T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

MDAMB-231 MEME KANSER HÜCRE DİZİSİNDE TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4) VE MAGE AİLE ÜYESİ A3 (MAGE-A3) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI

HACER KOTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL-2020

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

MDAMB-231 MEME KANSER HÜCRE DİZİSİNDE TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4) VE MAGE AİLE ÜYESİ A3 (MAGE-A3) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI

HACER KOTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL-2020

KABUL ONAY

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı — Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER — Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Filiz Sağlam
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğretim Üyesi Filiz Sağlam	İstinye Üniversitesi
Prof. Dr. Matem Tuçdemir	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum ‘MDA-MB-231 meme kanser hücre dizisinde Tansmembran serin proteaz 4 ve Mage aile üyesi A3 genlerinin transkripsiyon aşamasında anlatımlarının araştırılması’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazıralandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Hacer KOTAN

ÖZET

MDA-MB-231 MEME KANSER HÜCRE DİZİSİNDE TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4) VE MAGE AİLE ÜYESİ A3 (MAGE-A3) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ANLATIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Hacer Kotan
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Danışman: Filiz SAĞLAM

2020

Bu çalışmada amacımız; kanserleşmeye etki ettiği bilinen MDA-MB-231 agresif meme hücre hattında *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerinin *ACTB* genine göre transkripsiyon düzeyinde anlatımlarının araştırılmasıdır. Çalışmada hücre kültürü teknikleri, yarı manuel kit ile total RNA izolasyonu, cDNA sentezi, eş zamanlı kantitatif PCR yöntemleri uygulanmıştır. *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerine özel olarak tasarlanmış olan primerler aracılığıyla eş zamanlı PCR yapılmıştır. Referans olarak *ACTB* geni kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarında eş zamanlı PCR sonuçlarının Delta Ct hesaplaması yapıldı. *TMPRSS4* geninde 1,21 kat azalma, *MAGE-A3* geninde 12,46 kat artış gözlendi. *TMPRSS4* ve *MAGE-A3*'ün kanser gelişiminde, tümör oluşumu, çoğalması ve metastazında rol aldığı düşünülmektedir. *TMPRSS4* ve *MAGEA3*' ün meme kanseri üzerindeki etkisini daha iyi anlayabilmek için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, eş zamanlı kantitatif PCR, MDA-MB-231, gen ifadelenmesi, *TMPRSS4, MAGE-A3*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 4 (TMPRSS4) AND MAGE FAMILY A3 (MAGE-A3) GENES IN TRANSCRYPTION STAGE IN MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL SERIES

Hacer Kotan
Program: DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS
Advisor: Filiz SAGLAM

2020

Our aim in this study was to investigate the transcription level expression of the *TMPRSS4* and *MAGE-A3* genes in the MDA-MB-231 aggressive breast cell line, which is known to have an effect on cancer, according to the *ACTB* gene. Cell culture techniques, total RNA isolation with semi-manual kit, cDNA synthesis, simultaneous quantitative PCR methods were applied. Concurrent PCR were made through primers specifically designed for the *TMPRSS4* and *MAGE-A3* genes. The *ACTB* gene has been used as a reference. Delta Ct calculation of simultaneous PCR results was performed in the results of the study 1,21-fold decrease was observed in the tmprss4 gene and 12,46-fold increase in the *MAGE-A3* gene. *TMPRSS4* and *MAGE-A3* are thought to be involved in cancer development, tumor formation, proliferation and metastasis. Further research is needed to better understand the impact of *TMPRSS 4* and *MAGEA3* on breast cancer

Keywords: Breast Cancer, Real-time PCR, expression, MDA-MB-231, *TMPRSS4, MAGE-A3*

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, deney aşamaları ve yazım sürecinde bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM' a ve Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımlarıyla bize destek olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER' e teşekkür ederim.

Bölüm arkadaşlarımız Hüma Tuğçe SEZGİN'e, Duygu KAYA'ya, Ceren AYNACI'ya, Eqzona QIPA'ya, Elif ÇINAR'a, Büşra KÖSE'ye teşekkür ederim.

Tez yazarken yardım ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında görev yapan asistan Hüseyin Ayhan'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan sabrı, sevgisi, anlayışıyla desteğini esirgemeyen eşim Kadri Gökhan KOTAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **viii**
GİRİŞ **1**
1.GENEL BİLGİLER **2**
1.1.MEME KANSERİ 2
1.1.1.Risk Faktörleri 2
1.1.2.Patogenez 3
1.1.3.Meme Kanseri İle İlişkili Genler 5
1.1.3.1.BRCA1/2 6
1.1.3.2.HER2 6
1.1.3.3.Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) 7
1.1.3.4.c-Myc 7
1.1.3.5.Diğer ilgili genler 7
1.1.4.Meme kanserinde etkili olan başlıca sinyal yolakları 8
1.1.4.1.ER sinyali ve ER-Pozitif meme kanseri 8
1.1.4.2.HER2 sinyal ve HER2-Pozitif meme kanseri 9
1.1.4.3.Meme kanserinde kanonik Wnt / β-katenin sinyalleri 10
1.1.5.Hücre dizisi MDA-MB-231 10
1.1.6.*TMPRSS4* 12
1.1.7.*MAGE-A3* 14
2.MATERYAL VE METOD **15**

2.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ **15**
2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU 17
2.3.CDNA SENTEZİ 18
2.4. KANTİTATİF PCR 19
3.BULGULAR 21
3.1.GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARI 21
4.TARTIŞMA VE SONUÇ 23
KAYNAKLAR 27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanserinin başlangıç ve ilerlemesini açıklayan iki teori 5
Şekil 2: ER sinyal yolu. 8
Şekil 3: HER2 sinyal yolu. 9
Şekil 4: Kanonik Wnt / β-catenin sinyal yolu. 10
Şekil 5: TMPRSS4 yapısının şematik diyagramı 13
Şekil 6: MDA-MB-231 hücre dizisi 15
Şekil 7: TMPRSS4 Ct ve Tm sonucu 21
Şekil 8: MAGEA3 Ct ve Tm sonucu 21

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon sonuçları 18
Tablo 2: cDNA reaksiyonuna eklenenler 19
Tablo 3: cDNA sentezindeki aşamalar 19
Tablo 4: Primer dizimleri 20
Tablo 5: qPCR reaksiyonu için eklenler 20
Tablo 6: qPCR döngüsü 21
Tablo 7: Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları 22

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Akt	:Akt Serine
BRCA1	:Meme Kanseri Gen 1
BRCA 2	:Meme Kanseri Gen 2
cDNA	:Complementary DNA
c-erbB-2	:HER2/neu
DMC1	: DNA Meiotic Recombinase 1
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Dntp	: deoksi-Nucleoside triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Endoplazmik Retikulum
E2F	: Transkripsiyon Faktör 2
FBS	: Fetal Bovine Serum
HER1	: İnsan epidermal faktör reseptör-1
HER2	: İnsan epidermal faktör reseptör-2
HER3	: İnsan epidermal faktör reseptör-3
HER4	: İnsan epidermal faktör reseptör-4
h-TERT	: H-Telomerase Reverse Transcriptase
JNK	: c-JUN N-Terminal Kinase
LRP	: LDL Receptor Related Protein
MAGE-A3	: Melanom-associacted antigen-3
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MTA1	: Metastasis Associated 1
mTORC1	: The mechanistic target of rapamycin Complex1
OD	: Optic Density
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PEG10	: Paternally Expressed 10
PI3K	: Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat 3-kinase
PTEN	: Phosphatase And Tensin Homolog
P107	: RB Transcriptional Corepressor Like 1
P130	: RB Transcriptional Corepressor Like 2
Ras	: Ras onkogeni
Raf	: Serine/Threonne Kinase
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
RTE	: Reverse Transciption Enzyme
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
SFRP	: Secreted Frizzled-releated protein
TMPRSS4	: Transmembrane Serine Protease 4
TrCP	: Transducion repeat containing kinase
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
ΔΔCt	: Delta Delta Cycle of Tresh

GİRİŞ

Kanserler, hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve bu hücrelerin çevresindeki normal dokuları istila ederek vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeline sahip olduğu bir grup hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu çalışmadaki amaç, etkili oldukları sinyal yolakları ve kanserdeki etkileri bilinen *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerinin meme kanserindeki anlatımlarını transkripsiyon düzeyinde araştırmaktır.

