

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN KODLAMAYAN RNA ZEB2NAT'IN
MCF7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA EMT, METASTAZ VE APOPTOZ ÜZERİNDEN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CANAN EROĞLU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERCAN KURAR

KONYA-2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN KODLAMAYAN RNA ZEB2NAT'IN
MCF7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA EMT, METASTAZ VE APOPTOZ ÜZERİNDEN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CANAN EROĞLU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERCAN KURAR

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 171418001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Canan EROĞLU**'nun "**Uzun Kodlamayan RNA ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında EMT, Metastaz ve Apoptoz Üzerinden Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, TÜRKİYE/ 03.05.2019

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KARAAĞAÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları A.D.



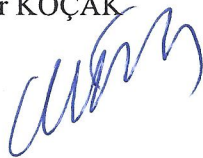
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Nadir KOÇAK

Selçuk Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik A.D.



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin TURAÇLAR

Selçuk Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **13/05/2019** tarih ve **09/11** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Investigation of the Effects of Long Noncoding RNA ZEB2NAT via EMT, Metastasis and Apoptosis in MCF7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines**” by **Canan EROĞLU** that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the Department of Medical Biology, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, TURKEY/ 03.05.2019

Principal Advisor

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

Examination Committee Member

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

Examination Committee Member

Asst. Prof. Dr. Mustafa KARAAĞAÇ

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Internal Medicine

Examination Committee Member

Asst. Prof. Dr. Nadir KOÇAK

Selcuk University

Faculty of Medicine

Department of Medical Genetics

Examination Committee Member

Asst. Prof. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Selcuk University

Vocational School of Health Sciences

Department of Medical Services and Techniques

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03.05.2019

Canan EROĞLU

TURNİTİN RAPORU

[Ercan Kurar](#) | [Kullanıcı Bilgisi](#) | [Mesajlar](#) | [Öğretmen](#) ▼ | [Türkçe](#) ▼ | [Topluluk](#) | [Yardım](#) | [Çıkış](#)



[Ödevler](#) | [Öğrenciler](#) | [Not Defteri](#) | [Kütüphaneler](#) | [Takvim](#) | [Tartışma](#) | [Tercihler](#)

GÖRÜNTÜLENİYOR:

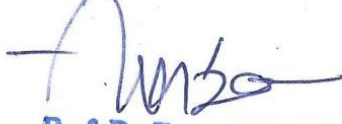
ANASAYFA > SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ A.D. > UZUN KODLAMAYAN RNA ZEB2NAT'IN MCF7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA EMT, METASTAZ VE APOPTOZ ÜZERİNDEN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu sayfa hakkında
Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

UZUN KODLAMAYAN RNA ZEB2NAT'IN MCF7 VE MDA-MB-231 ...
GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER ▼

[Dosyayı Gönder](#) [Çevrimiçi Derecelendirme Raporu](#) | [Ödev ayarlarını düzenle](#) | [E-posta bildirmeyenler](#)

☐	YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
☐	Canan EROĞLU	Doktora Tezi	%7 	--	--		1109638703	10-Nis-2019


Prof. Dr. Ercan KURAR
N.E.Ü Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D Başkanı

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilimsel katkılarından ve deneyimlerinden dolayı sayın danışman hocam Prof. Dr. Ercan KURAR’a,

Asistanlığım ve doktora eğitimi boyunca bilgilerini esirgemeyen değerli Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Hasibe VURAL ve Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN’a,

Her konuda yanımda olan değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Mehmet Ali KARASELEK, Seda ŞİRİN, Araş. Gör. Ebru AVCI ve Araş. Gör. Dr. İlknur ÇINAR AYAN’a,

Beni canlarından çok sevdiğine emin olduğum beni bu günlere getiren desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım Babam Seyfettin EROĞLU, Annem Azize EROĞLU’ya,

Her başım sıkıştığında dile getirmeme bile gerek kalmadan yetişen ve onlarla huzur bulduğum çok kıymetli Ablalarım, Ağabeyime ve Değerli Ailelerine,

Bu süreci benimle yaşayan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli nişanlım Ömer GÜNEŞ’e,

Tez çalışmam için gerekli olan maddi desteği NEÜ-BAP-171418001 proje numarası ile sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne,

Çok Teşekkür Ederim...

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	i
<i>Tez Onay Sayfası</i>	ii
<i>Approval</i>	iii
<i>Beyanat</i>	iv
<i>Turnitin Raporu</i>	v
<i>Teşekkür</i>	vi
<i>İçindekiler</i>	vii
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	x
<i>Şekiller Listesi</i>	xii
<i>Tablolar Listesi</i>	xiii
<i>Özet</i>	xiv
<i>Abstract</i>	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Meme Kanseri</i>	2
2.1.1. <i>Meme Kanserinde Risk Faktörleri</i>	4
2.1.2. <i>Meme Kanseri Türleri</i>	8
2.1.3. <i>Meme Kanserinin Evrelemesi</i>	10
2.1.4. <i>Meme Kanseri Tedavisi</i>	11
2.2. <i>Kodlamayan RNA 'lar</i>	13
2.2.1. <i>Uzun Kodlamayan RNA 'lar</i>	14
2.2.1.1. <i>ZEB2NAT</i>	14
2.2.2. <i>Küçük Kodlamayan RNA 'lar</i>	16
2.2.2.1. <i>siRNA ile Gen Susturulması</i>	17
2.3. <i>Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Metastaz</i>	18
2.3.1. <i>Epitelyal-Mezenkimal Geçiş</i>	18
2.3.1.1. <i>EMT'nin Sınıflandırılması</i>	19
2.3.1.2. <i>İskelet Dinamiklerindeki Değişiklikler</i>	20
2.3.1.3. <i>Matriks Yeniden Düzenlenmesi</i>	20
2.3.1.4. <i>EMT Sürecinde Sinyal Ağı</i>	21
2.3.1.4.1. <i>TGF-β Sinyal Yolağı</i>	21
2.3.1.4.2. <i>EGF ve Ras Sinyal Yolağı</i>	22
2.3.1.4.3. <i>HGF ve FGF Sinyal Yolağı</i>	23
2.3.1.4.4. <i>Wnt/ β-katenin Sinyal Yolağı</i>	24

2.3.1.4.5. Notch Sinyal Yolağı.....	25
2.3.1.4.6. Hedgehog Sinyal Yolağı.....	26
2.3.1.4.7. EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenleyicileri.....	27
2.3.2. Metastaz	29
2.4. Apoptoz.....	31
2.4.1. Ölüm Sinyalleri Aracılı Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak).....	32
2.4.2. Mitokondri Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)	33
2.5. Hipotez	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hücre Kültürü	35
3.2. siRNA Transfeksiyon Yöntemi.....	35
3.3. Gerçek-Zamanlı PZR Analizi	36
3.3.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu.....	36
3.3.2. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	36
3.3.3. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ile cDNA Sentezi.....	37
3.3.4. Primer Dizaynı	37
3.3.5. Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonu	42
3.4. Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi	42
3.4.1. Protein İzolasyonu	43
3.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jelinin Hazırlanması	43
3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	43
3.4.4. Protein Transferi ve Bloklama	44
3.4.5. Western Blot Analizi.....	45
3.5. Hücre Canlılık Testi	45
3.6. Akım Sitometri Analizi ile Apoptoz Tayini	46
3.7. İnvazyon Testi	46
3.8. Koloni Oluşum Testi.....	47
3.9. İstatistiksel Analizler.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Gerçek-Zamanlı PZR Analizi ile Kontrolü.....	48
4.2. siRNA Uygulaması Sonrası Hücrelerin Morfolojilerinin Gözlenmesi.....	49
4.3. ZEB2NAT'ın Susturulmasının EMT, Metastaz ve Apoptoz ile İlişkili Genler Üzerindeki Etkilerinin Gerçek-Zamanlı PZR Analizi ile Belirlenmesi	51
4.4. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Bazı Genlerin Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	54
4.5. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	54

<i>4.6. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Apoptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....</i>	<i>56</i>
<i>4.7. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Hücre İnvazyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....</i>	<i>58</i>
<i>4.8. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....</i>	<i>59</i>
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
7. KAYNAKLAR	76
8. ÖZGEÇMİŞ.....	89
9. EK	90

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AGO2	: Argonaute 2
AI	: Aromataz inhibitörleri
COL4A2	: Kollajen tip IV alfa 2
CYCS	: Sitokrom-c
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
ENCODE	: DNA elementleri ansiklopedisi
ER	: Östrojen reseptör
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FZD	: Frizzled
HA	: Hyaluronan
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HR	: Hormon reseptör
IRES	: İç ribozom giriş bölgesi
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
MAPK	: Mitogen aktive edici protein kinaz
MET	: Mezenkimal-epitelyal geçiş
miRNA	: mikroRNA
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
mRNA	: Mesajcı RNA
MTSS1	: Metastaz supresor 1
NAT	: Doğal antisense transkript
NICD	: Notch intrasellüler domaini
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
PR	: Progesteron reseptörü
PTEN	: Fosfataz ve tensin homoloğu
qPZR	: Gerçek-zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RNAi	: RNA interferans
RNase	: Ribonükleaz
RSIS	: Ribozom tarama inhibitör dizisi
siRNA	: Küçük interferans RNA
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü
TIMP	: Metalloproteazların spesifik doku inhibitörü
TNM	: Primer tümör, lenf nodu ve metastaz
ZEB2NAT	: ZEB2 antisens RNA 1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün toplam kanser içindeki dağılımı, (%), 2015.....	4
Şekil 2.2. ZEB2NAT mekanizması.....	16
Şekil 2.3. siRNA mekanizması	18
Şekil 2.4. TGF- β sinyal yolağı	22
Şekil 2.5. EGF ve Ras yolağı	23
Şekil 2.6. HGF sinyal yolağı	24
Şekil 2.7. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	25
Şekil 2.8. Notch sinyal yolağı	26
Şekil 2.9. Hedgehog sinyal yolağı.....	27
Şekil 2.10. Metastatik kaskadın ana basamakları.....	30
Şekil 2.11. Kanser metastazında genetik belirleyiciler	31
Şekil 2.12. Apoptotik sinyal iletim yollarının basamakları.	34
Şekil 3.1. RNA agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 3.2. Örnek erime eğrisi grafiği.....	42
Şekil 3.3. Bradford protein standart eğrisi	44
Şekil 4.1. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile kontrolü.	48
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile kontrolü	49
Şekil 4.3. MCF7 hücrelerine Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA muamelesinden 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri	50
Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücrelerine Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA muamelesinden 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri.....	50
Şekil 4.5. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT’ın susturulmasının ZEB2, E kaderin ve N kaderin protein ifadeleri üzerine etkisi	54
Şekil 4.6. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT’ın susturulmasının ZEB2, E kaderin ve N kaderin protein ifadeleri üzerine etkisi	54
Şekil 4.7. ZEB2NAT’ın MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.8. ZEB2NAT’ın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine göre etkisi	56
Şekil 4.9. ZEB2NAT’ın MCF7 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi	57
Şekil 4.10. ZEB2NAT’ın MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.11. ZEB2NAT’ın MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi	58
Şekil 4.12. ZEB2NAT’ın MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.13. ZEB2NAT’ın MCF7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi	60
Şekil 4.14. ZEB2NAT’ın MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi	61

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. A.B.D.’de kadınlarda 2018 yılı için farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları	3
Tablo 2.2. Türkiye’de yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	3
Tablo 3.1. EMT, metastaz, apoptoz ile ilişkili genler ve bu çalışmada kullanılan diğer genlerin tanımlamaları	38
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan genlerin simgeleri, primer dizileri ve baz çifti uzunlukları	40
Tablo 4.1. ZEB2NAT’ın susturulmasının MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Kontrol-siRNA gruplarına göre genler üzerine etkisi	52

ÖZET

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Uzun Kodlamayan RNA ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında
EMT, Metastaz ve Apoptoz Üzerinden Etkilerinin Araştırılması

