİNİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

BEYZA AKIN MUTLU

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Tarih ve Sayı: 05/11/2020-190704



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı :99984023-302.14.01-
Konu :Sınav Sonucu Onayı-Beyza AKIN

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :28.10.2020 tarih ve 186228 sayılı yazınız.

Anabilim Dalınızda 2017-2018 öğretim yılı bahar yarıyılında başladığı Yüksek Lisans eğitimine Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK'in danışmanlığı altında "BRCA1 Mutant Olan ve Olmayan Meme Kanseri Hücre Hatlarında WISP-1 Geninin Ekspresyonunun Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezini tamamlayan Beyza AKIN'a ait tez sınav tutanakları jüri tarafından imzalanmış nüshalarının teslim edildiği 28.10.2020 tarihli yazınız, Yönetim Kurulumuzun 03.11.2020 tarihli 44 sayılı toplantısında incelenmiş ve sınav sonucu onaylanmıştır.

Bilgilerinizi, Beyza AKIN'a ve danışman öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK'e şahsım ve Yönetim Kurulumuzun tebrik ve başarı dileklerinin iletilmesini rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

DAĞITIM

Gereği:
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

Bilgi:
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı
Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK

Doğrulamak için: <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8R1AKVC>

İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bozdoğan Kemer Caddesi No:8 Vezneciler Hamamı Sokağı Veznecii
34126 İSTANBUL
Tel : +90(212) 440 00 00-11280 Faks : +90(212) 440 00 00/14128
e-posta : saglikbil@istanbul.edu.tr Elektronik Ag : <http://saglikbilimleri.istanbul.edu.tr/>



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine eklediğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BEYZA AKIN MUTLU

İTHAF

Kıymetli annem Reyhan AKIN, babam Vait AKIN ve sevgili eşim
Muhammet Fatih MUTLU' ya ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Akademik hayatıma başlangıcımdan bugüne kadar, emek veren bilgi birikimini benimle paylaşan, bana ve fikirlerime sonsuz güvenen, destek veren, tez çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, akademik hayata dair tavsiyelerde bulunan, tez danışmanım, çok kıymetli hocam **Prof. Dr. Hülya YAZICI** ya

İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Ahmet KİZİR'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice BİLGE BECERİR'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalımızda bulunan, özellikle Kanser Genetiği bölümü ekibinden bilgi birikimini paylaşan; Araştırmacı Dr. Özge Şükrüoğlu ERDOĞAN, Arş. Gör. Dr. Şeref Buğra TUNÇER, Arş. Gör. Dr. Demet Akdeniz ÖDEMİŞ, Arş. Gör. Dr. Seda Kılıç ERCİYAS'a ve Arzu BURNUVA'ya,

Lisanstan mezun olduktan sonra da bana yardım eden, destek veren İstanbul Kültür Üniversitesi'nden değerli hocam Prof. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN'a,

Desteklerini benden her daim esirgemeyen kardeşlerim Başak BİLMİŞ ve Gizem ÖZKAYA'ya,

Emeği çok büyük, dualarıyla, desteğiyle her daim yanı başımda olan kıymetlim annem Reyhan AKIN'a, bana güvenen her seçtiğim yolda arkamda duran dağım babam Vait AKIN'a,

Küçüklüğümden bugüne hayallerimin peşinden koşmamı sağlayan destekçim biricik abim Buğra AKIN'a, ilerlediğim yolda konuşmalarıyla motive eden yengem Gülşah AKIN'a, yüzü güleç, neşe kaynağım, oyun arkadaşım yeğenim Çınar AKIN'a

Ve akademik yolda daima ilerlememi isteyen, bu yolda beni başından sonuna destekleyen, her konuda bana sonsuz güvenen, arkamda duran, yoldaşım, eşim Muhammet Fatih MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-34703; ID: 34703.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Memenin Anatomisi ve Fizyolojisi.....	3
2.2. Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme Kanseri Moleküler Alt Tipleri	6
2.2.2. Meme Kanseri Tipleri	9
2.2.2.1. In Situ Meme Kanserleri	10
2.2.2.2. Invaziv Meme Kanserleri.....	10
2.3. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları	11
2.3.1. Cerrahi Yöntemler.....	11
2.3.1.1. Mastektomi.....	11
2.3.1.2. Lumpektomi	11
2.3.1.3. Lenf Bezi Cerrahisi	11
2.3.2. Kemoterapi.....	11
2.3.3. Radyoterapi	12
2.3.4. Hormonoterapi	13
2.3.5. Hedefe Özgü İlaç Tedavisi.....	13
2.3.6. Hedefe Yönelik Akıllı İlaç Tedavisi (PARP İnhibitörleri)	13
2.4. Meme Kanseri Evrelendirilmesi	14
2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	15
2.5.1. Yaş	16
2.5.2. Menopoz.....	16

2.5.3. Üreme ile ilgili Endokrin Faktörler.....	16
2.5.4. Beslenme Şekli.....	17
2.5.5. Alkol ve Sigara.....	17
2.5.6. Obezite	17
2.5.7. Genetik Faktörler	18
2.6. Meme Kanseri Oluşumunda Görev Alan Genler ve Oluşturdukları Sendromlar ..	18
2.6.1. BRCA1/BRCA2 Genleri ve Proteinleri	19
2.7. Ekstraselüler Matriks Proteinleri	22
2.7.1. Matriselüler CCN Proteinleri	22
2.8. WISP-1 (WNT-1-Uyarılabilir Sinyal Yolu-1 Proteini, (CCN4))	23
2.8.1. WISP-1 Geni ve Kanser	24
2.8.2. AKT ve BRCA1 genlerinin WISP-1 ile ilişkisi	25
2.8.3. TGF BETA (TGF- β)	26
2.8.4. TGF- β 1 ve WISP1/CCN-4.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Kitler.....	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.3. Meme Kanseri Hücre Hatları	30
3.3.1. MDA-MB-436	31
3.3.2. MDA-MB-453	31
3.3.3. MCF-7	32
3.3.4. MDA-MB-436	33
3.4. Hücrelerin Yetiştirilmesi.....	33
3.5. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlama	33
3.4. Hücrelerin Yetiştirilmesi.....	33
3.6. Hücrelere TGF β 1 Uygulanması	34
3.7. Hücre Dondurulması ve Açılması.....	35
3.8. Eş zamanlı DNA/RNA/Protein izolasyonu işlemi	36
3.9. cDNA Sentezi	38
3.10. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu	39
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA	45
İNTİHAL RAPOR FORMU.....	47
ÖZGEÇMİŞ	48

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1-1: Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması	10
Tablo 2-1: Kemoterapi ilaçları.....	12
Tablo 2-2: Meme kanserinde TNM evrenmesi.....	15
Tablo 2-3: <i>BRCA1</i> geni ile etkileşimde olan genler	22
Tablo 3-1: Kimyasal maddeler ve kitlelere ait bilgiler	30
Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar ve markaları	30
Tablo 3-3: Kullanılan tampon çözelti içerikleri ve bilgisayar programları	31
Tablo 3-4: Kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....	36
Tablo 3-5: Kullanılan primerler	41
Tablo 3-6: PZR içeriği	42
Tablo 3-7: PZR koşulları	42
Tablo 4-1: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplanan WISP-1 ekspresyon düzeyleri...44	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme Anatomisi.....	3
Şekil 2-2: Lobül gelişimi 1,2,3,4 rakamlar ile tanımlanmaktadır.	4
Şekil 2-3: Türkiye’de meme kanseri tüm kanser tipleri arasında kadınlarda ilk sırada yer almaktadır (Globocan, 2018).	6
Şekil 2-4: Ülkelerdeki gelişmişlik seviyesine göre, Dünyadaki Meme Kanseri Dağılımı (Globocan, 2018).	6
Şekil 2-5: Kalıtsal meme kanseri ve moleküler alt tipleri arasındaki ilişki.	9
Şekil 2-6: PARP inhibitörü Olaparib’in etki mekanizması	14
Şekil 2-7: <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin şematik gösterimi	20
Şekil 2-8: <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin kromozom üzerindeki konumunun şematik gösterimi	20
Şekil 2-9: <i>WISP-1</i> geninin yapısı.....	24
Şekil 2-10: <i>WISP-1</i> ’in ilişkili olduğu genler ve etkileri	26
Şekil 2-11: <i>WISP-1</i> geni ile ilişkili proteinleri gösteren STRING analizi	27
Şekil 3-4: MDA-MB-231 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi.....	32
Şekil 3-5: MDA-MB-453 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi.....	33
Şekil 3-6: MCF-7 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi	34
Şekil 3-7: MDA-MB-436 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi.....	34
Şekil 3-8: cDNA sentezi (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, ROCHE). 41	
Şekil 4-1: Gerçek zamanlı PZR eğrileri görüntüsü.....	43
Şekil 4-2: <i>WISP-1</i> ekspresyon düzeyleri ile referans genin(ACTB) meme kanseri hücre hatlarında ekspresyon düzeyleri $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı	44
Şekil 4-3: MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının TGF β 1 uygulaması ile değişen <i>WISP-1</i> geni ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2\Delta Ct$ metodu ile değerlendirilmesi	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC: Adenomatous polyposis coli
Ark.: Arkadaşları
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
BRCA1: Breast Cancer 1
BRCA2: Breast Cancer 2
BRAF: V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CCND1: Cyclin D1
cDNA: Complementary DNA
CTNNB1: Cadherin-associated protein beta 1
DGCR8: DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EOK: Epitelyal over kanseri
FIGO: International Federation of Obstetrics and Gynecology
g: gram
IGF2: Insulin-like growth factor 2
kDa: Kilo Dalton
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS: Kirsten-Rous Avian Sarcoma
LOH: Loss of heterozygosity
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
 μ L: Mikrolitre
mL: Mililitre
MLH1: MutL homolog 1
MMR: Mismatch Repair
mRNA: Mesajcı RNA
miRNA: MikroRNA
MSH2: MutS homolog 2
ng: nanogram
PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PTEN: Phosphatase and tensin homolog

RISC: RNA-induced silencing Complex
RPM: Revolutions per Minute
RNA: Ribonükleik asit
TP53: Tumor Protein 53
CCN: Cyr61, CTGF, NOC
ECM: Ekstraselüler matriks
HGF: Hepatosit büyüme faktörü)
TGF- α : Transforme edici faktör-alfa
EGF: Epidermal büyüme faktörü
TGF- β Transforme edici büyüme faktörü-beta
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
MAPK: Mitojen aktive protein kinaz
ER: Östrojen steroid reseptörü
PR: Progesteron steroid reseptörü
TP53: Tümör protein 53
CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A

ÖZET

Akın Mutlu, B. (2020). *BRCA1* mutant olan ve olmayan meme kanser hücre hatlarında *WISP-1* geninin ekspresyonunun araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malign hastalıktır. Meme kanserinde çeşitli genomik farklılıkların özellikle gen ekspresyon düzeylerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Meme tümörigenezinde önemli rol alan *BRCA1* geninin mutasyonu ve buna bağlı *WISP-1* geninin aktivasyonu, *TP53* geni aracılı apoptozu engellemektedir. Ayrıca *WISP-1* genini negatif düzenleyen *TGFβ1*'in, meme kanserinde terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. CCN protein ailesinden olan *WISP-1* (*CCN4*) geni, genellikle farklı kanserlerde yüksek oranda eksprese edilen bir molekül olup kanserde progresyon, uzak metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu etki söz konusu genin onkogen gibi davrandığını göstermektedir, ancak bu genin aynı zamanda bazı doku tiplerinde tümör baskılayıcı gibi davrandığı da bildirilmektedir. Tez çalışmasında çeşitli gen mutasyonları taşıyan farklı meme kanser hücre soylarında MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 ve MDA-MB-436, *WISP-1* gen ekspresyon düzeyi değişimi *TGFβ1* uygulamasına bağlı olarak gerçek zamanlı kantitatif PZR ile değerlendirildi. MDA-MB-231, MDA-MB-453, ve MCF-7 hücre hatlarında, *WISP-1* geninde görülen ekspresyon artışına bağlı olarak kanser oluşumunda onkogen gibi davrandığı gösterildi. MDA-MB-436 hücre soyunda ise *WISP-1* ekspresyonu yok denecek kadar azdır yani onkogenik özellik taşımamaktadır. *TGFβ1* uygulaması ile ER-pozitif MCF-7 hücre hattında, *WISP-1* ekspresyonu 6 kat artmıştır. MCF-7 hücre hattında *TGFβ1*'in, hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. MDA-MB-453, *CDH1* mutant hücre hattında *TP53* yolağının düzenli çalışmasına bağlı olarak *TGFβ1* uygulaması sonrası *WISP-1* geninde meydana gelen azalış *TGFβ1*'in terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

WISP-1 geni, meme kanseri hücre hatlarında gen mutasyonlarına bağlı olarak biyolojik belirteç niteliği taşıyabilirken, *TGFβ1*'de terapötik bir hedef olabileceği gösterilmiştir, ancak daha detaylı ve klinik düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, *WISP-1*, *TGFβ1*, biyobelirteç, ekspresyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-34703; ID: 34703.

ABSTRACT

Akın Mutlu, B. (2020). Investigation of WISP-1 gene expression in BRCA1 mutant and non-BRCA1 breast cancer cell lines. Istanbul University Health Sciences Institute, Department of Basic Oncology. Master Thesis. İstanbul.

Breast cancer is the most common malignant disease of women. The various genomic differences particularly gene expression levels are known to be associated with poor prognosis in breast cancer. The mutation of the *BRCA1* gene which has a significant role in breast tumorigenesis, and associated *WISP-1* gene activation inhibit the TP53 gene mediated apoptosis. In addition, suggests that TGFβ1 negatively regulating the *WISP-1* gene might be a therapeutic target in breast cancer. *WISP-1* (*CCN4*) gene from the CCN protein family is a molecule which is highly expressed generally in different cancers, is associated with progression, distant metastasis, and poor prognosis in cancer. This effect shows that this gene behaves like an oncogene, however this gene was also reported as to behave as a tumor suppressor in some tissue types. The change of MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 and MDA-MB-436, *WISP-1* gene expression levels in different breast cancer cell strains with various gene mutations were evaluated associated with TGFβ1 treatment in the thesis study. MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MCF-7 cell lines have been shown to act as an oncogene in cancer formation due to the increased expression seen in the *WISP-1* gene. In the MDA-MB-436 cell line, *WISP-1* expression is almost nonexistent, it means that it does not have oncogenic features. In the study, it was shown that *WISP-1* expression increased 6-fold in the ER-positive MCF-7 cell line with TGFβ1 administration. It has been observed that TGFβ1 increases cell proliferation in MCF-7 cell line. The decrease in the *WISP-1* gene after TGFβ1 administration due to the regular operation of the TP53 pathway in MDA-MB-453, *CDH1* mutant cell line indicates that TGFβ1 may be a therapeutic target. *WISP-1* gene can have a biologic biomarker feature owing to the gene mutations in the breast cancer cell lines, and was shown to have a possible therapeutic target in TGFβ1, however, more detailed and clinical level studies must be conducted.

Key words: Breast cancer, *WISP-1*, *TGFβ1*, biomarker, expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı gerçekleşen ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanserinde tanı ve tedavide hastaların genomik farklılıkların özellikle taşıdıkları gen mutasyonlarının kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Meme kanserinde önemli bir rolü olan ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerinden CCN (Cyr61, CTGF, NOV) protein ailesi kanserin gelişiminde etkili olmaktadır. Bu protein ailesinden *WISP-1* (*CCN4*) geni, çeşitli kanserlerde yüksek oranda ifade edilirken metastaz ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir [1]. Literatürde *WISP-1* geni ile ilgili net bilgiler mevcut değildir. Onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı özellikte mi olduğu hala kesin olarak bilinmemektedir.

Wnt / β -katenin sinyal yolundaki moleküllerden biri olan *WISP-1* geni, kanser tedavisinde yeni bir hedef molekül olarak gösterilmektedir [1]. *WISP-1* geninin hem hücrenin hayatta kalmasında hem de büyümesinde önemli olan *PI3K* ve *AKT* sinyal yollarında rol aldığı bilinmektedir [1]. *BRCA1* geni mutasyonu ile birlikte *WISP-1* geninin aktivasyonu, *AKT* sinyal proteininin fosforilasyonunu ve kinaz aktivitesini arttırmaktadır. *AKT* kinazın aktivasyonu, insan malignitesi ile ilişkili en yaygın moleküler değişikliklerden biridir. Meme kanserinin büyük bir bölümünde artmış *AKT* kinaz aktivitesi izlenmektedir. *WISP-1* geni, *AKT* kinaz aktivasyonu ile DNA hasarına cevap olarak *TP53* aracılı apoptozu engellemektedir. Özetle, *WISP-1* apoptozu engelleyen yolda görev almaktadır. Ayrıca *WISP-1* geni osteoblastlarda *TGF- β* sinyal yolunun düzenleyicisidir. Belirli bölgelere uzak metastazların gelişiminin altında yatan mekanizmaları anlamak önemli ve potansiyel klinik değere sahiptir. Bundan dolayı kemik metastazı ile ilişkili olan ve kanserlerde proliferasyonu arttıran *TGF β 1*, *WISP-1* ekspresyonunu inhibe etmektedir [1]. Ayrıca *TGF- β 1* meme kanseri hücrelerinde EMT belirteç değişikliklerini de indüklemektedir. *TGF- β 1* ve *WISP-1* gerek osteoblastik proliferasyon gerekse farklılaşmanın düzenlenmesinde birlikte hareket etmektedirler.

Klinik verilere göre *BRCA1* mutasyonu taşıyan hastaların taşımayanlara göre tedaviye cevaplarının ve sağ kalımlarının daha iyi olduğu bilinmektedir. Bundan başka meme kanserinde kemik metastazları da oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. *BRCA* mutasyon taşıyıcısı olan hastaların daha uzun yaşam süresine sahip olmalarında *WISP-1*

geni kaynaklı metastatik yolağın etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak literatürde metastatik meme kanseri ve *WISP-1* geni arasındaki ilişki araştırılmamıştır.