1.GENEL BİLGİLER

1.1.MEME KANSERİ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanserlerden biridir ve 2015 yılında yaklaşık 570.000 kişinin ölümüne sebep olmuştur. Dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmaktadır (Stewart ve ark.; WHO: Geneva, Switzerland. Breast cancer, 2008). 2017 yılında ABD' de kadınlar arasında tüm yeni kanser vakalarının %30'unu meme kanserinin oluşturduğu bildirilmiştir (Siegel ve ark., 2017). Bazı meme kanseri türleri metastatik özellik göstermektedir ve çoğunlukla, tedavi edilmezse kemik, karaciğer, akciğer ve beyne metastaz yapar. Hastalığın erken teşhisi sağ kalım oranını arttırır. Kuzey Amerika'da, meme kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalma oranları, bu hastalığın erken tespiti sayesinde %80'in üzerindedir (DeSantis ve ark., 2016). Mamografi, meme kanserinin tespitinde yaygın olarak kullanılan bir tarama yöntemidir ve meme kanserine bağlı ölümlerin azaltılmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır. Son on yılda, mamografiden daha hassas olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) gibi diğer tarama yöntemleri de uygulanmaktadır (Drukteinis ve ark., 2013). Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi çok sayıda risk faktörü vardır ve bunlar meme kanserine yakalanma olasılığını artırabilir (Majeed ve ark., 2014).

1.1.1.Risk Faktörleri

Yaşlanma cinsiyetin yanı sıra meme kanserinin önemli risk faktörlerinden biridir, çünkü meme kanseri insidansı artan yaşla yakından ilgilidir. 2016 yılında, ABD'de meme kanseri ile ilişkili tüm ölümlerin yaklaşık %99.3'ü 40 yaş üstü kadınlarda ve % 71.2'si 60 yaş üstü kadınlarda bildirilmiştir (Siegel ve ark., 2017).

Aile Öyküsü; Meme kanserli hastaların ¼ ünde aile hikayesi vardır. Annesi, kız kardeşi veya ailesinde meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa yatkındır (Brewer ve ark., 2017). Meme kanserinde kalıtsallık kısmen BRCA1 ve BRCA2 gibi meme kanseri ile ilişkili genlerin mutasyonlarına bağlanmaktadır.

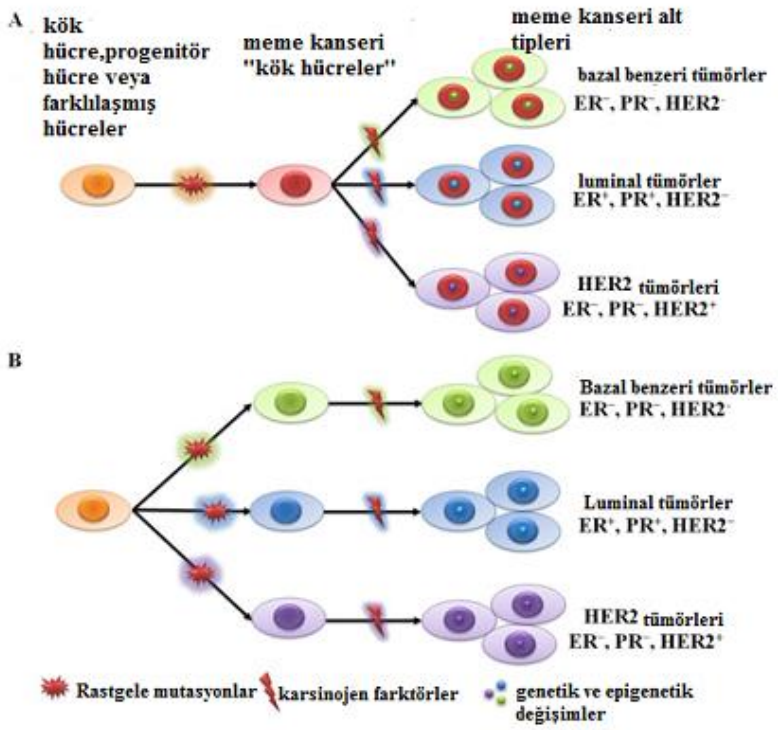
Yaşam şekli, aşırı alkol tüketimi, yağlı besin tüketimi, çok fazla diyet yapılması gibi sağlıksız yaşam şekli meme kanseri riskini arttırabilir. Alkol tüketimi, kandaki östrojenle ilişkili hormonların seviyesini yükseltebilir ve östrojen reseptörü yolaklarını tetikleyebilir (Hamajima ve ark.,2002; Jung ve ark., 2016). Hem sigara hem de alkol içen kadınlarda meme kanseri riski de artmaktadır (Knight ve ark., 2017). Şimdiye kadar, araştırmaların çoğu özellikle erken yaşta sigara kullanımının meme kanserine yakalanma riskini arttırdığını göstermektedir (Catsburg ve ark., 2015; Kispert ve ark., 2017).

1.1.2.Patogenez

Meme tümörleri genellikle duktal hiperproliferasyondan başlar ve daha sonra çeşitli kanserojen faktörler tarafından sürekli uyarıldıktan sonra iyi huylu tümörlere ve hatta metastatik karsinomlara dönüşebilir. Stromal etkiler veya tümör mikro çevresi meme kanseri başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynar (Maffini ve ark., 2004; Sonnenschein ve ark., 2016). Örneğin mikroçevrede bulunan makrofajlar, anjiyogenezin teşvik edilmesinde ve kanser hücrelerinin immün yanıttan kaçmalarını sağlayan mutajenik bir enflamatuar ortam üretebilir (Qian ve ark., 2010; Dumars ve ark., 2016). Epigenetik faktörler meme kanserinin gelişiminde rol alabilirler. Örneğin normal ve tümörle ilişkili mikro ortamlar arasında farklı DNA metilasyon şekilleri gözlenmiştir, Tümör mikro ortamındaki epigenetik modifikasyonların kanserin oluşum sürecinde rol alabileceği belirtilmektedir (Polyak ve ark., 2007; Basse ve ark., 2015).

Heterojen yapılar olan tümörler içerisinde, son zamanlarda kanser kök hücreleri adı verilen yeni bir malign hücre alt sınıfı belirlenmiştir. Bu kanser kök hücreler tümörün başlangıcı, immün sistemden kaçış ve hastalığın tekrarı ile ilişkilidir. Kanser kök hücreleri kendini yenileme yeteneklerine sahiptir ve kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilere karşı dirençlidir (Maffini ve ark., 2004; Qian ve ark., 2010). Meme kanseri kök hücreleri ilk olarak Ai Hajj tarafından tanımlanmıştır (Ai-Hajj ve ark., 2003). Wnt, Notch, Hedgehog, p53, PI3K ve HIF gibi sinyal yolakları, meme kanseri kök hücrelerinin kendini yenilemesi, çoğalması ve invazyonu ile ilgilidir (Valenti ve ark., 2017; Kasper ve ark., 2009). Bununla birlikte, meme kanseri kök hücrelerini anlaşılması veya yok edilmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi ve daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi için öne sürülen iki teori vardır. Bunlar kanser kök hücresi teorisi ve stokastik teoridir (Polyak ve ark., 2007; Deng ve ark., 2006). Kanser kök hücre teorisi, tüm tümör alt tiplerinin, aynı kök hücrelerden veya transit hücrelerden (progenitör hücreler) köken aldığını varsaymaktadır. Kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde bulunan genetik ve epigenetik değişiklikler, farklı tümör fenotiplerine yol açarlar (Şekil (Şekil 2A) .2A). Stokastik teori, her bir tümör alt tipinin, tek bir hücre tipinden (kök hücre, progenitör hücre veya farklılaşmış hücreden) köken aldığını öne sürer (Şekil (Şekil 2B). Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme hücresinde kademeli olarak birikebilir ve hücrenin tümör hücresine dönüşümünü sağlayabilir. Her iki teori de çok sayıda veri ile desteklenmesine rağmen, insan meme kanserinin kökeni henüz tam olarak açıklayamamaktadır.



Şekil 1. Meme kanserinin başlangıç ve ilerlemesini açıklayan iki teori

1.1.3.Meme Kanseri İle İlişkili Genler

Meme kanseri ile ilgili olarak birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenlerde hem de tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar tümörün oluşumu ve ilerlemesinde önemli rol oynar.

1.1.3.1.BRCA1/2

Meme kanseri ile ilişkili gen 1 ve 2 (*BRCA1* ve *BRCA2*), meme kanserini etkileyen iki önemli tümör baskılayıcı gendir. *BRCA1* ve *BRCA2* sırasıyla 17.kromozomun 17q21 bölgesinde ve 13.kromozomun 13q12 bölgesinde bulunur. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. *BRCA1* eksikliği, hücre döngüsü kontrolünde anormallikler, anormal sentrozom duplikasyonu, genetik instabilite ve apoptoz düzensizliğine yol açar. (Deng ve ark., 2006; Dine ve ark., 2013) *BRCA1* ifadesi, p130, p107 ve retinoblastoma gibi proteinler tarafından E2F'ye bağımlı bir şekilde susturulur (Tan-Wong ve ark., 2008; Hegan ve ark., 2010). BRCA2 proteini, RAD51 ve DMC1 ile etkileşime girerek DNA çift iplik kırıklarının rekombinasyonel onarımında görev alır (Sanchez ve ark., 2017; Martinez ve ark., 2016). *BRCA1* veya *BRCA2* genlerindeki zararlı mutasyonlar meme kanseri riskini arttırır. *BRCA1/2* mutasyonları, otozomal dominant şekilde kalıtılır. Toplamda kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %20-25'i ve tüm meme kanserlerinin %5-10'u *BRCA 1/2* mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Balmana ve ark., 2011; Paluch-Shimon ve ark., 2016). Chen tarafından yapılan bir meta-analiz çalışmasında, *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyonları taşıyan 70 yaşından büyük kadınlarda meme kanseri risk oranının sırasıyla %57 ve %49 olduğunu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2007).