Canan EROĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi/ KONYA-2019

Kadınlarda yaygın olarak görülen meme kanseri, kansere bağlı ölüm oranları dikkate alındığında ikinci sırada yer almaktadır. Kanser üzerine yapılan çalışmalarda genellikle gen ifadesi üzerine odaklanılmış olmasına rağmen artık kodlamayan RNA'larında önemi anlaşılmıştır. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) kodlamayan RNA ailesinin bir üyesidir. lncRNA'ların EMT (Epitelyal-mezenkimal geçiş), metastaz ve apoptoz gibi farklı süreç ve yollarda görevli genlerin düzenlenmesinde önemli işlevleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de kanser patogenezinin moleküler düzeyde anlaşılmasına katkıda bulunması kaçınılmazdır. lncRNA ZEB2NAT, EMT sürecinde önemli role sahip ZEB2'nin doğal antisense transkriptidir. Bu tez çalışmasında MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde lncRNA ZEB2NAT'ın EMT, metastaz ve apoptoz üzerinden etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

ZEB2NAT'ın ifadesi siRNA transfeksiyon metodu ile baskılanmıştır. ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde EMT, metastaz ve apoptozda önemli olan genlerin ifadeleri üzerine etkisi gerçek-zamanlı PZR (qPZR) ile belirlenmiştir. Önemli değişim görülen genlerden ZEB2, E kaderin ve N kaderinin protein seviyeleri western blot yöntemi ile kontrol edilmiştir. ZEB2NAT'ın hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve koloni oluşturma kapasitesi üzerine etkisi sırasıyla XTT, FITC annexin V, invazyon ve koloni testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

ZEB2NAT'ın baskılanması her iki hücre hattında da EMT, metastaz ve apoptozda önemli olan bazı genlerin ifadelerini anlamlı derecede değiştirerek antimetastatik ve apoptotik etkiye sahip olduğu qPZR analizi ile tespit edilmiştir. ZEB2NAT'ın baskılanması durumunda her iki hücre hattında da gen ifadelerinde anlamlı değişim görülen ZEB2 ve N kaderin protein ifadelerinin azaldığı E kaderin protein ifadesinin ise arttığı protein düzeyinde western blot analizi sonucunda belirlenmiştir. Ayrıca XTT testi sonuçlarında ZEB2NAT'ın baskılanmasının her iki hücre hattında da hücre çoğalmasında anlamlı derecede azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Akım sitometri sonuçları ZEB2NAT'ın baskılanmasının her iki hücre hattında da apoptozu anlamlı derecede uyardığını göstermiştir. İnvazyon ve koloni testleri sonucunda ZEB2NAT'ın baskılanmasının her iki hücre hattında da belli oranlarda sırasıyla invazyon ve koloni oluşum kapasitelerini anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır.

ZEB2NAT'ın baskılanması hem MCF7 hemde MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde anti-metastatik ve apoptotik etkiye neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar EMT sürecinde önemli role sahip olan ZEB2 transkripsiyon faktörünün antisense transkribi olan ZEB2NAT'ın meme kanserinde EMT, metastaz ve apoptoz üzerinden önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, EMT, meme kanseri, metastaz, ZEB2NAT.

ABSTRACT

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Investigation of the Effects of Long Noncoding RNA ZEB2NAT via EMT, Metastasis and Apoptosis
in MCF7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines

Canan EROĞLU

Department of Medical Biology

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy/ KONYA-2019

Breast cancer, which is common in women, is the second considering the most common cancer-related mortality. Although studies on cancer have been generally focused on gene expression, importance of non-coding RNAs have been also understood. Long non-coding RNAs (lncRNA) are member of the non-coding RNA family. It is known that lncRNAs have important functions in the genes regulation of role in the different processes and pathways such as EMT (Epithelial-mesenchymal transition), metastasis and apoptosis. Therefore, it is inevitable that lncRNAs have potential contribution for the understanding of cancer pathogenesis at the molecular level. lncRNA ZEB2NAT is the natural antisense transcript of ZEB2, which has an important role in the EMT process. In this thesis, the objective was to investigate effects of lncRNA ZEB2NAT via EMT, metastasis and apoptosis in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines.

The expression of ZEB2NAT was suppressed by the siRNA transfection method. The effect of ZEB2NAT on the expression of important genes in EMT, metastasis and apoptosis was determined by real-time PCR (qPCR) in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. The protein levels of ZEB2, E cadherin and N cadherin were investigated by western blot analysis. The effects of ZEB2NAT on cell proliferation, apoptosis, invasion and colony formation were evaluated using XTT, FITC annexin V, invasion and colony tests, respectively.

Expression of some important genes in EMT, metastasis and apoptosis pathways in both cell lines was determined by qPCR analysis. It was thereby suggested that the suppression of ZEB2NAT revealed anti-metastatic and apoptotic effects. The suppression of ZEB2NAT resulted in a decrease in ZEB2 and N cadherin and an increasing in E cadherin protein levels by western blot analysis in both cell lines. In addition, it was determined that suppression of ZEB2NAT significantly decreased cell proliferation in both cell lines in the XTT test. The results of flow cytometry showed that suppression of ZEB2NAT significantly stimulated apoptosis in both cell lines. As a result of invasion and colony tests, it was found that suppression of ZEB2NAT significantly decreased invasion and colony formation capacities in both cell lines.

It was shown that suppression of ZEB2NAT caused anti-metastatic and apoptotic effect in both MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. These results have suggested that ZEB2NAT, the antisense transcript of the ZEB2 transcription factor, has an important roles in EMT, metastasis and apoptosis in breast cancer.

Keywords: Apoptosis, EMT, breast cancer, metastasis, ZEB2NAT.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, Amerika Birleşik Devletleri'nde kalp hastalıklarından sonra erkek ve kadınlarda en sık görülen ikinci ölüm nedenidir ve yaklaşık her dört ölümün birinden sorumludur. Meme kanseri, kadınlarda en çok görülen kansere bağlı ölüm oranları dikkate alındığında ikinci sırada yer almaktadır (Siegel ve ark., 2018). Her 8-10 kadından birinin meme kanseri olabileceği tahmin edilmektedir. Dünya da her 18 saniyede bir meme kanseri vakası görülmekte ve yaklaşık 1,7 milyon insanda meme kanseri teşhisi yapılmaktadır (Harbeck ve Gnant, 2017; Winter ve ark., 2017).

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda genellikle proteinlere odaklanılırken artık kodlamayan RNA'larında önemi anlaşılmıştır. Artan çalışmalar ile birlikte bu kodlamayan RNA'ların çeşitli biyolojik rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Kodlamayan RNA ailesinin bir üyesi olan uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) özellikle son yıllarda birçok hastalığın yanı sıra kanser biyolojisindeki yeri de ortaya konmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda lncRNA'ların epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz ve apoptoz gibi birçok süreci kontrol eden genlerin düzenlenmesinde önemli işlevleri olduğu ve bu nedenle de kanser patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkısı kaçınılmazdır (Esteller, 2011; Prensner ve Chinnaiyan, 2011).

Bu tez projesinin amacı bir lncRNA olan ZEB2NAT'ın (ZEB2 antisens RNA 1) MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde EMT, metastaz ve apoptoz üzerinden etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla ZEB2NAT'ın ifadesi siRNA transfeksiyonu yöntemi ile baskılanmıştır. ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde EMT, metastaz ve apoptoz yollarında önemli genlerin ifadeleri üzerine etkisi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. mRNA düzeyinde anlamlı değişim görülen bazı genlerin protein seviyeleri western blot yöntemi ile kontrol edilmiştir. ZEB2NAT'ın hücre proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirmek için XTT ve FITC annexin V yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca ZEB2NAT'ın invazyon ve koloni oluşturma kapasitesi üzerine etkisini değerlendirmek için invazyon ve koloni testleri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanser hücrelerinin çoğu tipi tümör olarak adlandırılan bir kitle oluşturur ve vücutta tümörün köken aldığı kısmın adını almaktadır. Meme kanseri de bu kanser türlerinden biridir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türleri arasında yer almaktadır (Prat ve ark., 2010). Meme kanserlerinin çoğu süt bezlerinde ya da süt kanallarında başlayan malignitelerdir. Memenin geri kalan kısmı, yağ, bağ ve lenfatik dokulardan oluşmaktadır. Meme kanseri meme epitel dokusunda hücrelerin anormal çoğalması ile karakterizedir. Meme kanserinde tümör küçük olduğunda semptom üretmez ancak tedavi bu aşamada daha kolaydır. Bu nedenle tarama erken teşhis için çok önemlidir (American Cancer Society, 2017). Meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde östrojen reseptör (ER) ifadesi görülmektedir (Prat ve ark., 2010). Tümörögenезin erken evrelerinde ER'nin aşırı ifadesi, meme hücrelerinin tümör gelişimine neden olan anormal çoğalmasını uyaran önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (Musgrove ve Sutherland, 2009). ER ifadesinin varlığı anti-hormonal tedavi için önemli bir belirteçtir (Osborne, 1998). Erken evrede teşhis edilen meme kanserlerinde cerrahi ve radyoterapi teknikleri ile lokal terapiler mümkünken, ileri evrede başarı şansı düşük düzeylerde dir. Bu nedenle metastaz süreci ileri evre tümörlerde oldukça önemlidir (Nguyen ve Massague, 2007). Genellikle ER pozitif meme kanserli hastalarda ER negatif olanlara göre daha iyi klinik sonuçlar görülmektedir. ER negatif olarak adlandırılan meme kanserleri genellikle aşırı agresif ve metastatik olmaları nedeniyle bu tip meme kanserli hastalarda sağ kalım oranları düşüktür (Sørli ve ark., 2001; Finnegan ve Carey, 2007).

A.B.D'de yapılan istatistiki bir araştırma sonucunda, 2018 yılı için tahmin edilen meme kanseri olgusunun tüm kanser olgularının %30'unu ve ölüm oranlarının ise toplam kanser ölüm oranlarının %14'ünü oluşturabileceği rapor edilmiştir (Tablo 2.1; Siegel ve ark., 2018).

Tablo 2.1. A.B.D.’de kadınlarda 2018 yılı için farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları (Siegel ve ark., 2018).

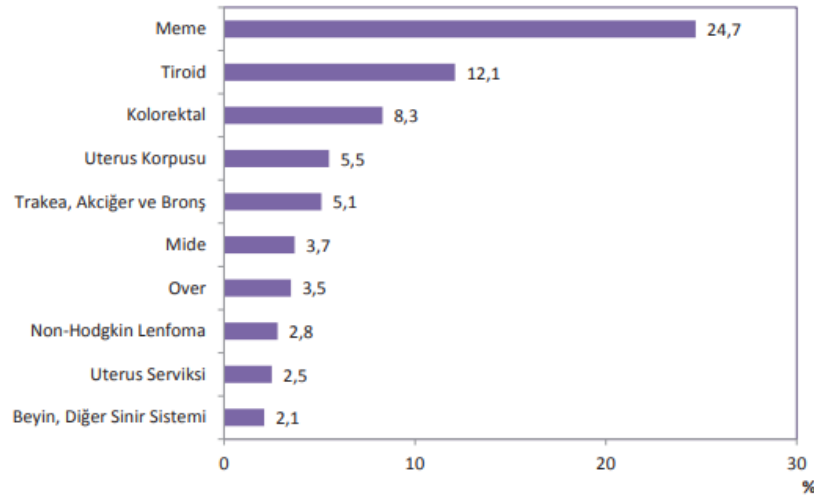
Kanser Olgularının Tahmini Sayıları			Kanser Olgularının Tahmini Ölüm		
Meme	266,12	%30	Akciğer	70,500	%25
Akciğer	112,35	%13	Meme	40,920	%14
Kolon	64,640	%7	Kolon	23,240	%8
Uterus	63,230	%7	Pankreas	21,310	%7
Tiroid	40,900	%5	Ovaryum	14,070	%5
Melanoma	36,120	%4	Uterus	11,350	%4
Non-Hodgkin lenfoma	32,950	%4	Lösemi	10,100	%4
Pankreas	26,240	%3	Karaciğer	9,660	%3
Lösemi	25,270	%3	Non-Hodgkin lenfoma	8,400	%3
Böbrek	22,660	%3	Beyin	7,340	%3
Tümü	878,98	%100	Tümü	286,01	%100

Türkiye Cumhuriyeti, Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı Verilerine bakıldığında, kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü insidansları arasında meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Tablo 2.2; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2017)

Tablo 2.2. Türkiye’de yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000 kişi ölçeğinde) (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2017).

