



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA NEAT1 VE MİR-410-3P'NİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE METASTAZA ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

Cihangir DOĞAN

Haziran 2022

DENİZLİ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Cihangir DOĞAN

İmza :

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA NEAT1 VE MİR-410-3P'NİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE METASTAZA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Cihangir Doğan
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Haziran 2022, 48 Sayfa

Meme kanseri ülkemiz ve dünya genelinde kadınlar için görülme sıklığı en yüksek kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm sebeplerinin en başında yer alır. Meme kanserinin uzak organlara metastazı bu ölümlerin önde gelen nedenlerindedir. Meme kanserinin erken tanısı hastalığın progresyonu ve sağkalımı açısından önemlidir. Meme kanseri meme dokusunda bölgesel olarak başlar, ancak lenf düğümlerine ve diğer organlara lenfatik veya kan damarları yoluyla metastaz yapabilir. Meme tümörünün metastazı için lokal invazyonu, kan veya lenfatik damarlara istilası olan intravazasyonu, dolaşımda hayatta kalması, dolaşım sisteminden geçerek ekstrasvazasyonu ve hedef bölgeye yerleşmesi gibi bir dizi adımları izler ve bu adımlardan herhangi birinin tamamlanmaması durumunda metastaz süreci durur. Bu adımları çok sayıda proteinler ve sinyal molekülleri aracılık eder.

Uzun kodlamayan RNA NEAT1 meme kanseri hücre hatlarının çoğalması ve hayatta kalması için gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca miR-410-3p'nin farklı kanser türlerinde anormal ekspresyonları gözlemlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmada MCF-7 meme kanser hücre hattında ve MCF-10A normal meme hücre hattında NEAT1 ve miR-410-3p'nin ekspresyonları incelendi. Kodlamayan RNA'ların ekspresyonları qRT-PCR ile analiz edildi. NEAT1'in kanser hücre hatlarında normal hücre hatlarına göre 2.30 kat artış olduğu tespit edildi. miR-410-3p'nin ekspresyonları normal hücre hatlarına kıyasla kanser hücre hatlarında -2.85 kat azalma olduğu gözlemlendi. Daha sonra gerçekleştirdiğimiz Transwell invazyon deneyinde MCF-7 hücre hatlarının invaziv özellikte olduğunu MCF-10A'nın invazyon yeteneği kazanmadığı gözlemlendi.

Yaptığımız bu çalışma, literatür ile uyumlu olarak NEAT1'in artan ekspresyonunun invaziv özellik ile ilişkili olduğunu ve aynı zamanda ekspresyon artışının, hedefi olan miR-410-3p'nin ekspresyonunun azalması ile paralel olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Metastaz, NEAT1, miR-410-3p

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (Proje No: 2020SABE028) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE EXPRESSIONS OF NEAT1 AND MIR-410-3P IN BREAST
CANCER CELL LINES AND DETERMINATION OF THEIR EFFECTS ON
METASTASIS**

DOĞAN, Cihangir

M. Sc. Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

June 2022, 48 pages

Breast cancer is the most common type of cancer for women in our country and around the world, and is one of the leading causes of cancer-related death. Metastasis of breast cancer to distant organs is one of the leading causes of these deaths. Early diagnosis of breast cancer is important for disease progression and survival. Breast cancer starts locally in the breast tissue, but can metastasize to lymph nodes and other organs through the lymphatic or blood vessels. For the metastasis of the breast tumor, it follows a series of steps such as local invasion, intravasation with invasion into blood or lymphatic vessels, survival in the circulation, extravasation through the circulatory system and localization to the target site, and if any of these steps is not completed, the metastasis process stops. These steps are mediated by numerous proteins and signaling molecules.

The long non-coding RNA NEAT1 has been reported to be essential for proliferation and survival of breast cancer cell lines. In addition, abnormal expressions of the miR-410-3p have been observed in different cancer types. In this study, the expressions of NEAT1 and miR-410-3p in MCF-7 breast cancer cell line and MCF-10A normal breast cell line were investigated. Expressions of non-coding RNAs were analyzed by qRT-PCR. It was determined that NEAT1 increased 2.30 times in cancer cell lines compared to normal cell lines. Expressions of miR-410-3p were observed to be reduced by -2.85 fold in cancer cell lines compared to normal cell lines. In the transwell invasion experiment we performed, it was observed that MCF-7 cell lines were invasive and MCF-10A could not gain invasion ability.

Our study showed that the increased expression of NEAT1 was associated with the invasiveness, in accordance with the literature, and at the same time, the increase in expression was in parallel with the decrease in the expression of its target, miR-410-3p.

Keywords: Breast Cancer, Metastasis, NEAT1, miR-410-3p

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through project numbers 2020SABE028.**

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım sürecinde bana tezimin yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerini aktaran Tıbbi Biyoloji AD başkanı ve değerli danışmanım sayın Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ'a

Tüm eğitim sürecinde bilgilerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Yavuz DODURGA, Prof. Dr. Ayőe Gaye TOMATIR'a ve Doç. Dr. Selda ŐİMŐEK'e,

Tez çalışmalarım süresince her türlü bilgi, deneyim ve tecrübelerini bana aktaran Arő. Gör. Dr. Ayően Buket Er URGANCI'ya, Zahra AZİZİ'ye, Sibel TOPAL'a

Ve eğitim hayatımda beni bu günlere ulaşmamı sağlayan, hiçbir desteği esirgemeyen, yol gösteren aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Meme kanseri.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	5
2.1.2.1. Menarş ve menepoz yaşı.....	6
2.1.2.2. Üreme faktörleri.....	6
2.1.2.3. Hormonlar.....	6
2.1.2.4. Çevresel faktörler.....	6
2.1.2.5. Alkol-Sigara.....	7
2.1.2.6. Beslenme.....	7
2.1.2.7. Obezite.....	7
2.1.2.8. Genetik faktörler.....	8
2.2. Meme Kanserinin Alt tipleri.....	8
2.2.1. Non-invaziv meme kanseri.....	8
2.2.2. invaziv meme kanseri.....	8
2.3. Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplendirme.....	10
2.4. Meme Kanserinin evrelendirilmesi.....	11
2.5. Meme Kanserinin Patogenezi.....	12

2.6. Meme Kanserinin Metastazı.....	12
2.7. Meme Kanserinde Kodlamayan RNA'lar.....	15
2.8. Hipotez.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. Hücre Kültürü.....	20
3.2. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	20
3.2.1. cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	21
3.3. Real-Time qPCR ile RNA Ekspresyon Analizi.....	22
3.4. Transwell İnvazyon Assay.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Hücre Hatlarında NEAT1 ve miR-410-3p Ekspresyon sonuçları.....	24
4.2. Hücre Hatların İnvazyon Kapasiteleri.....	25
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇLAR.....	30
7. KAYNAKLAR.....	31
8. ÖZGEÇMİŞ.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Dünyada meme kanseri insidansı 2020.....	3
Şekil 1.2. Dünyada meme kanserine bağlı ölüm oranları 2020.....	4
Şekil 1.3. Türkiye meme kanseri insidansı 2020.....	4
Şekil 1.4. Türkiye meme kanserine bağlı ölüm oranları 2020.....	5
Şekil 4.1 İnvazyon deneyi sonrası matrigel odacıkların görünümü (40x).....	25

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	21
Tablo 3.2. Real-Time PCR reaksiyon karışımı.....	22
Tablo 4.1. Hücre hatlarında NEAT1 ve miR-410 ekspresyon kat değişimleri.....	24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BC	Meme kanseri
BRCA1.....	Meme kanseri 1 geni
BRCA2.....	Meme kanseri 2 gen
CCDN1	Siklin D1
CDH1	Cadherin 1
cDNA.....	Komplementer DNA
cirkRNA	dairesel RNA
COX2	Siklooksijenaz 2
CTC	Dolaşımdaki kanser hücreleri
DCIS	Duktal karsinom in situ
DMEM	dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTC	Yayılmış tümör hücreleri
EGF.....	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptör
eRNA	Enhancer RNA
FBS	Fetal sığır serumu
HBOC	Kalıtsal meme-yumurtalık kanseri sendromu
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HR	Hormon reseptörü
IDC	İnvaziv duktal karsinom
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
LCIS	Lobüler karsinom in situ
lincRNA	İntergenik uzun kodlamayan RNA
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA
MC	Müsinoz karsinom

MIC	Metastaz başlatan hücreler
miRNA	Mikro RNA
MMP-1	Matriks metalloproteinaz 1
MMP-2	Matriks metalloproteinaz 2
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
NEAT1	Nükleer zenginleştirilmiş bol transkript 1
PALB2	partner ve lokalizör BRCA2
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
piRNA	PİWİ etkileşimli RNA
Pol II	Polimeraz iki
PR	Progesteron reseptör
PTEN	Fosfataz ve Tensin homolog
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı PCR
Rho GTPaz	GTPazların Rho ailesi
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	RPMI medium
rRNA	Ribozomal RNA
siRNA	Küçük müdahale eden RNA
snoRNA	Küçük nükleolar RNA
snRNA.....	Küçük nükleer RNA
STK11	Serin-Treonin kinaz
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TP53	Tümör protein p53
tRNA	Taşıyıcı RNA
UTR.....	Untranslated region
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktör

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri tüm dünyada teşhis edilen kanserler arasında insidansı en yüksek türdür. (Web1) Epidemiyolojik olarak vaka oranı tüm dünyada 11.7%, mortalitesi 6.9%'dur. Erken teşhis meme kanserinde tedavi oranını yükseltmektedir. Meme kanserinde genetik ve çevresel faktörler etkilidir.