1.1.3.2.HER2

Aynı zamanda *c-erbB-2* olarak da bilinen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2, meme kanserinde önemli bir onkogendir ve insan kromozomu 17. kromozomun17q12 uzun kolunda bulunur (Shih ve ark., 1981). *HER2* geninin aşırı ifadelenmesi, temel olarak genin amplifikasyonu ve yeniden düzenlemeleri yoluyla olur (Harbeck ve ark., 2017).

1.1.3.3.Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

İnsanlarda *c-erbB-1* veya *Her1* olarak da bilinen *EGFR*, kromozom 7'nin kısa kolunda (7p12) bulunur. EGFR proteini, tirozin kinaz ailesinin bir hücre yüzey glikoproteinidir . PI3K, Ras-Raf-MAPK ve JNK dahil olmak üzere *EGFR*'nin aşağı akış sinyal yolu, hücre çoğalması, hücre invazyonu, anjiyogenezi ve hücreleri apoptoza karşı korumak için tetiklenir (Appert-Collin ve ark., 2015; Ali ve ark., 2017). *EGFR*'nin aşırı ifadesi, çok agresif bir meme kanseri tipi olan enflamatuar meme kanseri vakalarının %30'undan fazlasında bulunur (Alanazi ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2009). Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ifadesi ve HER2 amplifikasyonu olmamasıyla bilinen üçlü negatif negatif meme kanseri vakalarının yarısından fazlasında *EGFR* aşırı ifadesi görülmüştür (Kim ve ark., 2017).

1.1.3.4.c-Myc

Bu gen, kromozom 8'in (8q24) uzun kolunda bulunur ve bir transkripsiyon faktörü olan Myc proteinini kodlar (Green ve ark., 2016; Poole ve ark., 2017). MTA1, hTERT ve PEG10 gibi Myc tarafından düzenlenen genlerin bazıları, meme kanserinin başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynar. C-Myc'nin aşırı ekspresyonu ilerleyen meme kanserlerinin invazyonunda gözlenirken, iyi huylu dokularda c-Myc amplifikasyonu tespit edilmemiştir (Chen ve ark., 2008; Jung ve ark., 2017).

1.1.3.5.Diğer ilgili genler

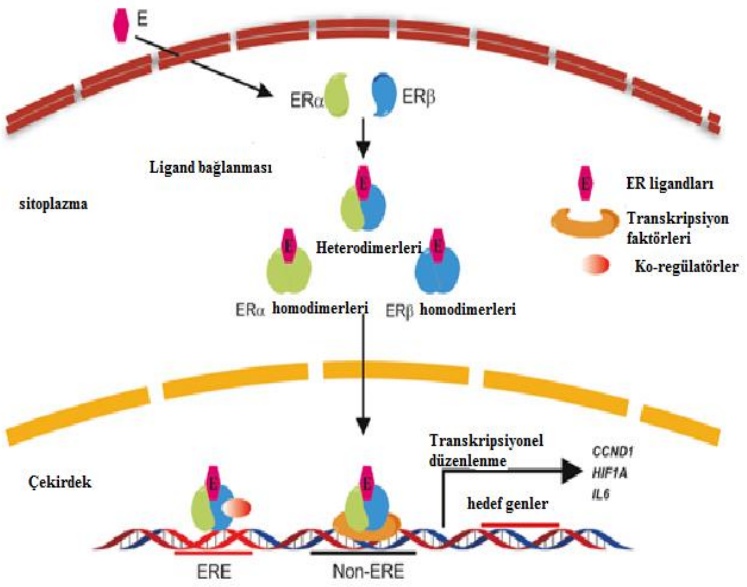
Ras gen ailesinde üç üye vardır: *Hras*, *Kras* ve *Nras*. Bu genlerin kodladığı proteinler, guanosin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein (G proteini) süper ailesine aittir (Pylayeva-Gupta ve ark., 2011). Ras proteinlerinin mutasyonları meme kanserinde nadir görülmekle birlikte (<%5), Ras sinyal iletim yolağındaki anormallikler hem iyi huylu hem de habis meme dokularında gözlenmektedir (Siewertsz van Reesema ve ark., 2016).

1.1.4.Meme kanserinde etkili olan başlıca sinyal yolakları

İnsan gelişimi, hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle iletişim kurmasını sağlayan karmaşık sinyal yolları ile kontrol edilir. Bu sinyal yolaklarının çoğu, kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinde düzensizdir. Temel olarak, kanser, hücrelerin normal olarak çoğalma, hayatta kalma ve göç etmeyi kontrol eden mekanizmalardan kaçmalarını sağlayan genetik ve epigenetik değişikliklerle olur (74. Sever ve ark., 2015).

1.1.4.1.ER sinyali ve ER-Pozitif meme kanseri

Östrojen reseptörleri (ER'ler), zar östrojen reseptörlerinden (çoğunlukla G protein-bağlantılı reseptörler) ve nüklear östrojen reseptörlerinden (ERα, ERβ) oluşur. Meme kanseri hücrelerinin nispeten yüksek ERα ifadesi ve düşük ERβ ifadesi vardır. Bu iki tür nüklear hormon reseptörü, ligand bağlanması üzerine homo veya heterodimerler oluşturur ve ER'lerin ana işlevi olan transkripsiyonel düzenleme için hücre çekirdeğine translokasyon yapar. ER dimerleri, hedef genlerin ERE bölgesine bağlanır ve transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesini sağlamak için yardımcı düzenleyiciler katılır. ER'lerin hedef genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bir başka mekanizma, diğer transkripsiyon faktörleri için bir yardımcı-düzenleyici görevi görmektedir. (Kumar ve ark., 1987; Osborne ve ark., 2001; Renoir ve ark., 2013; Cheskis ve ark., 2007).

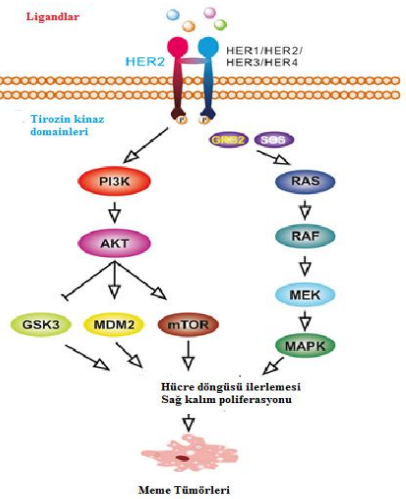


Şekil 2. ER sinyal yolu.

BRCA1, kısmen ERα sinyalleşmesini inhibe ederek bir tümör baskılayıcı görevi görür (Fan ve ark., 2001). ERα, meme kanserlerinin patogenezinde önemli bir rol oynar, çünkü meme kanserlerinin yaklaşık %75'i bu spesifik hormonal reseptörün pozitif ekspresyonunuyla olur (Nadji ve ark., 2005).