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Meme	40,6	38,6	44,2	46,8	45,9	43,0	43,8
Tiroid	18,6	18,1	20,4	20,3	21,3	20,7	21,7
Kolorektal	13,4	13,1	13,3	15,2	15,3	13,8	14,4
Uterus Korpusu	9,3	9,6	10,5	10,1	9,9	9,8	10,0
Trake, Akciğer ve Bronş	8,1	8,0	7,8	9,3	10,0	8,7	9,0
Mide	8,1	7,2	7,9	7,8	7,1	6,5	6,3
Over	6,9	6,6	7,3	7,3	7,0	6,1	6,4
Non-Hodgkin Lenfoma	5,3	5,3	5,0	5,2	5,3	5,0	4,9
Uterus Serviksi	4,5	4,0	4,5	4,5	4,6	4,0	4,5
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	5,0	4,4	4,5	4,7	4,7	4,1	4,1

Türkiye Cumhuriyeti, Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı Verilerine göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün toplam kanser içindeki dağılımı göz önünü alındığında meme kanseri %24,7’lik oranla ilk sırada yer almaktadır. (Şekil 2.1; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2017).



Şekil 2.1. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün toplam kanser içindeki dağılımı, (%), 2015. (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2017).

2.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda gözlenen meme kanseri insidansındaki artış nedeniyle meme kanseri oluşumundaki risk faktörleri önemlidir. Ayrıca değiştirilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi meme kanseri insidansını azaltan önleme stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Neoplastik dönüşüm sürecini etkileyen faktörler doğal ve değiştirilebilir faktörler olarak ikiye ayrılabilir. Doğal risk faktörleri içinde yaş, cinsiyet, ırk ve genetik yapı gibi faktörler sayılabilir. Bu faktörler bağımsız parametreleri oluşturmakla birlikte bu faktörlerde bir bireyin yaşamı boyunca çok fazla değişiklik görülmez. Değiştirilebilir ya da dışsal faktörler olarak da adlandırılabilen faktörleri de yaşam tarzı, diyet veya oral hormon kullanımı ve östrojen replasmanı tedavisi gibi belirli bir dereceye kadar değiştirilebilir faktörler oluşturur (Kamińska ve ark., 2015). Yeni tanı konmuş meme kanseri vakalarının %20-30’unun meme hücrelerinin neoplastik transformasyon sürecini aktif olarak başlatan veya değiştiren çeşitli risk faktörlerinin ortaya çıkması ile ilişkili olduğu yapılan araştırmalar ile anlaşılmıştır (Bucholc ve ark., 2001). Meme kanseri için önemli risk faktörlerinden bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Yaş: Meme kanseri insidansı ve ölüm oranları genellikle yaşla birlikte artmaktadır. 2014-2015 yılları arasında meme kanseri teşhisi konulan kadınların yaş ortalaması 62 olarak rapor edilmiştir. Ortalama meme kanseri tanı yaşının beyaz ırktan olan kadınlarda 63, siyah ırk kadınlarında ise 59 olduğu gösterilmiştir (Howlader ve ark.,

2017). Neoplastik hastalığın teşhis edildiği yaş ile incelenen tümör dokusunda bulunan meme kanserinde önemli bir belirteç olan östrojen reseptörünün ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür (Ban ve Godellas, 2014).

Cinsiyet: Tanı alan tüm meme kanserlerinin %1'den daha az kısmını erkekler oluşturmaktadır. Meme kanseri daha çok kadınlarda teşhis edilmekte ve kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olarak bilinmektedir (Gnerlich ve ark., 2011). Epidemiyolojik veri analizleri erkeklerde son 30 yılda meme kanseri oluşumunda bir artış olduğunu göstermektedir (Speirs ve Shaaban, 2009). Ayrıca histopatolojik inceleme sonucunda meme kanseri teşhisi konulan erkek hastalardan alınan dokuların meme kanseri olan kadınlardan alınan dokulara göre %80 daha fazla östrojen ve progesteron reseptörü ifadesi gösterdiği görülmüştür. Bu reseptörlerin aşırı ifadesi ile BCL2 protein seviyesinin de korele olduğu bulunmuştur. Erkeklerde meme kanseri oluşumuna yol açan diğer risk faktörleri arasında obezite, testis hormonal fonksiyon bozukluğu veya Klinefelter sendromu nedeniyle artan östrojen seviyeleri önde gelmektedir (Weiss ve ark., 2005).

İrk: Meme kanserinde ırk önemli risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Ban ve Godellas (2014) beyaz ırktan olan kadınlarda meme kanserinin görülme sıklığının 100.000 kişide yaklaşık 127,4 olduğunu rapor etmiştir. Siyah ırktan olan kadınlarda da meme kanseri sıklığının 100.000 kişide yaklaşık 121,4 olduğu belirtilmiştir. İspanya kökenli kadınlarda meme kanseri sıklığı çok düşüktür. Bu kadınlarda genel olarak hastalığın erken teşhisinin yanı sıra aşırı HER2, östrojen ve progesteron reseptör ifadesinin olmadığı görülmüştür.

Genetik Etkenler: Son yıllarda, malign meme veya yumurtalık kanseri oluşma riskinin artmasıyla ilişkilendirilen fonksiyon bozukluğu olan genlerin tanımlanmasına yol açan yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu genlerden en önemlileri hücrede tümör baskılayıcı genler olarak da bilinen BRCA1 (BRCA1 DNA tamiri ilişkili) ve BRCA2 (BRCA2 DNA tamiri ilişkili)'dir. Bu genlerin kodlama dizilerindeki değişiklikler kalıtsal meme ya da yumurtalık kanserine neden olabilmektedir. Tanı alan ailesel meme ve/veya yumurtalık kanseri vakaları tüm vakaların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Francken ve ark., 2013). BRCA1 veya BRCA2 genlerindeki mutasyonların tanımlanması mutasyon tipine bağlı olarak

sırasıyla mutasyon taşıyıcıların %65 veya %45'inde meme ve/veya yumurtalık kanseri görülme riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir (Antoniou ve ark., 2003).

Ailesel Meme Kanseri Hikayesi: BRCA1 veya BRCA2 gen mutasyonlarının neden olduğu kalıtsal sendromlar, hastada kompleks bir moleküler analiz gerektirebilecek çeşitli klinik semptomlarla ilişkilendirilmiştir. Bir soyağacında birinci ve ikinci derece akrabalarda meme kanseri vakalarının sıklığının belirlenmesi kalıtsal meme kanseri sendromları kriterlerinden birini oluşturmaktadır (Mohamad ve Apffelstaedt, 2008). Ayrıca, BRCA mutasyon taşıyıcılarının oluşturduğu bir hasta popülasyonundan rastgele seçilen gruptaki hastaların %35-50'sinde aile öyküsü bulunmadığı da rapor edilmiştir (Ban ve Godellas, 2014). Epidemiyolojik veriler dikkate alındığında birinci ve ikinci derece akrabalarda meme neoplazmalarının birikmiş ailesel varlığı olan ve meme bezlerinin benign proliferatif lezyonları tanısı alan kadın grubunda aile kanseri hikayesi olmayan kadınlara göre meme kanseri riskinde 11 kat artış görülmüştür (Hartmann ve ark., 2005).

Beslenme: Meme kanseri oluşma riskini değiştiren en önemli dış faktörlerden birisi özellikle gelişmiş ülke popülasyonlarında sıklıkla görülen obeziteye yol açabilecek diyet alışkanlıklarıdır. Aşırı kilo veya obeziteye yol açan yağ açısından zengin yiyeceklerin yanı sıra, lezzet arttırmak ve/veya koruma amaçlı gıda katkı maddeleri ve farklı kimyasallar içeren işlenmiş ürünler, meme bezi hücrelerinde neoplastik transformasyon işlemi arttıran bir faktör olabilmektedir (Kamińska ve ark., 2015). Araştırmacılar, menopoza sonra, neoplastik hastalık için tedavi gören bir grup kadında düşük yağlı diyet kullanılması, primer cerrahi işlem sonrası neoplazm nüks riskini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Saxe ve ark., 1999).

Vücut Ağırlığı: Aşırı vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksi birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (La ve ark., 2011).

Alkol: Karaciğerdeki östrojen metabolizmasını etkilediği için alkol tüketiminin bir sonucu olarak meme kanseri riski artabilmektedir (Bagnardi ve ark., 2013).

Doğurganlık Hikayesi: Meme kanserinin ortaya çıkma riski ile ilk başarılı hamilelik yaşı arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Erken gebelik ve son doğum tarihi meme kanserinden koruyucu bir etkiye sahiptir ve daha düşük meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Aşağıda da belirtildiği gibi uzun süreli emzirmenin de

benzer aktivite göstererek meme kanseri oluşma riskini azalttığı belirtilmiştir (Ban ve Godellas, 2014).

Laktasyon: Epidemiyolojik gözlemler sonucunda her bir yıl emzirmenin neoplastik hastalık riskini %4,3 azalttığı bulunmuştur (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002). Ayrıca, çocuklarını bir yıl veya daha uzun süre emziren BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında %32'lik bir meme kanseri riskinde azalma olduğu görülmüştür. Emzirmenin, hücre çoğalması sırasında ortaya çıkabilecek DNA seviyesindeki mutajenik faktörlerin ve bozuklukların aktivitesine daha az duyarlı olmaları sayesinde süt kanalı epitel hücrelerinin doğru farklılaşmasını kolaylaştırdığı görülmektedir (Ban ve Godellas, 2014).

Erken Menarş: Kadınların erken yaşta adet görmeye başlamaları, buna bağlı olarak östrojen aktivitesine daha uzun süre maruz kalmaları nedeniyle meme kanseri görülme riskini arttırmaktadır (Hsieh ve ark., 1990; Kruk ve Aboul-Enein, 2003). Ayrıca menarşın her 2 yılda bir gecikmesi, meme kanseri oluşma riskini %10 azaltmaktadır. Her adet döngüsünde östrojen ifadesi, 12 yaşından önce menarşın gerçekleştiği kadınlarda 13 yaşından sonra menarşı olan kadınlardan daha yüksektir (Apter ve ark., 1989).

Geç Menapoz: Ayrıca menopoz yaşının da meme kanseri olma riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Menstrüasyonun devam ettiği her yıl meme kanseri riskinin %3 oranında arttığı görülmüştür. Bu sonucu 40 yaşına kadar ovariectomi yapılan kadınlarda meme kanseri riskindeki %50'lik bir azalma desteklemektedir (Ban ve Godellas, 2014).

Östrojen Replasmanı: Östrojen reseptörü aşırı ifadesi ER (+) gösteren neoplazmlar, 50 yaşına kadar daha sık görülen ER (-) tümörlerinin aksine yaşla artmaktadır. Bu durumda menopozdan sonra kadınların yüksek oranda ER (+) tümör ile tanı aldıkları görülmektedir (Ban ve Godellas, 2014). Menopoza giren kadınlarda uzun süre östrojen tedavisi gördükleri durumda meme kanseri riskinin arttığı da görülmüştür (Cuzick, 2003).

Doğum Kontrol Hapı Kullanılması: Bazı çalışmalarda, doğum kontrol hapı kullanımının meme kanseri riskini artırdığını ve en yüksek insidans artışının doğum kontrol hapı kullanımı sırasında gözlemlendiği rapor edilmiştir (Hunter ve ark.,

2010; Ban ve Godellas, 2014). Bazı araştırmacılar da birçok analiz sonucunda doğum kontrol hapı formülasyonu ile meme kanseri riskini arttırma arasında anlamlı bir ilişki gözlemlememiştir (Marchbanks ve ark., 2012). Doğum kontrol haplarının kanser riskini arttırdığına dair veriler olmasına rağmen hala bu konuda net bir durum söz konusu değildir (Clamp ve ark., 2003).

Sosyoekonomik Durum: Sosyoekonomik açıdan gelişmiş toplumlarda doğum oranının azlığı, fazla alkol ve yağlı besin tüketimi gibi diğer risk faktörlerine bağlı olarak meme kanseri görülme oranının yüksek olduğu düşünülmektedir (Özmen ve ark., 2009).

Radyasyon: Radyasyon maruziyetinin atom bombası mağdurlarında ve Hodgkin lenfoma gibi 10-30 yaşları arasında yüksek doz radyasyon tedavisi almış kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı görülmüştür (Preston ve ark., 2002; Travis ve ark., 2003).