Meme kanseri meme bezinin epitel dokusunda ortaya çıkan maling bir tümördür ve tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşididir. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavi ve hedefe yönelik tedaviler iyi klinik sonuçlar vermesine rağmen meme kanserinin nüksü ve metastazı sağkalımı etkileyen başlıca faktörlerdir. (Xiong vd, 2019)

Tümör metastazları kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumludur. Meme kanseri hastalarının %25-50'sinin tanı ve primer tümör çıkarılmasının on yıllar sonrasında bile ölümcül metastazlar geliştirebileceği tespit edilmiştir. Günümüze kadar meme kanseri metastazının birçok moleküler mekanizması ve yolu araştırılmıştır, ancak metastazda yer alan kodlamayan RNA'nın (ncRNA) rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu ncRNA'lar arasında mikroRNA'lar, bir grup kodlamayan küçük RNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmalar onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyon sonrasında düzenlemede miRNA'ların vazgeçilmez işlevlerini ortaya çıkarmış, böylece tümör hücrelerinin invazyon, metastaz, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik davranışları modüle etmiştir. lncRNA'lar proteinleri kodlamayan 200 nükleotitten uzun RNA'lardır. Çalışmalar birçok kanser türünde multiple lncRNA'ların düzensiz olduğunu meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser hastalarında tanı ve prognoz ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. lncRNA'lar proliferasyon, metastaz, apoptoz ve kemodirenç gibi çeşitli kanser belirtilerinin düzenlenmesinde yer alır. (Kozłowski vd, 2015; Li vd, 2019; Li vd, 2020)

Nükleer zenginleştirilmiş bol transkript 1 (NEAT1) nükleer sınırlı bir lncRNA'dır ve gen paraspecklerin kritik bir yapı parçasıdır. lncRNA NEAT1 kolorektal kanser, pankreas kanseri, hepatosellüler karsinom gibi çeşitli kanser türlerinde tümör hücrelerinin

proliferasyonunu ve metastazını teşvik eder. Ayrıca NEAT1'in üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde kemodirenci ve hücrenin köklülüğü sağlar. NEAT1 EMT ve tümör metastazını indükler, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasına göçüne ve invazyonunu teşvik eder. Meme kanserinde NEAT1'in aşırı ekspresyonu genel sağkalımın azalmasında ilişkili bulunmuştur. (Li vd, 2020)

1.1. AMAÇ

Bu yüksek lisans tez projesinde meme kanser hücre hatları MCF-7 ve MCF10a'da NEAT1 ve hedefi miR-410-3p'nin ekspresyonlarının araştırılması ve metastazdaki rollerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

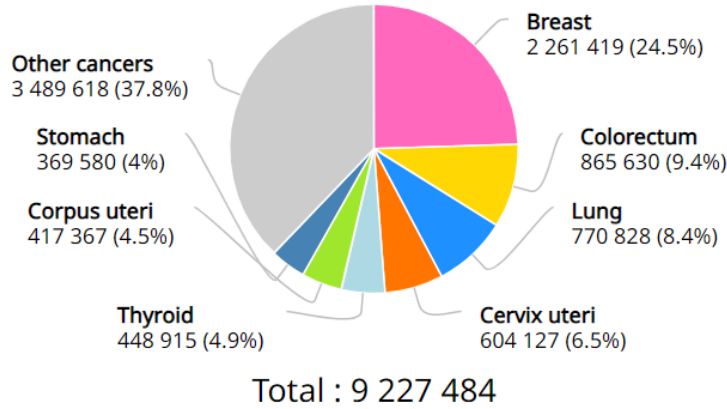
2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Meme Kanseri

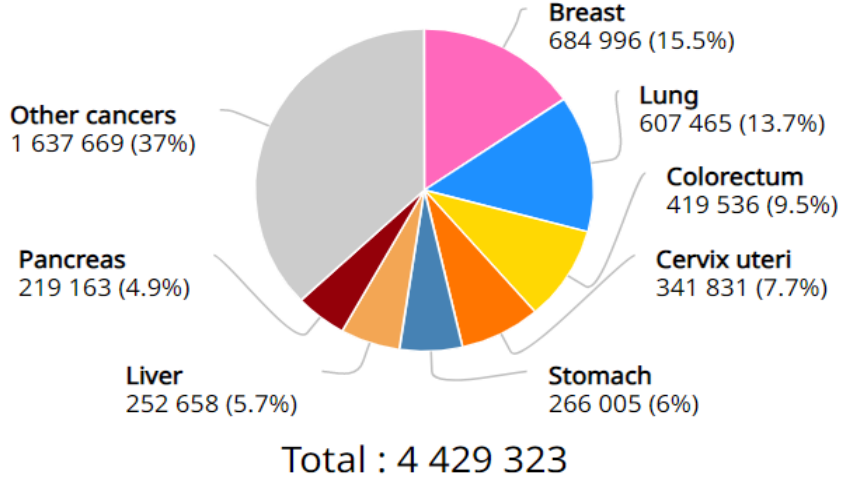
Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir. Erkeklerde görülse de çok nadirdir. Tüm kanserler arasında %1'den daha az, tüm meme kanserleri arasında da yine %1'den daha azdır. (Abdelwahab, 2017)

2.1.1. Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında insidansı 24.5%'dir. 2020 yılında teşhisi konulan yaklaşık 9.22 milyon vakanın 2.26 milyonluk payı meme kanseri oluşturmaktadır. Bu veriler yaklaşık olarak kanser teşhisi konulan her dört kadının birini meme kanseri olduğunu bize göstermektedir. Aynı yıl yaklaşık 685 bin kişi meme kanserine bağlı olarak hayatını kaybetmiştir. (Web1)

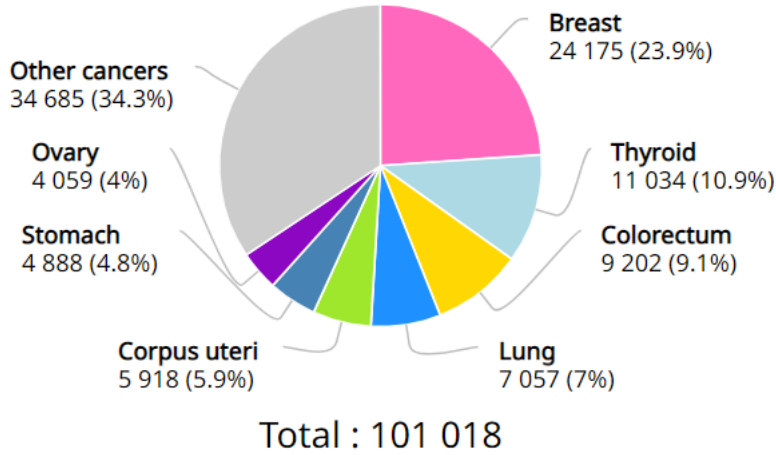


Şekil 1.1. Dünyada meme kanseri insidansı 2020 (Web1)

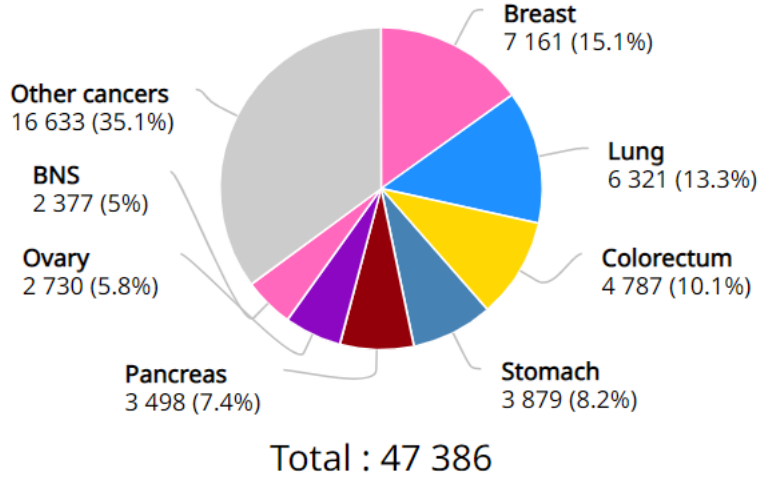


Şekil 1.2. Dünyada meme kanserine bağlı ölüm oranları 2020 (Web1)

Türkiye 2020 verileri kadınlarda teşhisi konulan toplam 101 018 kanser vakasının 24 175' i (23.9%) meme kanseri olduğunu göstermektedir. Aynı yıl Türkiye'de meme kanserine bağlı olarak 7 161 kişi hayatını kaybetmiştir. (Web1)



Şekil 1.3. Türkiye meme kanseri insidansı 2020 (Web1)



Şekil 1.4. Türkiye meme kanserine bağlı ölüm oranları 2020 (Web1)

Meme kanseri görülme sıklığı yıllara göre artmaktadır. Az gelişmiş ülkelerde vaka ve ölüm oranları artarken gelişmiş ülkelerde vaka ve ölüm oranı düşmektedir. (Winters,2017)

2.1.2. Etiyolojisi

Meme kanserinde birçok risk faktörünün rol aldığı bilinmektedir. Meme kanserlerinin %10' undan azı kalıtsal bir genetik mutasyonla ilişkilendirilir. Meme kanseri daha çok çevresel faktörlere, üreme ve yaşam tarzı faktörleriyle ilişkilendiriliyor. (Britt vd, 2020)

Meme kanseri çoğunlukla kadın hormonlarıyla ilişkilidir. Bu nedenle kadın hormonlarına maruz kalmayı artıran herhangi bir faktör potansiyel risk faktörü olarak görülmektedir. (Docus ve Benusigliio, 2015)

2.1.2.1. Menarş ve menepoz yaşı

Meme östrojene duyarlı bir organdır. Menarşta daha genç yaş ve menepozda daha geç yaş meme kanseri riskini artırmaktadır. (Winters vd, 2017)

Bir kadının menarş için her yıl %5 göreceli riski artırır. Menepozda geciken her yıl ortalama menepoz yaşı ile karşılaştırıldığında yılda %2.9 göreceli riski artırır. (Britt vd, 2020)

2.1.2.2. Üreme faktörleri

Araştırmalar yirmi yaşından önce erken ve tam süreli gebeliğin meme kanseri riskini %50'ye kadar azalttığını göstermektedir. Bir kadının birden fazla çocuk sahibi olması meme kanseri yakalanma riskini her gebelik ile %7 azaltır. Buna karşı hiç çocuk sahibi olmayan ya da 35 yaş üstü ilerleyen yaşlarda ilk gebelik meme kanseri riskini artırır. (Subramari ve Lakshmanaswamy, 2017)

2.1.2.3. Hormonlar

Hormon replasman tedavisi HRT genellikle menepoz ile ilişkili semptomları hafifletmek için kadınlarda kullanılır. HRT kombine östrojen-progesteron ya da yalnız östrojen içeren tedavileri vardır. Kombine östrojen- progesteron tedavisi kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin kullanım süresi ile arttığı ve tedavinin sonlanmasından iki yıl içinde riskin normale döndüğü gözlemlenmiştir. Östrojen tedavisinde tek başına meme kanseri riskini artırır fakat bu artış kombine HRT' den çok daha düşüktür. (Narod, 2011)

2.1.2.4. Çevresel faktörler

Özellikle ergenlik döneminde iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan kadınlarda meme kanseri geliştirme olasılığını artırdığı kabul edilmiştir. Ayrıca organ klorinlerine maruziyet meme kanseri için potansiyel bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. (Verenosi vd, 2005)

2.1.2.5. Alkol-Sigara

Alkol ve meme kanseri arasında doza bağılı bir ilişki vardır. Orta düzeyde alkol tüketimi başta hormon reseptörü pozitif olan alt tipler olmak üzere meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. (Liu vd, 2015) Meme dokusunun en savunmasız olduğu evre menarş ile ilk gebelik arasındır. Menarş ve ilk gebelik arasında alkol tüketimi meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. (Liu vd, 2013)

Bir kohort çalışması sonucunda sigara içmenin özellikle ergenlik çağlarında başlayanların meme kanseri riskiyle artan ilişkisi olduğu ve ailesel hastalık öyküsü bulunan kadınların sigara ile ilişkili meme kanseri riskinin daha fazla olduğunu göstermiştir. (Jones vd, 2017)

2.1.2.6. Beslenme

Diyet faktörlerin meme kanseri ile ilişkili birçok çalışma mevcuttur. Yüksek oranlarda işlenmiş et, kırmızı et alımı veya GI yüksek olan besinler veya yumurtalar artan meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Sebzeler soya ve karotenoidler gibi diğer yiyecekler meme kanseri ile ters ilişkili bulunmuştur. Meme kanseri ile narenciye ve mantar tüketimi arasında ters ilişki yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Ayrıca kalsiyum, folat, vitamin D, lignanlar ve karotenoidler meme kanseri ile ters ilişkili görülür. Süt ürünleri, doymamış yağ asitleri gibi diğer diyet unsurlarının sonuçları çelişkilidir. (Buja vd, 2020)

2.1.2.7. Obezite

Obezite birçok hastalıkla olduğu gibi meme kanseriyle de ilişkilidir. Obezitenin meme kanseri riski üzerinde etkisi menopoz durumu ve meme kanserinin alt tipleri arasında farklılık göstermektedir.