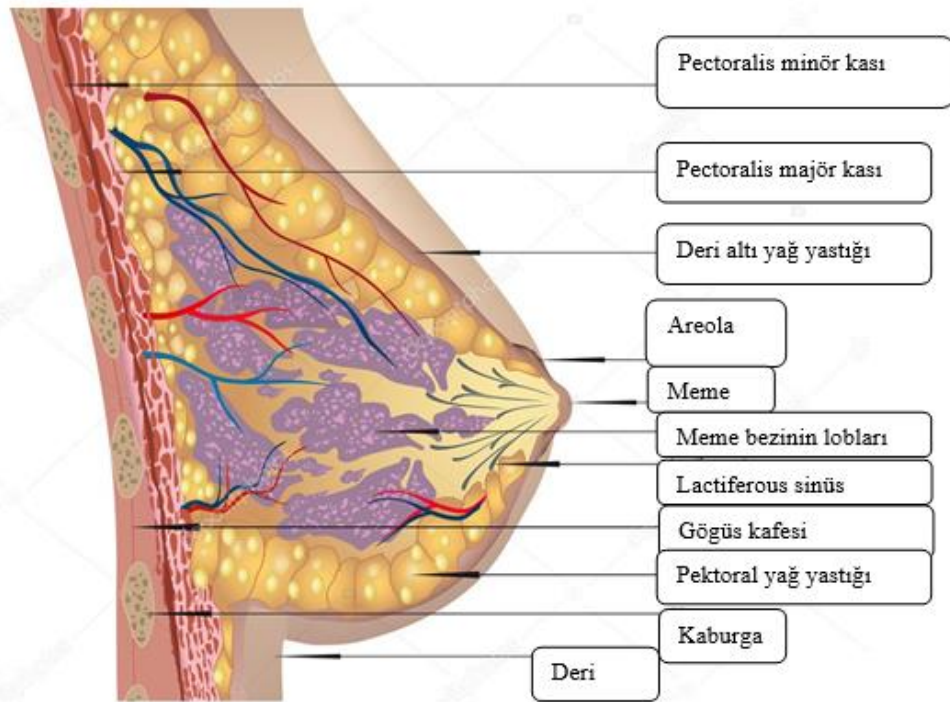
Tez öneri formunda HCC1395 primer meme kanser hücre hattı ile MDA-MB-436 *BRCA1* mutant, metastatik meme kanser hücre hattında *WISP-1* geninin ifade düzeyinin araştırılması planlanmıştı. Ancak ATCC'den temin edilen hücre hatlarında metastatik olmayan, primer meme kanseri hücre hattı HCC1395 ve *BRCA1* mutant, metastatik olan MDA-MB-436 hücre hatları açıldığında morfolojilerinin sağlıklı olmadığı tespit edilmiş ama yine de kültüre alınmış ancak kültürde başarılı bir büyüme gerçekleştirelememiştir. MDA-MB-436 hücre hattı ise sadece 2 gün yaşatılmış ve ardından kontamine olmuştur. Bu ilk iki gün içerisinde kontaminasyondan hemen önce bu hücre hattından gerçek zamanlı kantitatif PZR ile *WISP-1* ifadesini gösterecek kadar hücre toplanmış ve *WISP-1* ifadesi araştırılmıştır. Projede ilave bütçe olmadığından bu hücre hatları tekrar temin edilememiştir. Bu nedenle projede metastatik-üçlü negatif (MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve MDA-MB-453) ve metastatik ER-pozitif meme kanseri hücre (MCF-7) hatlarında *WISP-1* geninin TGFβ1 uygulamasına bağlı ekspresyon değişiklikleri araştırılmıştır.

Tez çalışmasının amacı literatürde *WISP-1* genin etki mekanizması ile ilgili bilgi edinmek, TGFβ1'in *WISP-1* ifadesine katkısını belirlemek ve özellikle metastatik hastalıkta TGFβ1'in terapötik bir hedef olup olmadığı göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memenin Anatomisi ve Fizyolojisi

Erişkin bir kadında meme yapısı lobüller ya da glandüler olarak adlandırılan süt bezleri ve duktuslar olarak adlandırılan süt kanalları ile yağ doku ve bağ dokudan oluşmaktadır. Memeler 2. ve 7. kaburgalar arasında yer alırlar. İçte sternumun kenarından dışta ön ve orta aksiller çizgiye kadar uzanırlar. Meme dokusu hem erkeklerde hem kadınlarda olmasına rağmen meme bezleri sadece postpartum dönemde fonksiyonel olmakta ve süt bezlerinden yenidoğan bebeği beslemeye yönelik süt salgılanmaktadır. İnsanlarda meme dokusu meme bezleri ve bağ dokusundan oluşur. Meme bezleri subkutan olarak anterior ve lateral torasik duvarda lokalizedir. Her meme, meme başından içine doğru uzanan birçok lobül bulunan 15-20 lobtan oluşmaktadır. Memenin apeksindeki meme başlarını çevreleyen pigmentli alana “areola” denmektedir.

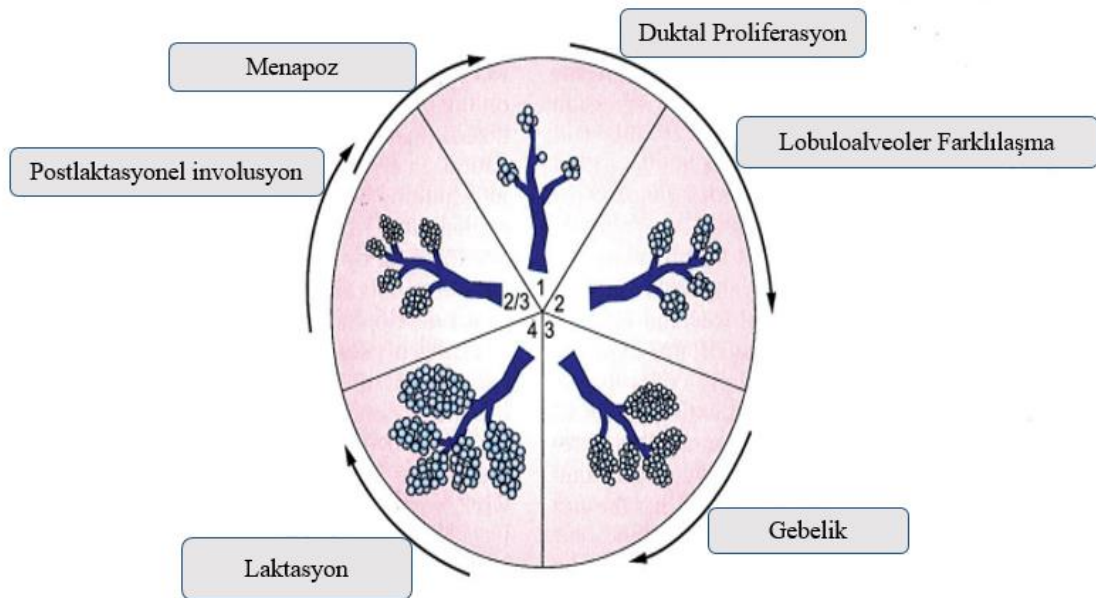


Şekil 2-1: Meme Anatomisi [2].

Meme morfolojisinin en önemli özelliklerinden biri heterojenitedir. Her lobun içindeki lobüller kendisine ait laktifer duktusa dökülmekte ve bu intralobüler duktuslar da birleşerek tek bir laktifer duktusta birleşmektedir. Her laktifer duktus meme başına

yakın tabakalanma gösteren yassı epitel hücrelerle çevrilidir. Derin areoler bölgede her laktifer duktus genişleyerek rezervuar görevi gören bir sinüs oluşturmaktadır(Şekil 2-1).

Meme dokusundaki alveoler yapı gebelik esnasında oluşmaktadır. Memenin lobülleri gevşek bağ dokusundan oluşmakta olup hücreden zengin olan bir stroma içinde bulunmakta ve çeşitli hormonlarla uyarılmaktadır. Terminal duktal lobuler üniteler (TDLU) meme bezlerinin fonksiyonel üniteleridir. Her TDLU intralobüler duktustan ve buna bağlı meme bezi kesecikleri duktuslardan oluşmaktadır. Östrojen, büyüme hormonu, kortikoidler, HGF (hepatosit büyüme faktörü), TGF- α (transforme edici faktör-alfa), EGF (epidermal büyüme faktörü), TGF- β (transforme edici büyüme faktörü-beta), FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi faktörlerin modülasyonu duktal gelişme olan Tip 1 lobülde gerçekleşmektedir. Tip 2 lobül olan lobüloalveoler gelişmede etkili olan faktörler ise; Puberte ile beraber östrojen, progesteron, prolaktin, büyüme hormonu, kortikoidlerin indüklemesi ve insülin, vitamin D, NRG (nörogulin)dir. Tip 3 lobül ise gebelik sonucu oluşmaktadır. Laktasyonla birlikte ise Tip 4 lobül oluşur. Postlaktasyonel involüsyonda TP53, STAT3, MMP [metalloproteineaz], TIMP [metalloproteinaz doku inhibitörü] gibi faktörler ile lobüller regrese olmaktadır (Şekil 2-2).



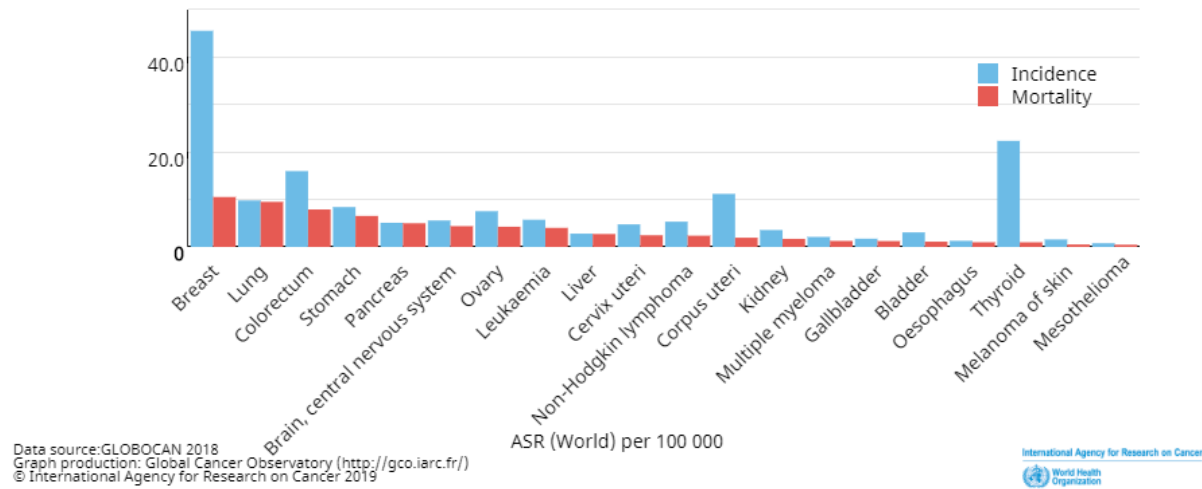
Şekil 2-2: Lobül gelişimi 1, 2, 3, 4 rakamları ile tanımlanmaktadır[2].

Menapozda östrojen ve progesteron hormonlarının azalması sonucu meme dokusu aralıklarla Tip 1 ve Tip 2 lobül yapısı kazanır [2].

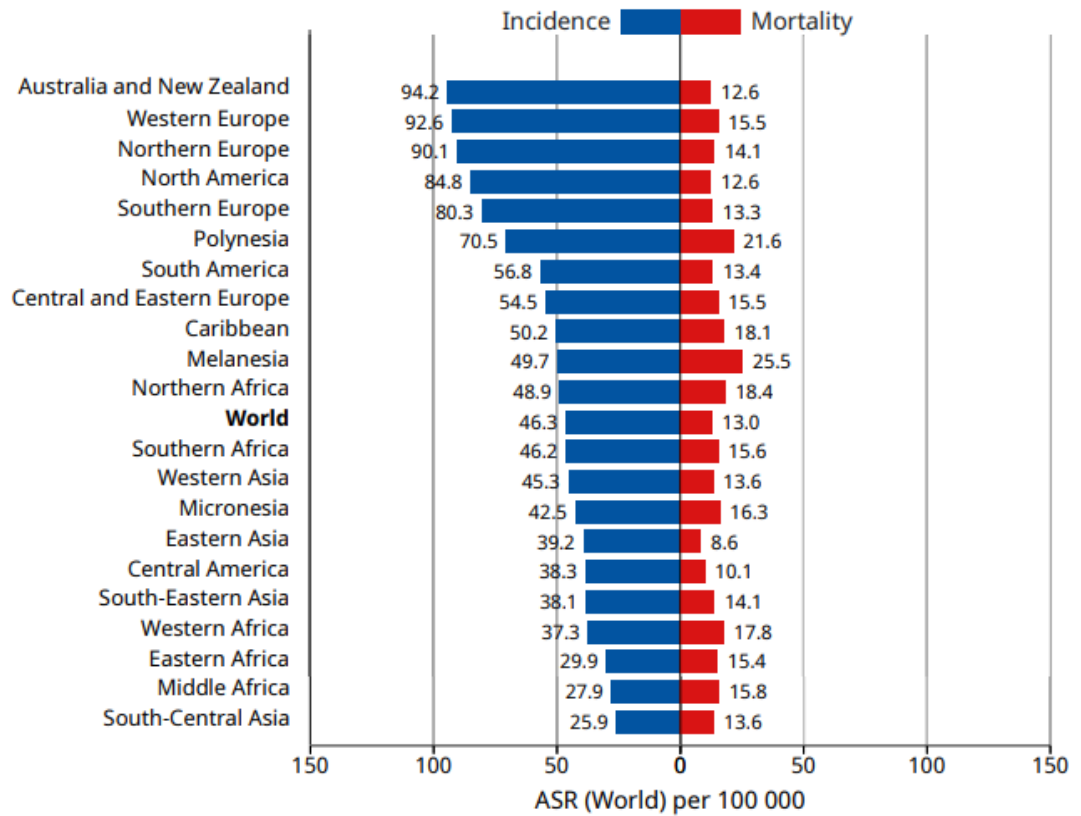
2.2. Meme Kanseri

Tüm hücreler kendilerini belli bir kontrol mekanizması içinde yenilerler ancak bazı kontrol dışı çoğalan hücreler mutasyon birikimi ya da hücre proliferasyonunun bozulması ile tümör adı verilen hücre toplulukları oluştururlar. Memeyi oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile meme kanseri oluşur. Meme kanseri diğer kanser türleri gibi genetik ve çevresel etkenler aracılığıyla meydana gelmektedir. Meme kanseri hücreleri; büyüme sinyallerine direnç, büyüme sinyalleri otonomisi, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin devamlılığı, doku invazyonu ile metastaz, DNA tamir mekanizmalarında bozulma ve metabolik farklılaşma geçirme özelliği taşımaktadırlar.

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen malign hastalıktır ve kadınlarda kansere bağlı gerçekleşen ölümlerin başında yer almaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5 ila 10' unun güçlü bir kalıtsal bileşene sahip olduğu bilinmektedir [3]. Kalıtsal nitelik taşıyan bu hastaların ailelerinde baskın bir meme kanseri kalıtım paterni görülmekte olup bu ailelerde hastalık standart popülasyona göre daha erken yaşta ortaya çıkmaktadır. Yüksek riskli bu ailelerde hastalığa yakalananlar arasında genellikle yumurtalık kanseri, bilateral meme kanseri, erkek meme kanseri ve prostat kanseri sıklıkla görülmektedir. Bu meme kanseri ailelerinin yaklaşık %28'inde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde germline mutasyonların varlığı gösterilmiştir [4]. Patojenik bir mutasyonun tanımlanması, sağlıklı aile üyelerinin riskinin belirlenmesini sağlayarak pre-semptomatik olarak hastalık gelişmeden ya da çok daha erken evrede tanımlanmasını mümkün kılmaktadır. *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyon taşıyıcısı olan kadınlarda, meme kanseri gelişimi için ömür boyu meme kanser riski %49 ila %87 arasında değişmektedir [4]. Bu nedenle söz konusu testin yapılması hastalığın önlenmesi açısından önem taşımaktadır.



Şekil 2-3: Türkiye’de kadınlarda görülen tüm kanser tipleri arasında meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Globocan, 2018).



Şekil 2-4: Ülkelerdeki gelişmişlik seviyesine göre, Dünyadaki Meme Kanseri Dağılımı (Globocan, 2018).

2.2.1. Meme Kanseri Moleküler Alt Tipleri

2000 yılında yapılan gen ekspresyon çalışması ile meme kanseri östrojen reseptörü (ER) varlığına göre alt tiplere ayrılmıştır [5]. Günümüzde hala kullanılan bu

sınıflamaya göre; ER pozitif tümörler; meme bezlerinin lümene bakan (luminal) hücrelerine benzer gen ekspresyonuna sahiptirler. Ayrıca sitokeratin profili ve diğer luminal hücrelerle ilişkili belirleyicileri de bulundurlar. ER negatif tümörlerin bir kısmı epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (*HER2*) gen amplifikasyonu ya da aşırı ekspresyonu gösterilebilirler. Bu grup *HER2* pozitif tümörler olarak bilinirler. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör-2, dört membran tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. *HER2* reseptörü, kromozom 17q21'de eşlenen bir proto-onkogen olan *HER2* geni tarafından kodlanır. Meme kanseri alt tiplerinin %15-20'sini oluşturan *HER2*-pozitif meme kanseri daha agresif biyolojik ve klinik davranış göstermektedir. Bu tümörler, 17q12 kromozomunda bulunan *HER2* geninin ekspresyonu ve amplifikasyonu ile ilişkili diğer genlerin yüksek ekspresyonunu da gösterirler. Bu tümörler yüksek düzeyde proliferasyon kabiliyetine sahip olup, %75'i yüksek histolojik ve nükleer grada, %40'ından fazlası ise *TP53* geninde mutasyon taşımaktadır [6]. *HER2* pozitif meme kanserlerinin yaklaşık yarısı ER için pozitifdir, ancak bu tümörler genellikle daha düşük düzeyde ER anlatımı gösterirler. Luminal grup dışı tümörlerin *HER2* negatif olanları ise meme bezlerinin normal bazal hücrelerine benzer gen ekspresyonu paterni göstermektedirler. Bu grup hücreler ER ve PR (Progesteron Reseptörü)'de negatif oldukları için bu alt grup bazal-benzeri ya da triple (üçlü) negatif tümör grubu olarak sınıflandırılırlar [5]. Yapılan çalışmalarda meme tümörlerinin %75'inde ER ve/veya PR (PR) bulunduğu, yani çoğu tümörün luminal grupta olduğu bilinmektedir [7].