1.1.4.2.HER2 sinyal ve HER2-Pozitif meme kanseri

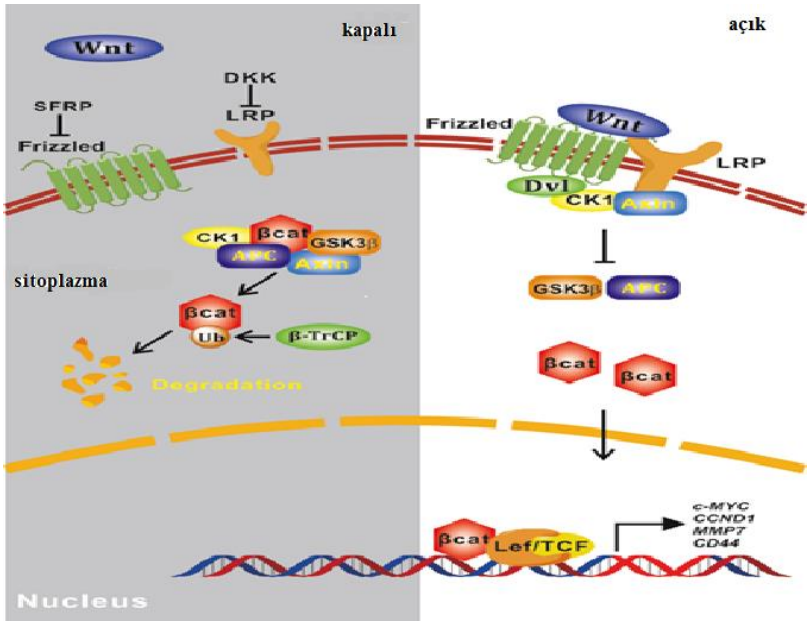
İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (*HER2 / NEU, c-ERBB2*) *EGFR* ailesinin bir üyesidir (Wee ve ark., 2017). *HER2*, hücre dışı bir ligand bağlayıcı alan ve transmembran reseptör içeren tirozin kinazdır (Arteaga ve ark., 2014; Wieduwilt ve ark., 2008). Yapısal olarak aktif formu, *HER2*'yi diğer moleküller ile dimerler oluşturmak için bileşen haline getirir ve *HER2*'ye çeşitli hücresel fonksiyonları etkileme kabiliyeti verir. *HER2*'nin hücre içi alanındaki artıklar, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3-kinaz (PI3K) yolakları gibi çoklu akış aşağı sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açmıştır (Burgess ve ark., 2008; Mayer ve ark., 2016; Ono ve ark., 2006). Bu sayede oluşan sinyalleşmeler meme tümörü oluşumuyla oldukça ilişkilidir. *HER2* ve ayrıca *EGFR* ailesinin diğer üyeleri, hücre zarı üzerinde bulunan ve çeşitli ligandlara cevap veren reseptör tirozin kinazlardır. Sitoplazmada tirozin kinaz bölgesinin fosforilasyonu, PI3K / AKT yolu ve Ras / MAPK yolu gibi aşağı akış yönünde onkojenik sinyal yollarını başlatır. (Şekil 4) (Nadji ve ark., 2005; Wee ve ark., 2017; Burgess ve ark., 2008; Elizalde ve ark., 2016).



Şekil 3. HER2 sinyal yolu.

1.1.4.3.Meme kanserinde kanonik Wnt / β-katenin sinyalleri

Wnt proteinleri, embriyonik indüksiyon, hücre polaritesi oluşturma yetişkin doku homeostazının korunmasıda dahil olmak üzere çeşitli gelişimsel süreçlerde önemli rollere sahip, yüksek glikozile edilmiş, salgılanmış proteinlerin bir ailesidir (Logan ve ark., 2004; Luo ve ark., 2007; Yang ve ark., 2016; Mohammed ve ark., 2016; MacDonald ve ark., 2009; Clevers ve ark., 2012; Nusse ve ark., 2017; Krishnamurthy ve ark., 2018). Kanonik Wnt/β-catenin sinyal yolu. Kanonik Wnt sinyalleri, meme bezi gelişimi ve meme tümörleri gibi birçok biyolojik ve patolojik süreçte önemli roller oynar. Wnt ligandları, recep-TrCP ile cat-katenin ubiquitinasyonunu hafifleten, kıvrılmış zar reseptörleri ve LRP'lerle bağlanır. P-katenin birikimi, nükleus translokasyonuna ve aşağı akış transkripsiyonel aktivasyonuna izin verir. DKK'lar ve SFRP'ler gibi Wnt sinyalinin inhibitörleri, β-katenin bozulmasına katkıda bulunan tümör baskılayıcıları olarak işlev görür, böylece β-katenin hedefleyen onkojenlerin transkripsiyonunu engeller.



Şekil 4. Kanonik Wnt / β-catenin sinyal yolu.

1.1.5.Hücre dizisi MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre dizisi, metastatik bir meme adenokarsinoması olan 51 yaşında beyaz bir kadın hastanın, plevral efüzyonundan elde edilen ve en sık kullanılan, epitel, insan meme kanseri hücre dizisidir (Valastyan ve ark., 2011).

MDA-MB-231, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve *HER2* (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) amplifikasyonundan yoksun olduğundan, oldukça agresif, istilacı ve zayıf farklılaştırılmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre dizisidir (Cailleau ve ark., 1978). Diğer metastatik kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerindede, hücre dışı matriks proteolitik enzimlerce bozulmuş durumdadır.

ER ve PR ekspresyonu ve *HER2* amplifikasyonunun eksikliği nedeniyle, MDA-MB-231 hücre dizisi başlangıçta bir "bazal" meme kanseri hücre dizisi olarak sınıflandırmakla birlikte, MDA-MB-231 hücre dizisinde, claudin-3 ve claudinin-4 proteinleri ile Ki-67 çoğalma biyobelirteçi daha az ifade edildiğinden ve epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkili biyobelirteçler daha yüksek ifade edildiğinden, bu hücre dizisi claudin-düşük moleküler alt tipine ait kabul edilmektedir.

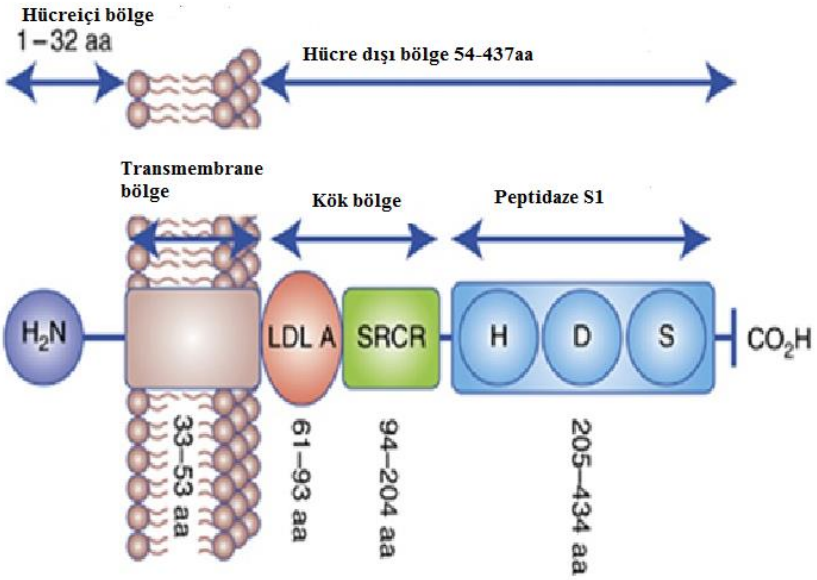
Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçeneğine sahip agresif bir meme kanseridir. Bu nedenle bu meme kanserinin moleküler temelini anlamak, etkili yeni ilaç gelişimi için oldukça önemlidir. Bu amaçla yüksek metastatik özelliğe sahip MDA-MB-231 hücre dizisi ile yapılan birçok çalışma bulunmaktadır.

MDA-MD-231 hücre dizisi, kemik metastazı araştırması için iyi bir araç olarak belirlenmiştir. Tercihen intraventriküler enjeksiyondan sonra farelerin kemiklerine, beynine ve akciğerlerine metastaz yapan MDA-MB-231 hücrelerinin alt klonları da izole edilmiştir, bu nedenle bu hücre hattı, metastazda rol alan genlerin ve yolakların tanımlanmasında sıkça kullanılmıştır (Liu ve ark., 2010).

1.1.6.*TMPRSS4*

Transmembran proteaz, önceden *TMPRSS3* olarak adlandırılan serin 4 (TMPRSS4) (Wallrapp ve diğerleri, 2000), kromozom 11'in uzun kolunda (11q23.3) lokalizedir ve bir serin proteaz kodlar. Bu gen 48,597 bç içerir ve 13 ekzon ile 12 introndan oluşur. 18 farklı transkripti oluşturulabilir, bunlardan 2'si nonsense aracılı değişir ve 8'i protein ürününe dönüşmez. Kalan sekizden üçünde 5 ′ veya 3 ′ 'de tamamlanmamış kodlama dizisi (CDS) bulunur ve kodon dizileri başlama veya durdurma özelliklerine sahip değildir. Buna göre, *TMPRSS4* geni tam CDS'ye sahip beş izoformu kodlar. Kanonik protein (*TMPRSS4-1*) 437 amino asitten (tahmin büyüklüğü 48 kDa ve 130 ve 178 amino asidinde iki glikozilasyon bölgesi ile) oluşur (NCBI, Gene ID: 56649).