Menopoz öncesi kadınlarda obezite ER+ meme kanseri riskinin daha düşük olduğu ne TNBC riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Menopoz sonrası kadınlarda ise belirgin bir şekilde daha yüksek ER+ meme kanseri riski ile ilişkilidir, ancak ER- meme kanseri riski üzerindeki etkisi çok düşüktür. Obezite meme kanseri olan hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası hastalarda ölüm riskini artırmaktadır. (Picon-Ruiz vd, 2017)

2.1.2.8. Genetik faktörler

Meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili çeşitli genler tanımlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserlerinin çoğunluğunu ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u kapsamaktadır. Bu genlerdeki mutasyon bireylerde meme kanseri geliştirme riskini artırır. Ayrıca BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar yumurtalık kanserini yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır ve bu mutasyonlar fallop tüpü ve prostat kanseri riskini artırır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarıyla ilişkili kansere yakalanma eğilimi kalıtsal meme-yumurtalık kanseri (HBOC) sendromu olarak bilinir. PTEN, TP53, STK11, CDH1 ve PALB2'de dahil olmak üzere diğer birçok genlerdeki mutasyonların, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarından daha az ölçüde meme kanserine yakalanma riskinin artırdığı bulunmuştur. (Lynch vd, 2015)

2.2. Meme Kanserinin Alt Tipleri

Meme kanseri bölgeye göre invaziv ve non-invaziv olarak ayrılmaktadır.

2.2.1. Non-invaziv meme kanseri

Non-invaziv meme kanseri bulunduğu lobülde ya da kanalda sınırlanmıştır. Atipik hücreler bulunduğu lobülün veya kanalın dışındaki dokulara yayılmamış olsalar bile gelişebilir ve invaziv meme kanserine dönüşebilir. Non-invaziv meme kanserleri lobüler karsinom in situ (LCIS) ve duktal karsinom in situ (DCIS) olarak sınıflandırılmıştır. Lobüler karsinom in situ meme lobüllerinde gelişim gösterir. LCIS meme kanseri lobüllerin dışındaki meme dokusuna yayılmamıştır. Lobüler kanser in situ genellikle non-invaziv meme kanseri olarak bilinir. DCIS non-invaziv meme kanserinin en yaygın türüdür. Duktal karsinom in situ memenin süt kanalları içerisinde (dukts) atipik hücreler geliştiğinde ortaya çıkar. DCIS meme kanalı ile sınırlıdır. (Akram vd, 2017)

2.2.2. İnvaziv meme kanseri

Meme kanserlerin çoğunluğu invaziv tipte yer almaktadır. Bu maligniteler kanalların ve bezlerin ötesine geçerek çevre dokulara ve lenf düğümlere doğru istila eder. (2) Vücudun farklı organlarına uzanan invaziv meme kanseri de metastatik meme kanseri olarak kabul edilmektedir. Bu hücrelerin yayıldığı en yaygın organlar beyin, kemikler, akciğer ve karaciğerdir. Bu hücreler vücudun farklı organlarına yerleşip çoğalsalar da hala meme kanseridir. (Akram vd, 2017)

İnfiltrasyon lobüler karsinom: (ILC) invaziv lobüler karsinom olarak kabul edilmektedir. ILC, memenin süt bezleri olan lobüllerden köken alır, ancak vücudun genellikle diğer bölgelerine yayılır. (Akram vd, 2017)

İnfiltrasyon duktal karsinom: (IDC) invaziv duktal karsinom olarak kabul görür. IDC, memenin süt kanallarından (ducts) kaynaklanmaktadır ve memenin kanalın duvarlarına uzanmaktadır. Memenin yağ dokusunu istila eder ve vücudun diğer kısımlarını da istila edebilir. (Akram vd, 2017) IDC en sık teşhis edilen meme kanseri türüdür. (Subramari ve Lakshmanaswamy, 2017)

Medüller karsinom: tüm invaziv meme karsinomların % 1'inden azını oluşturur. Agresif morfolojik özelliklerine rağmen olumlu prognozla ilişkili invaziv meme kanserlerinin ayırt edici bir alt tipidir. Meme kitlesi ile başvuran 30-40'lı yaşlardaki kadın hastalarda görülür ve görüntülemelerde yuvarlak, oval veya lobüle olurlar. (Masood, 2016)

Tübüler karsinom: invaziv meme kanserinin özel bir türüdür. Tübüler karsinomu olan kadınlar genellikle genel invaziv kanser tipleri olan kadınlardan daha iyi bir beklentiye sahiptir. (Akram vd, 2017)

Müsinöz karsinom: hücre dışı müsin miktarının yüksek olması ile karakterize nadir görülen bir meme kanseridir. Müsinöz karsinom (MC) tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %4'ünün temsil eder. Perimenepozal ve postmenepozal kadınlarda daha sık görülür, diğer meme malignitelerinden daha iyi bir prognoza sahiptir. (Marazzo vd, 2020)

İnflamatuvar meme kanseri: inflamatuvar meme kanseri (IBC) ABD'de meme kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. IBC nadir olmasına rağmen oldukça agresif meme kanseri alt tipidir. Hızlı ilerlemesi bölgesel ve uzak metastazlar ve daha erken yaşlarda görülmesi ile karakterizedir. Multimodal tedavi olarak adlandırılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi içeren tedavi yaklaşımının uygulanması klinik sonuçları önemli ölçüde iyileştirmesine rağmen 5 yıllık sağ kalım oranlar %35-40 seviyelerindedir. IBC'nin kötü prognozu ilk olarak IBC tümörlerinin yüksek metastaz potansiyeline bağlanır. Tanısı koyulan hastaların yaklaşık üçte birinde uzak metastaz vardır. Tanı anında evre III olan hastalarında standart tedavi aldıklarında yaklaşık %40'ı uzak nüks geliştirir. (Thomas vd, 2021)

Memenin Paget hastalığı: Sir James Paget tarafından meme başı ülserasyonu ile ilişkili bir karsinom olarak karakterize edilen nadir bir meme kanseridir. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %0,5-2.8'inde mevcut olduğu bildirilmektedir. Paget hastalığı meme ucunu ve areolayı etkileyen egzamatöz bir lezyon ve ülserasyon ile karakterizedir. Hastalar genelde egzama veya inflamatuvar reaksiyonlar olarak yanlış teşhis edilen

meme ucunda pullanma ve kızarıklığın erken belirtileri ile başvurabilir. Paget hastalığının daha sonra ilerlemesi akıntılı veya akıntısız döküntülerle ve ülserasyon ile yuvarlak bir plak oluşumu ile sonuçlanabilir. Paget hastalığının en temel tedavisi cerrahi olmuştur. Bununla birlikte meme koruyucu tedavi uygulaması da yapılmaktadır. (Okonofua vd, 2022)

Filloid tümör: memenin filloid tümörü nadir görülen fibroepitelyal bir neoplazmdir. Tüm meme tümörleri arasında görülme sıklığı %1'den azdır. Uzak metastaz maling tümörler filloid tümörlerin %22'sini oluşturur. (Zhang ve Kleer, 2016)

2.3. Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplendirme

Meme kanserinin moleküler alt tipleri gen ekspresyonlarının profillemesine dayanılarak tanımlanmaktadır. Meme kanserinin başlıca alt tipleri üç tümör belirtecinin ekspresyonları ile belirlenir. Bu belirteçler; östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2). Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü birlikte hormon reseptörü (HR) olarak ifade edilir. HR/ HER2 ekspresyon durumlarına göre dört ana molekül alt tipleri şunlardır; luminal A, luminal B, HER2-zenginleştirilmiş, üçlü negatif meme kanseri (TNBC). (Howlader vd, 2018)

Luminal A: tüm meme kanseri tümörlerin %60-70'ini oluşturan en yaygın tiptir. Luminal A alt tipi tümörlerde en iyi prognoza ve genel sağkalım oranına sahiptir. Bu alttıpte ER ve PR pozitif, HER2 ve Ki67 negatiftir. (Dvorská vd, 2021)

Luminal B: HR pozitif, HER2 pozitif veya negatif Ki67 pozitif. HER2 negatif en sık görülen ikinci alt tiptir, meme kanseri tümörlerin yaklaşık %10-20'sini oluşturur. HER2 pozitif prognozları negatiflere göre daha kötüdür. (Dvorská vd, 2021)

HER2-zenginleştirilmiş: HER2 ile zenginleştirilmiş tipik olarak ER negatif, PR negatif, HER2 pozitif, Ki67 pozitifdir. Bu alt tipin tümörleri agresif olarak kabul edilmekle birlikte, tedaviye iyi yanıt verirler ve bu nedenle prognozları orta düzeyde kalır. Luminal B benzeri HER2 pozitif ile birlikte tüm meme kanseri tümörlerin %15-20'sini kapsar. (Dvorská vd, 2021)

Üçlü negatif meme kanseri: TNBC meme kanseri tümörlerin yaklaşık %15'ini oluşturur ve tipik olarak ER negatif, PR negatif, HER2 negatif, Ki67 pozitifdir. (31) TNBC meme kanserinin en agresif alt tipidir. TNBC daha genç yaşlarda başlanması, daha büyük metastatik potansiyeli, daha yüksek nüks insidansı ve düşük sağkalım oranları ile ilişkilidir. TNBC tedavisi tümörün heterojenliği, yüksek invazivlik yapısı ve düşük terapötik yanıtı nedeniyle zordur. (Manjunath ve Choudhary, 2021)

2.4. Meme Kanserinin Evrelendirilmesi

Meme kanserinin evreleri dört ana özelliklerine göre belirlenir. Bunlar kanserin büyüklüğü, kanserin invaziv ya da non-invazivliği, lenf düğümlerinde tespiti ve kanserin meme dışında vücudun diğer bölgelerine metastazını içerir. Meme kanserinin evresinin belirlenmesi kanserin prognozu, patoloji sonuçları ve en iyi tedavi şeklinin anlaşılmasında yardımcı olur. Meme kanseri evreleri 0'dan IV'e ölçeklendirilmiştir.

Evre 0: non-invaziv meme kanserini tanımlar.