Luminal tümörler de kendi arasında farklı davranış göstermeleri sebebi ile Luminal A ve B olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. Meme kanserleri içinde en yüksek prevalansa sahip olan ve %50-%60'ını oluşturan Luminal A tümörlü hastaların prognozları çok iyi olup, metastazlar çoğu kez kemiklerle sınırlıdır. *HER2* negatif tümörlerin ER+, PR+, *HER2*-, Ki67 düzeyleri %14'ün altında olup proliferatif aktivitesi, mitoz oranı ve histolojik derecesi son derece düşüktür. Meme kanserinde tübüler, invaziv cribriform, müsinöz ve lobüler gibi özel histolojik tiplerde bulunmaktadır. Meme kanserlerinin %15-%20'sini oluşturan Luminal-B tümörler, daha agresif özelliktedirler. Luminal-B tümörler yüksek proliferasyon hızına sahiptirler ve ER+, PR+, *HER2*-, Ki67 düzeyleri %14'ün üstündedir. Luminal A ile B arasındaki sınır değeri, genellikle immünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinin Ki67 ekspresyonunu %14'ünden fazla oranda göstermesi olarak kabul edilir. Ayrıca *HER2* pozitif

tümörlerden yaklaşık %30 kadarı immünohistokimyasal olarak Luminal B fenotipindedir.

Bazal benzeri alt tip, tüm meme kanserlerinin %8 ila %37'sini temsil eder. Bazal benzeri alt gruba ait tümörler, *CK5*, *CK14*, *CK17* ve *Laminin* gibi yüksek düzeyde bazal miyoepitelyal belirteçleri ekspresse ederken *ER*, *PR* ve *HER2* genlerinin ekspresyonu bu grupta görülmemektedir. Bu nedenle üçlü negatif olarak adlandırılırlar ve ayrıca *P-cadherin* ve epidermal büyüme faktörü (*EGFR*) reseptörünü aşırı ifade ederler.

Bazal benzeri kanserlerde, tümör protein 53 (*TP53*) geninde sık mutasyon bulunmaktadır ayrıca genomik instabilite ve retinoblastomun (*Rb*) inaktivasyonunda görülmektedir.

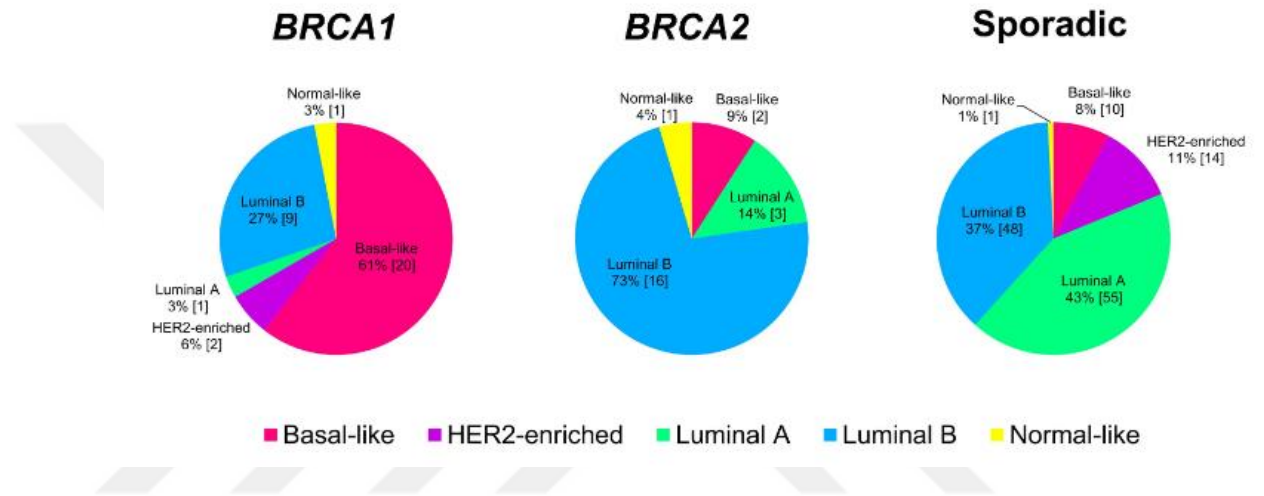
Üçlü negatif ve bazal benzeri terimleri tamamen eş-anlamli olmayıp çalışmalarda yaklaşık %20-%30 uyumsuzluk görülmektedir. Üçlü negatif terimi, *ER*, *PR* ve *HER2* protein ekspresyonu olmayan meme tümörlerinin immünohistokimyasal sınıflandırmasını ifade ederken, bazal benzeri alt tip gen ekspresyonu mikroarray analizi ile tanımlanmaktadır. Bazal benzeri alt tip ile ilgili çeşitli genler, hücrel çoğalma, hücre sağkalımı, hücre göçü ve invazyonun teşvik edilmesinde rol oynamaktadır. İlgili yolların çeşitliliğine rağmen, mitojen aktive protein kinaz (*MAPK*), *PI3K*, *AKT* ve nükleer faktör kappa B (*NF-kB*) gibi sinyal molekülleri, diğer meme kanseri alt tiplerinde görüldüğü gibi yaygın olarak deregüle edilirler [8]. Bazal benzeri kanserlerde sitoplazmik ve nükleer beta-katenin birikimi gibi diğer değişiklikler de gözlenmektedir ve genlerde meydana gelen bu değişiklikler kanser için söz konusu alt grubun potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir.

Mikroarray ve immünohistokimyasal analizler, bazal benzeri alt tipin *BRCA1* genine bağlı meme kanserlerinin yaklaşık dörtte üçünü oluşturduğunu göstermiştir [8]. *BRCA1* ile ilgili meme kanserleri genellikle üçlü negatif fenotipi ifade eder ve Ki67 bazal sitokeratinler, *TP53*, *EGFR* ve *p-cadherin* ve X kromozom anormallikleri için sıklıkla pozitifler. Bazal benzeri tümörler ve *BRCA1* ile ilişkili meme kanseri olan kadınların sonuçları, özellikle erken nüks ve metastatik hastalık paterni gösterirler.

BRCA1 mutant olan bazal benzeri kanserler, poli-ADP riboz polimeraz (*PARP*) enzim inhibitörleri gibi spesifik terapötik rejimlere daha iyi cevap vermektedir [9]. Ayrıca, *BRCA1* mutant hücreler, DNA çift iplikli kopma onarım mekanizmalarında, *PARP* enzim inhibitörleri gibi DNA çift iplikli kopmalar üreten terapötik ajanlara

özellikle duyarlı hale getirebilecek kusurlara sahiptir. Bazal benzeri kanserde sıklıkla aşırı ifade edildiği gibi, EGFR’de başka bir potansiyel terapötik hedef olabilir.

Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturan normal-like meme benzeri tümörler, kötü karakterize tümörlerdir. Normal-like meme kanser hücreleri, lüminal ve bazal benzeri kanserler arasında ara prognoz gösteren, adipoz dokunun gen özelliklerini ifade ederler ve genellikle neoadjuvan kemoterapiye cevap vermezler [8]. Bu alt tip üzerinde çok az çalışma vardır ve klinik önemi belirsizliğini korumaktadır [8].



Şekil 2-5: Kalıtsal meme kanseri ile moleküler alt tipleri arasındaki ilişki [4].

2.2.2. Meme Kanserinin Histolojik Alt Tipleri

Meme kanseri, histolojik özelliklerine göre sınıflandırılan heterojen bir dizi tümör tipini kapsamaktadır. Meme kanseri, hem karsinom yani epitel hücrelerinden kaynaklanan hem de glandüler dokudan yani salgı bezlerinden kaynaklanan adenokarsinomlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Meme kanserinin iki tipi vardır. Süt salgılayan kısımdan gelişen Lobuler kanser ve süt kanallarından gelişen Duktal kanser. En yaygın görülen meme kanser tipi tüm meme kanserlerinin %75'ini oluşturan Duktal Kanserdir [8]. Histolojik olarak meme karsinomları in situ karsinomlar ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 1-1).

Tablo 1-1: Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması

İn situ Karsinom	İnvaziv Karsinom
In Situ Duktal Karsinom	İnvaziv Duktal Karsinom
In Situ Lobüller Karsinom	İnvaziv Lobüller Karsinom
	Tübüler Karsinom
	Medüller Karsinom
	Müsinöz Karsinom
	Papiller Karsinom

2.2.2.1. İn Situ Meme Kanserleri

İn situ meme kanserleri duktuslarda (in situ duktal karsinoma) ya da lobüllerde (in situ lobüler karsinoma) oluşmaktadır. Bu aşamadaki kanserlerin hemen hemen hepsi iyileştirilebilir özelliktedir.

2.2.2.2. İnvaziv Meme Kanserleri

Tüm meme kanserlerinin %10-20'sini temsil eden üçlü negatif meme kanseri (TNBC), östrojen steroid reseptörü (ER), progesteron steroid reseptörü (PR) ve bir tirozin kinaz olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) ekspresyon eksikliği ile karakterizedir.

İnvaziv meme kanserleri içerisinde %80 görülme oranına sahip olan İnvaziv duktal karsinom, perimenapozal ve postmenapozal dönemde görülmektedir. İnvaziv duktal karsinomdan sonra sıklıkla görülmekte olan bir diğer invaziv meme kanseri olan İnvaziv Lobuler Karsinomdur. Multifokal, multisentrik ve bilateral özellik gösterebilmektedir.

BRCA1 geni pozitif olan herediter meme kanserleri arasında %4 oranında medüller karsinomlarda yer almaktadır. Bu tümörler, yumuşak ve kanamaya meğilli

tümörlerdir. %2 oranında görülen Müsinoz karsinom ve Papiller karsinom ise genellikle yaşlılarda görülmektedir.

2.3. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Meme kanseri tedavileri hastalara özel olmakla birlikte; kanserin tipine, kanserin hangi evrede olduğuna, kanser hücrelerinin hormonlara duyarlı olup olmadığına, hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişmektedir. Meme kanseri için bir çok tedavi seçeneği bulunmaktadır.

Evre I ile evre III meme kanseri olan hastalar için genel tedavi, tümörün çıkarılmasını içeren cerrahi, sonrasında meme kanseri alt tipine göre kemoterapi uygulaması ve gerektiğinde duruma göre radyasyon tedavisi ile bir dizi tedavi planını kapsamaktadır [10]. Evre IV meme kanserine sahip hastalar için, tedavinin amacı meme kanserini mümkün olduğunca uzun süre kontrol altında tutmaya yöneliktir. Evre IV meme kanseri tedavisi ilaç kombinasyonlarından oluşmaktadır [10].

2.3.1. Cerrahi Yöntemler

Tümör kalmayacak şekilde operasyonla çıkarılır ve koltuk altına yayılım gösteren hastalarda lenf bezleri tümüyle alınır.

2.3.1.1. Mastektomi

Meme uçları dahil tüm meme alınır. Koltuk altı lenf bezleri veya memenin altındaki kas dokuları alınmaz.

2.3.1.2. Lumpektomi

Meme kanseri erken teşhis edildiğinde daha çok memenin etkilenmiş kısmı alınır. Memeden sadece kanserli dokunun ve etrafını kuşatan bir kısım sağlam dokunun çıkarılmasıdır [11].

2.3.1.3. Lenf Bezi Cerrahisi

Kanserin lenf nodlarına yayılıp yayılmadığının anlaşılması uygulanacak tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu yüzden lenf nodu çıkarılır ve incelenir. Duruma göre tedavi planı yapılır [11].

2.3.2. Kemoterapi

Kemoterapi, adjuvan ve neoadjuvan olmak üzere kanser hücresinin durumuna göre uygulanmaktadır. İki şekilde de kullanılabilen ortak ilaç grupları; Taksanlar, Antrasiklinler, Monoklonal Antikorlardır. Eğer kanserin nüks etme olasılığı ve vücudun başka bölgelerine yayılma olasılığı varsa ameliyat sonrası kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak tümör boyutu büyük ise tümörün boyutunun küçültülmesi amacıyla ameliyat öncesi kemoterapi uygulaması yapılmaktadır. Kemoterapi yine büyük tümörlerde ameliyat öncesi tümör boyutunu küçültmek için de uygulanmaktadır ve neoadjuvan kemoterapi olarak adlandırılmaktadır. Meme kanserinde ise kemoterapi genellikle ameliyattan sonra uygulanmaktadır. Ameliyat sonrası herhangi bir kanserli hücre kalmamasına rağmen koruyucu bir tedavi olarak bir süre daha kemoterapi tedavisi devam edebilmektedir [11].

Tablo 2-1: Kemoterapi İlaçları (ilaç sınıflaması gözden geçirilsin)

Antrasiklinler	Doxorubicin Epirubicin
Taksanlar	Paclitaxel Docetaxel
Alkilleyici Ajanlar	Cyclophosphamide

2.3.3. Radyoterapi

Radyoterapide, X-ışınları, radyoaktif izotoplar ve elektron demetleri kanser hücrelerini yok etmek için kullanılmaktadır. Dışarıdan vücuda ışın verme şeklindeki tedavi yöntemi erken aşamadaki meme kanserleri hastalarında lumpektomiden sonra uygulanmaktadır. Fakat bu tedavi yöntemi daha büyük meme kanserlerinde mastektomi sonrasında da önerilmektedir [12, 13].

Meme kanserinde radyoterapi ile koltukaltı ve meme bölgesine verilen ışınla, ameliyat sonrası kalma olasılığı olan kanser hücrelerini yok etmeyi hedeflenmektedir. Bir makinadan doğrudan tümöre verilen bu yöntem meme kanseri hastalarında en çok kullanılan yöntemdir. Meme kanseri tedavisinde radyoterapi, kalan meme dokusunu

korumak amacı ile özellikle yenileme riski yüksek hastalarda ve meme koruyucu cerrahi yapılan hastalarda uygulanır.

2.3.4. Hormonterapi

Hormon reseptör pozitif olan hastalarda hormonal tedavisi uygulanmaktadır. Post-menapoze dönemde androjenleri östrojen hormonuna dönüştüren aromatazı etkisiz hale getiren aromataz inhibitörleri olan Anastrozol, Exemestan, Letrozol kullanılmaktadır. Fulvestrant, seçici östrojen reseptör modulatorü (SERM) olarak adlandırılan gruba dahil olan Tamoksifen ile tedavi sonrasında veya tedavi sırasında nüks eden hastalarda tercih edilmektedir. Bu ilaç grubu kanser hücreleri üzerindeki östrojene bağlanarak östrojeni bloke etmektedir. LH-LR Agonisti (Zoladex) premenapozal hastalarda nüks durumunda veya adjuvan tedavi olarak kullanımı tercih edilen ilaç grubudur. Hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 'yı inhibe eden Palbociclib de meme kanseri tedavisinden kullanılan ilaçlar arasındadır [14].

2.3.5. Hedefe Özgü İlaç Tedavisi

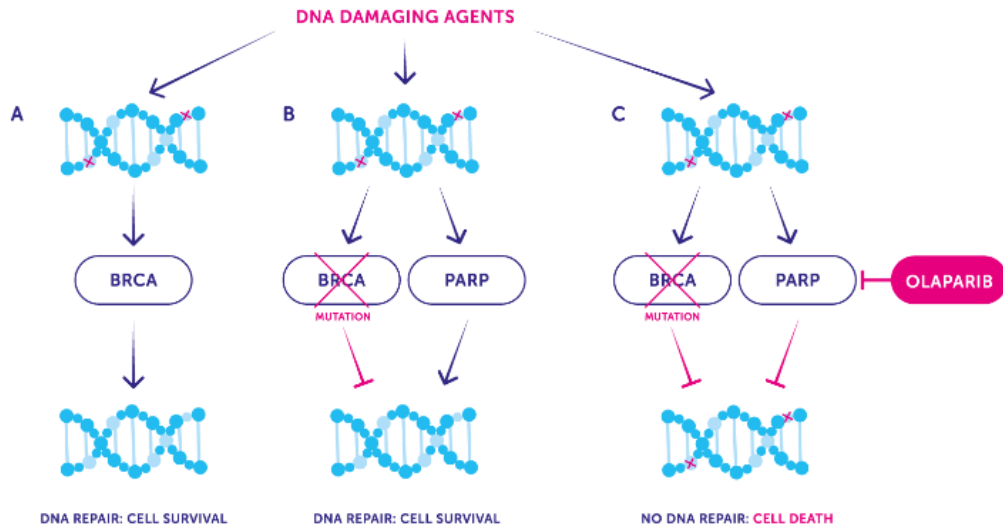
HER2 proteinini hedef alan; Trastuzumab (Herceptin), kanser hücrelerini besleyen damarların oluşumunu sağlayan sinyalleri engelleyen; Bevacizumab (Avastin), yine HER2 proteinini hedef alan; Lapatinib (Tykerb), m-TOR proteinini hedef alan; Everolimus (Afinitor), HER2 proteinini hedefleyen ilaçlardır. Diğer ilaçlar arasında da Pertuzumab (Perjeta) ve TDM 1 (Kadcyla) verilebilir [15].

2.3.6. Hedefe Yönelik Akıllı İlaç Tedavisi (PARP İnhibitörleri)

BRCA1 ve *BRCA2* mutasyonları bulunan meme kanserlerinin tedavisinde Poli-ADP-riboz-polimeraz baskılayıcıları yani PARP inhibitörleri yeni moleküler hedef tedavisi olarak klinikte yer almıştır [9]. PARP inhibitörlerinden biri olan Olaparib'in platine duyarlı meme kanserinde de etkili olduğu bilinmektedir (Şekil 2-6). Bir başka PARP inhibitörü olan AZD-2461, meme kanseri modellerinde P-glikoprotein aracılı dirençten etkilenmeyen yeni bir PARP inhibitörü olarak bildirilmiştir [16]. AZD-2461, kanser tedavisi için onaylanan ilk PARP inhibitörü olan Olaparib'in ardından yeni nesil

ve Olaparib'e göre farklı özellikleri olan bir terapötik ajandır [16]. Bu molekülün Olaparib' den en büyük farkı P-glikoprotein aracılı olarak etki etmesidir. Bu sayede söz konusu AZD-2461 molekülü Olaparib'e direnç gösteren hastalar için yeni bir umut olmuştur

Meme, prostat, kolon, over, akciğer, lösemi gibi çeşitli kanserlerde yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda PARP inhibitörlerinin (Olaparib, rucaparib, niraparib, veliparib, iniparib, AZD-2461, PJ34) farklı yollara etki ederek tümör hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve kanser hücrelerinin yayılıp metastaz yapmasını engellediği görülmektedir [16]. *BRCA1* allel kaybı olan hastalarda *BRCA1*'nin aktif olmadığı durumda PARP inhibitör tedavisinde olumlu sonuçlar görülmektedir.