2.1.2. Meme Kanseri Türleri

İki ana *in situ* meme kanseri türü vardır. Bunlar *in situ* duktal karsinom ve *in situ* lobüler karsinomdur. Diğer *in situ* meme kanserleri hem duktal hem de lobüler karsinomların özelliklerine veya bilinmeyen kökenlere sahiptir.

In Situ Duktal Karsinom: *In situ* vakaların yaklaşık %83'ünü oluşturan duktal karsinom anormal hücrelerin meme kanallarının epitel hücreleri farklılaştırdığı, kanalları ve lobülleri büyük ölçüde genişlettiği durum olarak ifade edilmektedir. Bu karsinom invaziv olmayabilir ve bazen tedavi olmasa bile yavaş büyümesi nedeniyle kadının sağlığını etkilemez (Sanders ve ark., 2005; Erbas ve ark., 2006; Allred, 2010).

In Situ Lobüler Karsinom: *In situ* meme kanseri vakalarının yaklaşık %13'ünü oluşturan lobüler karsinoma meme lobüllerinin bazılarında büyüyen ve gelişen anormal hücreler sonucu oluşmaktadır. Genellikle invaziv kanser öncüsü olduğu düşünülmez, ancak invaziv kanser için risk faktörü olarak görülebilmektedir (American Cancer Society, 2015.).

Meme kanserlerinin yaklaşık %80'ini invaziv karakterdedir. Meme kanseri tek bir hastalık olarak adlandırılmasına rağmen 21 ayrı histolojik alt tipi ve risk

faktörleri, tedaviye cevap ve sonuçlar açısından farklılık gösteren en az dört farklı moleküler alt tipi vardır (Tamimi ve ark., 2012; Cancer Genome Atlas Network, 2012; Dieci ve ark., 2014). Gen ekspresyonu profillemeye teknikleri, meme kanserlerinin moleküler alt tiplerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Moleküler alt tipleri hormon (östrojen ve progesteron) reseptör (HR+/HR-) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'nin aşırı ifadesi ve/veya HER2 geninin ekstra kopyalarının (HER2+/HER2-) varlığı veya yokluğu rutin olarak değerlendirilmiş biyolojik işaretleyiciler kullanılarak tanımlanmıştır (Cheang ve ark., 2015). Meme kanserinin dört ana moleküler alt tipleri ve bunların dağılımı aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Luminal A (HR+/ HER2-): Luminal A kanserleri östrojen reseptörü (ER)+ ve/veya progesteron reseptörü (PR)+ özellikte olup, dağılımı %71 oranındadır. Bu kanserler yavaş büyüme ve diğer alt tiplerden daha az agresif olma eğilimindedir. Luminal A tümörleri, özellikle kısa vadede, anti-hormon tedaviye daha duyarlıdır ve bu nedenle iyi prognoza sahiptir (Blows ve ark., 2010; Haque ve ark., 2012).

Üçlü Negatif (HR-/ HER2-): ER-, PR- ve HER2- olmaları nedeniyle üçlü negatif olarak adlandırılmaktadır. Sıklığı daha düşük (%12) orandadır. Bu kanserler, siyah kadınlarda A.B.D.'deki beyaz kadınlardan iki kat daha yaygındır. Ayrıca premenopozal ve BRCA1 gen mutasyonlu kadınlarda daha yaygın olarak da görülmektedir (Perou ve Borresen-Dale, 2011). Gen ekspresyon profili nedeniyle üçlü negatif meme kanserlerinin yaklaşık %75'i bu kanserlerin moleküler alt tiplerinin heterojen bir topluluktan oluştuğunu düşündürmektedir. Üçlü negatif meme kanserleri, bu tümörler için hedef tedaviler bulunmaması nedeniyle diğer alt tiplerden daha kötü prognoza sahiptir (Bianchini ve ark., 2016).

Luminal B (HR+/ HER2+): Luminal A kanserleri gibi, luminal B kanserleri de ER+ ve/veya PR+'dır. Ortalama %12 sıklığına sahiptir. Bu kanserlerde Ki67 (aktif olarak bölünen hücrelerin büyük bir bölümünün göstergesi) veya HER2 yüksek ifadesi ile tanımlanır. Luminal B meme kanserleri daha yüksek evrede olma eğilimindedir ve luminal A kanserlerinden daha kötü prognoz ile ilişkilidir (Haque ve ark., 2012).

HER2 (HR-/ HER2+): Bu kanserlerde genellikle ER/PR- iken HER2+'dır. HER2+ kanserler, diğer alt tiplerden daha agresif bir şekilde büyüme ve yayılma

eğilimindedir. Daha az (%5) sıklıkta gözlenir. Ayrıca bu kanserler HR+ meme kanserlerine kıyasla daha kısa süreli kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu kanserlerde hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesiyle hastalarda iyi tedavi sonuçları görülmektedir (Haque ve ark., 2012).

2.1.3. Meme Kanserinin Evrelemesi

İnvaziv meme kanserinin prognozu hastalığın ilk tanısının konulduğunda ki kanserin boyutu ve yayılmasından yani evresinden etkilenmektedir. Kanser evrelemesinde iki ana sistem bulunmaktadır. Tümörlerin TNM sınıflandırması; tümör boyutu ile birlikte memeye ve komşu dokulara ne kadar yayıldığı (T), yakındaki lenf düğümlerine yayılma derecesi (N) ve uzak metastazların varlığı veya yokluğu (M) hakkında bilgi vermektedir (Edge ve ark., 2010). Tümörler T, N ve M belirlendikten sonra 0, I, II, III veya IV olmak üzere 2. evreleme yapılmaktadır. Anormal hücreler köken aldıkları kanallara veya bezlere nüfuz etmemişlerse evre 0, erken evre invaziv kanserse evre I, en ilerlemiş hastalık ise evre IV olarak tanımlanır. Meme kanserinde TNM evrelemenin son revizyonu meme kanseri evreleme sistemini daha da geliştirmek için biyolojik faktörleri de içermektedir.

Amerikan Kanser Ortak Komisyonu'na (AJCC) göre TNM evreleme sisteminde;

Evre 0: *In situ* evre olarak da bilinen evre yakındaki dokulara invaze olmamış anormal hücrelerin varlığını ifade etmektedir.

Evre I ve bazı evre II: lokal evre olarak da bilinen meme ile sınırlı kanserleri ifade etmektedir.

Evre II veya III: büyüklük ve lenf düğümü tutulumuna bağlı olarak bölgesel evre olarak da bilinen çevredeki dokuya ya da yakındaki lenf düğümlerine yayılmış tümörleri ifade etmektedir.

Evre IIIc veya IV: köprücük kemiği üzerindeki uzak organlara veya lenf düğümlerine metastaz yapan kanserleri ifade etmektedir.

Meme kanseri için AJCC'nin primer tümör, lenf nodu ve metastaz (TNM) sınıflamasının sekizinci baskısının revizyonu, multidisipliner bir meme kanseri uzmanları ekibi tarafından belirlenmiştir. Panel, tümör aşaması, proliferasyon hızı,

ER ve PR ekspresyonu, HER2 ekspresyonu ve gen ekspresyonu prognostik panelleri gibi biyolojik faktörleri evreleme sistemine dahil etme ihtiyacını kabul etmiştir. Panel, dünya çapında değeri korumak için tümör evreleme sisteminin TNM anatomik faktörlerine dayanması gerektiğini belirtmiştir. Bununla birlikte, evrelerin prognostik etkisinin, hormon reseptörü ekspresyonunun ve HER2 amplifikasyonunun kabul edilmesi, bunların evrelendirme sistemine dahil edilmesini zorunlu kılmıştır. Ticari olarak temin edilebilen, gen bazlı analizlerin önemi anlaşılmış ve prognoz için önemli olduğu kabul edilmiştir. Tümör biyobelirteçleri prognoz ve evrelemeyi değiştirebilir. Bu güncellemelerin evrelendirme sistemine ek hassasiyet ve esneklik sağlaması beklenmektedir. Böylece, AJCC TNM evreleme sisteminin 8. baskısı, hasta biyobelirteçleri ve çok faktörlü prognostik paneller kullanılarak değiştirilebilen ve geliştirilebilen geleneksel anatomik faktörlere dayanan prognostik sınıflandırma için esnek bir platform sağlamıştır. Sekizinci baskı, meme kanseri evrelemesinde dünya çapında bir temel olmaya devam etmektedir (Giuliano ve ark., 2017).

2.1.4. Meme Kanseri Tedavisi

In situ duktal karsinomanın ilerleme potansiyelinin belirlemenin kesin bir yolu olmadığı için tanı sonrası cerrahi ve/veya hormon tedavisi yapılmaktadır (Elshof ve ark., 2015; Francis ve ark., 2015). Klasik *in situ* lobüler karsinoma ise cerrahi tedavi gerekmez. Ancak daha agresif *in situ* lobüler karsinoma için optimal tedavi konusunda bir fikir birliği söz konusu değildir (Morrow ve ark., 2015; Wazir ve ark., 2016). Erken evre meme kanserli kadınların çoğu, nüks riskini azaltmak için radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi ve/veya hedeflenmiş tedavi gibi sıklıkla başka tedavilerle kombine edilen bir tür ameliyat geçirmektedir. Metastaz olduğu durumda hastalar öncelikle kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve hormonal tedaviyi içeren sistemik tedaviler ile tedavi edilmektedir. Lenf düğümlerinde kanser hücrelerinin varlığı hastalığın tekrarlama riskini artırır ve bu nedenle ileri tedavi ihtiyacını belirleme konusunda önemlidir (American Cancer Society, 2017).

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınların veya partiküllerin kullanılmasıdır. Ameliyattan sonra meme, göğüs duvarı veya koltuk altı bölgesinde kalan kanser hücrelerini yok etmek amacıyla tercih edilebilmektedir (Darby ve ark., 2011). Radyasyon ayrıca, özellikle merkezi sinir sistemine veya kemiklere yayılmış meme kanserinin semptomlarını tedavi etmek için

de kullanılabilmektedir. Sistemik terapi ise kan dolaşımından geçen ve vücudun hemen her yerini etkileyen bir tedavi yöntemidir. Sistemik terapi, hepsi farklı mekanizmalarla çalışan kemoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviyi içermektedir. Örneğin, kemoterapi ilaçları genellikle kanser hücreleri gibi hızlı çoğalan hücreleri hedef alarak etki göstermektedir. Hormon tedavisi bazı kanserlere neden olan hormonların seviyelerini düşürme ya da vücudun doğal hormonlarını bloke etme mekanizmasına sahiptir. Hedefe yönelik tedavi kanser hücrelerinde daha yaygın ifade olan ya da spesifik moleküllere etki etmektedir (American Cancer Society, 2017).

Hastalara cerrahi öncesi verilen sistemik tedaviler neoadjuvan tedavi olarak adlandırılmaktadır. Bu tedavi büyük meme tümörlerinde genellikle cerrahi rezeksiyonu daha kolay ve daha az kapsamlı hale getirmek amacıyla tümörü küçültmek için kullanılır. Neoadjuvan sistemik tedavinin, ameliyat sonrası sağkalım ve uzak nüks açısından verilen aynı tedavi kadar etkili olduğu bulunmuştur (Mauri ve ark., 2005). Ameliyat sonrası hastalara verilen sistemik tedavi ise adjuvan tedavi olarak adlandırılmaktadır. Bu tedaviler de vücudun diğer bölümlerine invaze olan saptanmamış tümör hücrelerini öldürmek için kullanılmaktadır. Sistemik tedavi, metastatik meme kanserli kadınlar için ana tedavi seçeneğidir (American Cancer Society, 2017).

Kemoterapinin faydası, tümörün boyutu, lenf nodu sayısı, ER veya PR'nin varlığı ve kanser hücrelerinde HER2 aşırı ekspresyonunun varlığı gibi birçok faktöre bağlıdır (Carey ve ark., 2007). Araştırmalar, ilaç kombinasyonlarının erken evre meme kanserinin tedavisi için tek bir ilaçtan daha etkili olduğunu ve bir kemoterapi rejimi seçerken çeşitli seçeneklerin bulunduğunu göstermiştir. Kullanılan ilaçların kombinasyonuna bağlı olarak, adjuvan ve neoadjuvan kemoterapi genellikle 3-6 ay boyunca verilir. HR+ meme kanseri olan hastalara östrojen seviyelerini düşürmek veya östrojenin meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini bloke etmek için hormon tedavisi verilebilmektedir (American Cancer Society, 2017).