Evre I: bu aşamada meme kanseri invazivdir. Evre IA ve EvreIB olarak ikiye ayrılmıştır. Evre IA'da tümör lenf nodlarında tutulum göstermeyen 2 cm'ye kadar büyüyen tümörleri kapsar. Evre IB'de tümörler lenf nodlarında bulunabilir.

Evre II: Evre IIA ve Evre IIB olarak ikiye ayrılır. Evre IIA bir ile üç aksiler lenf tutulumu gösteren 2 cm'ye kadar ölçülen invaziv tümörleri kapsar. Evre IIB bir ile üç aksiller lenf tutulumu ile 2 ile 5 cm arası tümör boyutları görülür.

Evre III: üç kategoriye ayrılmıştır. Evre IIIA dört ile sekiz aksiller lenf tutulumu ile herhangi bir boyuta ulaşmış tümörlerin gözlemlendiği evredir. Evre IIIB'de tümör boyutları herhangi bir boyuta ulaşmış, göğüs duvarına, meme derisine ve dokuz aksiller lenf noduna kadar yayılmıştır. Evre IIIC meme kanserlerin 10 veya daha fazla lenf nodlarına kadar ulaşmıştır.

Evre IV: bu evre kanserin ileri metastatik aşamalarını ifade eder. Kanseri bu aşamada kemik, akciğer, karaciğer, beyin gibi vücudun diğer bölgelerine metastaz gerçekleştirmiştir.

Bir başka kanser evreleme sistemi olan TNM kanserin bize nasıl görüldüğü ve davrandığı hakkında bilgi verir. Kısaca T tümör boyunu, N lenf nodu tutulumunu, M metastazı temsil eder. (Subramani ve Lakshmanaswamy, 2017)

2.5. Meme Kanserinin Patogenezi

Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi için iki teori vardır. Bunlar kanser kök hücre teorisi ve stokastik teoridir. Kanser kök hücre teorisi tüm tümör alt tiplerin aynı kök hücrelerden veya progenitör hücrelerden geliştiğinin savunmaktadır. Kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde edinilmiş genetik ve epigenetik mutasyonlar farklı tümör tiplerin farklı tümör fenotiplerinin gelişmesine yol açar. (Sun vd, 2017)

Stokastik teori her bir tümör alt tipinin kök hücre, progenitör hücre veya farklılaşmış tek bir hücre tipinden başlatılmasıdır. Rastgele mutasyonlar herhangi bir meme hücresinde kademeli olarak birikebilir ve yeterli mutasyonlar biriktiğinde tümör hücrelerine dönüşmelerine neden olabilir. Her iki teoride birçok veri ile desteklense de her ikisi de insan meme kanserinin kökenini tam olarak açıklayamaz. (Sun vd, 2017)

2.6. Meme Kanserinin Metastazı

Meme kanseri hastaların %20-30'unda tanı ve primer tümör tedavisi sonrasında metastaz geliştirebildiği ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ının metastaza bağlandığı bildirilmiştir. Meme kanseri hastalarında metastaz geliştirmeyen hastaların 5 yıllık genel sağ kalım oranı %80'in üzerindedir. Ancak metastaz geliştiren hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %25'lere kadar düşebilmektedir. (Liang vd, 2020)

Meme kanseri kemik, akciğer, karaciğer ve beyin gibi farklı organlara metastatik eğilim gösterir. Kemik metastazı metastatik olguların yaklaşık %75'ini oluşturur ve 5 yıllık genel sağkalım oranı %22,8'dir. Meme kanserinin en sık metastaz yaptığı ikinci organ akciğerdir. 5 yıllık genel sağkalım oranı %16,8'dir. Akciğerden sonra memenin en sık metastaz yaptığı yer karaciğerdir. Sağkalım oranı kemik ve akciğere nüksüne göre daha düşüktür, 5 yıllık genel sağkalım %8,5'tir. Metastatik meme kanseri hastaların yaklaşık %15-30'unda beyin metastazı gelişebilir ve son derece kısa sağkalım süresi verilir. (Liang vd, 2020)

Primer tümör, her gün gram tümör başına yaklaşık bir milyon kanser hücresini dolaşıma sokar. (Goldman vd, 2017) Stephan Paget tarafından öne sürülen ve köklü bir teori olan 'seed and soil' bu dolaşımdaki hücrelerin uzak bölgelerde kolonileşerek metastazı tohumlar.

Tümör metastazı primer tümörün çevredeki dokulardan kaçmak için lokal invazyonu, kan veya lenfatik damarları istila etmesi(intravazasyon), dolaşımdaki tümör

hücreleri (CTC) olarak dolaşımında hayatta kalması, CTC'lerin dolaşım sisteminden geçmesi (ekstravazasyon), yayılmış tümör hücreleri (DTC) olarak mikroçevreye adaptasyonu ve metastatik bir lezyon oluşturmak için metastaz başlatan hücrelere (MIC) dönüşümü gibi ardışık adımlardan geçen bir süreçtir. (Liang vd, 2020)

Bu adımlardan herhangi birinin tamamlanmaması süreci durduracaktır. (Scully vd, 2012)

Ayrıca benzer birkaç mekanizma lokal invazyon, intravazasyon, dolaşımında sağkalım da dahil olmak üzere metastazın erken aşamalarına katkıda bulunur. (Liang vd, 2020)

Lokal invazyon: kanser hücrelerin primer tümörden çevredeki stromaya ve daha sonra bitişik normal dokuya göç ile başlar. Bu aşamada primer epitel tümör hücreleri, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) için bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliğe uğrar. EMT, E-kadherin, claudin, occludin ve catenin gibi epitel dokuda yer alan hücre bağlantılı proteinlerinin kaybederek başlar. Ardından N-kadherin ve vimentin dahil olmak üzere mezenkimal belirteçlerin ekspresyonları ile devam eder.

Bu geçişte TGF-B, IGF, EGF gibi birçok onkojenik molekül ve Snail, Slug, Twist ZEB-1 ve ZEB-2 gibi EMT aktive edici transkripsiyon faktörleri aracılık eder. EMT'yi düzenleyen ve anoikis direnci kazandıran moleküler olaylar, Rho GTPaz ailesinin üyeleri aracılığıyla tümör hücrelerindeki göç mekanizmasını aktive ederek lamellipodia, filopodia ve invadopodia oluşumuna yol açabilir. Primer tümör hücreleri EMT, migrasyon ve bazal membrandan invazyon sonrasında, tümör hücreleri çeşitli proteazları serbest bırakarak proteolitik ürokinaz tipi plazmojen aktivatör sistemini aktive ederek hücre dışı matriksi doğrudan istila edebilir ve bozabilir.

Bu progresyon sırasında maling meme hücreleri adipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kemik iliği kaynaklı çeşitli hücreler ve bağışık sistemi hücrelerinin biyolojisini ve işlevini iyileştirme ve yeniden programlama kapasitesini kazanır. Bu durumda çeşitli heterotipik sinyaller yoluyla agresif tümör davranışlarını artırabilir ve bağışıklık baskılayıcı bir ortamın teşvik edilmesine katkıda bulunabilir. (Barone vd, 2020)

Intravazasyon: intravazasyon süreci tümör hücrelerinin lenfatik veya kan damarlarının lüminasına aktif olarak geçişini ifade eder. Intravazasyona aracılık eden mekanizmalar cytoskelet remodeling ve ECM modifiye edici enzimlerin aktivasyonudur. Tümör-makrofaj karışması meme tümörü hücresi intravazasyonunu teşvik etmede önemli rol

oynadığı görülmektedir. Ek olarak tümör hücreleri esas olarak vasküler endotelial büyüme faktörlerin (VEGF) etkilerini yakınlaşarak daha fazla besin maddesine ve oksijene erişebilmek ve birincil nişi mekanik olarak genişletmek için yerel mikro ortamlarında neoanjiogenezi uyarmaktadır. Hem lenfaanjiogenezi hem de anjiogenezi kanser hücre yayılımında rol oynayan kritik olgulardır ve kötü prognoz ile korelasyon göstermektedir. (Barone vd, 2020)

Dolaşımda hayatta kalma: dolaşımda meme kanseri hücrelerinin sağ kalımı büyük olasılıkla metastaz oluşumunun başarı oranını sınırlayan önemli bir adımdır. Kan dolaşımındaki mekanik yıkım ve bağışıklık hücrelerinin özellikle natural killer hücrelerin denetimi gibi çeşitli zorluklar kan dolaşımındaki tümör hücreleri için tehlikeli bir ortam teşkil eder. CTC'lerin %0.01'den azının lezyon oluşturma şansının olduğu tahmin edilmektedir. Dolaşımda CTC'lerin sağkalımını yöneten çeşitli mekanizmalar önerilse de tartışmalıdır. CTC 'ler primer tümör hücrelerine kıyasla genetik değişiklikler ve anormal gen ekspresyonu sergilemiştir. Kanser kök hücrelerinden oluşan bir CTC alt kümesinin stemness profili sunduğu öne sürülür. Tümör hücreleri trombosit agregasyonunu uyarmak için çeşitli molekülleri ekspre ederek kendini koruyabilirler. Bu trombosit 'coat' ekstrasvazasyonu ve bunun sonucunda uzak organlarda tutunmayı kolaylaştırabilir. Bağışıklık hücreleri özellikle miyeloid türevi baskılayıcı hücreler CTC'nin konakçı bağışıklığından kaçmasına yardımcı olabilir. Nötrofiller hücre döngüsü ilerlemesini desteklemek ve metastatik potansiyellerini genişletmek için CTC'lere eşlik eder. (Barone vd, 2020)

Uzak organlara tutulum ve ekstrasvazasyon: invazyon metastaz kaskadın sonraki adımı kanser hücrelerinin hedef organdaki vasküler endotele yapıştığı ve dolaşımı terkettiği ekstrasvazyondur. Bu olay, spesifik hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve vasküler hiper-permeabiliteyi indükleyen faktörlerin salgılanmasıyla ilişkilidir. Meme kanseri hücrelerinin ekstrasvazasyonu ayrıca EGF, epiregulin, COX2, MMP-1 ve MMP-2 ekspresyonu ile desteklenir. Meme kanseri sıklıkla meme bezi dokusu ile doğrudan bağlantısı olmayan kemik, akciğer, karaciğer ve beyin gibi organlarda metastaz yapar. Bu tropizm, her metastatik bölge için farklı genetik programlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca organa özgü kemokinlerin salınması ve tümörün yüzeyinde uygun kemokin reseptörlerin ekspresyonu, tümör hücrelerin spesifik bölgeleri hedeflemelerine yardımcı olabilir. (Barone vd, 2020)

Mikrometastaz oluşumu: ekstrasvazyon geçirmiş meme kanseri hücrelerinin, mikrometastaz oluşturmak için yabancı mikro ortamda özel koşullar oluşturması gerekmektedir.