Şekil 2-6: PARP inhibitörü Olaparib'in etki mekanizması[17].

Yapılan çalışmalarda PARP inhibitörlerinin BRCA mutasyonu taşıyan hastalarda daha iyi sonuç verdiği klinik gözlemlere bağlı olarak bildirilmiştir [17].

2.4. Meme Kanseri Evrelendirilmesi

Kanserde evreleme, TNM denilen T=tümör çapı büyüklüğü, N=komşu lenf nodu tutulumu, M= uzak metastaz, gibi tümör özelliklerine göre evre 1-2-3-4 şeklinde dört evre ve alt grupları olarak evreleme yapılır (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Meme kanseri TNM evrelenmesi [18]

T (Primer Tümör)	N(Kanserin lenf noduna ulaşp ulaşmadığı)	M (Metastaz)
Tx Primer tümör yok.	Nx Lenf Nodu yok.	Mx Uzak metastaz olup olmadığı değerlendirilememiştir.
Tis Primer tümör varlığına dair kanıt yok.	N0 Lenf nodlarında kanser yok.	M0 Uzak metastaz yok.
T0 Karsinoma in situ (Yayılmamış erken kanser aşaması)	N1 Lenf nodu katılımı var. Yayılım sayısı ya da genişliği	M1 Kanser vücudun uzak bölgelerine de yayılmış. Uzak metastaz var.
T1 (Primer tümör büyüklüğü ve genişliği)	N2 Lenf nodu katılımı var. Yayılım sayısı ya da genişliği	
T2 (Primer tümör büyüklüğü ve genişliği)	N3 Lenf nodu katılımı var.	
T3-T4 (Primer tümör büyüklüğü ve genişliği)		

2.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserini etkileyen risk faktörleri yaş, aile öyküsü, üreme ile ilgili faktörler, menopoz, yaşam şekli, emzirme, ilk mensturasyon yaşı, çocuk sahibi olma, beslenme şekli, alkol, sigara olmakla beraber obezite ve hormonal durumlarda meme kanseri ile ilişkilidir.

2.5.1. Yaş

Meme kanseri riski yaşla birlikte artmaktadır. Yaşa ve moleküler alt tiplere göre yapılan çalışmalarda meme kanserinin en yüksek insidans gösterdiği yaş aralığı 50-59 arasındadır. Luminal B tipi kanserlerin %32.4'ü, üçlü negatif meme kanserlerinin % 35.0 bu yaş aralığında tanı almaktadır. Luminal A tipi meme kanserinde ise yaş aralığı 60-69 arası olup insidans % 31.9'dur. Üçlü negatif meme kanseri ile yapılan çalışmalarda bu kanser alt türünde 40 yaşından sonra her yaş için insidans giderek artmakta olup ancak insidans 70 yaşından sonra bir azalma göstermektedir. 70 yaşından sonra en yüksek insidans gösteren meme kanseri alt tipi Luminal A'dır (% 31.9 ve% 22.7)[19].

Meme kanserinin sağ kalımı tanı yaşı ile ilişkilidir. 50 yaşın altındaki hastalarda düşük sağkalım görülürken, 70 yaşın üzerindeki hastalarda en düşük sağkalım görülmektedir. Bunun nedeni yaş ve yaşa bağlı ortaya çıkan diğer hastalıklardır. 50-59 yaş aralığındaki hastalarda tanı konma oranı daha fazla olduğu için tedavi ve sağkalım oranının yüksek olduğu görülmektedir [19].

2.5.2. Menopoz

Geç menopoz kanser riskini arttırmaktadır. Yani doğurganlık hayatı kısa olan kadınlarda meme kanseri daha az görülmektedir. Menopoz sonrası östrojen hormonu kullanan kadınlarda az da olsa meme kanseri riski artmaktadır. Ancak ilaç alımı kesildiğinde yıllar içinde risk azalmakta ve risk normal düzeye gerilemektedir [20].

2.5.3. Üreme ile ilgili Endokrin Faktörler

Çocuklukta erken yaşta adet görülmesi önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca kadınlarda hiç doğum yapmamış olmak veya 35 yaş sonrası ilk doğumunu yapmak meme kanseri riskini arttırmaktadır. Emzirmek ise meme kanseri riskini azaltmaktadır [21].

2.5.4. Beslenme Şekli

Sağlıklı diyet ve yaşam tarzı, sağlık için büyük önem taşımaktadır. Menopozdan sonra yağ tüketimi fazla olan kadınlarda meme kanseri sıklığının artmaktadır. İşlenmiş et ürünleri (sosis,salam), krema, çikolata, pasta ve bisküvi gibi doymuş yağdan zengin olan gıdalarla beslenenlerde meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır. Omega-3 balık yağı içeren gıdalardan zengin beslenmenin meme kanseri riskini azalttığı yapılan çalışmalarda görülmektedir [22].

Lifli gıdalarla beslenme de meme kanserinde risk azaltıcı bir etkidir çünkü bol posalı gıdalar dışarıdan alınan östrojenin emilmeden atılımını kolaylaştırmaktadır [23]. Şekerden zengin beslenme ise kilo artışına sebep olarak, menopozdaki kadınlarda obezitenin sebep olduğu risk artışına benzer bir riske neden olmaktadır. Kalsiyumdan zengin süt ve süt ürünleri ile beslenmenin meme kanseri riskini azalttığına dair çalışmalarda bulunmaktadır [24]. Ayrıca fazla miktarda meyve tüketen kadınlarda meme kanseri görülme sıklığında azalma olmaktadır [24].

2.5.5. Alkol ve Sigara

Alkol tüketimi meme kanseri riski ile ilişkilidir ve bir çok çalışmada bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca tümör ilerlemesini ve meme kanseri nüksünü etkileyebilir, böylece meme kanserine özgü mortalite riskini etkileyebilmektedir. Ancak yapılan son çalışmalarda, meme kanseri tanısı öncesinde bir kadının hayatı boyunca tüketilen alkolün, meme kanserinden sonraki ölüm riskini artırdığına dair net kanıt bulunmamıştır [25]. Sigaranın, özellikle ergenlik çağında veya peri-menarş yaşlarda sigara içmeye başlayan kadınlar arasında, meme kanseri riskini önemli ölçüde arttıran bir etken olduğu bildirilmiştir [26]. Sigara ile ilişkili meme kanseri riski, aile öyküsü olan kadınlar için daha fazla olmaktadır.

2.5.6. Obezite

Premenopozal ve postmenopozal kadınlarda obezitenin meme kanseri riski üzerindeki etkileri ER durumuna göre farklılık gösterir. Obez yağ dokusunda lokal hipoksi oluşumu, leptin ve VEGF salgılanmasını düzenlemekte ve adiponektin düzeyini azaltmaktadır. Obez adipoz doku tarafından yüksek seviyelerde salgılanan belirli

sitokinler ve leptinler, hem adipositlerin hem de bağışıklık hücrelerinin ve preadipositlerin salınımını artırır ve NF- κ B yolunu aktivasyonuna aracılık eder. NF- κ B yolu, TNF - α ve IL - 6 ayrıca meme stromal fibroblastları ve adipositlerinde aromataz ekspresyonunu uyarmaktadır. Obez kadınlarda serum östrojen seviyesi yükselmeye meyillidir, çünkü yağ dokusunda bulunan ve ifade edilen aromataz enzimi ile androjenler östrojene dönüşmektedir. Hormonlardaki bu değişiklikler meme kanseri gelişimi için elverişli bir yerel mikroçevre oluşturmaktadırlar [27].

2.5.7. Genetik Faktörler

Meme kanseri, bir seri genetik mutasyonel olaylardan kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 / neu, tedavi kararlarına yardımcı olmak için rutin klinik uygulamada kullanılan moleküler biyobelirteçlerdir. Yapılan çalışmalarda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ilave olarak farklı genlerin de biyobelirteç olama potansiyeli gösterilmiştir [3]. Meme kanserinin yaklaşık %5-10'u kalıtsaldır ve meme kanseri yatkınlık genleri olan *BRCA1* ve *BRCA2*'nin kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir [3]. Birbirinden bağımsız olan gen gruplarında çeşitli mutasyonlar ve tümör örneklerinde bu mutasyonların neden olduğu çeşitli ekspresyonlar görülmektedir. Meme kanseri insidansını birbirinden bağımsız şekilde etkileyen bir çok farklı genetik faktör bulunmaktadır. Yüksek riskli genler olan *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11*, *CD1* ve *PTEN* ailesel riskin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır [28]. Orta risk genler olan *CHEK2* (1100delC), *ATM* ve *PALB2* genleri kalıtsal meme kanser riskinin %5'ini oluşturmaktadır. Bununla beraber 180'den fazla düşük riskli genlerden oluşan bir grup ise ailesel riskin % 18'ini açıklamaktadır [28].

2.6. Meme Kanseri Oluşumunda Görev Alan Genler ve Oluşturdukları Sendromlar

Ailesel kanser sendromlarından bazıları meme kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir.

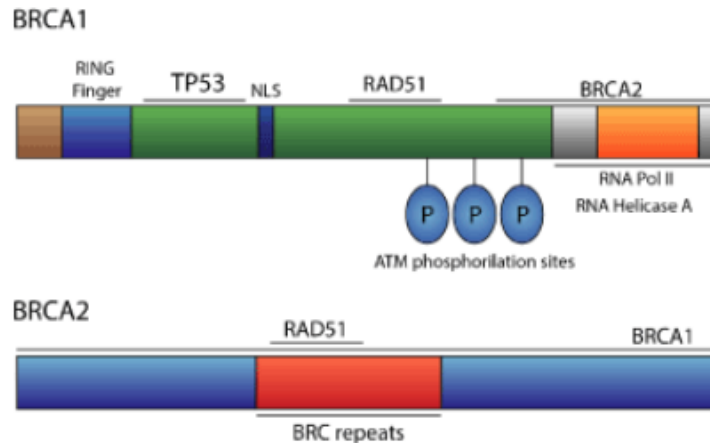
TP53 ve *CHEK2* genleri ile ilişkili olan Li Fraumeni Sendromu, otozomal dominant kalıtılmaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri ile ilişkili ailesel meme-over

kanseri veya kalıtsal meme-over kanseri sendromunda (HBOC), söz konusu genlerde meydana gelen kanser yatkınlık mutasyonları otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Von Hippel Lindau hastalığı (VHL) ise *VHL* geninin mutasyonundan kaynaklanan bir sendromdur. The Peutz–Jeghers syndrome (PJS), ise *STK11* adı verilen tümör baskılayıcı bir genin sorumlu olduğu bir sendromdur. Gerek VHL gerekse PJS sendromlarının meme kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir [29]. Meme kanseri riskini %25-50 ve benign meme değişiklikleri riskini %65 oranında arttıran *PTEN* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan Cowden Sendromu da meme kanser riski ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiş bir sendromdur [30]. Hücre bölünmesinde görevli ve çift zincirli DNA kırıklarına cevapta önemli bir rolü olan *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) geni (11q22.3) de, meme kanseri ile ilişkilendiren bir genidir [30].

2.6.1. *BRCA1/BRCA2* Genleri ve Proteinleri

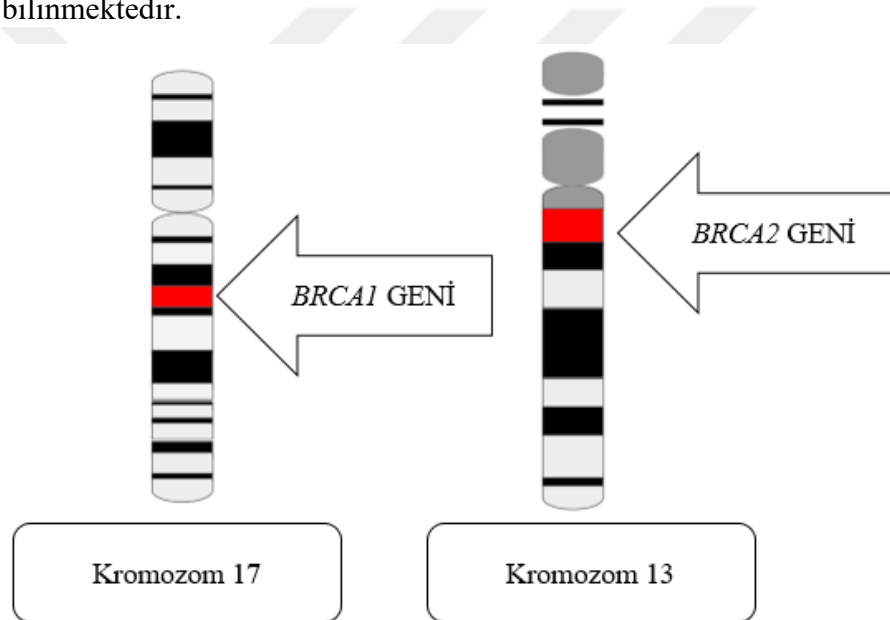
BRCA1 ve *BRCA2* genleri meme kanseri de başta olmak üzere diğer kanserlerde de tümör baskılayıcıları olarak genomik stabiliteyi korumaktadır. Tümör baskılayıcı proteinler, hücrelerin büyümesini ve bölünmesini kontrol ederler [31].

BRCA1 proteini, hasar görmüş DNA'nın onarımında rol oynar. Birçok normal hücrenin çekirdeğinde, *BRCA1* proteini DNA'daki kırıkları onarmak için diğer birçok proteinle etkileşir. Bu kırılmalar doğal ve tedaviye bağlı radyasyon veya diğer çevresel nedenlerden kaynaklanabilir. DNA onarımına yardımcı olarak, *BRCA1* proteini hücrenin genetik stabilitesini sağlamada kritik bir rol oynar. *BRCA1* proteini, hücre bölünmesini düzenleyen diğer tümör baskılayıcıları ve diğer birçok protein ile etkileşime girer [31].



Şekil 2-7: BRCA1 ve BRCA2 genlerinin şematik gösterimi [32].

BRCA1 ve *BRCA2* sırasıyla 17q21 kromozomu üzerinde bulunan 1,863 ve 13q12-13 kromozomu üzerinde bulunan 3,350 amino asitten oluşan büyük proteinleri kodlayan ayrıca 20'den fazla ekzondan oluşan tümör baskılayıcı genlerdir (Şekil 2-8). Her iki gen C-terminalindeki BRCT alan hariç olmak üzere, bilinen diğer genler ile önemli bir homoloji taşıyan *BRCA1*, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yanıt ile ilişkili 40'dan fazla genle etkileşim halindedir[31]. Tanımlanan mutasyonlar, proteinin boyunun kısalmasına yol açmakta ve sağlam olan ikinci kopyanın genom stabilitesinin tam olarak korunmasında yetersiz kalması ve buna bağlı olarak kansere yatkınlık geliştirildiği bilinmektedir.



Şekil 2-8: BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kromozom üzerindeki konumunun şematik gösterimi [33].

Hem *BRCA1* hem de *BRCA2* nükleer proteinlerdir. *BRCA1* geninde binlerce mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyonların çoğu, erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda over, hem erkeklerde hem de kadınlarda meme ve pankreas kanseri riski ile ilişkilidir [31]. Bu mutasyonlar vücuttaki her hücrede yani germline da bulunduklarında bir nesilden diğerine geçmektedir. Sonuç olarak, bazı ailelerde meme ve/veya over kanserlerinin sıklıkla görülmesi, bu kanserlere prostat, pankreas, kolon ve mide gibi kanserlerin de eşlik ettiği gözlemlenmiş ve bu genlerle bu hastalıkların korelasyon gösterdiği saptanmıştır [31]. Literatürde de söz konusu hastalıklarla bu genlerin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bir bireyin *BRCA1* geninde mutasyon taşıyor

olması o kişinin kesinlikle kanser olacağı anlamına gelmemekte sadece kansere yakalanma riski normal popülasyona göre 8-10 kat arttığı anlamına gelmektedir. Bunlara ilave olarak, diğer genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri de kişinin kansere yakalanma riskine katkıda bulunmaktadır.

BRCA1 gen mutasyonlarının çoğu, *BRCA1* proteininin kısalmasına yol açan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar sebebi ile ilgili protein doğru bir şekilde ve yeterli dozda üretilemez ve hücreyi DNA hasarından tam olarak koruyamaz. Genin yarı dozda çalışması sebebi ile hücrede oluşan hasarların tümü tamir edilemez ve biriken hasarlar hücrelerin büyümesini ve kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör oluşturmaya neden olmaktadır [31]. Bu genlerde mutasyon taşıyan aile bireyleri sıklıkla kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromunu taşımaktadırlar. Bu sendromu taşıyan kadınlar meme, over, pankreas, kolon kanserinden, erkekler ise erkek meme kanseri, prostat, pankreas ve kolon kanseri için yüksek riske sahiptirler. *BRCA1* gen mutasyonu taşıyan kadınlar, genel nüfusun %1,6' sını oluşturmakta olup, yaşamları boyunca %35-80 oranında meme ve yumurtalık kanseri gelişme riskine sahiptir [34]. Bununla beraber aynı *BRCA1* gen mutasyonuna sahip aile bireylerinin neden farklı organlarda kanser geliştirdiği konusu ise hala açıklık kazanmamıştır. Belirli organları etkileyen çevresel faktörler ya da mikro çevre, belirli bölgelerdeki kanserlerin gelişiminde katkıda bulunuyor olabilir [34].

BRCA1 mutasyonları olan tümörlerin çoğu, hem östrojen hem de progesteron reseptörleri için genellikle negatif iken, *BRCA2* mutasyonları olan çoğu tümör, bu hormon reseptörleri için pozitifdir. *BRCA1* mutasyonları olan meme kanserleri ve *BRCA2* mutasyonları olan meme kanserleri karşılaştırıldığında bunlarda önemli ölçüde farklı gen gruplarının ifade edildiğini görülmektedir [35].