TMPRSS4 proteininde proteolitik, kök, transmembran ve sitoplazmik bölgeler bulunur (Antalis ve ark., 2010). Proteolitik bölge ve aktivitesi, His, Asp ve Ser amino asitlerini içeren bir "katalitik üs" varlığına bağlıdır. Enzimatik aktivite, enzimin özgünlüğünü belirleyen bir substrat bağlayıcı cep tarafından da modüle edilir (Daly ve ark., 1995). Kök bölge, *TMPRSS4*'te bulunan bir LDL reseptör sınıf A alanında olduğu gibi farklı düzenleyici ve / veya bağlayıcı alanlar içerebilir. (Netzel-Arnett ve ark., 2003). Çöpçü reseptör alanı ayrıca kök bölgede bulunur. Bu alan lipoproteinlerin, lipitlerin ve polisakkaritlerin bağlanmasında rol oynar (Min ve ark., 2014). Kalan alanlar, transmembran bölgesinden ve kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşmaktadır. Bu sitoplazmik kuyruğun işlevi henüz tam olarak bilinmemekte olup, hücre sinyalizasyonunda ve hücre iskeletine bağlanmada iş gördüğü düşünülmektedir. *TMPRSS4*, tek geçişli bir tip II membran proteinidir. C terminalinde (peptidaz S1) bir serin proteaz bölgesi, ardından bir temizleyici reseptör sistein bakımından zengin bölge (SRDR) ve düşük yoğunluklu bir lipoprotein reseptörü A sınıfı bölge içerir. Serin proteaz alanındaki H, D ve S sırasıyla üç katalitik tortu histidin, aspartat ve serinin konumunu gösterir (Antalis ve ark., 2010).



Şekil 5. TMPRSS4 yapısının şematik diyagramı

Aktif *TMPRSS4* proteaz domeni, kültürdeki hücrelerden salınabilir ve şartlandırılmış ortamda bulunur (Passero ve ark., 2012). Bu ilginç bulgu, çözülebilir parçaların tümör taşıyan hastaların serumunda tespit edilebilebileceğini ve dolayısıyla *TMPRSS4*'ün invasif olmayan bir teşhis biyobelirteci olarak kullanılabileceği olasılığını ortaya koymaktadır.

TMPRSS4 proteini, matriptaz, furin veya stromelisin proteazları gibi kanserde klinik potansiyeli olan yeni bir adaydır. *TMPRSS4* temel olarak hem embriyo gelişiminde hem de kanser gelişiminde rol almaktadır. Zebra balığı embriyosunda organogenez için gerekli olduğu düşünülmektedir. Çünkü morfolinolarda, *TMPRSS*4'ün susturulduğu bir çalışmada, patolojik bir iskelet kası oluşumu, yavaşlayan kalp atışı ve dejenere olmuş bir vasküler sistem dahil olmak üzere doku gelişimi ve hücre farklılaşmasında ciddi kusurlara neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, *TMPRSS4*'ün organ gelişiminde rol alan adhezyon moleküllerinin aktivitesini değiştirebileceğini düşündürmektedir (Ohler ve ark., 2011).

1.1.7.*MAGE-A3*

MAGE-A3 geni, *MAGE-A* gen ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri, birbirlerine %50 ile %80 oranında özdeşlik gösteren proteinleri kodlar. *MAGE-A* genleri, Xq28 kromozomal konumunda kümelenir (NCBI, Gene ID: 4102).

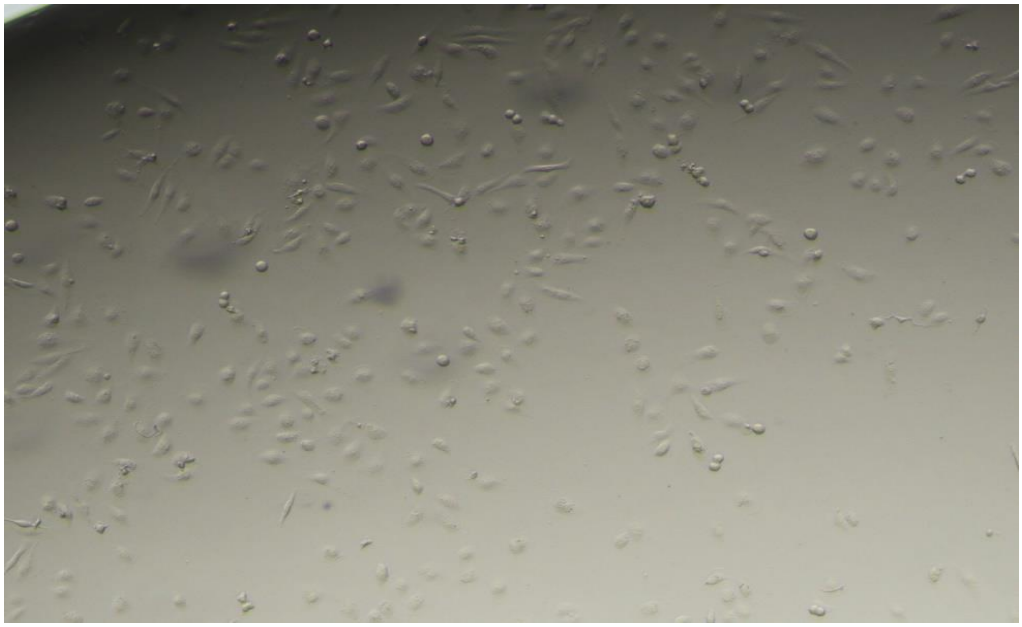
MAGE-A3 ile ilişkili hastalıklar arasında Melanom ve Oküler Melanom bulunur. İlgili yolları arasında NF-kappaB Sinyali vardır. Bu genin önemli bir paralojisi *MAGE-A6'* dır. Melanom antijen (*MAGE*) ailesi, çoğu kanserde yüksek oranda eksprese edilen ve tümör oluşumunda kritik rol oynayan kanser-testis antijenlerini kodlayan 60'tan fazla genden oluşur. Bununla birlikte, bu protein ailesinin biyokimyasal ve hücresel işlevlerinin çoğu belirsiz kalmıştır (The Human Protein Atlas, MageA3).

2.MATERYAL VE METOD

2.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ

Besiyeri, RPMI-1640 içerisinde %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 Penicilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması: Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80^{o}C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınarak falkon tüp, 21^{o}C 800 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25 cm^{2}'lik flasklara alınarak 37^{o}C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.



Şekil 6. MDA-MB-231 hücre dizisi

Besiyeri Değiştirme: Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS; 25 cm^{2}'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm^{2}'lik flask içerisine 4 ml ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm^{2}'lik flask içerisine 5ml, 75 cm^{2}'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklendi.

Hücre Soylarının Pasajlanması: Hücre soyları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37^oC'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş olundu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 21 ^oC 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37^oC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmış oldu.

Hücre Soylarının Stoklanması: Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37^oC'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 21 ^oC 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı ve sonra süpernatant kısım aspire edildi. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO +5 ml FBS +40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtıldı ve hemen -80^oC'ye kaldırıldı.

Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı: Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak iyice karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı.

Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

RNA İzolasyonu: Kültürlenmiş 1 x 10^6 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanıldı.

Kit içeriklerinden olan trizol TRK solüsyonuna çeker ocakta 1 mililitre/20 mikrolitre beta-merkaptoetanol ilave edilerek işleme başlandı. Trizol hcre bileşenlerine zarar vermeyerek proteinleri denatüre etmek için kullanıldı. Beta-merkaptoetanol disülfit bağları kırarak üç boyutlu yapıyı bozmaktadır. Ardından 1 mililitre besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 mikrolitre TRK solüsyonu eklendi ve 21G ölçülü 5 mililitrelik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapıldı.

500 mikrolitre %70'lik etil alkol ilave edilerek vortekslenen hücre lizatından 700 mikrolitresi, kit komponentlerinden olan spin kolonlu koleksiyon tüpüne aktarıldı. Örnek, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve koleksiyon tüpüne inen sıvı boşaltılıp santifüj tekrar yapıldı.

Kit içeriğinde olan RNA Yıkama Tamponu I'den 500 mikrolitre kolonlu tüpe eklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Tüpe inen sıvı boşaltılıp aynı santrifüj, bu kez %99'luk etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 mikrolitre eklendi ve tekrarlandı. Bu işlem bir kez daha yapıldı. Herhangi ekleme yapılmadan sadece santrifüj tekrarlanarak tüpe inen sıvı boşaltıldı.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten ayrılıp kitte mevcut olan yeni bir koleksiyon tüpüne oturtuldu ve bir ekleme yapılmadan 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mililitrelik santrifüj tüpüne alındı ve 60 mikrolitre kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenerek 10.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Elde etmek istediğimiz RNA' -80 °C kaldırıldı.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için, "SPECTROstar Nano absorbance plate reader" cihazı ve LVis Plate fonksiyonu kullanıldı. LVis Plate'teki örnek ölçüm noktacıklarına 2 mikrolitre RNA koyuldu ve OD ve konsantrasyon ölçümü 1. Tablodaki gibi yapıldı.

Tablo 1. İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon sonuçları

Blank: Su			
	Örnek	OD Ölçümü	Konsantrasyon (ng/mL)
1	MDA-MB-231	1,88	61,59

2.3.cDNA SENTEZİ

cDNA Sentezi: cDNA sentez için çalışmamızda Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription Kit ürünü kullanıldı. 10 mikrolitre RNA örnekleri, 65 **°C** 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 5 dakika yaklaşık olarak 4 **°C** buzda bekletildi.