Primer tümör hücreleri tarafından dolaşıma salınan büyüme faktörlerine yanıt olarak, çeşitli moleküller metastatik bölgelerde up-regüle edilir ve kemik iliği kaynaklı hematopoetik progenitör hücrelerin takviyesine yol açar. Bu hücrelere ilaveten, fibroblastlar, miyeloid ve endotel hücreleride dahil olmak üzere diğer hücre tipleri metastaz öncesi niş oluşumunda önemli olan sitokinleri ve adezyon proteinleri ekspre eder. Metastatik kaskadda tümör hücreleri mikrometastazları doldurmak için nişi aşılabilir. (Barone vd, 2020)

Metastatik büyüme: klinik olarak saptanamayan mikrometastazların gelişiminden sonra, meme kanseri hücrelerinin makroskopik metastazlar oluşturması için mikrometastazların büyümesi gerekmektedir. Tümör hücrelerinin proliferasyonu belirli bir zamansal kalıba bağlı değildir. Uzak organlarda tutulan tümör hücreleri sessiz kalabilir ve ilerleyene kadar birkaç yıl boyunca bağıışıklıktan kaçabilir. Metastatik hastalığın klinik veya histopatolojik bulguları olmayan bu olay metastatik gecikme olarak bilinir. Metastazlar daha sonra diğer dokulara daha fazla yayılma kaynağı olabilir. (Barone vd, 2020)

2.7. Meme Kanserinde Kodlamayan RNA'lar (ncRNA)

İnsan genomunun yaklaşık %52'si transkribe edilir, ancak transkriptlerin yalnız %1.2'si proteinler için kodlanır. Transkriptlerin çoğunluğu ncRNA olarak temsil edilmektedir. ncRNA'lar house-keeping ve regulatory ncRNA'lar olarak sınıflandırılır.

Housekeeping ncRNA'ları hücrelerin normal işlevleri için her yerde ekspresyonu yapılır ve gereklidir. Housekeeping ncRNA'lar arasında tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA vardır.

Regulatory ncRNA'lar spesifik doku ekspresyonu sergiler. Kabaca 200 nükleotidden küçük small ncRNA'lar ve 200 nükleotidden uzun lincRNA'lar olarak sınıflandırılır. Küçük ncRNA'lar arasında RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile ilişkili miRNA'lar ve küçük müdahale eden RNA'lar (siRNA) vardır. lincRNA'lar genomik konumlarına ve oryantasyonlarına göre çeşitli sınıflarda sınıflandırılır. lincRNA'lar aralarında eRNA, lincRNA, ciRNA gibi farklı transkript sınıfları içeren çok geniş bir tanımdır. ncRNA'lar, özellikle miRNA ve lincRNA son yıllarda hücre fizyolojisi ve

patolojisinin anahtar düzenleyicileri olarak ve farklı kanser türlerinde tanısal ve prognostik belirteçler olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. (Amelio vd, 2021)

mikroRNA: miRNA'lar insan genomunun %1-5'ini oluşturan ve protein kodlayan genleri en az %30'unu düzenleyen kısa, tek sarmallı 19-25 nükleotit uzunluğundaki kodlamayan RNA'lardır. Yakalaşık 28.000 olgun miRNA tanımlanmıştır. Onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak tümör büyümesinin, proliferasyonun, farklılaşmasının ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynar.

miRNA'ların olgunlaşmasında yer alan birkaç aşama vardır. İlk olarak bir nükleotid dizisi RNA Polimeraz II tarafından intergenik veya intron kodlayan bölgelerden transkribe edilir ve primer-mikroRNA (pri-miRNA) adı verilen keplenmiş, poliadenillenmiş transkriptlerle sonuçlanır. Daha sonra, multiprotein kompleksinin bir parçası olan nükleik ribonükleazlar, mikroşlemci kompleksi olan Drosha ve DGCR8 tarafından işlenir. Daha sonra ürün RNA'nın parçalanması ve prekürsör-miRNA (pre-miRNA) olarak bilinen 70-100 nükleotid bir saç tokası ara maddesi üretilir. Pre-miRNA nükleer zarı exportin-5 kanalı aracılığıyla sitoplazmaya geçirir, burada başka bir ribonükleaz olan Dicer, iplikçikler ayrılan kısa, çift sarmallı RNA fragmanları işler ve olgun tek sarmallı molekül, miRNA ve spesifik proteinleri içeren bir efektör molekül olan RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yapışır. (Volovat vd, 2020)

miRNA molekülleri mRNA'yı iki şekilde bastırır. İlki miRNA hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine hibridize olarak gerçekleşir. RISC ve hibrid RNA molekülü kompleksi hedef mRNA'nın bölünmesine ve bozulmasına aracılık eder. İkinci model miRNA hedef mRNA'sının 3' UTR tamamlayıcı bölgelerine tam olarak bağlanmaz. Bunun sonucunda sadece mRNA translasyonu bloke olur. Hedef mRNA tarafından kodlanan genin ürününün miktarı azalmasıyla sonuçlanır. Ayrıca miRNA'lar malign fenotip süreçleri de dahil çeşitli biyolojik ve patolojik düzenleyici süreçlerde rol oynarlar. (Volovat vd, 2020)

miR-410-3p kanser dahil çeşitli hastalıklarda anormal ekspresyon gösterir ve proliferasyon, apoptoz, kök hücrelerin farklılaşması ve ilaç direnci gibi birçok biyolojik süreçte yol alır. Yapılan çalışmalar bize miR-410-3p'nin farklı kanser türlerinde anormal ekspresyonu olduğunu göstermiştir. Akciğer ve kolorektal kanserlerde yüksek oranda ekspresyonu invazyon ve göçü teşvik ettiği buna karşılık pankreas kanserinde proliferasyonu, invazyonu ve göçü baskıladığı bildirilmiştir. Meme kanserinde miR-410-3p'nin komşu diğer hücrelere kıyasla upregüle olduğu, proliferasyonu ve invazyonu baskıladığını yapılan çalışmalar ortaya koymuştur. (Wang vd, 2019; Zhang vd; 2016)

lncRNA: uzun kodlamayan RNA'lar transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenleyen bir kodlamayan RNA

kategorisidir. lncRNA'lar peptitleri veya proteinleri kodlamaz, ancak hücrel süreçlerin düzgün çalışması için kritik öneme sahiptirler. lncRNA'lar kromozom arası etkileşimler, endojen RNA'lar için sünger görevi görme, mRNA düzenleme ve epigenetik gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla işlevlerini yerine getirirler. lncRNA ekspresyon seviyelerindeki herhangi bir değişiklik malign dahil çeşitli hastalıklara yol açabilir. (Volovat vd, 2020)

lncRNA'lar 200 nükleotidden uzun kodlamayan RNA sınıfıdır. Çoğunluğu 1000 ile 10.000 nükleotit arasında değişmektedir. lncRNA'lar ikili RNA ve protein benzeri roller oynamasını sağlayan ikincil ve üç boyutlu yapılar oluşturur. lncRNA'nın biyogenezi mRNA ile benzerlik gösterir; RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu gerçekleşir, daha sonra çoğunluğu eklenir. mRNA'ların aksine lncRNA'lar genellikle çekirdekte lokalize olur ve ekspresyon seviyeleri daha düşüktür. lncRNA'ların ekspresyon paternleri hücre tipine özgüdür. lncRNA'ların çoğunluğu DNA dizileri kontrol ettikleri ve sitoplazmada farklı işlevlere sahip transkripsiyonel düzenlemeye dahil oldukları çekirdeğe ve kromatine lokalize olurlar. Moleküllerin bir kısmı eksozomlar aracılığıyla iletilerek dolaşıma katılır. (Volovat vd, 2020)

lncRNA'lar transkripsiyon faktörleri, olgun mRNA'lar, kromatin modifiye edici kompleksler, RNA bağlayıcı proteinler, DNA, yeni RNA transkriptleri, miRNA ve kromatin dahil olmak üzere çeşitli moleküllerle etkileşime girebilir. lncRNA transkriptleri aktif proteinlere bağlanabilir, cis veya trans pozisyon oluşturabilir. Sonuç olarak lncRNA'lar epigenetik, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunu düzenlemede önemli işlevlere sahiptir. (Volovat vd, 2020)

lncRNA nükleer parabenek montaj transkript 1 (NEAT1) upregülasyonu birçok malignitenin ilerlemesinde etkili olduğu yapılan araştırmalar tarafından bildirilmiştir. NEAT1 hücre büyümesi, invazyon ve göç ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar NEAT1'in meme kanseri hastalarının dolaşımında yüksek ekspresyon gösterdiği, tümörde yüksek NEAT1 ekspresyonun kötü sağkalım ile korelasyon gösterdiği ortaya koymuştur. NEAT1 bir iskele RNA molekülü olarak parabenekler yoluyla ve rakip endojen RNA, to decoy, miRNA süngerleme veya kanser ilerlemesi kolaylaştırmak için histonlara ya da diğer proteinler komplekslere bağlanarak kromatin düzenleyicileri olarak işlev görür. Meme kanseri hücrelerinde NEAT1'in hücre hatların hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NEAT1 meme kanserinde tümörlerin EMT'sini ve metastazını teşvik ettiği birçok çalışmada belirtilmiştir. NEAT1 meme kanserinde ekspresyonu kötü prognoz daha az sağkalım ve kemodirenç ile ilişkilendirilmiştir. (Shin vd, 2019)

snRNA: cajal cisimlerindeki küçük kodlamayan RNA'lardır ve çekirdekdeki speckleri ekler. snRNA'lar yaklaşık 150 nükleotiddir. Pre-mRNA post-transkripsiyonel modifikasyonu birincil fonksiyonudur. İki ana sınıfı ortak diziler ve etkileşen proteinler bakımından farklılık gösterir. SM sınıfı snRNA'lar RNA polimeraz II tarafından transkribe edilenleri içerir ve bunların işlenmesi sitoplazmaya aktarımı ve çekirdeğe dönüşünü takip eder. Lsm sınıfı snRNA'lar polimeraz III tarafından kopyalanır ve hücre çekirdeğinde kalır.