BRCA1 ve *BRCA2* genleri, homolog rekombinasyon ve çift zincir DNA kırıklarının onarımında görevli olan *RAD51* geni ile etkileşime girmektedir [36]. S fazı hücrelerinin genotoksik ajanlara maruz kalmasında sonra, *BRCA1*, *BRCA2* ve *RAD51* genleri replikasyon bölgelerine giderek onarımı gerçekleştirirler [36]. *BRCA1* ya da *BRCA2*'nin işlevsel yokluğunda, onarım gerçekleşmez, sonrasında yine tümör baskılayıcı bir gen olan *p53* geni aktive olur ve hücre döngüsü durdurularak hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşir. *p53* geni aktive olmadığı durumda ise döngü durdurulamaz ve hücre proliferasyonu devam ettiği için DNA hasarı onarılamamaktadır.

Tablo 2-1: *BRCA1* geni ile etkileşimde olan genler

BRCA1	
DNA Tamiri	RAD50, RAD51, NBS, MRE1
Transkripsiyonun Düzenlenmesi	c-MYC, E2F1, CtIP, ZBRK1
Kromatin Yapısının Düzenlenmesi	HDAC, RB1
Hücre Siklusunun Düzenlenmesi	CHEK1,CHEK2,TPX2, NuMa
Ubikitinasyonun Düzenlenmesi	BARD1,BAP1

2.7. Ekstraselüler Matriks Proteinleri

Metastaz, meme kanserinin en ölümcül yönü ve hastalık nüksü ile ilişkili en belirgin özelliğidir. Epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) meme kanseri metastazının başlatılmasına aracılık ettiği moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

2.7.1. Matriselüler CCN Proteinleri

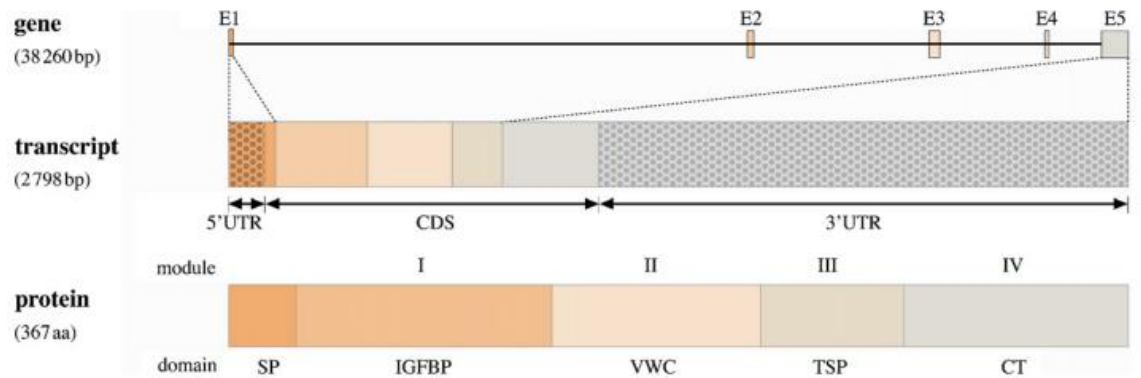
Matriselüler CCN proteinleri, tümör fonksiyonu ile gelişimi ve Ekstraselüler matriks (ECM) ile ilişkili proteinlerdir. ECM protein ailelerinden biri olan CCN (Cyr61, CTGF, NOV) proteinleri hücrelerel sinyalleri düzenleyerek kanserde patolojik işlev göstermektedir. CCN proteinleri arasında meme kanserinde *CCN1/Cyr61*, *CCN2/CTGF*, *CCN3* ve *CCN4/WISP1* tümör oluşturulması yönünde etkiye sahipken, *CCN5 / WISP2* ve *CCN6 / WISP3* genleri tümör baskılayıcı etki göstermektedir [37]. *WISP-1* geni, tümör baskılayıcı aktivitelerde daha fazla rol alırken; *WISP-1* seviyesinin, tümör saldırganlığı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir Buna karşılık, *WISP-2*, meme kanserinin agresifliği ile ilişkili olup kötü bir prognostik özellik taşımaktadır. *WISP-1* ve *WISP-2*' nin zıt yöndeki bu etkileri, bu moleküllerin birinin terapötik, diğerinin ise prognostik bir rolünün olduğunu düşündürmektedir.

Meme kanseri ile CCN proteinleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha fazla bilimsel çalışmaya gereksinim vardır. *CCN1* ve *CCN2* genlerinin aşırı eksprese edilmesi meme kanserinde metastaz ile ilişkilidir [37]. *WISP-1(CC4)* geni de tümör oluşumunu artırarak metastaza neden olmaktadır. *WISP-1* başlangıçta *WNT1* ve β -*katenin*

yolağında görevli olarak tanımlanmış bir gendir ve β -katenin aracılı tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *WISP-1* geninin ekspresyon artışının meme kanserli hastalarda metastaz gelişiminde etkili olduğu görülmektedir [37]. *Wnt*/ β -katenin sinyal yolu ve bu yolda görev alan moleküller hakkında edinilecek bilgiler, metastatik meme kanseri teşhis ve tedavisinde önemli olacaktır. Son araştırmalar, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) metastazın erken aşamalarında önemli olduğu gösterilmiştir [38]. EMT’de, epitel hücreleri özelliklerini kaybeder, mezenkimal özellikler kazanarak hareketli ve invaziv hale dönüşürler. EMT deki en önemli olaylar arasında hücre-hücre etkileşiminin artadan kaldırılması ya da azaltılmasının yanında özellikle epitel yapısını korumada kritik olan E-cadherin’in azaltılması sayılmaktadır. E-cadherin ekspresyonunun kaybedilmesinin tümör invazyonu ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. E-cadherin ekspresyonunun kaybıyla, mezenkimal belirteçler olan vimentin ve fibronektin EMT’nin devamını ve tamamlanmasını oluşturmak üzere yüksek düzeyde ifade edilirler. TGF- β 1 sinyalleri, göç, istila ve EMT gibi kanser hücrelerinin metastatik yayılımında önemli bir role sahiptir.

2.8. WISP-1 (WNT-1-Uyarılabilir Sinyal Yolu-1 Proteini, (CCN4))

WISP-1, 8q24.1 – q24.3 kromozomu üzerinde bulunan, 5 ekzon ve 4 introndan oluşan, sistein bakımından zengin bir heparin bağlayıcı glikoproteindir ve hücre çoğalmasında önemli rol oynamaktadır [39]. 367 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. 40 kD kütleyle sahip bu proteinin cDNA uzunluğu; 2,830 bp dir. *WISP-1* proteininin domain yapısı, sinyal peptidi ile başlamaktadır ve dört fonksiyonel alana sahiptir. Domain yapısında, SP bölgesi sonrasında sırasıyla; insülin büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP), van willebrand faktör C (VWC), trombospondin tip I tekrarı (TSP) ve C-terminal alan (CT) bulunmaktadır (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: *WISP-1* geninin yapısı [40].

WISP-1, akciğer, böbrek ve dalak gibi birçok iç organda ifade edilir. *WISP-1*, diğer hücrelerin hücre dışı matrikse bağlanmasını arttıran Lösin açısından zengin proteoglikanlara bağlanmaktadır. *WISP-1*, BMP-2'ye bağlanarak mezenkimal hücre proliferasyonunu ve osteoblastik farklılaşmaya neden olur. Erken evre ER-pozitif lenf nodu negatif meme kanseri hastaları arasında artmış metastaz riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [40]. Bu nedenle, *WISP-1* ve *EXT1* genlerinin gelecekte yapılacak etraflı çalışmalarla metastaz riski göstergesi olarak görev yapıp yapmayacağı anlaşılabilecektir. *WISP-1* geni, meme kanseri için prognostik bir belirteç olarak kullanılabilir ancak bir tümör uyarıcısı mı yoksa baskılayıcısı mı olduğu hala açığa kavuşturulamamıştır.

2.8.1. *WISP-1* Geni ve Kanser

WISP-1 geni, Wnt / β -katenin sinyal yolunun hedef geni olsa da, çeşitli sinyal iletim yollarından oluşan ve farklı tümörlerde farklı biyolojik olayların gerçekleşmesi ile bağlantılı olan karmaşık bir sinyal ağının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

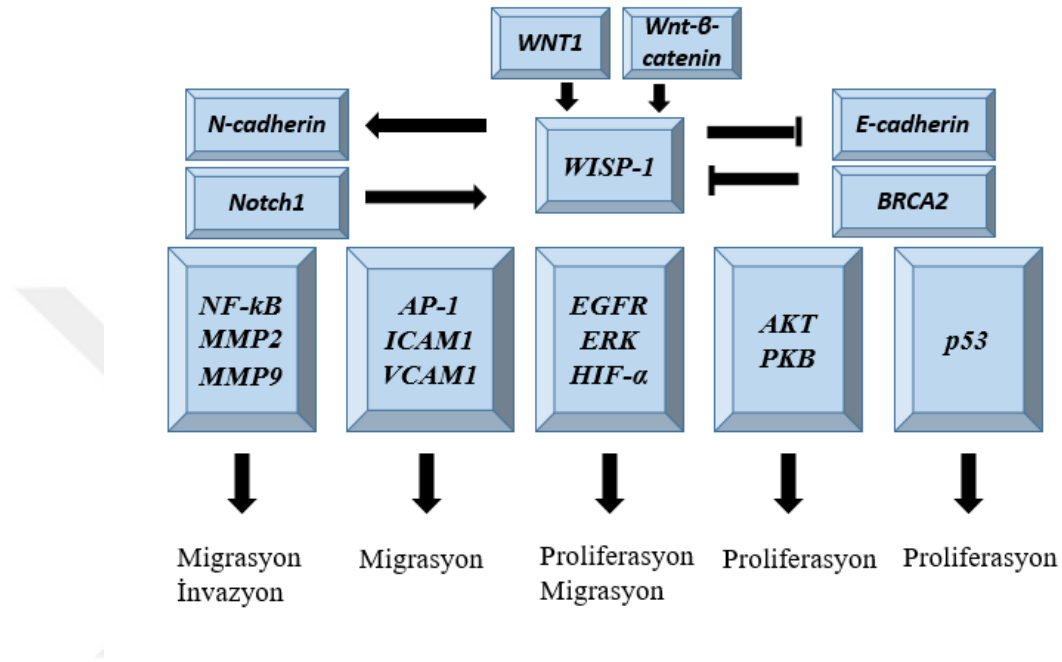
Meme kanseri dokuları sağlıklı meme dokularına göre daha yüksek *WISP-1* mRNA ekspresyonuna sahip olmakla birlikte yapılan çalışmalarda rekombinant *WISP-1* uygulandığında meme kanseri hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmektedir. *WISP-1* transfeksiyonu, MCF-7 hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyerek daha yüksek migrasyon ve invazyona yol açmaktadır [39]. *WISP-1*, hücre dışı matrikste (ECM) salgılanan bir matriküler proteindir. *WISP-1*, diğer ECM proteinleri gibi, farklılaşma, proliferasyon, migrasyon gibi biyolojik olaylarda görev almaktadır. *WISP-1* 'in ekspresyon seviyesi tümör tipi, hasta yaşı ve aile öyküsüne bağlı olarak farklılık göstermektedir.

WISP-1, osteosarkom hastalarında *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonunu düzenleyen NF- κ B sinyal yolunu aktive ederek hücresel migrasyonu ve invazyonu desteklemektedir. *Notch1*, *WISP-1* sinyal iletim yolunu aktive ederek insan melanom hücrelerinin çoğalmasını baskılamaktadır [41].

WISP-1, PKB/AKT sinyal yolunu aktive ederek meme kanseri hücre hatlarında *p53* tümör baskılayıcı genine bağlı hücre ölümünü önleyerek proliferasyonu desteklemektedir [42].

WISP-1, genellikle çeşitli kanserlerde yüksek oranda ifade edilen ve kanser hastalarının progresyonu, uzak metastazı ve kötü prognozu ile ilişkili olan bir onkogen

gibi davranmaktadır; ancak yapılan çalışmalarda bazı kanser hücre hatlarında bir tümör baskılayıcı gibi hareket ettiği de görülmektedir. *WISP-1* geninin meme kanserinde onkogen mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğu tartışmalıdır ve bu konuda net bir bilgi literatürde bulunmamaktadır [43].

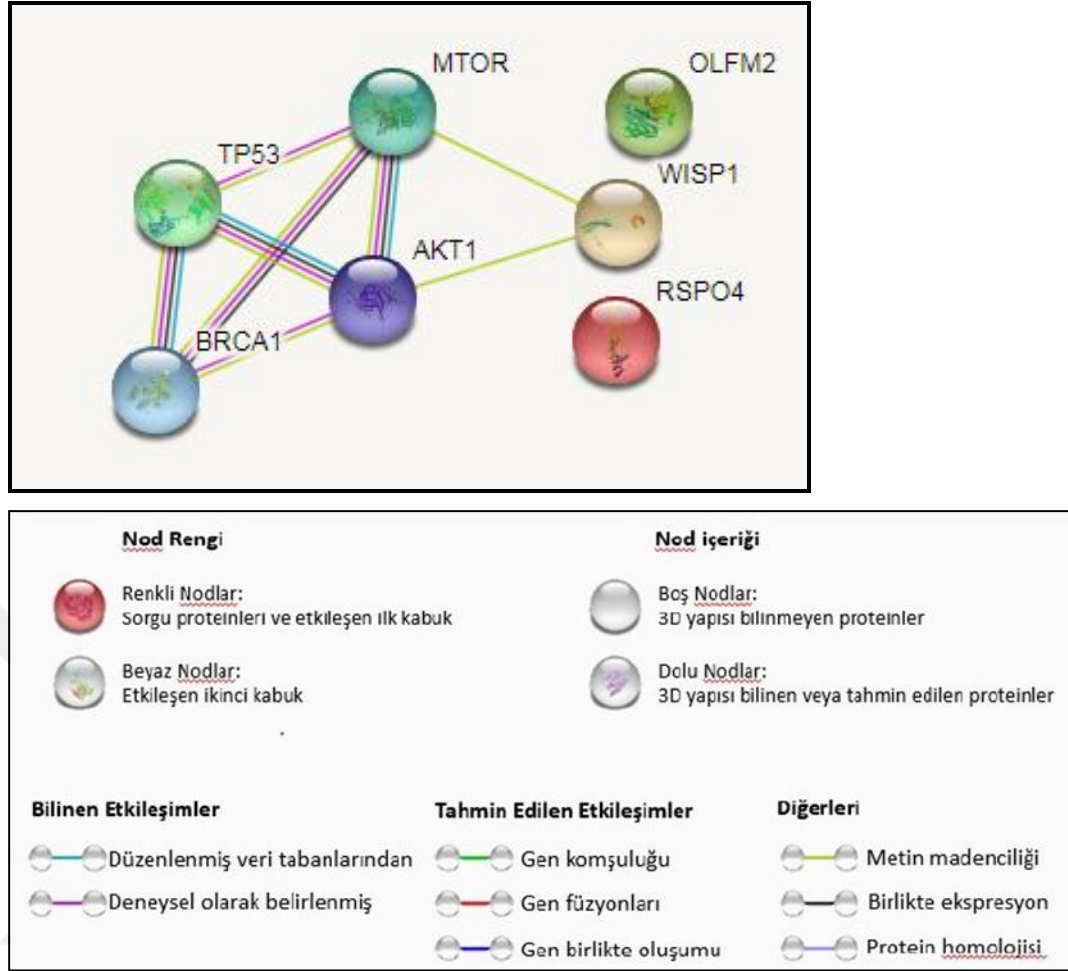


Şekil 2-10: *WISP-1*' in ilişkili olduğu genler ve etkileri

Her ne kadar *WISP-1*, Wnt / β -katenin sinyal yolunun hedef geni olsa da, çeşitli sinyal iletim yollarından oluşan ve farklı tümörlerde, farklı biyolojik işlemlerin gerçekleşmesi ile bağlantılı olan karmaşık bir sinyal ağının düzenlenmesinde görev almaktadır (Şekil 2-10). *WISP-1*, kanser tanı ve tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak hareket etme potansiyel rolünü üstlenmektedir.

2.8.2. AKT ve BRCA1 genlerinin *WISP-1* ile ilişkisi

BRCA1 geninin eksikliği ya da mutasyonu AKT onkogenik yolunu aktive ederek AKT geninin fosforilasyonunu ve kinaz aktivitesini artırır [44]. *BRCA1*-AKT yolu tümör oluşumunda önemli olup *BRCA1*'in AKT sinyal yolunun negatif bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. *BRCA1*'in eksik olduğu ya da mutasyonlu olduğu kanser hastalarında, AKT sinyal yolu ve bu sinyal yolağındaki genler yeni bir terapötik hedef olmaktadır.



Şekil 2-11: *WISP-1* geni ile ilişkili proteinleri gösteren STRING analizi

2.8.3. TGF BETA (TGF- β)

Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), EMT' nin güçlü bir indükleyicisidir bununla birlikte tümör progresyonu ve metastazının pozitif düzenleyicisidir. *TGF- β 1*, hücrel farklılaşma, homeostaz ve EMT dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik sürecin düzenlenmesinde görev alan bir sitokindir.

TGF- β 1'in aşırı ekspresyonunun, bazal benzeri ve luminal tip meme kanserlerinin kötü prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bu da *TGF- β 1* sinyalinin meme kanseri hücrelerinin gelişmesinde önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir [38]. Bundan dolayı, meme kanserinde bazal ve luminal tipte *TGF- β 1* sinyalinin inhibe edilmesiyle invazyon ve metastazın inhibisyonu sağlanmaktadır. *TGF- β 1*, SMAD sinyalinin uyararak EMT 'ye aracılık etmektedir [45].

SMAD genleri, hedef genlerin transkripsiyonu için *TGF- β 1* sinyallerini hücre yüzeyinden çekirdeğe iletmede görevli olan proteinlerdir. *TGF- β 1*, meme kanseri hücrelerinde EMT sinyal yolağındaki genleri indüklemektedir [45]. EMT, meme kanserinde *SMAD2* sinyaline bağlı olarak tümör progresyonunu ve metastazını düzenlemektedir [45]. Mezenkimal tümör belirteçleri olan; *E-Cadherin*, *Vimentin* ve *SMAD* genleri ifade düzeyleri meme kanserinin tipine ve çeşidine göre farklılık göstermektedir [45].