Tamoksifen, östrojenin meme dokusundaki etkilerini bloke eden, ancak karaciğer, uterus ve kemikler gibi diğer dokularda östrojenik etkileri olan bir tedavidir. Tamoksifen hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası kadınlarda hem erken hem de ileri derecede HR+ meme kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Erken evre HR+ meme kanserinin en az 5 yıl boyunca tamoksifenle adjuvan tedavisinin, ilk on yılda nüks oranını yaklaşık %40-50 oranında azalttığı ve meme kanseri ölüm oranını ilk 15 yılda üçte bir oranında azalttığı gösterilmiştir (Davies ve ark., 2011).

Letrozol, anastrozol ve ekzemestan gibi aromataz inhibitörleri (AI'ler), hem erken hem de ileri düzey HR+ meme kanserini tedavi etmek için kullanılan başka bir ilaç sınıfıdır. AI'nın genellikle HR+ meme kanserli postmenopozal kadınların tedavisinde kullanılması önerilmektedir. HR+ tümörlü premenopozal kadınların çoğunda tedavinin temeli tamoksifendir (Burstin ve ark., 2014).

Fulvestrant, metastatik meme kanserini tedavi etmek için kullanılan başka bir tedavi seçeneğidir. Östrojen reseptör ifadesini azaltan ve östrojen bağlanmasını bloke eden intramüsküler enjeksiyonla verilen bir anti-östrojen ilaçtır (American Cancer Society, 2017).

Meme kanserlerinin yaklaşık %17'si, büyümeyi teşvik eden protein HER2'yi aşırı ifade etmektedir ve bu alt tipin tedavisi için birçok ilaç onaylanmıştır. İlk onaylı ilaç olan trastuzumab, HER2 proteinini doğrudan hedef alan monoklonal bir antikordur. Bu ilaç HER2+ meme kanseri standart tedavisinin bir parçası olarak kabul edilmiştir (Romond ve ark., 2005).

2.2. Kodlamayan RNA'lar

Moleküler biyoloji ve genetik alanında kullanılan teknolojiye gözlenen hızlı gelişme ile birlikte RNA dünyası ve farklı transkriptlerin işlevleri de daha detaylı anlaşılmaya başlanmıştır. Gen ifadesi düzenlenmesinin transkripsiyon faktörleri ve diğer proteinler ile gerçekleştiğinin ötesinde bilgiler ENCODE (DNA Elementleri Ansiklopedisi) gibi geniş çaplı genom çalışmalarıyla ortaya konulmuştur. Bu bilgiler genomun çok büyük bir kısmının kodlamayan RNA'lar olduğu ve bunların önemli rollere sahip olduğunun anlaşılması olarak karşımıza çıkmaktadır. ENCODE projesi ile birlikte transkripsiyon, kromatin yapısı ve histon modifikasyon bölgeleri sistematik olarak haritalanmıştır. Bu veriler protein kodlayan bölgelerin dışında genomun %80'inin fonksiyonlarının anlaşılmasını sağlamıştır. Keşfedilen aday düzenleyici elementlerin çoğu fiziksel olarak birbiriyle ve ifade edilen genlerle

ilişkilidir. Ayrıca bu bilgiler gen düzenlenme mekanizmaları hakkında bilgiler sağlamaktadır (ENCODE Project Consortium, 2012).

İnsan genomunun %90'ı transkribe olmasına rağmen genom sekansının sadece %2'sinin protein kodlayan genler olduğu bilinmektedir (Gibb ve ark., 2011). Gelişen moleküler teknikler ile birlikte transkriptomun insan hastalıklarında önemli role sahip ve gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak işlev gören çeşitli fonksiyonel kodlamayan RNA sınıflarını da içerdiği görülmüştür (Taft ve ark., 2010). Kodlamayan RNA'lar uzun kodlamayan RNA'lar ve küçük kodlamayan RNA'lar olmak üzere iki ana sınıf altında toplanmaktadır. Bu RNA'lar gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak görev almaktadır (Lewis ve ark., 2003).

2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar

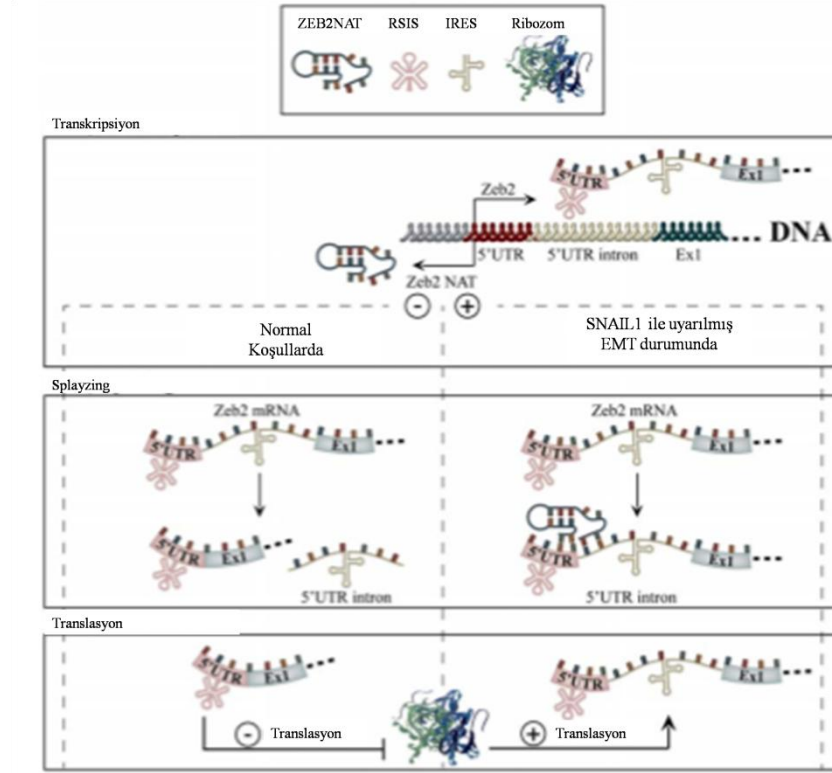
Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ortalama 200 bp - 100 Kbp büyüklüğündedir. Her ne kadar lncRNA'larda ekzon bölgeleri içersede, mRNA'dan farklı olarak daha az ekzon bölgelerine sahiptirler. Ayrıca lncRNA'lar çoğunlukla mRNA'lar gibi RNA polimeraz II tarafından transkribe edilmektedir. lncRNA'lar splayzing, 5' başlık eklenmesi ve 3' poliadenilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlara uğrayabilmektedirler (Derrien ve ark., 2012). lncRNA'lar gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak rol oynamaktadırlar. Sekanslama tekniklerinin gelişmesiyle çok sayıda lncRNA tanımlanmıştır. Ayrıca bu lncRNA'ların özellikle son yıllarda birçok hastalığın yanı sıra kanser biyolojisindeki yeri de ortaya konmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015a; Zhao ve ark., 2015). lncRNA'ların, hastalık patogenezi yanında gelişim, farklılaşma ve hücre kaderi gibi çeşitli fonksiyonel rollere de sahip olduğu belirlenmiştir (Rinn ve ark., 2007; Guan ve ark., 2013; Kung ve ark., 2013; Lee ve Bartolomei, 2013). Çok sayıda lncRNA tanımlanmasına rağmen fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak literatürde bazı kanser tiplerinde ekspresyonlarının farklılıklar gösterdiği lncRNA'lar ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Brunner ve ark., 2012).

2.2.1.1. ZEB2NAT

Derin DNA dizileme çalışmaları ile birlikte protein kodlayan sense genlerin büyük bir kısmının doğal antisense transkriptleri (NAT) olarak bilinen antisense transkripsiyon da sergiledikleri görülmüştür (Katayama ve ark., 2005; Engstrom ve

ark., 2006). Bu doğal antisense transkriptler uzun kodlamayan RNA'lar olarak sınıflandırılabilir. ZEB2 transkripsiyon faktörü, EMT ve bir epitelyal fenotipin kaybı ile yakından ilişkilendirilmektedir (Gheldof ve ark., 2012). İlk çalışmalar ZEB2 geninin bir doğal antisense transkript varlığını ortaya koymuş ve daha sonraki araştırmalar ile bu transkriptin ZEB2 ifadesinin düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu bulunmuştur (Nelles ve ark., 2003; Beltran ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışma ile SNAIL1 ile EMT'nin uyarılmasından sonra ZEB2 protein ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir. SNAIL1 ZEB2 mRNA sentezini etkilememiş ancak ZEB2 mRNA transkriptinin 5'-UTR bölgesinde bulunan büyük bir intronun işlenmesini engellemiştir. Bu intron ZEB2'nin ifadesi için gerekli olan iç ribozom giriş bölgesi (IRES; internal ribosome entry sequence) içermektedir (Beltran ve ark., 2008). Ayrıca ZEB2 transkripti, 5'-UTR bölgesinde ZEB2 translasyonunun düşük seviyelerine neden olan bir ribozom tarama inhibitör dizisini (RSIS; a ribosome scanning inhibitory sequence) barındırır (Serviss ve ark., 2014). ZEB2 5'-UTR intronunun korunması intronda 5' splayz bölgesi ile çakışan doğal bir antisense transkriptin (NAT) ifadesine bağlıdır. Epitel hücrelerde bu NAT'ın aşırı ifadesi ZEB2 ribozomal bağlanmayı sağlayarak protein ifadesinin artmasına neden olan ZEB2 5'-UTR'sinin splayzingini önler. 5'-UTR intronunun korunması ve NAT ifadesi arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ZEB2 ekspresyonunu aktive eden ve ZEB2NAT olarak tanımlanan bir NAT varlığı ortaya konulmuştur (Beltran ve ark., 2008; Şekil 2.2).



Şekil 2.2. ZEB2NAT mekanizması (Serviss ve ark., 2014).

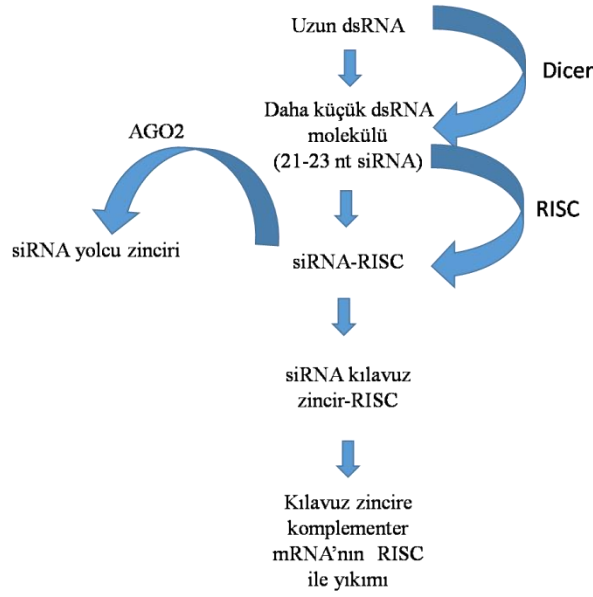
2.2.2. Küçük Kodlamayan RNA'lar

RNA interferans (RNAi) son dönemlerde oldukça yaygın kullanılan transkripsiyon sonrası gen ifadesi baskılama mekanizmasıdır. RNAi ilk önce 1998 yılında Fire ve Mello tarafından *C. elegans*'ta eksojen RNA tarafından etkin gen susturma mekanizmalarını araştıran Nobel ödüllü çalışmasına dayanarak tanımlanmıştır (Fire ve ark., 1998). Son yıllarda keşfedilen küçük interferans RNA'lar (siRNA'lar) ve mikroRNA (miRNA'lar) gen düzenlemesinde önemli rol oynayan kodlamayan RNA'lardır. Bu RNA'lar kanserler ve enfeksiyonlar da dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için potansiyel terapötik ajan sınıfları olarak araştırılmaktadır. siRNA ve miRNA etki mekanizmalarında farklılıklar olmasına rağmen çok fazla ortak özelliğe sahiptir. Her ikisi de mesajcı RNA'yı (mRNA) hedefleyerek transkripsiyon sonrası seviyede gen susturma etkilerine sahip küçük RNA molekülleridir. siRNA'lar ve miRNA'lar arasındaki en büyük fark, siRNA'ların sadece bir mRNA hedefine oldukça spesifik olması, miRNA'nın ise çoklu hedeflere sahip olmasıdır (Lam ve ark., 2015).