snRNA'lar ilgili snRNA'lara bağlı olarak minör veya majör spliceosome kompleksi oluşturmak üzere yaklaşık 150 protein ile birleşir. Splisozomal anormallikler nörodejeneratif hastalıklarda kanser öncesi ve kanser lezyonlarından sorumlu snRNA mutasyonlarında tipiktir. (Dvorská vd, 2021)

snoRNA: snoRNA'lar 60 ila 300 bp uzunluğundaki kısa kodlamayan RNA'lardır. Çoğunluk ribozom sentezinde bulunan proteinleri kodlayan genlerin intron veya diğer kodlamayan bölgelerinde kodlanır. Nihai snoRNA transkripsiyonu ayrıca insanlarda konakçı-gen ekspresyonu ile yakından ilişkilidir. snoRNA işlenmesi çekirdekte başlar, sitoplazmada devam eder. Daha sonra snorP protein kompleksine dahil olması gerekmektedir. Bu süreç cajal cisimlerde çekirdeğe dahil olabilmeleri için stabilitesini geliştirir. Cajal cisimleri ekleme ve son modifikasyon için ana bölgeleri sağlar. (Dvorská vd, 2021)

snoRNA insan genomunda sayısının en az 2000 olduğu açıklanmıştır. Başlarda snoRNA'lar nükleus içinde işlev gördüğü ve rRNA'ları transkripsiyon sonrası modifikasyonları hedefledikleri belirtildi. Sonraki çalışmalarla birlikte snoRNA'ların etkilerinin nükleustan öte sitoplazmaya kadar uzandığı açıklandı. Son zamanlarda bu moleküller kanserlerin oluşumunda, ilerlemesinde ve metastazında rol oynayan çok sayıda rapor bildirilmiştir. (Van der Werf vd, 2021)

cirkRNA: ilk olarak RNA virüslerinde daha sonra ökaryotik hücreler ve insanlarda keşfedilmiştir. cirkRNA'lar 5' ve 3' uçlarının birbirine kovalent bağlı kapalı halka yapılarıdır. Halkasal yapıları doğrusal yapıları RNA'lardan daha kararlı olmasını sağlar. cirkRNA'lar spesifik dokularda spesifik gelişim aşamalarında ekspre edilir. Çok sayıda rapor cirkRNA'ların tümör dokularında anormal şekilde ekspre edildiğini bulmuş ve tümörlerin oluşumunda ve gelişiminde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Kanser hücrelerin proliferasyonuna ek olarak göç, invazyon, apoptoz ve anjiyogenezden kaçışı etkiler. (Zhang vd, 2022)

piRNA: piwi etkileşen RNA'lar, düzenleyici roller oynamak için genellikle piwi protein ailesinin üyelerine bağlanan yaklaşık 24-31 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA

moleküllerini oluşturur. Son çalışmalar memeli germline ek olarak piRNA'ların çeşitli insan dokularında dokuya özgü ifade edildiği ve transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel düzeyde anahtar sinyal yollarını modüle ettiğini göstermektedir. piRNA'lar bir piRNA/piwi kompleksi oluşturmak için piwi proteinlerine bağlanabilir, böylece transpozan susturma, spermiogenez, genom yeniden düzenlenmesi, epigenetik düzenleme, protein regülasyonu ve germ kök hücre bakımını etkiler. Anormal piRNA veya PIWI protein ekspresyonu bazı kanserlerde rapor edilmiş, tümör oluşu ve kanser prognozu ile ilişkilendirilmiştir. (Liu vd, 2019)

2.8. Hipotez

Bu çalışmadaki hipotezimiz meme kanserli hücrelerde NEAT1'in ekspresyonlarının artması, miR-410-3p'nin seviyelerinin azalması ve buna bağlı meme kanseri hücrelerinde invazyon gözlenmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre kültürü

MCF10a sağlıklı meme hücre hattı ve MCF-7 meme kanser hücre hattı kullanıldı. MCF-7 hücreleri RPMI 1640 + %10 FBS +100U/ml penisilin/streptomisin ile kültüre edildi. MCF-10a hücre hattı ise %1 Penisilin-Streptomisin, L-glutamin, 5% ısıyla inaktive edilmiş At FBS , 10ug/ml insülin, 20ng/ml EGF, 0.5ug/ml hidrokortizon içeren DMEM/F12 besi ortamında kültüre edildi. Her iki hücre hattı da 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemli hava içeren ortamda inkübe edildi. Hücre hatları T25 flasklarda, 5 ml besiyeri ile kültüre edildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 3-4 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml Tripsin/EDTA ilave edildi. Yeni flasklara 1×10^6 hücre/ml ekim gerçekleştirildi. Yeni ekim gerçekleştirilmeyecek MCF-7 hücreler %10 DMSO içeren 2ml besiyeri ile cryo tüplerle -80°C derecede saklandı. MCF10A hücrelerinde dondurma medyumunu, diğer hücrelerden farklı olarak %70 besiyeri, %20 At FBS ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

3.2. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

T25 Flaskda kültüre edilen hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 750 µl lysis Reagent ile kaldırılıp 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı. Oda sıcaklığında (15-25° C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 150 µl kloroform eklendi ve 15 saniye vorteks sonrası oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon Sonrasında 15 dakika 12,000 x g, 4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan RNA içeren beyaz ara faz yeni bir tüpe alındı. Üzerine üst faz kadar (yaklaşık 500 µl) buffer RBI ilave edilmiştir ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.

Elute spin kolonlarına 700 µl örnek koyulup, 10,000 x g'de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edildi. Daha sonra tekrar kolona 700 µl örnek eklendi ve 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Sonrasında 500 µl buffer SWI eklendi 10,000 x g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sonra , 500 µl buffer RNW eklenir ve 10,000 x g'de 30

saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu işlemden sonra, RNeasy min elute spin kolonlar, 10,000 x g'de oda sıcaklığında 60 saniye santrifüj edildi ve spin kolonlar 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve 50 µl RNase- free water spin kolonun ortasına koyulup ve 1dk bekletip daha sonra 1dk 10,000 x g'de santrifüj yapıldı. Kolonda bulunan miRNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı.

3.2.1. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

RT-PCR ile RNA düzeyindeki ekspresyon değişimlerini tespit etmek amacıyla hem lncRNA için hem de mikro RNA için revers transkriptaz enzimi ile ticari kitler yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentezi, üretici firmanın belirtmiş olduğu prosedür doğrultusunda 0,2ml tüpler kullanılarak RotorGene Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlandı. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25°C' de 10 dakika, 37°C' de 120 dakika inkübe edildi ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, serumda RNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

lncRNA ve miRNA ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü gerçekleştirildi (Qiagen - miScript II Rt Kit). Reaksiyon karışımı Tablo 3.1 da verilen miktarlarla hazırlandı.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Madde	Miktar
5x HiFlex Buffer	4 µl
10x MiScript Nucleics Mix,	2 µl
MiScript Reverse Transkriptaz Mix	2 µl
RNA	1 µl
dH2O	11 µl
Toplam	20 µl

3.3. Real-Time qPCR ile RNA (lncRNA ve miRNA) Ekspresyon Analizi

Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5 µl SYBR Green mix, 2 µl nükleaz içermeyen su, 1µl primer ve 2 µl cDNA olacak şekilde 0,1 ml RotorGene PCR strip tüplerinde kuruldu. Gerçek- zamanlı PZR cihazına yüklenen plaka, NEAT1 için, 40 döngü olacak şekilde, 95 C'de 10 dk, 95 C'de 10 sn ve 62 C'de 45 sn ve 72°C 30 sn olarak ve miR-410 için 45 döngü olacak şekilde 95 C'de 15 dk, 94 C'de 15 sn ve 55 C'de 30 sn ve 70°C 30 sn olarak amplifiye edildi.

NEAT1 FORWARD: 5'- GTACGCGGGCAGATAACAC-3'

REVERSE : 5'- TGCCTCTAGACACCACAACC-3'

miR-410 FORWARD: 5'-CCG CAC GAT ATA ACA CAG ATG-3'

REVERSE. 5'-GTG CAG GGT CCG AGG TAT TC-3'

Tablo 3.2. Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Madde	Miktar
SYBR green PCR mastermix	5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
cDNA	2
dH2O	2
Toplam	10

NEAT1 reaksiyon koşulları;

95°C 10 dakika

95°C 10 saniye,

62°C 45 saniye,

72°C 30 saniye

} 40 döngü

miR410 reaksiyon koşulları;

95°C 15 dakika

94°C 15 saniye,

55°C 30 saniye,

70°C 30 saniye

} 45 döngü

Ekspresyon değışimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile belirlendi.

3.4. Transwell İnvazyon Assay

Transwell invazyon deneyi için BioCoat Matrigel Invazyon Chamber (Kat. No:354480, Corning) kullanıldı. Deney kit protokolüne göre;

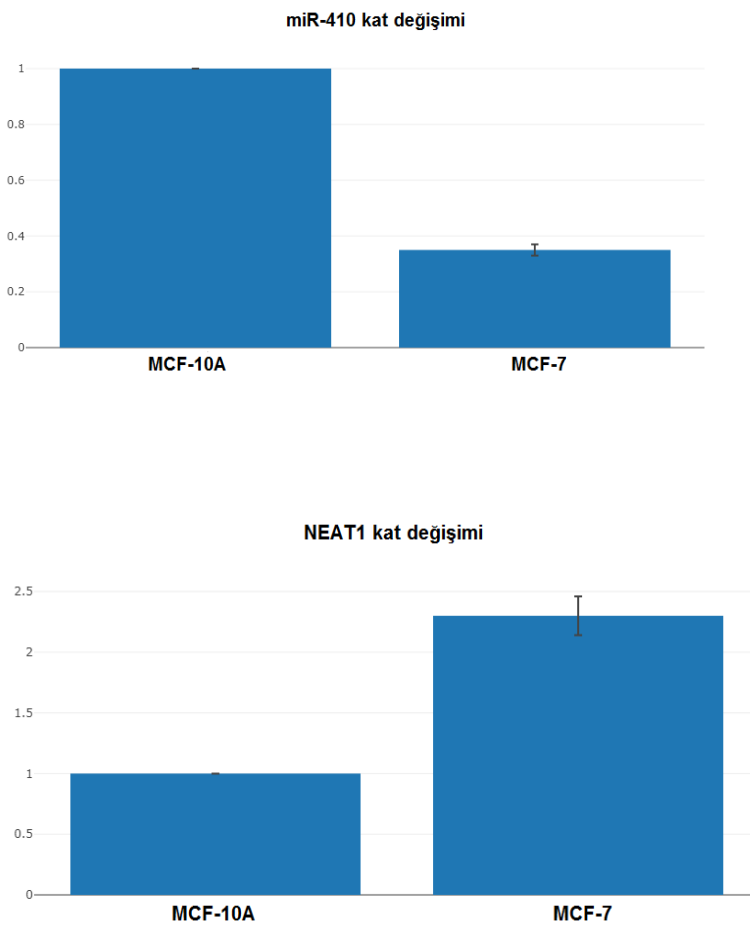
- -20 °C'de saklanan invazyon kuyucukları çıkartılmıştır ve 1 saat oda ısısında bekletildi.
- MCF-7 ve MCF-10A hücreleri tripsinizasyon işleminden sonra sayılarak serum içermeyen besiyerinde 10×10^4 hücre ekimi 500µl serumsuz besiyeri ile gerçekleştirildi.
- İnvazyon kuyucuklarının alt bölümüne kemoatraktant olarak %10 serum içeren besiyerinden 750 µl eklendi.
- 24 saat %5 CO₂ ve %95 nem ve 37°C'de koşullarında inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi bittiğinde invazyon kuyucuklarının üst bölümünde kalan invaziv olmayan hücreler pamuklu çubukla dikkatli bir şekilde temizlendi.
- İnvaziv hücrelerin fiksasyonu için invazyon kuyucukları önceden soğutulmuş %100 metanol içine aktararak 10 dakika -20°C'de inkübe edildi ve seri şekilde kuyucuklar Kristal viyole boya solüsyonunda 10 dakika bekletilerek hücrelerin boyanması sağlandı.
- Kuyucuklar PBS ile yıkanarak boyanın fazlası temizlendi ve invaziv hücreler ışık mikroskobu altında x10 büyütmede fotoğraflanarak sayıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Hatlarında NEAT1 ve miR-410-3p Ekspresyon Sonuçları