5 mikrolitre 5X konsantrasyonlu reaksiyon tamponu, 2 mikrolitre deoksinükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi, 5,25 mikrolitre randomize primerler, 0,5 Molar RNaz inhibitörü, RNA'nın ikincil yapısını oluşturan bağları kırmak için 1,25 Molar dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 Molar ters transkriptaz (reverse transcriptase, RTE) enzimi ve 10 mikrolitre RNA örnekleri ilave edilerek reaksiyon tüpü 25 °C 10 dakika, 50 °C 60 dakika ve 85 °C 5 dakika olarak 75 dakikalık reaksiyon yapıldı. Reaksiyon bitiminde ise cihaz tüpleri 4 °C soğutmaya ayarlandı.

Tablo 2. cDNA reaksiyonuna eklenenler

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
5X Reaksiyon tamponu	5 µl	1X
dNTP	2 µl	100 mM
Randomize primerler	5,25 µl	100 µm
RNase inhibitörü	0,5 M	0,5 mM
DTT	1,25 M	1,25 mM
RTE	1 M	1 M
RNA örnekleri	10 µl	3 M
Toplam hacim:	25 µl	25 µl

Tablo 3. cDNA sentezindeki aşamalar

cDNA Sentez Döngü Aşamaları	
Primer bağlanması	65 °C 5 dakika, 4 °C 5 dakika
DNA polimerizasyonu	25 °C 10 dakika, 50 °C 60 dakika
Enzim deaktivasyonu	85 °C 5 dakika

2.4. KANTİTATİF PCR

qPCR çalışmasına ilk olarak genlerin ifade düzeylerini incelemek için, 4. Tablo'daki primerler tasarlandı.

Tablo 4. Primer dizimleri

Genin Adı		Primer Dizilimi
ACTB	Forward	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
ACTB	Reverse	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
TMPRSS4	Forward	CCTGGCGAGTATCATCATTGTG
TMPRSS4	Reverse	GATCGGTCCTTGGAGAGGCG
MAGE-A3	Forward	AAGCCGGCCCAGGCTCGGT
MAGE-A3	Reverse	GCTGGGCAATGGAGACCCAC

Amplifikasyon için, "Corbett Research Real-time PCR Thermal Cycler" cihazı kullanıldı ve reaksiyon tüpüne 2X konsantrasyondaki Sybr Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün) içerikli reaksiyon karışımından 10 mikrolitre eklendi, reverse ve forward primerlerin her birinden 1,5 mikrolitre eklendi, 4 mikro litre cDNA örneği ve 4 mikrolite nükleazdan arındırılmış su eklendi (5. Tabloya bakınız.) Reaksiyonun aşamaları 5. Tablodaki gibi yapıldı.

Tablo 5. qPCR reaksiyonu için eklenler

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µl	1 X
Forward Primer	1,5 µl	0,3 µm
Reverse Primer	1,5 µl	0,3 µm
Cdna	4 µl	<500 ng
Su	4 µl	
Toplam hacim:	21 µl	

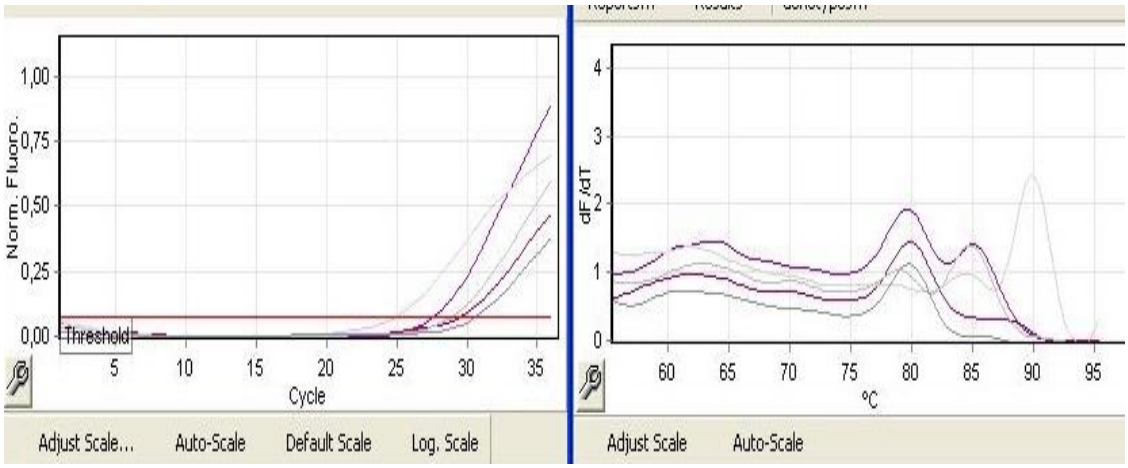
Tablo 6. qPCR döngüsü

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 °C 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 °C 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C 30 saniye
	3. Uzama	72 °C 30 saniye, Floresan okuma
Sonlanma		72 °C 10 dakika
		X 36 DÖNGÜ

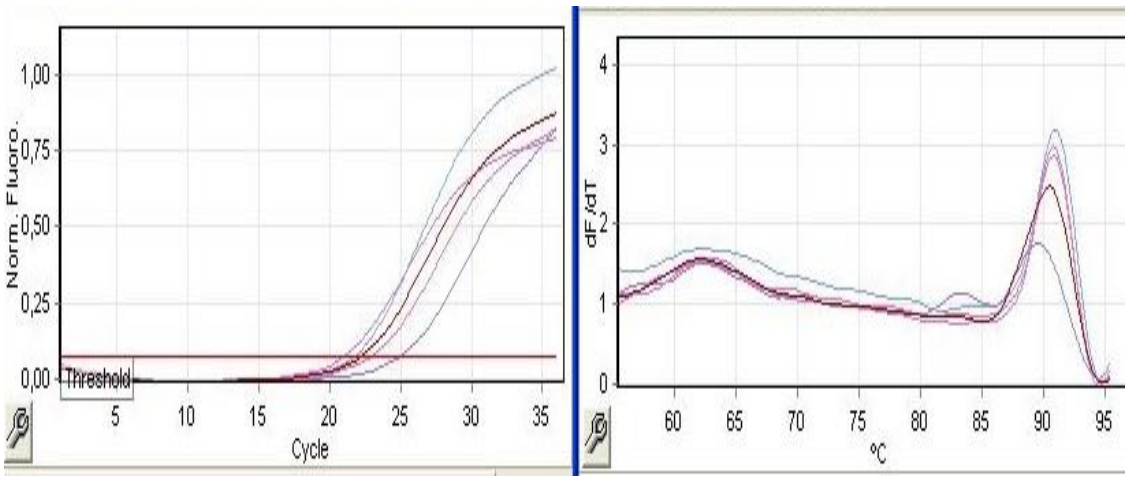
3.BULGULAR

3.1.GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARI

Aşağıdaki şekillerde *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerine ait Ct ve Tm grafikleri görülmektedir.



Şekil 7. *TMPRSS4* Ct ve Tm sonucu



Şekil 8. *MAGEA3* Ct ve Tm sonucu

Tablo 7. Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	MDA-MB-231 Ortalama Ct değeri	Delta Ct ΔCt (MDA-MB-231)	Ekspresyon Değişimi 2^- ΔΔCt
Beta-Actin (house-keeping gen)	29,31		
TMPRSS4	30,55	-0,32	0,82
MAGE-A3	22,2	8,03	12,46

Yapılan gerçek zamanlı PCR analizinde, *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genleri ve referans olarak kullanılan *β-aktin* geninin Ct değerleri hesaplamada kullanıldı. Elde edilen değerle her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan değişim kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alındı.

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tabloda, *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerinin *Beta-Aktin* genine kıyasla ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir. Gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre *TMPRSS4* geni için hesaplama sonuç 1'den küçük olduğu için 1/0,82 şeklinde hesaplanmıştır. Bu hesaplamaya göre ifade seviyesinde de -1,21 kat azalış göstermiştir. Diğer gen olan *MAGE-A3* geninde ifade seviyesi ise 12,46 kat artış gözlenmiştir.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

TMPRSS4 kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynar ve özellikle meme kanseri için gen terapisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Bu tez çalışmasında *TMPRSS4* geninin ifade düzeyi MDA-MB-231 hücre hattında qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma sonrasında elde ettiğimiz bulgular literatürdeki çalışmaların tersi özellikte olup, gendeki ifade düzeyi *BEAS-2B* ye göre 1,21 kat azalmıştır.