2.8.4. TGF- β 1 ve WISP-1 İLİŞKİSİ

Meme kanserinin progresyonu ve metastazında ECM proteinleri etkilidir. ECM proteinlerinden bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ailesine ait olan *WISP-1* meme kanserinin başlamasında, ilerlemesinde ve metastazında etkilidir. *WISP-1* geninin aracılık ettiği aşırı hücre proliferasyonu apoptozun baskılanması yoluyla oluşturulmaktadır. *WISP-1* geninin aşırı aktive ettiği *AKT* proteini *TP53*'ün inaktivasyonuna neden olur. *TGF- β 1* uygulaması ile *TP53*'ün inaktivasyonu ortadan kaldırılarak hücre apoptoza yönlendirilebilmektedir. *TGF- β 1* ve *WISP-1*, osteoblast fonksiyonunu birlikte kontrol etmekte ve bu kontrolü birbirlerinin faaliyetlerini düzenleyerek oluşturmaktadırlar [1]. *WISP-1* geninin yüksek ekspresyonu kemik metastazı ile ilişkili olan alkalın fosfataz aktivitesini arttırmaktadır. Artan *WISP-1* ekspresyonu *TGF- β 1* uygulaması ile inhibe edilerek metastaz engellenmektedir [1].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Kitler

Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlere ait bilgi ve detaylar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3-1).

Tablo 3-2: Kimyasal maddeler ve kitlere ait bilgiler

RPMI 1640	BIOCHROM AG
PBS	AMRESCO
β -Merkaptoetanol, Tris (hidroksimetil aminometan), Borik Asit	MERCK
DMEM	THERMO SCIENTIFIC
Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisi (BFB)	SIGMA
Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA)	THERMO SCIENTIFIC
Lysis Buffer ve Buffer R.	
miRNeasy Mini Kiti [QIAGEN] ve QIAzol Lysis Reagent	QIAGEN
Primerler	SENTEBİOLAB
Tripsin (1:250)	GIBCO
Lightcycler 480 Probes Master Kit	ROCHE APPLIED SCIENCES
cDNA Sentez Kiti	ROCHE
All Prep DNA/RNA/Protein Mini Kit	QIAGEN
Penisilin/Streptomisin	GIBCO

Kullanılan cihazlara ait bilgi ve detaylar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar ve markaları

-80 Derin Dondurucu	SANYO
Azot Tankları	MVY
Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj	HERAEUS
Soğutmalı Ependorf Santrifüj	HERAEUS
Santrifüjler Soğutmasız	HETTICH, JOUAN
Mikropipetler	GILSON

Yatay Gel Elektrophorez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri	BRL
Vorteks	FINEPZR
Distile Su Cihazı	MILLIPORE
Spektrofotometre NanoDrop 2000	THERMO SCIENTIFIC
Gel Dökümantasyon Sitemi	BRL
Etüvler (37°C ve 56°C)	NÜVE
Manyetik Karıştırıcı	NÜVE
Vortex Mixer IKA-Model MS3	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD
Sınıf II laminar flow	TEZSAN
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD
THOMA lamı	ISOLAB
Bidistile su üretim cihazı	İNCEKARALAR
NanoDrop spektrofotometre	THERMO SCIENTIFIC
İnvert mikroskop	SEDIVAL
Lightcycler 480II	ROCHE APPLIED SCIENCES
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	TPP
25-75 cm ² hücre büyüme kapları	TPP

Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması aşağıda tabloda belirtilmektedir (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Kullanılan tampon, çözelti içerikleri ve bilgisayar programları

<u>10X PBS Tampon Çözeltisi (1L)</u>
• 80 g NaCl
• 2 g KCl
• 11,5 g Na ₂ HPO ₄
• 2 g KH ₂ PO ₄
<u>10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi (1L)</u>
• 0.88 M Borik Asit
• 5 M Trisma-Base

• 0.02 M EDTA (pH: 8.00)
<u>%0.8'lik Agaroza Hazırlanması</u>
0,8 g Agaroza
100mL 0.5X TEB100mL 0.5X TEB
5µL Etidyum Bromür (10mg/mL) mL
<u>Bilgisayar Programları</u>
LightCycler 480 Software release 1.5.0

3.3. Meme Kanseri Hücre Hatları

Çalışmamızda, meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmış; özellikleri detaylı şekilde aşağıda belirtilmiştir (Tablo 3-4).

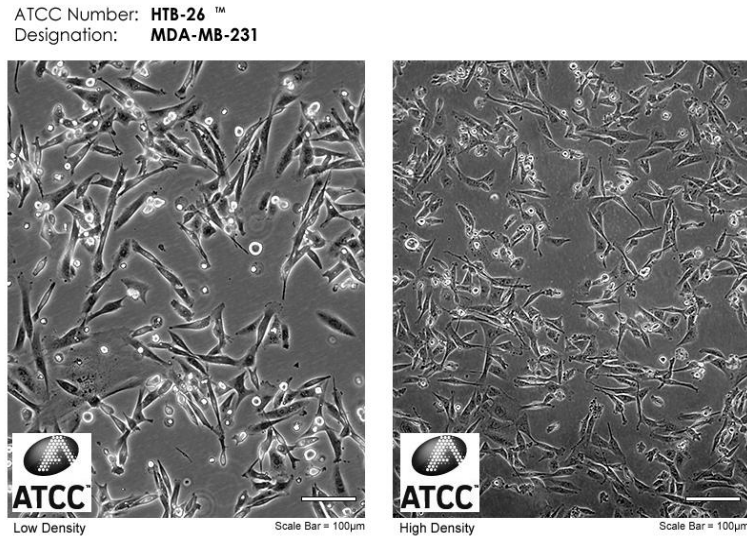
Tablo 3-4: Kullanılan hücre hatları ve özelliklerinin özet gösterimi

MDA-MB-231	MDA-MB-453	MDA-MB-436	MCF-7
Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı	Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı	Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı	Östrojen reseptörü pozitif (ER+) Meme Kanseri hücre hattı
Metastatik Adenokarsinom	Metastatik Karsinom	Metastatik Adenokarsinom	Metastatik Adenokarsinom
51 yaşında beyaz ırk kadın hastadan alınmıştır.	48 yaşında beyaz ırk kadın hastadan alınmıştır.	43 yaşında beyaz ırk kadın hastadan alınmıştır.	69 yaşında beyaz ırk kadın hastadan alınmıştır.
Mutasyon Durumu <i>TP53</i> (homozigot) <i>NF2</i> (homozigot) <i>BRAF</i> (heterozigot) <i>CDKN2A</i> (homozigot)	Mutasyon Durumu <i>CDH1</i> (homozigot) <i>PIK3CA</i> (heterozigot)	Mutasyon Durumu <i>BRCA1</i> (homozigot) <i>RB1</i> (homozigot)	Mutasyon Durumu <i>Erb4(HER4)</i>

<i>KRAS</i> (heterozigot)			
---------------------------	--	--	--

3.3.1. MDA-MB-231

Östrojen hormonu ve HER2 reseptörü taşımayan tümörler olan Triple (üçlü) negatif meme kanserinin mezenkimal benzeri morfoloji gösteren meme kanser hücre hattı grubundadır. MDA-MB-231; 51 yaşında, beyaz ırka sahip kadın hastadan alınan metastatik özellikli ve adenokarsinom yapıda bir hücre hattıdır. Söz konusu MDA-MB-231 hücre hattı *TP53* (homozigot), *NF2* (homozigot), *BRAF* (heterozigot), *CDKN2A* (homozigot), *KRAS* (heterozigot) genlerinde mutasyon taşımaktadır (Şekil 3-4).

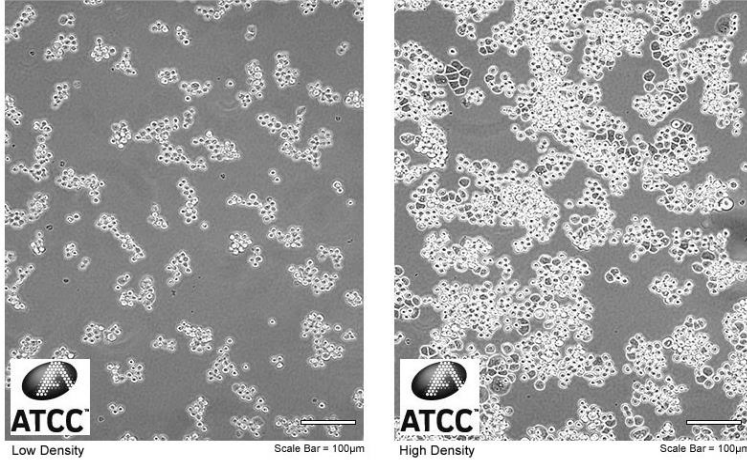


Şekil 3-4: MDA-MB-231 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi

3.3.2. MDA-MB-453

MDA-MB-453 hücre hattı, üçlü negatif meme kanserinin Luminal Androjen Reseptörü (LAR) alt tipinin özelliklerine sahip, karsinom ve metastatik özellikli olup CDK4 / 6 inhibisyonuna oldukça duyarlıdır [46]. 48 yaşında beyaz ırklı bir metastatik karsinomu olan kadın hastadan alınan MDA-MB-453 hücre hattı *CDH1* (homozigot) ve *PIK3CA* (heterozigot) genlerinde mutasyon taşımaktadır (Şekil 3-5).

ATCC Number: **HTB-131™**
Designation: **MDA-MB-453**

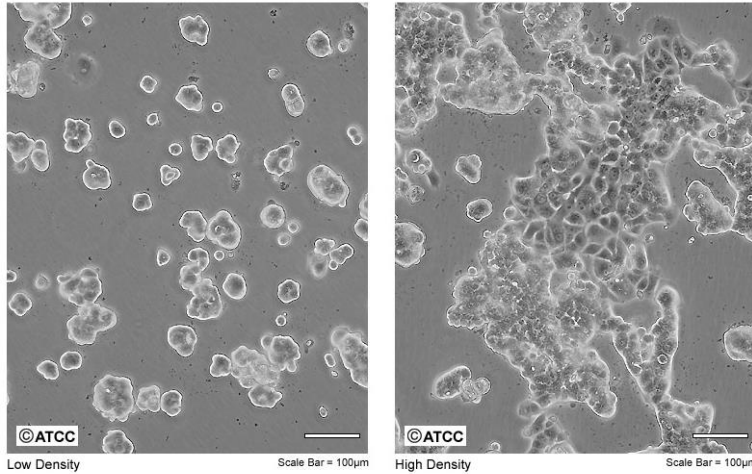


Şekil 3-5: MDA-MB-453 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi

3.3.3. MCF-7

MCF-7, östrojen reseptörü pozitif (ER+) olan, adenokarsinom ve aynı zamanda metastatik özellikli 69 yaşında beyaz ırk kadın hastadan alınan meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattı, *IGFBP* geni ve *WNT7B* onkogenini aşırı ifade etmektedir. MCF-7 hücrelerinin büyümesi tümör nekroz alfa (TNF alfa) molekülü tarafından inhibe edilmektedir. Söz konusu hücre hattı MCF-7, sadece epitel kökenli bazı tümör tiplerinin oluşumunda rol oynayan bir büyüme faktör reseptör olan *Erb4(HER4)* geninde mutasyon taşımaktadır (Şekil 3-6).

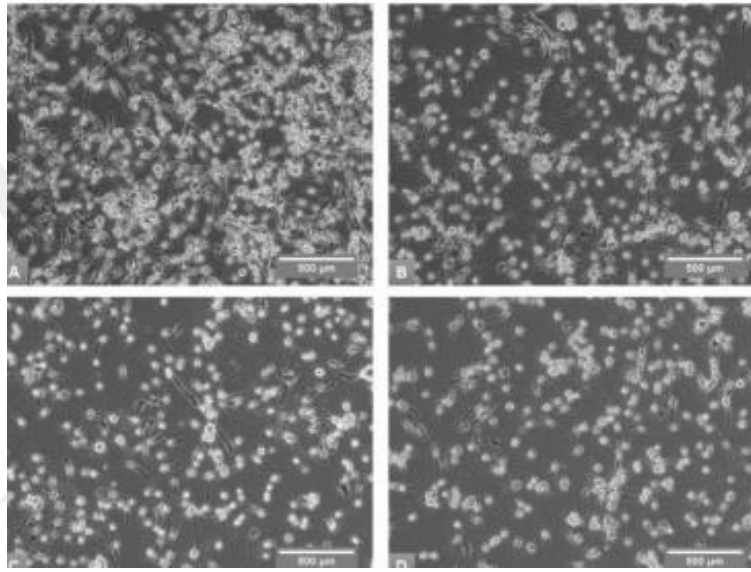
ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Şekil 3-6: MCF-7 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi

3.3.4. MDA-MB-436

MDA-MB-436 üçlü negatif meme kanseri hücre hattıdır. 43 yaşında beyaz ırklı bir kadın hastadan alınmış olup adenokarsinom ve metastatik özelliği bulunmaktadır. Mezenkimal benzeri morfoloji sergileyen MDA-MB-436 meme kanseri hücre hattı, *BRCA1* (homozigot) ve *RB1* (homozigot) genlerinde mutasyon taşımaktadır (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: MDA-MB-436 hücre hattının morfolojisinin görüntülenmesi [47].

3.4. Hücrelerin Yetiştirilmesi ve Deney Planı

BRCA1 mutant olan ve olmayan meme kanseri hücre hatlarında *WISP-1* geninin ekspresyonunun araştırılması başlıklı tez öneri formunda HCC1395 primer meme kanser hücre hattı ile MDA-MB-436 *BRCA1* mutant, metastatik meme kanser hücre hattında *WISP-1* geninin ifade düzeyinin araştırılması planlanmıştır. Ancak ATCC'den temin edilen hücre hatlarında metastatik olmayan, primer meme kanseri hücre hattı HCC1395 ve *BRCA1* mutant, metastatik olan MDA-MB-436 hücre hatları açıldığında morfolojilerinin sağlıklı olmadığı tespit edilmiş ama yine de kültüre alınmıştır ancak kültürde başarılı bir büyüme gerçekleştirilememiştir. MDA-MB-436 hücre hattı ise sadece 2 gün yaşatılmış ve ardından kontamine olmuştur. Bu ilk iki gün içerisinde kontaminasyondan hemen önce bu hücre hattından Real Time PZR ile *WISP-1* ifadesini

gösterecek kadar hücre toplanmış ve *WISP-1* ifadesi araştırılmıştır. Projede ilave bütçe olmadığından bu hücre hatları tekrar temin edilememiştir. Bu nedenle projede elimizde mevcut olan metastatik-üçlü negatif (MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve MDA-MB-453) ve metastatik ER-pozitif meme kanseri hücre (MCF-7) hatlarında *WISP-1* geninin *TGFβ1* uygulamasına bağlı ekspresyon değişiklikleri araştırılmıştır.

İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Araştırma Laboratuvarı'nda, mevcut olan meme kanseri hücre hatlarından; üçlü negatif, metastatik ve *TP53* mutasyonu taşıyan MDA-MB-231 hücre hattı ile üçlü negatif, metastatik ve *CDH1* ve *PIK3CA* genlerinde mutasyonu olan MDA-MB-453 ve ER-pozitif, metastatik ve *HER4* geninde mutasyonu olan MCF-7 meme kanseri hücre hatları hücre açma protokollerine uygun olarak açılmış ve hücre içeriğinde DMEM, % 10 fetal bovine serum (Gibco FBS/Life Technology) ve % 1 penisilin/streptomisin (10,000 U/mL) (Life Technology) bulunan besin ortamı içerisinde 37°C 'de %5 CO₂ koşullarında büyütülmüştür. Yapılan deney dizaynı aşağıda özetlenmiştir.

1. MDA-MB-453,MDA-MB-231,MDA-MB-436 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları kültür ortamında büyütülerek kültürler stoklanmıştır.
2. Söz konusu hücre hatlarından RNA izolasyonu ve konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir.
3. Elde edilen RNA'lar cDNA'ya dönüştürülmüştür.
4. *WISP-1* genine uygun primer tasarlanması ve optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.
5. Real Time PZR'da *WISP-1* gen ekspresyonunu incelenmiş ve analiz edilmiştir.
6. Meme kanseri hücre hatlarına TGF-β1 uygulanmıştır.
7. TGF-β1 uygulaması sonrasında *WISP-1*'in ekspresyon düzeyindeki değişiklikler tekrar Real Time PZR ile incelenmiş ve değerlendirilmiştir

3.5. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlama

Petri kabındaki hücrelerin petri kabının %70-80'ini doldur düzeye gelmesini takiben hücreler pasajlandı.

1. Hücre pasajlaması için petri kabında bulunan besin ortamı uzaklaştırıldı.

2. 25 cm² petri kabı için 1 mL, 75 cm² olan petri kabı için 2 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanıp sırasıyla petri kabının büyüklüğüne göre 1mL ya da 2mL tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ile CO₂ içeren etüvde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesini engellenmek ve Tripsin-EDTA'nın aktivitesini inhibe etmek için 2 mL DMEM besin ortamından eklendi ve hücreler santrifüj tübüne aktarıldı.
3. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve sonra süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine 1 mL taze besin ortamı eklenerek iyice pipetaj yapıp homojen hale gelen hücreler sayım için hazır hale getirildi.
4. Hazır olan hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak hemositometre ile hücre sayımı gerçekleştirildi.
5. Bir mililitredeki hücre sayısı hemositometredeki hücre sayısının 10⁴ ile çarpılarak hesaplandı.
6. 1x10⁶ hücre, 75 cm²' lik petri kabına eklenerek pasajlama işlemi tamamlandı.

3.6. Hücrelere TGFβ1 Uygulanması

Hücre hatlarına uygulanacak olan TGFβ1'nin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi zamana ve doza bağlı olarak metiltiazol difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile ölçüldü. 1x10³ hücre/kuyu 96 kuyucuklu petriye ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra, literatürlerden seçilen konsantrasyonlarda TGFβ1, 10µg/200µL H₂O'da çözülerek 5ng/mL hücrelere verilmiş 24 saat uygulanmıştır [48-50].

3.7. Hücre Dondurulması ve Açılması

Küçük pasaj sayısına sahip hücreler sağlıklı şekilde yedeklenmek amacıyla önce birkaç gece -80°C derin dondurucuda bekletildikten sonra daha uzun süre saklamak için -196°C sıvı azot tankına alındı. Bu işlem için yapılan uygulamalar aşağıda özetlenmiştir.