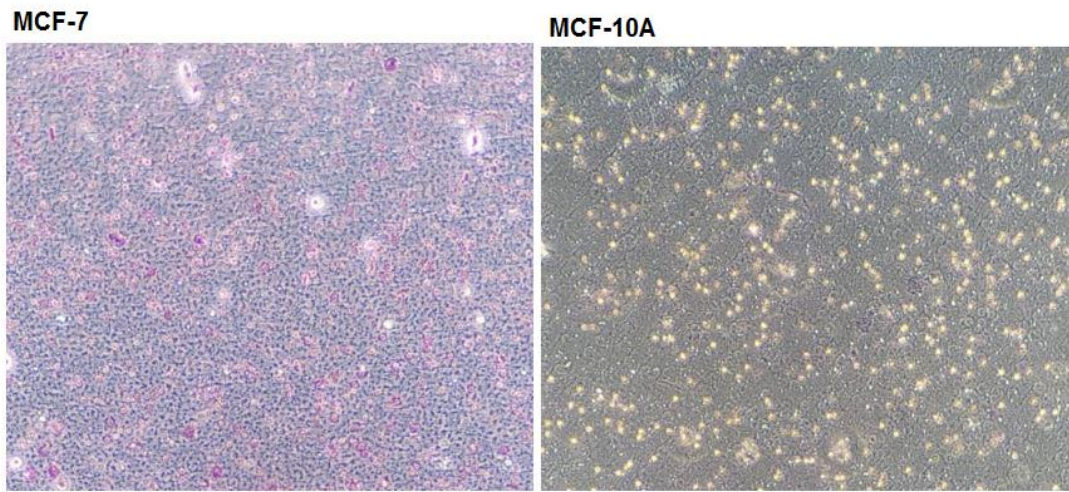
Hücre hatlarına kantitatif gerçek zamanlı PCR ile NEAT1 ve miR410 ekspresyonları belirlenmiştir. NEAT1 ekspresyonu MCF-7 hücre hattında MCF-10A hücre hattına göre 2.30 kat artış göstermiştir ($p=0,000145$). miR-410 ekspresyonu MCF-7 hücre hattında MCF-10A hücre hattına göre 0,35 kat azalma göstermiştir ($p=0,000001$).

Tablo 4.1. Hücre hatlarında NEAT1 ve miR-410 ekspresyon kat değişimleri



4.2. Hücre Hatların İnvazyon Kapasiteleri

Hücre hatları arasındaki farklı invazyon kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile matrigel-invazyon testi gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole boyası kullanılarak invazyon yapan hücrelerin boyanması sonrasında literatür ile uyumlu olarak MCF-7 hücre hattının invaziv özelliğinin olduğu ancak MCF10A hücre hattının kemoatraktant varlığında bile invaziv özellik kazanmadığı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 İnvazyon deneyi sonrası matrigel odacıklarının görünümü (40x)

5. TARTIŞMA

Meme kanseri tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin ilk nedenlerindedir ve kadınlarda en sık görülen malignitedir. Klinik tedavilerde iyileşmelere rağmen meme kanserinin insidansında artış görülmesi giderek mortaliteyi arttırmıştır. ER, PR, HER2 ve Ki67 ekspresyonlarına bakılarak tümörün luminal A, luminal B, HER2-zenginleştirilmiş ve TNBC olmak üzere 4 moleküler alt tipi belirlenmektedir. Tümörün tipi ve evresi bize tedavi yaklaşımları için fikir sunmaktadır. Günümüzde kullanılan tedaviler arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve endokrin tedavisi vardır. Meme kanserinde erken tanı ve tümörün alt tipi genel sağkalımı etkilemektedir. Meme kanseri gelişiminde genetik ve genetik olmayan çeşitli faktörler etiyolojisini etkilemektedir.

LncRNA'lar 200 nükleotidden daha uzun kodlamayan RNA sınıfıdır. Yapılan çalışmalar lncRNA'ların gen transkripsiyonunu ve post-transkripsiyonel işlemeyi düzenleyerek proliferasyonu, farklılaşmayı, göç ve apoptoz gibi hücrel fizyolojik süreçlerin çeşitli aşamalarında yer aldığını göstermiştir. lncRNA'lar insanlarda yaygındır ve gen ekspresyonunun, fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesi için gereklidir. Mevcut kanıtlara göre lncRNA'ların hücrenin fizyolojik regülasyonlarında gösterdiği beş ana fonksiyonu vardır;

1. lncRNA'ların bir kısmı peptitleri kodlar
2. lncRNA'lar transkripsiyonel düzenlemeyi katılırlar
3. lncRNA'lar transkripsiyon sonrası düzenlemeye katılırlar
4. lncRNA'lar epigenetik düzenlemeye katılırlar
5. lncRNA'lar bir sinyal dönüştürücü olarak işlev gösterir

Bunlara paralel olarak lncRNA'lar kanserde anormal bir şekilde eksprese edilir, doğrudan veya dolaylı etkileşimler yoluyla kanser gelişimine, progresyonuna, nüksüne ve terapötik direncine katkıda bulunur. lncRNA'lar meme, karaciğer, kolon, akciğer ve lösemi gibi çeşitli kanserlerin oluşumu, gelişimi ve prognozu ile yakından ilişkilidir. (40), (Venkatesh vd, 2021)

miRNA'lar 17-25 nükleotit uzunluğunda kısa kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar mRNA'daki 3' UTR dizilerine bağlanarak RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)

yoluyla onları parçalayarak gen ekspresyonlarını düzenlerler. Ayrıca mRNA hedeflerine miRNA bağlanması translasyonu inhibe edebilir. lncRNA'lar gibi miRNA ekspresyonları da meme kanseri dahil birçok kanser türünde düzensizdirler. miRNA'lar ana gen düzenleyicileri olarak kabul edilir ve tümör baskılayıcı miRNA yada oncomiR'ler olarak işlev görürler. miRNA'ların ekspresyon paternleri meme kanserinin alt tipleri ile ilişkilidir. (Venkatesh vd, 2021)

lncRNA nükleer parabenek montaj transkript 1 (NEAT1) upregülasyonu birçok malignitenin ilerlemesinde etkili olduğu yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. NEAT1'in mesane ürotelyal karsinomu, servikal skuamöz karsinom, kolanjiyokarsinom, kolon kanseri, özofagus karsinomu, baş ve boyun skuamöz karsinomu, böbrek karsinom, hepatosellüler karsinom, pankreas kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, ve tiroit kanseri dahil birçok tümör dokularında aşırı ekspre edildiğini birçok çalışma göstermiştir. Sadece lösemi gibi birkaç rapor NEAT1'in tümör baskılayıcı rolünü savunmuştur. (Shin vd, 2019)

Kanser hücrelerinde, genetik değişiklikler, transkripsiyon faktörleri, DNA metilasyonu, miRNA'lar ve RNA bağlayıcı protein NEAT1 ekspresyonunu kontrol eder. NEAT1 bir iskele RNA molekülü olarak parabenekler yoluyla ve rakip endojen RNA, to decoy, miRNA süngerleme veya kanser ilerlemesi kolaylaştırmak için histonlara ya da diğer proteinler komplekslere bağlanarak kromatin düzenleyicileri olarak işlev görür. (Shin vd, 2019)

MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3, MDA-MB-453 gibi çeşitli meme kanseri hücre hatlarında normal meme epitel hücrelerine kıyasla yüksek miktarlarda NEAT1 ekspresyonu gerçekleşir. Ayrıca meme kanseri hastalarından alınan kanın normal kontrollerle karşılaştırıldığında NEAT1 meme kanseri hastası kanında 90 düzensiz lncRNA arasında yüksek oranda ekspre edilen lncRNA olduğu görülmüştür. NEAT1 meme kanseri hücre hatlarının çoğalması ve hayatta kalması için gerekli olduğu belirtilmiştir. NEAT1 meme kanserinde tümörlerin epitel-mezenkimal geçişini (EMT) ve meme kanseri metastazını teşvik eder. EMT meme kanseri hücrelerinin invazyonunu, metastazını ve kemodirencini katkıda bulunan önemli bir mekanizmadır. NEAT1'in yıkılması MDA-MB-468 ve MCF-7 hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunu arttırdığı N-kadherin ekspresyonlarını azalttığı bulunmuş ve NEAT1'in EMT süreçlerine dahil

olduğunu düşündürmüştür. İnsan normal ve kanserli hücrelerinde mutasyon veya epigenetik susturma yoluyla BRCA1 gen inaktivasyonu NEAT1 ekspresyonunu teşvik eder. Meme kanserinde NEAT1'in onkogen olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür. Farklı hücrel olayların anahtar molekülleriyle etkileşime girerek meme kanserini teşvik eder. NEAT1 ekspresyonun kötü prognoz daha az sağkalım süresi ve meme kanserinde kemodirenci ile belirgin korelasyonu NEAT1 için meme kanseri biyobelirteç veya terapötik hedef olarak kullanım imkânı sunar. (Shin vd, 2019)

miR-410-3p, kanser, inflamasyon ve otoimmün hastalıklarda dahi çeşitli hastalıklarda anormal ekspresyon gösterir ve proliferasyon, apoptoz, kök hücrelerin farklılaşması, ilaç direnci gibi birçok biyolojik süreçlerde rol alır. Yapılmış çalışmalar miR410-3p'nin akciğer ve kolorektal kanserde yüksek oranda ekspresyon yapıldığı ve kanser hücrelerinin çoğalmasını, istilasını ve göçünü teşvik ettiğini göstermiştir. Buna karşılık miR-410-3p'nin meme kanseri ve pankreas kanserinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu baskıladığı bildirilmiştir. Bu veriler bize miR-410-3p'nin düzenlenmesinin farklı hastalık türlerinde dokuya özgü bir şekilde meydana geldiğini göstermektedir. (Wang vd, 2019)

miR-410-3p'nin anormal ekspresyonu farklı kanser türlerinde yaygın olarak görülmesi, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde ciddi rol alabileceğini düşündürmüştür. Araştırmalar miR410-3p'nin mide kanseri ve glioma hücrelerinin invazyonunu ve göçünü baskıladığını bildirmiş. Meme kanserinde miR-410-3p'nin etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan araştırmada mir-410-3p'nin meme kanseri dokularında komşu normal hücrelere kıyasla upregüle edildiğinde meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu ve invazyonu baskıladığı gözlemlendi. Bunun sonucunda meme kanseri progresyonunda miR-410-3p'nin tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği düşünülmüştür. Ayrıca Snail'in 3' UTR dizisine bağlandığı gösterilmiştir. miRNA-410-3p, Snail mRNA ve protein ekspresyonunu downregüle eder. Snail ayrıca meme kanseri progresyonunda miR-410-3p aracılık edebileceği gözlemlenmiştir. Snail çeşitli malignitelerde aşırı ekspre edilir, birçok maling tipinde EMT'yi destekler, invavizliği ve metastazı aracılık eder. (Zhang vd, 2016)

Liu ve arkadaşları meme kanseri dokularında ve hücrelerinde NEAT1 ve CCDN1 upregüle edilirken miR-410-3p'nin downregüle edildiğini gösterdi. Meme kanseri hastalarında NEAT1'in yüksek ekspresyon düzeyi daha düşük sağkalım oranıyla

ilişkilendirildi. miR-410-3p'nin yıkılması, geri yüklenen susturulmuş NEAT1 aracılı meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu, göçü, invazyon ve EMT'sini inhibe olmasına aracılık etti. NEAT1 meme kanseri hücrelerinde miR-410-3p'yi süngerleyerek CCDN1 ekspresyonunu düzenledi. NEAT1'in yıkımı in vivo olarak tümör büyümesini bloke etti. (Liu vd, 2020)

Yaptığımız bu çalışmada; normal meme hücre hattı MCF-10A ve kanser meme hücre hattı MCF-7'de NEAT1'in ve miR-410-3p'nin ekspresyonlarının analiz ettik. NEAT1'in MCF-7 hücre hattında MCF-10A hücre hattına göre ekspresyonlarında 2.30 artış olduğunu gözlemledik. miR-410-3p'nin ekspresyonları ise MCF-7 hücre hatlarında MCF-10A hücre hattına göre -2.85 oranında azalma olduğu sonucuna vardık.