2.2.2.1. siRNA ile Gen Susturulması

Genel olarak, ya hücrel genlerden kopyalanan ya da enfekte edici patojenleri kopyalayan ya da yapay olarak hücrelere sokulan dsRNA, sitoplazmada Dicer isimli özel bir ribonükleaz (RNase) III-benzeri enzim tarafından daha küçük bir dsRNA molekülüne işlenmektedir. Bu kısa dsRNA molekülü, 3' ucunda iki nükleotit çıkıntısı olan 21-23 nükleotide sahip siRNA olarak bilinmektedir. siRNA, RNA aracılı indüklenen susturma kompleksi (RISC; RNA-induced silencing complex) ile etkileşime girer ve bu kompleksi aktive etmektedir. RISC'nin endonükleaz argonaute 2 (AGO2) bileşeni, siRNA'nın yolcu zincirini (sense zincir) ayırırken, kılavuz zincir (antisens zincir) RISC ile ilişkili kalmaktadır. Daha sonra kılavuz zincir, aktif RISC'yi, AGO2 ile ayrılması için hedef mRNA'sına yönlendirir. Kılavuz zincir sadece komplementeri olan mRNA'ya bağlanır ve RISC aracılığı ile siRNA spesifik gen susturma işlemine (Şekil 2.3) neden olur (Fire ve ark., 1998; Elbashir ve ark., 2001; Agrawal ve ark., 2003; Pecot ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda sentetik siRNA'ların kullanılması ile hedef genin susturulması yoluyla genlerin fonksiyonları araştırılabilmektedir. Bu tez çalışmasında da siRNA mekanizması kullanılarak lncRNA ZEB2NAT'ın susturulmasıyla insan meme kanseri hücrelerinde EMT, metastaz ve apoptoz üzerindeki fonksiyonları araştırılmıştır.



Şekil 2.3. siRNA mekanizması.

2.3. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Metastaz

2.3.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Mezenkimal-Epitelyal Geçiş (MET), epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler arasında dönüşümden bahsedilmektedir. EMT olayları kanser gelişimi dışında da büyük öneme sahiptir. Spesifik olarak, EMT yetişkinlerde yara iyileşmesi ve doku onarımının yanı sıra embriyonik dönemde gastrulasyon sırasında mezoderm oluşumu, nöral krest olgunlaşması, organ morfogenezi için de kritik öneme sahiptir (Yan ve ark., 2010).

Epitelyal kanser hücrelerinin mezenkimal özellikler kazanması tümörün yayılmasında önemli yer tutmaktadır. Bu süreçte epitelyal hücreler hareketli bir fenotip kazanmak için hücre iskeleti elemanlarının yeniden organize olmalarıyla diğer epitelyal hücreler ile bağlantısını kaybederler. Bu aşamada epitelyal hücreler E-kaderin ve epitelyal sitokeratin gibi hücre-hücre bağlantı proteinlerinin ifadesinin azalmasına neden olan proteinlerin ifadesindeki değişiklikler ile epitelyal özelliklerini kaybedip fibronektin, vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal ilişkili proteinleri ifade etmeye başlamaktadırlar. E-kaderin ifadesinde azalma gelişim, doku fibrozu, yara iyileşmesi ve kanser gelişimi ile ilişkili EMT sürecinde neredeyse her zaman gözlenir. Bu nedenle E-kaderin kaybı EMT olayları için belirteç olarak kabul edilmektedir (Hay ve Zuk, 1995).

E-kaderinin aktin iskeletine bağlanmasında p120, α -, β - ve γ -kateninler ile etkileşimi önemlidir. E-kaderin-katenin kompleksinin hücre içi yıkımı hücre-hücre adezyonunun kaybı için yeterlidir. Ayrıca epitel doku bu nedenle karakteristik doku sertliğini de kaybetmektedir (Christofori ve Sembl, 1999). Aktif Wnt/ β -katenin sinyali ve nüklear β -katenin birikmesinin meme kanserinde EMT, invazyon ve zayıf prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Prasad ve ark., 2009). Kısaca, E-kaderin kaybı, nüklear β -katenin lokalizasyonu ve mezenkimal kaderin ekspresyonlarının kazanılması metastatik potansiyel ve EMT için anahtar belirteçler olarak tanımlanmaktadır.

Mezenkimal özellikleri kazanan hücreler daha hareketli bir fenotip kazanmak için kendi fizyolojilerini değiştirirler ve dokulara invazyon ve migrasyonda önemli rol oynayan matriks proteazları ifade etmeye başlarlar (Hay ve Zuk, 1995). EMT ile mezenkimal özellik kazanan hücreler daha sonra sekonder epitel hücreleri oluşturabilmek için MET potansiyeline sahiptir (Chaffer ve ark., 2007).

Tümör metastazının ilk aşamalarında kanser hücrelerinin primer tümör bölgesinden ayrılarak kan dolaşımı ve/veya lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine göç ettiği karmaşık bir dizi olay meydana gelmektedir. Metastazın gerçekleşmesi hücrelerinin yayılma, migrasyon ve çevre dokuları istila etmek için gerekli özellikleri kazanmasına bağlıdır. Bu durumda EMT ile sonuçlanan gelişimsel yolların yeniden aktif hale gelmesi, uzak metastazın oluşmasında ve hücrelerin bu yetenekleri kazanmasında bir muhtemel mekanizma olarak görülebilmektedir. Gelişimsel ve onkogenik EMT arasında oldukça fazla benzerlik tanımlanmış ve bu benzerlikler EMT'yi düzenleyen ortak sinyal yollarının ve transkripsiyonel düzenleyicilerinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Bu yolların ve faktörlerin anormal düzenlenmesi *in vitro* ve *in vivo* modellerde metastatik potansiyelin artması ile ilişkilidir ve kötü klinik sonuçlar ile de uyumludur (Amatangelo ve ark., 2012).

2.3.1.1. EMT'nin Sınıflandırılması

Gelişimsel EMT ve onkogenik EMT oldukça benzer olmasına rağmen, Kalluri ve Weinberg (2009) EMT'yi üç farklı sınıfta değerlendirmiştir. Erken embriyo ve organ gelişmesi ile ilişkili EMT olayları tip-1 EMT olarak kabul edilmektedir. Tip-2 EMT olayları yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve fibrozis ile

ilişkilidir. EMT'nin bu tipi inflamasyona yanıt olarak yetişkin dokularında ortaya çıkmaktadır. Tip-3 EMT ise karsinoma hücrelerinin mezenkimal hücreler için karakteristik olan invaziv ve hareketliliğe sahip fenotipi kazanmasındaki süreç olarak tanımlanmaktadır.

2.3.1.2. İskelet Dinamiklerindeki Değişiklikler

EMT ile ilgili çalışmalar bu süreçte vimentin ifadesinin önemli role sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Vimentin mekanik strese karşı hücreyi koruyan mezenkimal bir ara filamenttir (Pekny ve Lane, 2007). İnvaziv bir fenotip için karsinom ilerlemesine kanserlerin çoğunda vimentin ifadesi artışının eşlik ettiği bilinmektedir (Lang ve ark., 2002; Hu ve ark., 2004; Otsuki ve ark., 2011). Ancak patoloğlar kanserde vimentin ifadesinde her zaman önemli artış gözlemlemedikleri gibi benign tümörlerde de bazen artmış vimentin ifadesine rastlandığını belirtmektedir (Heatley ve ark., 1995). Vimentin ifadesi hücre iskeleti dinamiklerindeki değişikliklerden dolayı EMT ve metastatik potansiyel için önemli pozitif belirteç olarak görülebilmektedir.

2.3.1.3. Matriks Yeniden Düzenlenmesi

Epitel dokular normalde invazyon için engel teşkil eden bazal membran olarak adlandırılan laminin ve tip-4 kollajen proteinleri bakımından zengin bir ECM (ekstraselüler matriks) ile sarılıdır (Lee ve ark., 2007). Bazal membran kaybı kanser invazyonunda anahtar basamaktır ve çoğu epitel karsinomalarda zayıf prognoz en güvenilir belirteci olarak kabul edilmektedir (Barsky ve ark., 1983). Fibronektin ile fibronektin reseptörü olan $\alpha_5\beta_1$ integrinin bağlanması hücresel uzantıların oluşturulması ve hücre hareketini indüklemeye önemlidir (Davidson ve ark., 2006).

EMT sürecinde ECM yıkımı önemli aşamalardan biri olmakla birlikte, matriks metalloproteinazlar (MMP) olarak adlandırılan bir proteinaz ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. MMP'ler yapısal olarak bir sinyal peptid, çinko bağlayıcı bölge içeren katalitik kısım ve bir c-terminal kuyruk kısmı bulundurlar ve kalsiyum bağımlı proteazlardır (Sato ve ark., 1994). Ayrıca ECM'nin tüm elemanlarını yıkma özelliğine sahiptirler. MMP'ler fiziksel bariyerleri yıkabildiği için hücreleri invazyon, intravazasyon, ekstrasvazasyon ve migrasyona teşvik edebilmektedir. Bu nedenle MMP'ler antimetastaz tedavileri için moleküler hedef olarak

görülmektedirler. Ancak MMP'ler fetal gelişim sürecinde ve doku tamirinde ECM'nin yeniden düzenlenmesinde rol oynadığı gibi derinin otoimmün olayları, romatoid artrit ve osteoartrit gibi patolojik durumlarda da MMP seviyelerinde artışlar görülmektedir. Serum MMP seviyelerinin artışında en önemli patolojik durumlardan biri de kanserdir (Hidalgo ve Eckhardt, 2001; Bourboulia ve Stetler-Stevenson, 2010). MMP'ler büyüme faktörlerinin aktivasyonu, tümör hücre apoptozunun baskılanması ve anjiogenik faktörlerin salınımında da önemlidir (Hojilla ve ark., 2003).

2.3.1.4. EMT Sürecinde Sinyal Ağı

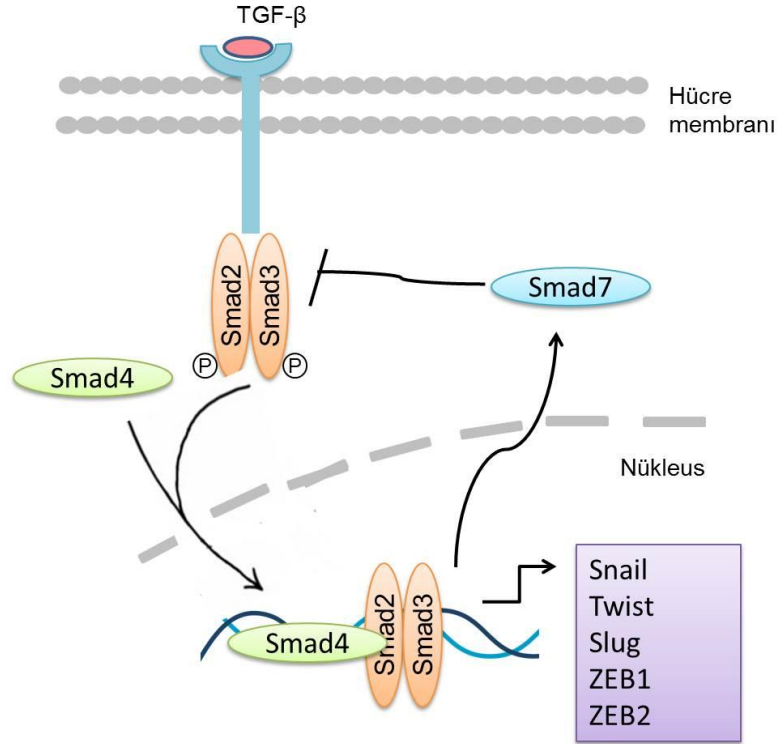
EMT nin 3 tipinde de EMT; TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve Ras, HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü) ve FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog gibi sinyal yolları aracılığı ile indüklenir. Bu yollardaki anormallikler farklı kanser türlerinde tümör gelişimi ve metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiştir (Amatangelo ve Stearns, 2012).