1. Petri yüzeyine yapışık hücreleri kaldırmak için tripsin-EDTA uygulandı.
2. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra Hemistometre ile sayılmış ve yaklaşık sayısı 10⁶ olan hücre örneği % 10 DMSO ve %90

FBS solüsyonu içeren kriyo tüplere koyuldu. Saklanması için önce -80 °C’ de saklandı. 3 gün sonra -196 °C sıvı azot tankına alındı.

Hücrelerin sıvı azottan alınarak açılmasında uygulanan protokol aşağıda özetlenmiştir.

1. Hücrelerin açılması işleminde kriyo tüpte olan hücreler sıvı azottan alındıktan sonra, hızlı bir şekilde çözülerek dondurucu ortama medya ortamı eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı.
2. 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Hücrelerin üzerine besin ortamı eklenerek 25 cm² ve 75 cm²’ lik petriye ekildi.

3.8. Eş zamanlı DNA/RNA/Protein izolasyonu işlemi

Hücre kültür işlemlerinin ardından çoğalan hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra DNA/RNA/Protein izolasyonu işlemine geçildi. Ancak bu işlemde önce hücrelerin içinde bulundukları besin ortamının uzaklaştırılması için hücrelerin içinde bulunduğu besin ortamı 15 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Hücre pelletine 1 mL PBS eklenerek ve tekrar 1500 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüj sonrası çıkan pellet alınarak eş zamanlı DNA/RNA/protein izolasyonu işlemi yapıldı. Bu işlem All prep DNA/RNA/Protein Mini Kit ile Qiagen Inc. firmanın vermiş olduğu protokole uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

1. Hücre pelletine 600 µL RLT solüsyonu eklendi. Pipetaj yapılarak hücreler homojenize edilerek lizat haline getirildi.
2. Homojenize halde olan hücre lizatı, öncelikle DNA kolonuna yüklendi.
3. 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi. Bu aşamada alt faz ile RNA ve Protein izolasyon işlemine devam edebilmek için DNA izolasyon işlemi durduruldu. Bu süre zarfında DNA kolonu 2 mL’lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek (Basamak 17-20) 4°C’de bekletildi.
4. 3. Aşama’da altta kalan sıvıya 400 µL %96-100’lük etanol eklendi ve pipetle iyiye homojenize edildi. 700 µL’lik hücre karışımı pembe renkli RNA kolonuna yüklendi ve

10.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Bu aşamada altta kalan sıvı protein pürifikasyonu (Basamak 9-16) için yeni bir 2 mL’lik tüpe aktarıldı.

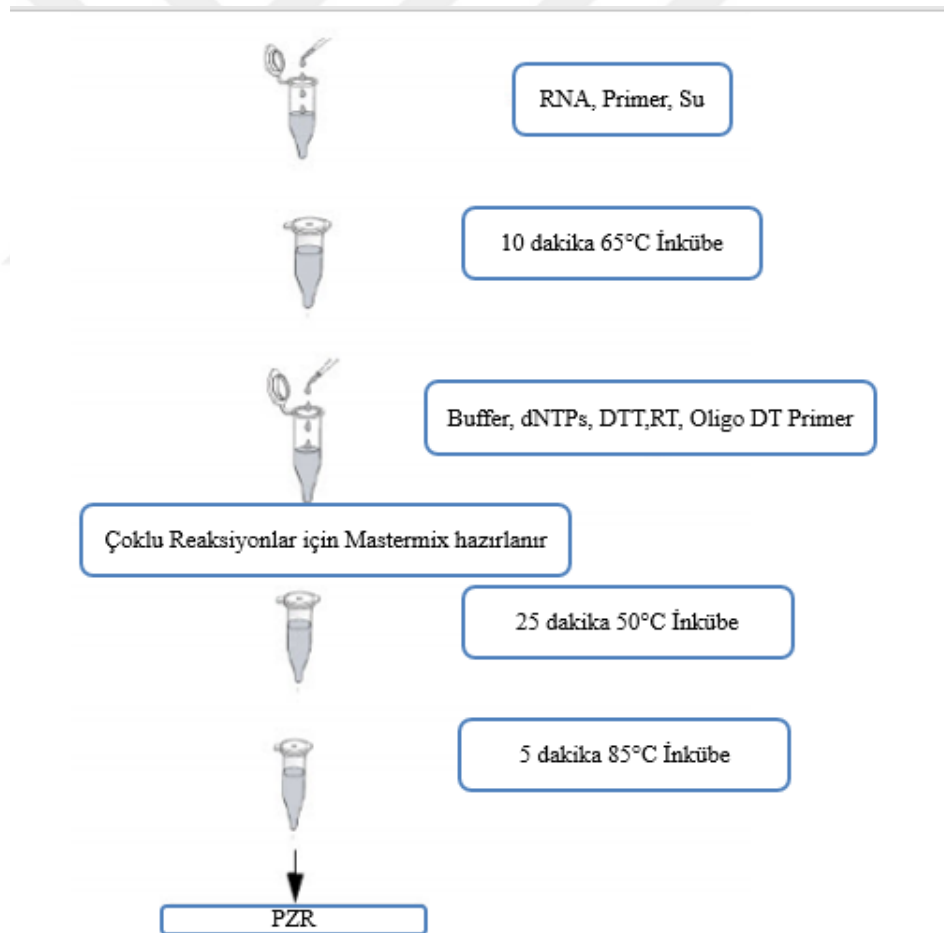
5. Pembe renkli RNA kolonuna 700 µL RW1 solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
6. Pembe renkli kolona 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
7. Pembe renkli kolona 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
8. Pembe renkli kolon 1.5 mL’lik yeni bir tüpe aktarıldı ve 35 µL RNase içermeyen su direk kolon membranına eklendi ve RNA’yı elde etmek üzere 1 dakika 10.000 rpm’ de santrifüj yapıldı.
9. 4. Aşamada elde edilen alt faza 1000 µL APP solüsyonu eklenerek karıştırıldı.
10. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. Ependorf santrifüjde maksimum hızda 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
12. Protein pelletine 500 µL %70’lik etanol eklenerek 1 dakika ependorf santrifüjde maksimum hızda (12.000rpm) santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
13. Protein pelleti 5-10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.
14. 100 µL ALO solüsyonu eklendi ve protein pelletinin çözöldü.
15. Protein pelletinin tamamen çözölebilmesi için 95°C’ de 5 dakika inkübasyon yapılarak ardından oda sıcaklığına bekletildi.
16. 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılarak, elde edilen protein gelecekteki çalışmalar için birkaç tüpe paylaştırılarak -80°C’de saklandı.
17. 4. aşama sonundaki DNA kolonuna 500 µL AW1 solüsyonu, eklendi ve 10.000 rpm’de 15 sn. santrifüj edilerek alt faz atıldı.
18. DNA kolonuna 500 µL AW2 solüsyonu eklendi ve ependorf santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
19. DNA kolonu yeni bir 1.5 mL’ lik tüpe aktarıldı. 100 µL EB solüsyonu kolona eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.

20. DNA'yı kolondan ayırmak için 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek -80°C'ye kaldırıldı.

Bu aşama sonunda her hücre hattından sırasıyla, DNA, Protein ve RNA ekstraksiyonu işlemi tamamlanmış oldu. Her bir DNA, Protein ve RNA örneği bir sonraki deneysel aşama için uygun ortamda saklandı.

3.9. cDNA Sentezi

İzole edilen saflığı ve kalite ölçümleri tamamlanan RNA örneklerinden daha sonraki deneysel aşamalar için cDNA hazırlandı. Bu işlem için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanıldı. cDNA oluşturma işlemi ilgili kit protokolün göre yapıldı. Protokole ilişkin işlemler aşağıda özetlendi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: cDNA sentezi işlemi (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, ROCHE)

3.10. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

Gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi kullanılarak farklı deneysel aşamalarındaki hücre soylarında izole edilen RNA örneklerinde *WISP-1* gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. İncelenmek istenen gene özgü primerler kullanılarak gene özgü ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR ile belirlendi (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: Kullanılan primerler

<i>WISP-1 Geni</i>	
Forward Primer	5' CCTACGACCATGGACTTTACC 3'
Reverse Primer	5' TTACAGCACTCACAGCCATC 3'

<i>ACTB Geni (Referans Geni)</i>	
Forward Primer	5'TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT 3'
Reverse Primer	5'AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA3'

Gerçek zamanlı kantitatif PZR'da kullanılan maddeler (Tablo: 3-1); forward ve reverse primerlerden 2µL (10mM), Light Cycler 480 probe master karışımından (Roche Applied Sciences, Germany) 10µL eklenip son hacmi 20µL olacak şekilde hazırlandı, 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı. Tablo 3.3 verilen koşullarda gerçek zamanlı kantitatif PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3-6: Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR İçeriği

SYBR Mastermix	10 µL
10mM F-primer	2 µL
10mM R-primer	2 µL
dH ₂ O	3 µL
cDNA	3 µL
Total 1 reaksiyon için=20 µL	

Tablo 3-7: Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Koşulları

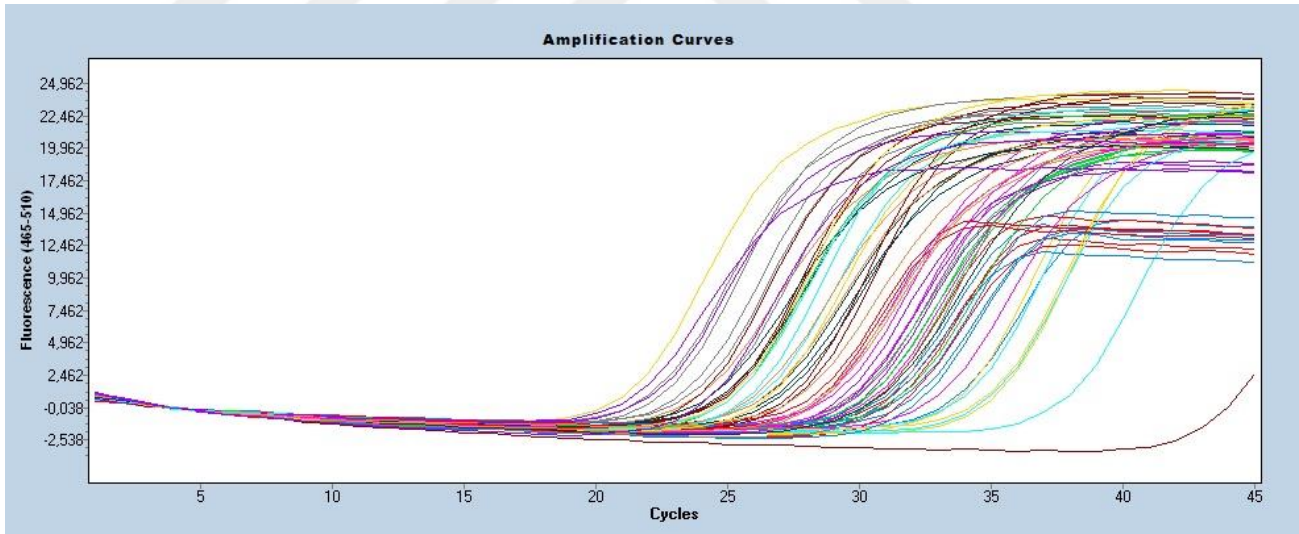
PZR Adımları	Sıcaklık °C	Süre
Denatürasyon (1 Siklus)	95°C	5 dk.
Amplifikasyon (45 Siklus)	95°C 62°C 72°C	15 sn. 1 dk. 10sn.
Erime Eğrisi (1 Siklus)	95°C 55°C 85°C	10 sn. 20 sn. Sürekli
Soğutma (1 Siklus)	40°C	30 sn.

4. BULGULAR

MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-436 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları, doku kültüründe büyütülerek bu hücrelerden izole edilen RNA materyalinde gerçek zamanlı kantitatif PZR metodu ile *WISP-1* geninin ekspresyon düzeyi araştırıldı. Sonuçların analizi, LightCycler 480 yazılımında Absolut Hesaplama/Fit Points programı ile gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz sonuçlar meme kanserinde kötü prognoza yol açan genomik farklılıklar ile gen ekspresyonları arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Yukarıda bildirilen hücre hatlarında meme kanseri için belirteç olabilecek *WISP-1* geninin ekspresyonu, β -Aktin kontrol geni varlığında ve terapötik hedef olabilecek TGF β 1'in etkisine bağlı olarak değişen ekspresyon seviyeleri incelendi.

Araştırılan genlerin gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile incelenmesi sırasında, floresan emisyon düzeyi, Ct değeri olarak ölçüldü (Şekil 4-1).

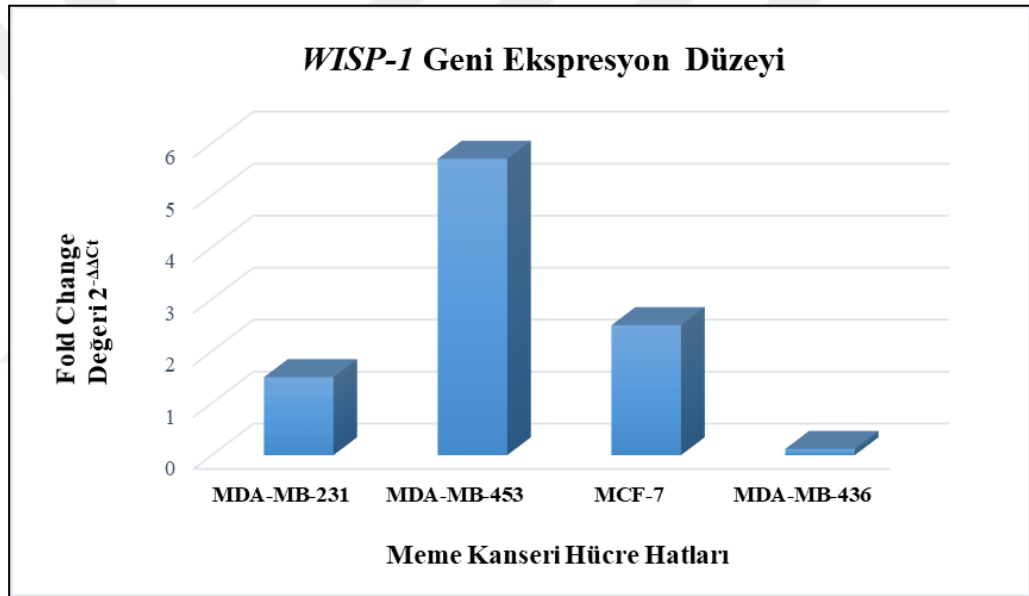


Şekil 4-1: Gerçek zamanlı kantitatif PZR eğrileri görüntüsü (x eksen: her bir örneğin amplifikasyona girdiği döngü sayısını, y eksen: floresan düzeyini ifade etmektedir).

Tablo 4-1: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplanan *WISP-1* ekspresyon düzeyleri.

Meme Kanseri Hücre Hattı	<i>WISP-1</i> Geni Ekspresyon Durumu Fold Change Değeri	
	TGFβ1 yok	TGFβ1 var (5ng/mL)*
MDA-MB-231	1,5	3,2
MDA-MB-453	5,7	0,196
MCF-7	2,5	15,7
MDA-MB-436	0,12	

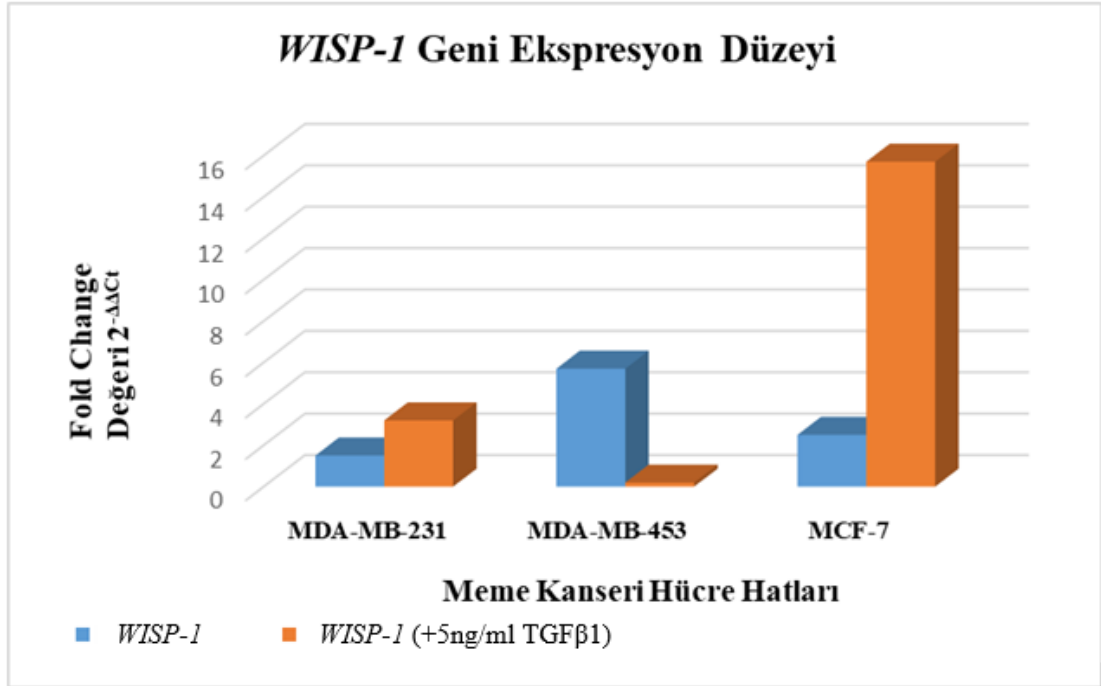
*Meme kanseri hücre hatlarına, 24 Saat boyunca 5ng/mL TGFβ1 uygulaması sonrasında değişen *WISP-1* geni ekspresyonları.



Şekil 4-3: *WISP-1* ekspresyon düzeyleri ile referans genin (*ACTB*) meme kanseri hücre hatlarında ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı.

WISP-1 geninin ekspresyon düzeyi, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 ve *BRCA1* mutant olan MDA-MB-436 meme kanseri hücre hatlarında referans gen *ACTB*' e göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı (Şekil 4-2).

BRCA1 ve *RB1* mutant olan MDA-MB-436 meme kanseri hücre hattında *WISP-1* gen ekspresyonu görülmemektedir. Referans gene göre % 48 down regüle olup kat artışı 0,12 değerindedir. Hedef genin 1,5 kat fazla olduğu MDA-MB-231 hücre soyu ise *p53* mutasyonu taşımaktadır. ER-pozitif olan MCF-7 hücre hattında ise hedef genin kat artışı 2,5 oranındadır. En fazla *WISP-1* geninin ekspresyonu 5,7 kat artışla MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında görülmektedir.