Daha sonra gerçekleştirdiğimiz transwell invazyon deneyinde MCF-7 hücre hattının invazyon gerçekleştirdiğini MCF-10A hücre hattının invazyon kapasitesinin olmadığını gözlemledik.

6. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı MCF-7'de normal meme hücre hattı MCF-10A'ya göre NEAT1 ekspresyonları literatüre uygun olarak yükseldiği bulundu. miR-410-3p'nin MCF-7 hücrelerinde sağlıklı meme hücre hattına göre ekspresyonlarının azaldığı belirlendi.

Daha sonra gerçekleştirilen invazyon deneyinde MCF-7 hücrelerinin invazyon gerçekleştirdiği MCF-10A hücrelerin ise invaziv özellik göstermediği bulundu. Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile NEAT1'in artan ekspresyonunun invaziv özellik ile ilişkili olduğu ve aynı zamanda hedefi olan miR-410-3p'nin ekspresyonunu azalttığı gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

- Abdelwahab Yousef A. J. Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in oncology*, 2017; 44(4): 267–272.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 2017; 50(1): 33.
- Amelio, I., Bernassola, F., & Candi, E. Emerging roles of long non-coding RNAs in breast cancer biology and management. *Seminars in cancer biology*, 2021; 72: 36–45.
- Barone, I., Giordano, C., Bonofiglio, D., Andò, S., & Catalano, S. The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. *Seminars in cancer biology*, 2020; 60: 274–284.
- Britt, K. L., Cuzick, J., & Phillips, K. A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature reviews. Cancer*, 2020; 20(8): 417–436.
- Buja, A., Pierbon, M., Lago, L., Grotto, G., & Baldo, V. Breast Cancer Primary Prevention and Diet: An Umbrella Review. *International journal of environmental research and public health*, 2020; 17(13): 4731
- Dossus, L., & Benusiglio, P. R. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast cancer research* 2015; 17: 37.
- Dvorská, D., Braný, D., Ňachajová, M., Halašová, E., & Danková, Z. (2021). Breast Cancer and the Other Non-Coding RNAs. *International journal of molecular sciences*, 2021; 22(6): 3280
- Goldman, E., Zinger, A., da Silva, D., Yaari, Z., Kajal, A., Vardi-Oknin, D., Goldfeder, M., Schroeder, J. E., Shainsky-Roitman, J., HersHKovitz, D., & Schroeder, A. Nanoparticles target early-stage breast cancer metastasis in vivo. *Nanotechnology*, 2017;28(43): 43LT01.
- Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2018; 27(6): 619–626.
- Jin, H., Du, W., Huang, W., Yan, J., Tang, Q., Chen, Y., & Zou, Z. lncRNA ve meme kanseri: Mekanizmaların tanımlanmasından klinik tedavinin zorluklarına ve fırsatlarına doğru ilerleme. *Moleküler terapi. Nükleik asitler*, 2021; 25: 613–637.
- Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Wright, L. B., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast cancer research: BCR*, 2017; 19(1): 118.
- Kozłowski, J., Kozłowska, A., & Kocki, J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2015; 69: 447–451.

- Li, S., Hao, J., Hong, Y., Mai, J., & Huang, W. Long Non-Coding RNA NEAT1 Promotes the Proliferation, Migration, and Metastasis of Human Breast-Cancer Cells by Inhibiting miR-146b-5p Expression. **Cancer management and research**, 2020; 12: 6091–6101.
- Li, X., Deng, S., Pang, X., Song, Y., Luo, S., Jin, L., & Pan, Y. LncRNA NEAT1 Silenced miR-133b Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. **International journal of molecular sciences**, 2019; 20(15): 3616.
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in cancer biology**, 2020; 60: 14–27.
- Liu, X., Yao, W., Xiong, H., Li, Q., & Li, Y. LncRNA NEAT1 accelerates breast cancer progression through regulating miR-410-3p/ CCND1 axis. **Cancer biomarkers : section A of Disease markers**, 2020; 29(2): 277–290.
- Liu, Y., Colditz, G. A., Rosner, B., Berkey, C. S., Collins, L. C., Schnitt, S. J., Connolly, J. L., Chen, W. Y., Willett, W. C., & Tamimi, R. M. Alcohol intake between menarche and first pregnancy: a prospective study of breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, 2013; 105(20): 1571–1578.
- Liu, Y., Dou, M., Song, X., Dong, Y., Liu, S., Liu, H., Tao, J., Li, W., Yin, X., & Xu, W. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. **Molecular cancer**, 2019;18(1): 123
- Liu, Y., Nguyen, N., & Colditz, G. A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. **Women's health (London, England)**, 2015; 11(1): 65–77.
- Lynch, J. A., Venne, V., & Berse, B. Genetic tests to identify risk for breast cancer. **Seminars in oncology nursing**, 2015; 31(2): 100–107.
- Manjunath, M., & Choudhary, B. Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies. **Oncology letters**, 2021; 22(1)
- Marrazzo, E., Frusone, F., Milana, F., Sagona, A., Gatzemeier, W., Barbieri, E., Bottini, A., Canavese, G., Rubino, A. O., Eboli, M. G., Rossetti, C. M., Testori, A., Errico, V., De Luca, A., & Tinterri, C. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. **Breast (Edinburgh, Scotland)**,2020; 49: 87–92
- Masood S. Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. **Women's health (London, England)**, 2016; 12(1): 103–119.
- Narod S. A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **Nature reviews. Clinical oncology**, 2011; 8(11): 669–676.
- Okonofua, D., Soh, C. L., & Tafazal, H. An unusual case of complete pathological response to Paget's disease of the breast. **Journal of surgical case reports**, 2022; 2022(4): rjac106.
- Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2017; 67(5): 378–397
- Rojas, K., & Stuckey, A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Clinical obstetrics and gynecology**, 2016; 59(4): 651–672
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. Breast cancer metastasis. **Cancer genomics & proteomics**, 2012; 9(5): 311–320.

Shin, V. Y., Chen, J., Cheuk, I. W., Siu, M. T., Ho, C. W., Wang, X., Jin, H., & Kwong, A. Long non-coding RNA NEAT1 confers oncogenic role in triple-negative breast cancer through modulating chemoresistance and cancer stemness. **Cell death & disease**, 2019; 10(4): 270.

Subramani, R., & Lakshmanaswamy, R. Pregnancy and Breast Cancer. **Progress in molecular biology and translational science**, 2017; 151: 81–111

Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International journal of biological sciences**, 2017; 13(11): 1387–1397

Thankachan, S., Bhardwaj, B. K., Venkatesh, T., & Suresh, P. S. Long Non-coding RNA NEAT1 as an Emerging Biomarker in Breast and Gynecologic Cancers: a Systematic Overview. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 2021;28(9): 2436–2447

Thomas, C., Karagounis, I. V., Srivastava, R. K., Vrettos, N., Nikolos, F., Francois, N., Huang, M., Gong, S., Long, Q., Kumar, S., Koumenis, C., Krishnamurthy, S., Ueno, N. T., Chakrabarti, R., & Maity, A. Estrogen Receptor β -Mediated Inhibition of Actin-Based Cell Migration Suppresses Metastasis of Inflammatory Breast Cancer. **Cancer research**, 2021;81(9): 2399–2414

van der Werf, J., Chin, C. V., & Fleming, N. I. SnoRNA in Cancer Progression, Metastasis and Immunotherapy Response. **Biology**, 2021; 10(8): 809.

Venkatesh, J., Wasson, M. D., Brown, J. M., Fernando, W., & Marcato, P. LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack. **Cancer letters** 2021 509: 81–88.

Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., & Viale, G. Breast cancer. **Lancet (London, England)**2005; 365(9472): 1727–1741.

Volovat, S. R., Volovat, C., Hordila, I., Hordila, D. A., Mirestean, C. C., Miron, O. T., Lungulescu, C., Scripcariu, D. V., Stolniceanu, C. R., Konsoulova-Kirova, A. A., Grigorescu, C., Stefanescu, C., Volovat, C. C., & Augustin, I. MiRNA and LncRNA as Potential Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. **Frontiers in oncology** 2020; 10: 526850.

Wang, Y., Xu, N., Zhao, S., Jiao, T., Fu, W., Yang, L., & Zhang, N. (2019). miR-410-3p Suppresses Cytokine Release from Fibroblast-Like Synoviocytes by Regulating NF- κ B Signaling in Rheumatoid Arthritis. **Inflammation** 2019; 42(1): 331–341.

Web_1 CANCER TODAY internet sitesi. <https://gco.iarc.fr/today/home>

(son güncelleme tarihi: 2020, alındığı tarih 12.06.22)

Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. **Progress in molecular biology and translational science** 2017; 151: 1–32.

Xiong, Y., Liu, Z., Li, Z., Wang, S., Shen, N., Xin, Y., & Huang, T. Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 interacts with microRNA-107 to modulate breast cancer growth and metastasis by targeting carnitine palmitoyltransferase-1. **International journal of oncology** 2019; 55(5): 1125–1136

Zhang, Y. F., Yu, Y., Song, W. Z., Zhang, R. M., Jin, S., Bai, J. W., Kang, H. B., Wang, X., & Cao, X. C. miR-410-3p suppresses breast cancer progression by targeting Snail. **Oncology reports** 2016; 36(1): 480–486.

Zhang, Y., & Kleer, C. G. Phyllodes Tumor of the Breast: Histopathologic Features, Differential Diagnosis, and Molecular/Genetic Updates. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2016;140(7): 665–671.

Zhang, Y., Zhang, X., Xu, Y., Fang, S., Ji, Y., Lu, L., Xu, W., Qian, H., & Liang, Z. F. . Circular RNA and Its Roles in the Occurrence, Development, Diagnosis of Cancer. *Frontiers in oncology* 2022