2.3.1.4.1. TGF- β Sinyal Yolu

TGF- β normal, gelişimsel ve malignant dokularda EMT'nin ana düzenleyicisi olarak fonksiyon gösterebilen bir sitokindir. Tipik kanser hücrelerinde, TGF- β metastazda kritik rol oynayan EMT'yi indüklediği ve çeşitli kanserlerde de kemoterapiye dirençle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Parikh ve ark., 2014).

Memelilerde TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 farklı TGF- β izoformu ifadesi görülmektedir. TGF- β sinyal yolu TGF- β tip-1 reseptörü Smad proteinlerini fosforilemekte ve aktif hale getirmektedir. TGF- β ailesi Smad2 ve 3'ü aktive etmektedir. Bu aktivasyon gerçekleştiğinde bu proteinler sitoplazmada Smad4 ile heterodimer oluşturur ve nükleusta TGF- β cevap genlerini düzenlerler. TGF- β cevap genlerinden biri Smad7'dir ve negatif feedback olarak fonksiyon göstermektedir. Smad7 ifadesi TGF- β tip-1 reseptörü ile daha fazla Smad proteinin etkileşimini engellemektedir (Hayashi ve ark., 1997; Kavsak ve ark., 2000). TGF- β 1; integrinlerin, integrin ligandlarının ve integrin ilişkili proteinlerin ifadesini düzenleyerek integrin aracılı hücre adezyonu ve migrasyonunu etkilemektedir (Margadant ve Sonnenberg, 2010). TGF- β EMT'yi indükleyen ana faktörlerden

biridir ve Snail, Twist, Slug, ZEB1 ve ZEB2'nin aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.4; Thiery ve ark., 2009).



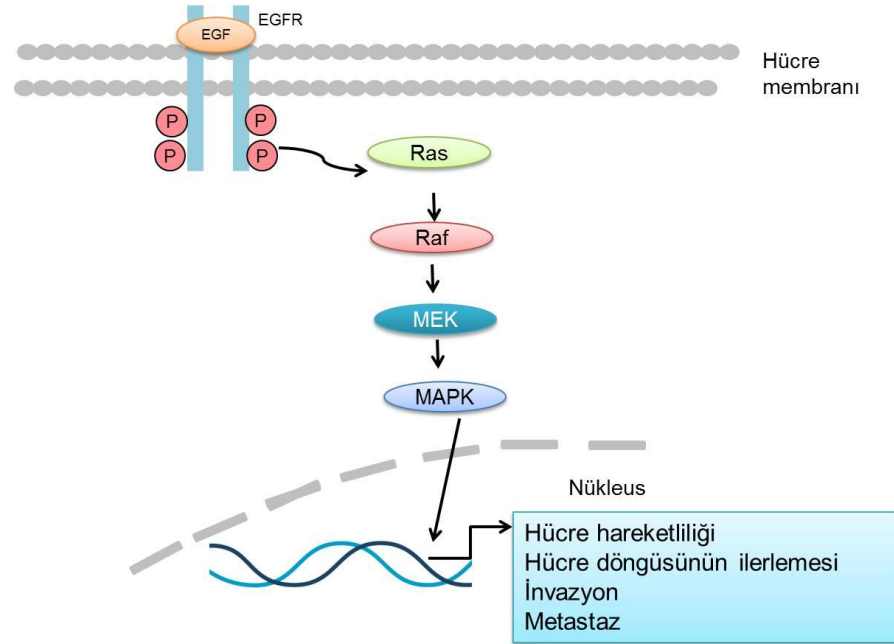
Şekil 2.4. TGF-β sinyal yolağı.

Son yıllarda yapılan moleküler düzeyde çalışmalar TGF-β uyarımı ve TGF-β reseptör aktivitesinin E-kaderin ve sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesinin azalmasına neden olduğu açığa çıkartılmıştır (Pardali ve Moustakas, 2007). Ayrıca PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz) ve PTEN'inde (fosfataz ve tensin homoloğu) E-kaderin-katenin adezyon kompleksi ile ilişkili olduğu ve TGF-β1 indüklü α ve β -katenin'in fosforilasyonunda önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Vogelman ve ark., 2005).

2.3.1.4.2. EGF ve Ras Sinyal Yolağı

ErbB reseptör ailesi, epidermal büyüme faktör (EGF) reseptörü (EGFR, ErbB1, HER1), ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) olmak üzere 4 reseptör tirozin kinaz üyesi içermektedir (Linggi ve Carpenter, 2006). ErbB reseptör sinyal yolağı aracılığıyla hücre-hücre bağlantılarının kaybı, epitelyal hücre polarite kaybı, migrasyon ve invazyon olayları indüklenebilmektedir (Normanno ve ark., 2006). EGFR ve EGF ailesi farklı kanser tiplerinin patogenezinde ve ilerlemesinde merkezi bir role sahiptir (Normanno ve ark., 2001). EGFR'nin hücre

dışı domainine ligand bağlandığı durumda EGFR homodimerize olur ve aktiflenir. Bu homodimerizasyon hücre içi tirozin kinaz domaininin fosforilasyonuna neden olmaktadır. EGFR'nin aktivasyonu Ras/Raf/MAPK (mitogen aktive edici protein kinaz) sinyal yolağının aktivasyonunu içeren bir seri hücre içi sinyali başlatır (Altieri ve ark., 2013; Şekil 2.5). Ras ailesi çoğu büyüme faktör reseptörleri tarafından aktiflenmektedir. Bu reseptörlerdeki bazı mutasyonlar sonucu Ras sinyal yolağı aşırı aktiflenmekle birlikte bu anormal aktivasyona çoğu kanser türünde rastlanmaktadır (Marshall, 1996). Ras-Raf-MAPK sinyali ve TGF- β sinerjistik olarak E-kaderin degradasyonunda önemli rol oynamakla birlikte MMP-2, MMP-12 ve MMP-13 ifadesinde artışa da neden olduğu görülmüştür (Jechlinger ve ark., 2003; Janda ve ark., 2006).

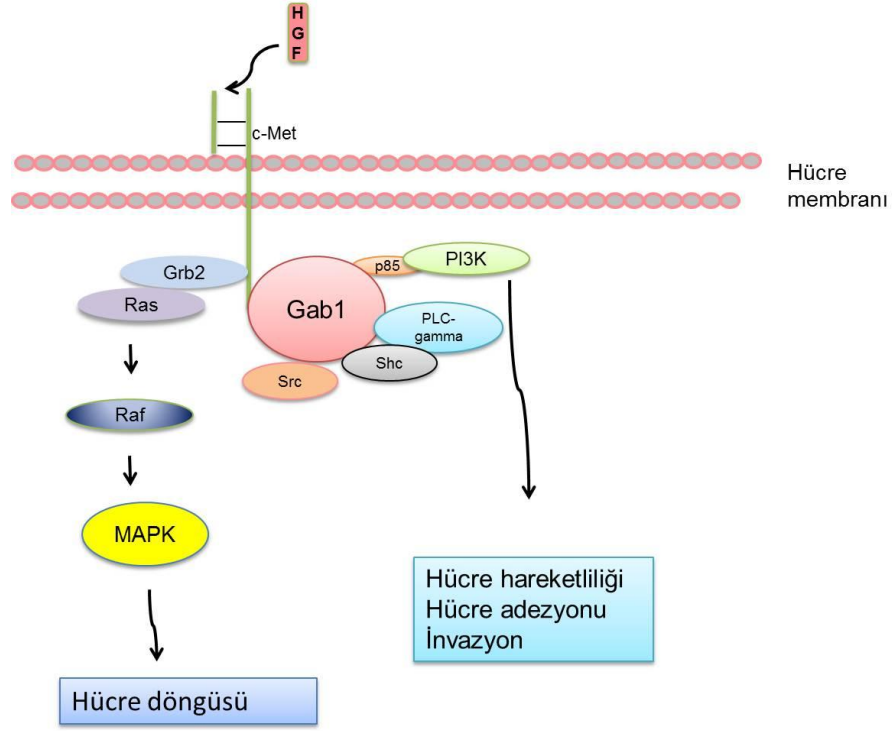


Şekil 2.5. EGF ve Ras yolağı.

2.3.1.4.3. HGF ve FGF Sinyal Yolağı

TGF- β ve EGF'nin yanı sıra özellikle FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve HGF (hepatosit büyüme faktörü) başta olmak üzere diğer büyüme faktör reseptör yolakları da EMT'nin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. HGF, p85 (PI3K'ın altbirimi), Grb2 ve Shc adaptör proteinleri için yerleşme bölgeleri oluşturan tirozinlerin dimerizasyonu ve otofosforilasyonuna neden olan c-Met'e bağlanır. Böylece Ras-MAPK, PI3K, PLC-gamma ve Src kinaz yolağı aktive edilir (Amatangelo ve Stearns, 2012; Şekil 2.6). HGF'nin, hücre hareketliliği ve

invazivliğinin yanı sıra EMT'yide indüklediği bilinmektedir (Uehara ve Kitamura, 1992).



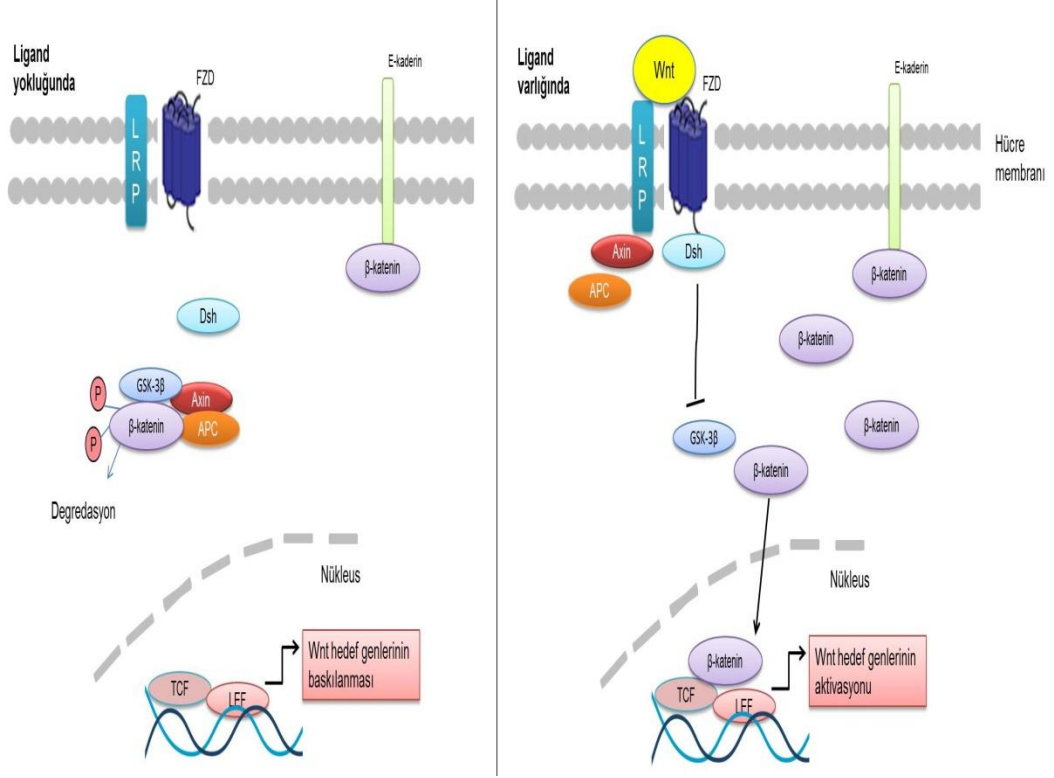
Şekil 2.6. HGF sinyal yolağı.

FGF ligand ailesi en az 23 üyeden oluşmakta ve 4 yüksek afiniteli reseptör tirozin kinaz (FGFR-1, 2, 3 ve 4) aracılığı ile sinyal iletimi gerçekleştirmektedir. FGF sinyal yolağı hücre hareketliliğini ve invazyonu arttırmada önemli rol oynamaktadır (Turner ve Grose, 2010).