Son yıllarda *TMPRSS4* popüler bir araştırma konusu olarak yer almaktadır. *TMPRSS4* ile ilgili verilerin çoğu, kanser gelişiminin ve metastazın araştırıldığı çalışmalardan gelmektedir. *TMPRSS4*'ün aşırı ifadelenmesi, pankreas, yumurtalıkta, tiroid, kolorektal, akciğer, meme, servikal, safra kesesi, gastrik ve karaciğer tümörlerinde belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2011).

Daha önce yapılan çalışmalarda farklı kanser türlerinde tespit edilen *TMPRSS4* geninin aşırı ifadesinin, gen amplifikasyonu, kromozom düzenlenmeleri, transkripsiyonel düzensizlikler veya diğer mekanizmalara bağlı olup olmadığı hala bilinmemektedir. Li ve arkadaşlarının hepatokarsinom hücrelerinde yaptığı bir çalışmada, *TMPRSS4*'ün, ilk VEGF ve MMP-9 kaynaklı hücre yanıt genlerinin ifadesi normal seviyelere döndüğünde, ışınlanmadan 30 gün sonra gen ifade seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Araştırıcılar *TMPRSS4*'ün aşırı ifadesinin, bu hücrelerin yayılması ve metastazı için kritik olabileceğini belirtmişlerdir (Li ve diğerleri, 2011).

Daha önce yapılan çalışmalarda, kolon, akciğer ve meme kanseri hücre hatları, *TMPRSS4*'ün kanserleşme süresindeki rolünü ortaya çıkarmak için in vitro modeller olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kanser hücrelerinde *TMPRSS4*'ün aşırı ifadelenmesinin, tümör invazyonu ve metastazını gösteren bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (Jung ve arkadaşları, 2008). Akciğer ve kolon kanserlerinde yapılan çalışmalarda ise, *TMPRSS4*'ün inhibisyonun hücre göçünü azalttığı belirlenmiştir. Tersine, *TMPRSS4* aşırı ekspresyonun, kolon kanserinde göç ve istilayı arttırdığı söylenmektedir. Ayrıca *TMPRSS4*'e özgü shRNA ile transfekte edilmiş akciğer kanseri hücre hatlarının proliferasyon oranlarında bir inhibisyon olduğu da bildirmiştir (Larzabal ve ark. 2011).

Son araştırmalar hücre döngüsünün, tümör gelişiminde ve kanser tedavisinde olumlu yanıt almada önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Hücre döngüsü, tümörün ilerlemesini ve kanserin tedaviye tepkisini azaltmak için aktif hale getirilebilen kökleşmiş bir tümör baskılama mekanizmasıdır (Daiz Morelli ve ark. 2013) *TMPRSS4*' ün kanser hücre döngüsündeki etkileri incelendiğinde Assani ve arkadaşlarının MDA-MB-468 meme kanseri hattında *TMPRSS4*'ün inhibisyonunun hücre döngüsünün G2/M fazında durudurulmasına imkan sağladığı ortaya çıkmıştır (Assani ve ark.,2019).

Kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı ifade edilen *TMPRSS4*' ün, kanser gen terapisi (CGT) stratejileri kullanılarak biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. *TMPRSS4* susturma işleminin, kanser proliferasyonunu azalttığı ve aşırı ekspresyonunun indüksiyonunun, birçok kanser hücresi soy türlerinde hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Fan ve diğerleri, 2018; Huang ve diğerleri,al., 2014; Lee ve arkadaşları, 2016; Jung ve arkadaşları, 2008).

Daha önce yapılan çalışmalar *TMPRSS4*' ün akciğer kanserli hastalarda prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, meme kanseri hücre poliferasyonunda *TMPRSS4* susturma işleminin hücre çoğalmasını azalttığını göstermektedir (Fan ve ark., 2018). Chikaishi ve arkadaşları akciğer kanseri hastalarında hastalığın tekrar edişinde bir biyobelirteç olarak yer aldığını belirtmektedir (Chikaishi ve ark.,2016).

Agresif meme kanseri hücre hattında yaptığımız araştırma sonucunda *TMPRSS4* geninde azalma olduğu tespit edilmiştir. Daha önce bahsettiğimiz çalışmalarda *TMPRSS4*'ün biyobelirteç olarak kullanılabileceği söylenmektedir. Bizim agresif meme kanseri hücre hattında yaptığımız araştırmada *TMPRSS4*'te transkripsiyonel seviyede azalma olduğu tespit edildi. Araştırma sonucunda azalmanın 1,21 kat olduğunu gözlemledik. Daha önce bahsettiğimiz çalışmalarda *TMPRSS4*'ün aşırı ifadelendiği ve aşırı ifadelenme sebebiyle kanserli dokuların tespitinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği söylenmektedir.

Bu tezin konusunu oluşturan diğer hedef gen olan *MAGE-A3* geni embriyonel dönemde ifade edilen bir gendir. Normal dokularda çok fazla ifade edilmemekle beraber erişkin erkeklerin testis germ hücrelerinde ifade edilmektedir. *Tip I MAGE* genleri beyin, meme, karaciğer, akciğer, yumurtalık, prostat, cilt, testis ve tiroid dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde yüksek oranda ifade edilir.

Tip I MAGE ifadesi, çeşitli kanser tiplerinde ifadesi yüksektir ve hastalarda kötü prognoz ile ilişkilidir. *Tip I MAGE* geninin kanser testis antijenlerinin, kanser hücresinin hayatta kalmasını, çoğalmasını, tümör oluşumunu ve metastazı aktif olarak arttıran onkojenik özellikler göstermektedir (Bolli ve diğerleri, 2002; Brasseur ve diğerleri, 1995; Brichard ve Lejeune, 2007; Dhodapkar ve diğerleri., 2003; Patard ve arkadaşları, 1995).

Liu ve ark. 2008'de yaptığı çalışmada insan tiroid karsinomu hücreleri kullanılarak ortotopik fare modeli oluşturmuşlardır. Araştırmada *MAGE-A3*'ün aşırı ifadesi sağlanılarak fonksiyonel etkileri incelenmiştir. Çalışmada meme kanserinde risk faktörü oluşturan fibroblast büyüme faktörü reseptör 2'nin de hedefi olan stromal fibronektin baskılanmış ve *MAGE-A3*'ün ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Stromal fibronektin tümör hücrelerinde fazla ifade edilirse tümör hücrelerinde hızlı poliferasyon, invazyon ve metastaza engel olmaktadır. *MAGE-A3*'ün kanser ilerlemesindeki rolünü anlamak için fibroblast büyüme faktörü reseptör 2'nin ve stromal fibronektininde dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolaklarında fonksiyonel görev aldığı sonucuna varılmıştır. (Liu ve ark., 2008)

Testis ve çeşitli tümörlerde ifade edilen kanser-testis antijeni *MAGE-A3*, uzun zamandır immünoterapi için ideal bir hedef olarak kabul edilmektedir. Wang ve ark. 2018'de yaptığı çalışmada *MAGE-A3*'ün STAT1 (transkripsiyon sinyal ileticileri ve aktivatörleri 1) ekspresyonunu düzenlediğini belirtmektedirler. *MAGE-A3*, *MAGE-A3*'e özgü siRNAlar tarafından susturulduğunda STAT1'in ifade düzeyinde artış olduğu görülmüştür. STAT1'in anti-tümör bağışıklığını arttırdığı bilinmektedir. Tümör hücrelerinde *MAGE-A3* ifadesi, anti-tümör immün yanıtlarını inhibe ederek tümör immün kaçışında katkıda bulunduğunu göstermiştir. Çalışmadaki bulguların *MAGE-A3*'ün immünoterapideki yeri için yeni stratejiler sağlayacağı düşünülmektedir (Wang ve ark., 2018).

Bu çalışmada MDA-MB-231 agresif meme kanseri hücre hattında *MAGE-A3*'ün ifadesinde *BEAS-2B*'ye göre 12,46 kat artış görülmüştür ve daha önce bahsettiğimiz çalışmalarla uyumludur. Daha önce bahsettiğimiz çalışmalarda *Tip I MAGE* ifadesinin kanser hücrelerinde tümör oluşumunu, çoğalmasını ve metastazı aktif olarak arttırmasından dolayı *MAGE-A3*'ün meme kanserine etkisini ve kanser gelişimini anlayabilmek için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Yapılan çalışmalara tersi olarak bulduğumuz *TMPRSS4* genindeki 1,21 kat azalma bu gende yapılacak protein düzeyindeki araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. *TMPRSS4* ün bir biyobelirteç olarak kullanılmaya devam edilmesi konusu araştırılmalıdır. *TMPRSS4* ile ilgili verilerden ve yaptığımız çalışmadan yola çıkılarak genin sinyal yolaklarındaki etkisinin araştırılmasına ihtiyaç vardır. *MAGE-A3* ile ilgili verilerden ve yaptığımız çalışmadan yola çıkılarak ileride yapılacak çalışmalar sonucunda *MAGE-A3*'ün immünoterapide hedef gen olabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Alanazi, I.O., Khan, Z.. Understanding EGFR Signaling in Breast Cancer and Breast Cancer Stem Cells: Overexpression and Therapeutic Implications. Asian Pacific journal of cancer prevention: *APJCP*. 2016;17:445–453.