Şekil 4-4: MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının, TGFβ1 uygulaması ile değişen *WISP-1* geni ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2\Delta\Delta C_t$ metodu ile değerlendirilmesi.

BRCA1 mutant olmayan ancak *TP53*, *NF2*, *CDKN2A* geninde homozigot formasyonlarda, *BRAF*, *KRAS* genlerinde ise heterozigot formasyonda mutasyonlara sahip MDA-MB-231 hücre hattında *WISP-1* geni ifadesi son derece az olup 5ng/mL TGFβ1 uygulaması sonrasında 2.13 kat artarak 3,2 değerine ulaşmıştır. Bunun anlamı bu hücre soyunda TGFβ1'nin terapötik etkisinin olmadığıdır.

MDA-MB-453 hücre hattında ise *WISP-1* ekspresyonu 5,7 olup TGFβ1 uygulaması sonrasında 29 kat azalarak 0,196 olarak ölçülmüştür. MDA-MB-453 hücre soyunda *WISP-1* geni onkogenik özellik göstermektedir. Bu hücre soyunda TGFβ1 uygulaması *WISP-1* ekspresyonu azaltıldığından bu hücre soyunda ve bu hücreye benzer genomik özellikte olan hücre yapısına sahip meme kanserinde TGFβ1'in terapötik etkisinin olabileceği anlaşılmaktadır. Bu hücre soyu *CHD1* geninde homozigot ve *PIK3CA* geninde ise heterozigot formasyonda mutasyon taşımaktadır. *CDH1* geni hücre-hücre adezyonunda son derece önemli bir moleküldür. Bu hücre soyunda *CDH1* geninin homozigot delesyonu hücre-hücre adezyonunu ortadan kaldırarak metastatik sürecin hızlanması ve kolaylaşmasını sağlamaktadır. Özellikle *CDH1* geninin

homozigot delesyonunu taşıyan bu hücre soyunda TGF β 1'nin terapötik etkisi olduğu düşünülmektedir.

Metastatik özellikte ER-pozitif ve *ERB4* geninde mutasyonu olan MCF-7 hücre hattında ise TGF β 1 uygulamasının ardından *WISP-1* gen ekspresyonunda 6.28 kat artarak 15,7 değerine ulaşmıştır. Bu hücre soyunda TGF β 1 uygulaması öncesi *WISP-1* geninin ekspresyonunun 2.5 yani normal değerden yüksek olması ve bu hücre soyunda TGF β 1 uygulaması ardından *WISP-1* ekspresyonunun aşırı derece artış göstermesi bu hücre soyunda *WISP-1* geninin onkogen gibi davrandığını düşündürmektedir. Özellikle bu hücre soyunda TGF β 1 uygulamasının *WISP-1* ekspresyonunun daha da artmasına neden olduğu görülmektedir. Bu artışın hücrenin genomik özellikleri ile ilişkili olduğu ve *WISP-1*'in kontrolünde başka gen yollarının da etkili olabileceğini göstermektedir. Bu bulgu literatürdeki bulgularla uyumaktadır. Özetle MCF-7 hücre soyunun ER-pozitif hücre soyu olması sebebi ile çalışmadaki diğer üçlü negatif hücre soylarının aksine bir özellik göstererek hücre proliferasyonu yönünde etkili olması da tarafımızdan beklenen bir bulgudur.

Tez çalışmasında MDA-MB-436 hücre soyu çok kısa süreli yaşatılabilmektedir. Bu nedenle bu hücre soyunda sadece TGF β 1 uygulaması öncesi *WISP-1* ekspresyonu incelenebilmiştir. Bu incelemede *WISP-1* geninin son derece az eksprese edildiği saptanmıştır (0,12). Ancak bu değerlerin gelecek çalışmalarda tekrar edilmesi daha doğru sonuçlar verecektir.

Tez çalışmasında meme kanserinde biyolojik belirteç olabileceğini düşündüğümüz *WISP-1* gen ekspresyon düzeyi, farklı genlerde mutasyon taşıyan üç farklı metastatik üçlü negatif meme kanseri hücre hatları ile ER-pozitif metastatik meme hücre hattı arasında incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızın en önemli eksik yanı sağlıklı meme kanseri hücre hattında söz konusu genin incelemesinin yapılamamış olmasıdır. Bundan başka yine bütçe yetersizliğinden TGF β 1 uygulamasının sadece 24 saatlik etkisi araştırılmış olup 48 ve 72 saatlik etkilerine ilişkin incelemeler yapılamamıştır. Tez çalışmasının yayına gönderilmesinden önce eksik kalan bu deneysel işlemlerin tamamlanması planlanmaktadır.

5. TARTIŞMA

Meme kanser hastalarını daha iyi sınıflandırmaya yardımcı olabilecek bir biyobelirteç, hastaların klinik yönetimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. *BRCA1*, *BRCA2*, *HER2*, *TP53* genlerinde mutasyona sahip kişiler meme kanseri geliştirme açısından yüksek riske sahiptirler. Aynı zamanda yukarıda bildirilen genlerde mutasyon taşıyan meme kanseri hastalarının sekonder kanserlere yakalanma konusunda ilave bir risk taşımalarının yanı sıra belli ilaç gruplarına karşı ilave hassasiyet gösterdikleri bilinmektedir.

Üçlü negatif meme kanseri tedavisinde başarı oranı son derece düşüktür. Özellikle *BRCA* mutasyonları ile ilişkili üçlü negatif meme kanserine ait biyolojik özelliklerin anlaşılması, farklı terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açacaktır. Günümüzde genomik özelliklerin ve gen ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların kanser tedavisinin başarısında ya da tedavi seçiminde farklı yönde etkileri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle üçlü negatif meme kanser hastalarının tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesinde genomik özelliklerin ve gen anlatım düzeylerinin bilinmesine bu hastalığın tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesine katkı da bulunacaktır.

Mutasyonu ya da genomik özellikleri tam olarak bilinen meme kanseri hücre hatlarında yapılan kanser araştırmaları ile ilaç keşfine ve etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar daha doğru olarak yorumlanabilecek ve tedavinin tam etkin olduğu meme kanser alt grubunun belirlenmesi mümkün olacaktır.

WISP-1 temel olarak, embriyogenezde bağ dokusu oluşumu esnasında ve kanser gelişimi sırasında anlatım yapan bir gendir [39]. Bununla birlikte, *WISP-1* geninin işlevi hala tam olarak anlaşılmamıştır ve *WISP-1*'in özellikle kanser gelişimi ve ilerlemesi sırasında hücrelerin sahip olduğu genetik yapıya bağlı olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir. Meme kanseri açısından da *WISP-1* geninin rolü hala tartışmalıdır.

Tez çalışmasında özellikle kemik metastazı yapan metastatik üçlü negatif (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-436) ve metastatik ER-pozitif meme kanser hücre (MCF-7) soylarında *WISP-1* ekspresyonundaki değişiklikler TGFβ1 varlığında

araştırılmış, *WISP-1*'in biyolojik belirteç niteliği taşıyıp taşımadığı ve TGFβ1'nin terapötik hedef olup olmayacağı incelenmiştir.

BRCA1 gen mutasyonu taşımayan ancak *p53*, *NF2*, *KRAS*, *CDKN2A* genlerinde mutasyon olan üçlü negatif özellikli MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, *WISP-1* geni ifadesi son derece düşük düzeyde olup TGFβ1 uygulaması ile artış görülmektedir. Metastatik ve ER-pozitif MCF-7 hücre hattında TGFβ1 uygulaması ile *WISP-1* ekspresyonu artmaktadır. Literatürdeki aksine [43], çalışmamızda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında *WISP-1* ekspresyonu artışının metastatik özelliğe sahip üçlü negatif ve ER-pozitif meme kanser hastaları için onkogen niteliği taşıyan bir biyolojik belirteç olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda *BRCA1* ve *RB1* genlerinin her ikisinde de homozigot mutasyon taşıyan MDA-MB-436 hücre hattında *WISP-1* ekspresyonunun fold change değerinin ikinin altında olması bu genomik yapıya sahip hücrelerde *WISP-1*'in tümör baskılayıcı özelliğinin öne çıktığını göstermektedir.

Literatürde *WISP-1* geninin meme kanserinde onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı bir gen olarak mı görev aldığını gösteren bir bilgi bulunamamaktadır [43]. Mevcut sonuçlarımız, *WISP-1*'in insan meme kanserinde özellikle de MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında onkogen özelliği gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre bu hücre hatlarındaki gibi genomik konfigürasyona sahip olan kanserlerde de *WISP-1* geninin bu özelliği gösterebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle gelecek çalışmalarda *WISP-1* geninin hasta örneklerinde biyolojik belirteç özelliğinin ilave olarak araştırılması anlamlı olacaktır. Bundan başka çalışmamızda araştırılan *WISP-1* geninin ekspresyonunun meme kanser hücre hatlarında *WISP-1*'in fonksiyonunu kontrol eden kodlamayan RNA moleküllerinden miR-133b'nin de incelenmesi metastatik özelliğin geliştirilmesinde *WISP-1*'in etkisinin her yönden değerlendirilmesinde önem taşımaktadır.

TGFβ1 uygulaması sonrasında farklı meme kanser hücrelerinde *WISP-1* ekspresyonunun farklılık göstermesi bu sonuçların moleküler düzeyde Fax Flow ve Western Blot gibi farklı yöntemler kullanılarak diğer etkin moleküllerin ve etkin yolların belirlenmesi gelecekte yapılacaklar arasında yer almaktadır.

İNTİHAL RAPOR FORMU

BRCA1 MUTANT OLAN VE OLMAYAN MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA WISP-1 GENİNİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 17	% 15	% 3	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.tmhdf.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	% 1
5	fjfsdata01prod.blob.core.windows.net İnternet Kaynağı	% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
7	acikerisim.iku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
8	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Beyza	Soyadı	Akın Mutlu
Doğ.Yeri	İstanbul/Bakırköy	Doğ.Tar.	17.04.1995
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	34243882284
Email	beyzakin07@gmail.com	Tel	05558555591

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Temel Onkoloji-Kanser Genetiği	2020
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edb. Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2017
Lise	Prof. Dr. Sabahattin Zaim Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Bursiyer	TED Üniversitesi	(1 ay) 2020
2.	Kısmi Zamanlı Öğrenci-Stajer Biyolog	İstanbul Üniversitesi Kanser Araştırma Laboratuvarı	(8 ay) 2019
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi iyi	iyi	53,750 iyi
Arapça	Zayıf	Zayıf	Zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74	79	82
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
• Office Programları(Word, Excel, PowerPoint)	İyi
• SPSS	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlanan Uluslararası Kitap Bölümü

- Hulya Yazici and Beyza Akin ‘Tumor Progression and Metastasis, Molecular Genetics of Metastatic Breast Cancer’ in DOI: 10.5772/intechopen.86674, 2019.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts andve Humanities)

- Elif D.Arisan,Remzi O.Akar,Ozge Rencuzogullari,PinarObakan Yerlikaya,Ajda Coker Gurkan,Beyza Akın☆,Elif Dener☆,Ecem Kayhan☆,Narcin Palavan Unsal’ The molecular targets of diclofenac differs from ibuprofen to induce apoptosis and epithelial mesenchymal transition due to alternation on oxidative stress management p53 independently in PC3 prostate cancer cells’ in the Prostate International, 2019.

KAYNAKLAR

1. Inkson, C.A., et al., *TGF-beta1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function*. J Cell Biochem, 2008. **104**(5): p. 1865-78.
2. Russo, I.H. and J. Russo, *Role of hormones in mammary cancer initiation and progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. **3**(1): p. 49-61.
3. Yazici, H., et al., *Frequency of Rearrangements Versus Small Indels Mutations in BRCA1 and BRCA2 Genes in Turkish Patients with High Risk Breast and Ovarian Cancer*. Eur J Breast Health, 2018. **14**(2): p. 93-99.
4. Larsen, M.J., et al., *Classifications within molecular subtypes enables identification of BRCA1/BRCA2 mutation carriers by RNA tumor profiling*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64268.
5. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
6. Tsutsui, S., et al., *Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer*. Am J Surg, 2003. **185**(2): p. 165-7.
7. Naderi, A., et al., *A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets*. Oncogene, 2007. **26**(10): p. 1507-16.
8. Weigelt, B., et al., *Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2010. **11**(4): p. 339-49.
9. McCann, K.E. and S.A. Hurvitz, *Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer*. Drugs Context, 2018. **7**: p. 212540.
10. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment*. JAMA, 2019. **321**(3): p. 316.
11. Al-Mahmood, S., et al., *Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(5): p. 1483-1507.
12. Abduev, Z. and K. Altundag, *Deciphering trastuzumab resistance in residual tumor according to HER2 status after neoadjuvant trastuzumab containing regimen in HER2 positive breast cancer patients might help to choose further adjuvant anti-HER2 treatment*. J BUON, 2019. **24**(5): p. 2208.
13. Bhutiani, N., et al., *Identifying factors influencing delays in breast cancer treatment in Kentucky following the 2014 Medicaid expansion*. J Surg Oncol, 2020. **121**(8): p. 1191-1200.
14. Draganescu, M. and C. Carmocan, *Hormone Therapy in Breast Cancer*. Chirurgia (Bucur), 2017. **112**(4): p. 413-417.
15. Bayoudh, L., et al., *[Trastuzumab (herceptin) for the medical treatment of breast cancer]*. Tunis Med, 2012. **90**(1): p. 6-12.
16. Morgan, R.D., et al., *PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2018. **81**(4): p. 647-658.
17. Lord, C.J. and A. Ashworth, *PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic*. Science, 2017. **355**(6330): p. 1152-1158.
18. Fleeman, N., et al., *The clinical effectiveness and cost-effectiveness of genotyping for CYP2D6 for the management of women with breast cancer treated with tamoxifen: a systematic review*. Health Technol Assess, 2011. **15**(33): p. 1-102.
19. McGuire, A., et al., *Effects of age on the detection and management of breast cancer*. Cancers (Basel), 2015. **7**(2): p. 908-29.

20. Kotsopoulos, J., *Menopausal hormones: definitive evidence for breast cancer*. Lancet, 2019. **394**(10204): p. 1116-1118.
21. Liu, Q., et al., *Transient increase in breast cancer risk after giving birth: postpartum period with the highest risk (Sweden)*. Cancer Causes Control, 2002. **13**(4): p. 299-305.
22. Freitas, R.D.S. and M.M. Campos, *Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications*. Nutrients, 2019. **11**(5).
23. Li, Q., et al., *Dietary fiber intake and risk of breast cancer by menopausal and estrogen receptor status*. Eur J Nutr, 2013. **52**(1): p. 217-23.
24. Lopes, C.M., A. Dourado, and R. Oliveira, *Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 7207983.
25. Ma, H., et al., *Pre-diagnosis alcohol consumption and mortality risk among black women and white women with invasive breast cancer*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 800.
26. Jones, M.E., et al., *Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort*. Breast Cancer Res, 2017. **19**(1): p. 118.
27. Picon-Ruiz, M., et al., *Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(5): p. 378-397.
28. Wendt, C. and S. Margolin, *Identifying breast cancer susceptibility genes - a review of the genetic background in familial breast cancer*. Acta Oncol, 2019. **58**(2): p. 135-146.
29. Butel-Simoes, G.I., et al., *Low-level parental mosaicism in an apparent de novo case of Peutz-Jeghers syndrome*. Fam Cancer, 2019. **18**(1): p. 109-112.
30. Costa, M. and P. Saldanha, *Risk Reduction Strategies in Breast Cancer Prevention*. Eur J Breast Health, 2017. **13**(3): p. 103-112.
31. Takaoka, M. and Y. Miki, *BRCA1 gene: function and deficiency*. Int J Clin Oncol, 2018. **23**(1): p. 36-44.
32. Godet, I. and D.M. Gilkes, *BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer*. Integr Cancer Sci Ther, 2017. **4**(1).
33. Mehrgou, A. and M. Akouchekian, *The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development*. Med J Islam Repub Iran, 2016. **30**: p. 369.
34. Sopik, V., et al., *BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer*. Clin Genet, 2015. **87**(5): p. 411-8.
35. Borg, A., et al., *Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study*. Hum Mutat, 2010. **31**(3): p. E1200-40.
36. Mylavarapu, S., A. Das, and M. Roy, *Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 16.
37. Nivison, M.P. and K.E. Meier, *The role of CCN4/WISP-1 in the cancerous phenotype*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 2893-2903.
38. Wahdan-Alaswad, R., et al., *Metformin attenuates transforming growth factor beta (TGF-beta) mediated oncogenesis in mesenchymal stem-like/claudin-low triple negative breast cancer*. Cell Cycle, 2016. **15**(8): p. 1046-59.
39. Chiang, K.C., et al., *WNT-1 inducible signaling pathway protein-1 enhances growth and tumorigenesis in human breast cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8686.

40. Berschneider, B. and M. Konigshoff, *WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(3): p. 306-9.
41. Liu, Y., et al., *The emerging role of WISP proteins in tumorigenesis and cancer therapy*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 28.
42. Su, F., et al., *WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 46-57.
43. Davies, S.R., et al., *Differential expression and prognostic implications of the CCN family members WISP-1, WISP-2, and WISP-3 in human breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(6): p. 1909-18.
44. Xiang, T., et al., *Negative Regulation of AKT Activation by BRCA1*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10040-4.
45. Lv, Z.D., et al., *Transforming growth factor-beta 1 enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing a Smad2-dependent epithelial-to-mesenchymal transition*. Oncol Rep, 2013. **29**(1): p. 219-25.
46. Asghar, U.S., et al., *Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(18): p. 5561-5572.
47. Pirsko, V., et al., *An Effect of Culture Media on Epithelial Differentiation Markers in Breast Cancer Cell Lines MCF7, MDA-MB-436 and SkBr3*. Medicina (Kaunas), 2018. **54**(2).
48. Liu, B., et al., *Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells*. Cell Cycle, 2009. **8**(13): p. 2031-40.
49. Lee, J.O., et al., *Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51*. Breast Cancer Res, 2019. **21**(1): p. 115.
50. Xiao, H., et al., *Metformin is a novel suppressor for transforming growth factor (TGF)-beta1*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28597.