Al-Hajj, M, Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3983–3988.

Ali, R, Wendt, M.K., The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2:16042.

Antalis, T.M, Buzza MS, Hodge KM, Hooper JD, Netzel-Arnett S. The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. *Biochem J.* 2010;428 (3:325–346.

Appert-Collin, A, Hubert, P, Cremel, G. et al. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6:283.

Arteaga, C.L., Engelman, J.A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014;25(3):282–303.

Assani, G., Yessoufou, A., Xoing, Y., Segbo, C., Yu, X., Zhou, F., Zhou, Y. Role of TMPRSS4 Modulation in Breast Cancer Cell Proliferation (2019). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 20 (6) 1849-1856.

Balmana, J, Diez, O, Rubio, IT. et al. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22(Suppl 6):31–34

Basse, C, Arock, M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *Int J Cancer*. 2015;137:2785–2794.

Brewer, HR, Jones, ME, Schoemaker MJ. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165:193–200.

Burgess, A.W. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*. 2008;26(5):263–274.

Chen, S, Parmigiani, G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25:1329–1333.

Chen, Y, Olopade, O.I., MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8:1689–1698.

Cheskis, B.J., Greger, J.G., Nagpal, S., Freedman, L.P. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol*. 2007;213(3):610–617.

Chikaishi, Y, Uramoto, H, Koyanagi, Y, Yamada, S, Yano, S, Tanaka, F. TMPRSS4 expression as a marker of recurrence in patients with lung cancer. *Anticancer Res*. 2016;36:121–127.

Clevers, H., Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192–1205.

Cailleau, R, Olive, M, Cruciger, QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 1978. 14(11):911–915.)

Catsburg, C, Miller, A.B., Rohan, T.E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int J Cancer*. 2015;136:2204–2209.

Daly, NL, Scanlon, M.J, Djordjevic, J.T, Kroon, PA, Smith R. Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92 (14:6334–6338.

Deng, C.X., BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:1416–1426.

DeSantis, C.E, Fedewa, SA, Goding, Sauer, A. et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:31–42.

Diaz-Morall,i S, Tarrado-Castellarnau, M, Miranda, A, Cascante, M (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther,* 138, 255-71.

Dine, J, Deng, CX. Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32:25–37.

Drukteinis, J.S., Mooney, B.P., Flowers, C.I., et al. Beyond mammography: new frontiers in breast cancer screening. *Am J Med.* 2013;126:472–479.

Dumars, C, Ngyuen, J.M., Gaultier, A. et al. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget.* 2016;7:78343–78354.

Elizalde, P.V., Cordo Russo R.I., Chervo M.F., Schillaci R. ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(12):T243–T257.

Fan, S., Ma Y.X., Wang C. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene.* 2001;20(1):77–87.

Fan, X, Liang, Y, Liu, Y, et al (2018). The upregulation of TMPRSS4, partly ascribed to the downregulation of miR 125a 5p, promotes the growth of human lung adenocarcinoma via the NF κB signaling pathway. Int J Oncol, 53, 148-58. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Green, AR, Aleskandarany MA, Agarwal D. et al. MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br J Cancer.* 2016;114:917–928.

Hamajima, N, Hirose K, Tajima K. et al. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2002;87:1234–1245.

Harbeck, N, Gnant M. Breast cancer. *The Lancet.* 2017;389:1134–1150.

Hegan, DC, Lu Y, Stachelek GC. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:2201–2206.

Jung, M, Russell AJ, Liu B. et al. A Myc Activity Signature Predicts Poor Clinical Outcomes in Myc-Associated Cancers. *Cancer Res*. 2017;77:971–981.

Jung, S, Wang M, Anderson K. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *International journal of epidemiology.* 2016;45:916–928.

Kim, A, Jang MH, Lee SJ. et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of breast cancer.* 2017;20:150–159.

Knight, JA, Fan J, Malone KE. et al. Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *Int J Cancer.* 2017;141:916–924.

Krishnamurthy, N., Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:50–60.

Kumar, V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R., Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51(6):941–951.

Larzabal, L., Nguewa P.A., Pio R., Blanco D., Sanchez B., Rodriguez M.J., Pajares M.J., Catena R., Montuenga L.M., Calvo A. Overexpression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer is associated with poor prognosis in patients with squamous histology. *Br. J. Cancer.* 2011;105:1608–1614.

Logan, C.Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781–810.

Luo, J., Chen J., Deng Z.L. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest*. 2007;87(2):97–103.

MacDonald, B.T., Tamai K., He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9–26.

Majeed, W, Aslam B, Javed I. et al. Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *APJCP*. 2014;15:3353–3358.

Maffini, MV, Soto AM, Calabro JM. et al. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci.* 2004;117:1495–1502.

Martinez, JS, von Nicolai C, Kim T. et al. BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:3515–3520.

Mayer, I.A., Arteaga C.L. The pi3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Annu Rev Med.* 2016;67:11–28.

Min, HJ, Lee MK, Lee JW, Kim S. TMPRSS4 induces cancer cell invasion through pro-uPA processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446 (1:1–7.

Mohammed, M.K., Shao C., Wang J. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* 2016;3(1):11–40.

Nadji, M., Gomez-Fernandez C., Ganjei-Azar P., Morales A.R. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):21–27.

Netzel-Arnett, S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH, Antalis TM. Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22 (2-3:237–258.

Nusse, R., Clevers H. Wnt/beta-Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell.* 2017;169(6):985–999.

Ohler, A, Becker-Pauly C. Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion. *Biol Chem.* 2011;392 (7:653–664.

Ono, M., Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7242–7251.

Osborne, C.K., Schiff R., Fuqua S.A., Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res.* 2001;7(suppl 12):4338s–4342s. discussion 4411s-4412s.

Paluch-Shimon, S, Cardoso F, Sessa C. et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol.* 2016;27:103–110.

Passero, CJ, Mueller GM, Myerburg MM, Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. TMPRSS4-dependent activation of the epithelial sodium channel requires cleavage of the gamma-subunit distal to the furin cleavage site. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302 (1:F1–F8.

Patard, Francis, Gil Diez De Medina, François, Marie, Philippe, Antoine, Paul, Clément, Dominique. (1995). Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. International journal of cancer. *Journal international of cancer*. 64. 60-4. 10.1002/ijc.2910640112.

Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007;117:3155–3163.

Poole, CJ, van Riggelen J. MYC-Master Regulator of the Cancer Epigenome and Transcriptome. *Genes.* 2017;8:142.

Pylayeva-Gupta, Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:761–774.

Qian, BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39–51.

Renoir, J.M., Marsaud V., Lazennec G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(4):449–465.

Sanchez, H, Paul MW, Grosbart M. et al. Architectural plasticity of human BRCA2-RAD51 complexes in DNA break repair. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:4507–4518.

Sever, R., Brugge J.S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(4)

Shih, C, Padhy LC, Murray M. et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature.* 1981;290:261–264.

Siegel, RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:7–30.

Siewertsz van Reesema, LL, Lee MP, Zheleva V. et al. RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis. *Clinical laboratory international.* 2016;40:18–23.

Stefenska, B., Jian Huang, Bishnu Bhattacharyya, Matthew Suderman, Michael Hallett, Ze-Guang Han and Moshe Szyf (2011). Definition of the *Landscape of Promoter DNA Hypomethylation in Liver Cancer*- 10.1158/0008-5472.CAN-10-3823.

Stewart, BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2014.

Sonnenschein, C, Soto AM. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2016;122:70–76.

Tan-Wong, SM, French JD, Proudfoo NJ. et al. Dynamic interactions between the promoter and terminator regions of the mammalian BRCA1 gene. *P Natl Acad Sci USA.* 2008;105:5160–5165.

The Human Protein Atlas. MAGE family member A3. "https://www.proteinatlas.org/ENSG00000221867-MAGEA3/cell " 12 aralık 2019 tarihinde alındı.

Valastyan, S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147:275–292.

Valenti, G, Quinn HM, Heynen G. et al. Cancer Stem Cells Regulate Cancer-Associated Fibroblasts via Activation of Hedgehog Signaling in Mammary Gland Tumors. *Cancer Res.* 2017;77:2134–2147.

Wee, P., Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel)* 2017;9(5)

Wieduwilt, M.J., Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(10):1566–1584.

Yang, K., Wang X., Zhang H. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest.* 2016;96(2):116–136.

Zhang, D, LaFortune TA, Krishnamurthy S. et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor reverses mesenchymal to epithelial phenotype and inhibits metastasis in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6639–6648.