2.3.1.4.4. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı yetişkin doku gelişim sürecinde, organ gelişiminde önemli role sahiptir. Ayrıca kanser kök hücre pluripotensinde oldukça merkezi role sahip yolaklardan biridir (Logan ve Nusse, 2004; Nusse ve ark., 2008). β -katenin, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının merkezi düzenleyicisidir. Wnt sinyal yolağı çeşitli hücre içi faktörler tarafından aktiflenir. Wnt ligandları FZD (Frizzled) ve LRP (Low-density lipoprotein receptor-related protein) gibi hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma ile APC ve Axin proteinleri aktiflenir. APC ve Axin proteinlerinin aktive edilmesi GSK-3 β 'nın defosforilasyonuna neden olur. Böylece Wnt ligand varlığı β -katenin'in sitoplazmada birikmesiyle sonuçlanır. β -katenin'in artan ifadesi LEF

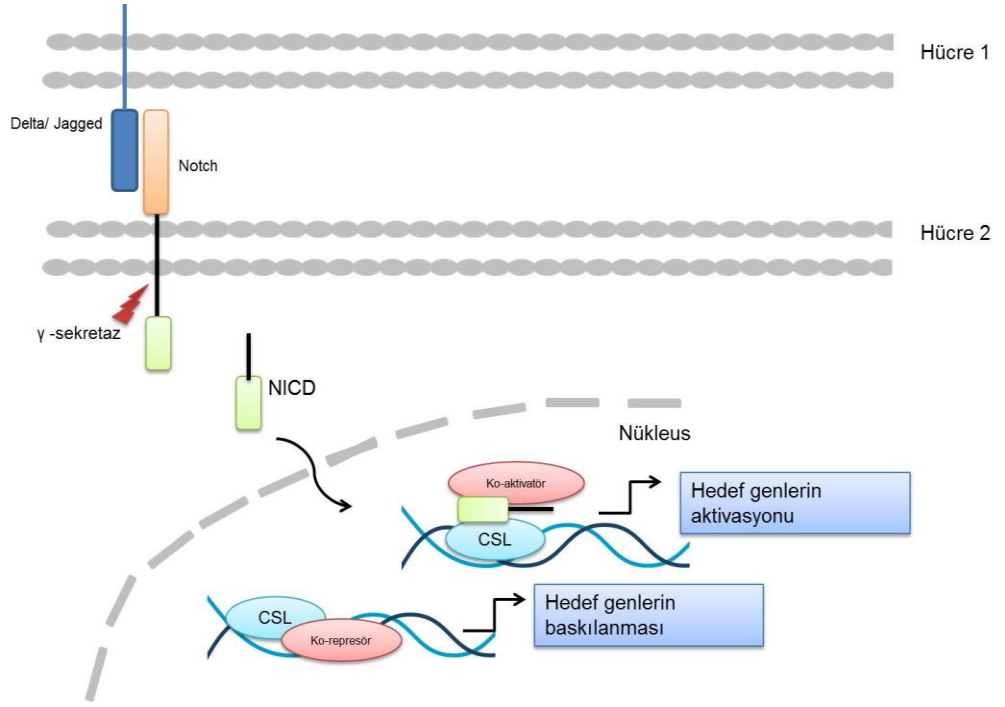
(lymphoid enhancer factor) ve TCF (T-cell factor) ile kompleks oluşturmak için nükleusa geçişine neden olur ve Wnt hedef genlerinin ifadesi düzenlenir (Clevers ve Nusse, 2012; Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Wnt/ β-katenin sinyal yolağı.

2.3.1.4.5. Notch Sinyal Yolağı

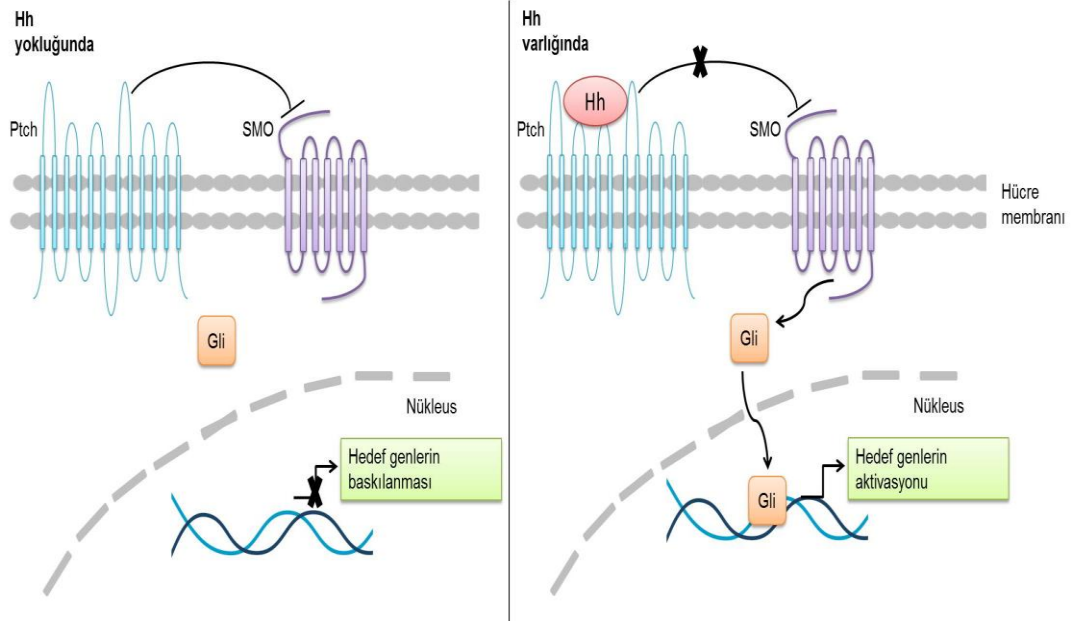
Memelilerde Notch-1, Notch-2, Notch-3 ve Notch-4 olmak üzere dört Notch reseptör izotipi, Deltalike-1, -3, -4, Jagged-1 ile Jagged-2 olmak üzere de beş ligand ifade edilmektedir. Bu yolak iki farklı kısımda Notch reseptörünün proteolitik kesimine neden olan Jagged veya Deltalike ligandı ile Notch reseptörünün etkileşimi aracılığıyla aktive edilir. Daha sonra Notch intraselluler domaini (NICD) gamma-sekretaz aracılığıyla kesilir ve bu kısım nükleusa transloke olur. NICD nükleusta transkripsiyonel represör RBP-JK'ya (CSL/CBF-1) bağlanır ve aktif transkripsiyonel kompleks oluşur (Şekil 2.8). Notch ifadesinin çoğu insan kanserlerinde yüksek olduğu bilinmektedir (Penton ve ark., 2012).



Şekil 2.8. Notch sinyal yolağı.

2.3.1.4.6. Hedgehog Sinyal Yolağı

Sonic hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) ve Desert hedgehog (Dhh) olmak üzere 3 homolog hedgehog ligandı bulunmakla birlikte hedgehog sinyali, Patched (Ptch) ve Smoothed (SMO) transmembran reseptörleri ile işbirliği içindedir. Hedgehog (Hh) ligandı reseptöre bağlandıktan sonra SMO'nun inhibitör etkisi salınır ve Gli kompleksi nükleusa geçer ve hedgehog hedef genlerinin aktivasyonunu artırır. Hedgehog ligandı reseptöre bağlanmadığı durumda, Ptch katalitik olarak SMO'nun aktivitesini baskılar ve yolağın alt kısmında bulunan genlerin aktivitesi engellenir (Şekil 2.9). SMO ve Gli'nin ifadesi hedgehog yolağı aktivasyonu için belirteçler. Shh, Smo, Ptch1 ve Gli1'in ifadesi akciğer skuamöz hücre karsinomalarında belirlenmiştir ve Shh yolağının aktivasyonunu göstermektedir. Gli1 ve β -katenin'in yanısıra Gli1 ve E-kaderin arasında da zıt korelasyonun olduğu görülmüştür (Yue ve ark., 2014).



Şekil 2.9. Hedgehog sinyal yolağı.

2.3.1.4.7. EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenleyicileri

Son yıllarda EMT sürecinde aşırı ifade olan Snail (SNAI1 ve SNAI2/Slug), Zeb (ZEB1 ve ZEB2/SIP1) ve basic helix-loop-helix (Twist ve Twist2) transkripsiyon faktörleri de kanser ilişkili patogeneizde EMT'nin ana transkripsiyonel düzenleyicileri olarak kabul edilmektedirler (Peinado ve ark., 2007).

Snail ve Slug

Snail (SNAI1) ve Slug (SNAI2) Snail süperailisinin üyeleri olmakla birlikte her iki transkripsiyon faktörü E-kaderin'in promotoruna bağlanır ve transkripsiyonel baskılayıcı olarak hareket etmektedir (Cano ve ark., 2000; Bolos ve ark., 2003). Ayrıca, MAPK ve PI3K sinyal yolağının Ras aktivasyonu Snail promotorunun aktivasyonunu indüklemek için TGF-beta ile işbirliği içindedir (Peinado ve ark., 2003). Snail'in tümöröenez sırasında hedgehog ve β -katenin indüklü EMT'nin ana transkripsiyonel düzenleyicisi olarak fonksiyon gösterdiği görülmüştür (Li ve ark., 2007).

Zeb1 ve Zeb2

Zeb1 (delta-EF1) ve Zeb2 (Sip1) invazyonda önemli olan E-kaderin geninin direk transkripsiyonel represörü olarak ortaya çıkan çinko parmak transkripsiyon faktörleridir ve hücrelerin invazyon kapasitelerinin artması ile ilişkilidirler (Comijn

ve ark., 2001; Eger ve ark., 2005). İki ZEB proteininde N- ve C-terminal DNA bağlanma çinko parmak motifleri arasında bir merkezi represör domaini bulundurmaktadır. ZEB proteinleri ile Smad aracılı transkripsiyonun düzenlenmesi Smadlar tarafından ZEB proteinlerinin doğrudan transkripsiyona sokulması ile gerçekleştirilebilmektedir. Ancak TGF-beta bağımlı genlerde ZEB bağlanma bölgelerinin varlığı hedef genlerde endojen ZEB ve Smad proteinlerinin konsantrasyonunda önemli olabilmektedir (Postigo, 2003).

Zeb1 ve Zeb2, reseptör tarafından aktiflenmiş Smad'larla etkileşebilme ve onların aktivitesini düzenleme yeteneğinde proteinler olarak tanımlanmaktadır (Verschueren ve ark., 1999; Postigo, 2003). ZEB proteinin ifadesinin TGF-beta, NF-kappaB ve hipoksi indüklü sinyalizasyon ile indüklendiği gösterilmiştir (Krishnamachary ve ark., 2006; Chua ve ark., 2007). ZEB proteinleri promotorlarında hipoksi response element içerir ve böbrek kanseri hücrelerinde HIF-1 α bağımlı E-kaderin baskılanmasına aracılık ettiği görülmüştür (Krishnamachary ve ark., 2006). ZEB2, dokulardan epitelyal hücrelerin ayrılmasına katkı sağlayan birkaç sıkı bağlantı, adherens bağlantı, desmozom ve gap junction proteinlerinde promotor aktivitelerinin engellenmesiyle ifadelerini baskılamaktadır (Vandewalle ve ark., 2005).

Twist1 ve Twist2

Helix-loop-helix yapılarıyla yüksek oranda korunmuş olan Twist birçok kanser türünde temel onkogenik özellikleri düzenlediği düşünülmektedir (Mironchik ve ark., 2005; Ohuchida ve ark., 2007; Khan ve ark., 2013). Snail ve ZEB transkripsiyonel faktörleri gibi HIF-1 α da Twist promotorunda HRE (hypoxia-response element)'e direk bağlanarak hipoksi sırasında Twist ifadesini düzenlemektedir (Yang ve ark., 2008). Twist1 ve Twist2 transkripsiyonel baskılama için HDAC (histon deasetilaz) kompleksleri ile etkileşmektedir (Hayashi ve ark., 2007; Koh ve ark., 2009). Twist proteinlerinin bazı EMT olayları sırasında N-kaderin ifadesinin direk artışına ve E-kaderin ifadesinin direk azalışına neden olduğu rapor edilmiştir (Alexander ve ark., 2006).

2.3.2. Metastaz

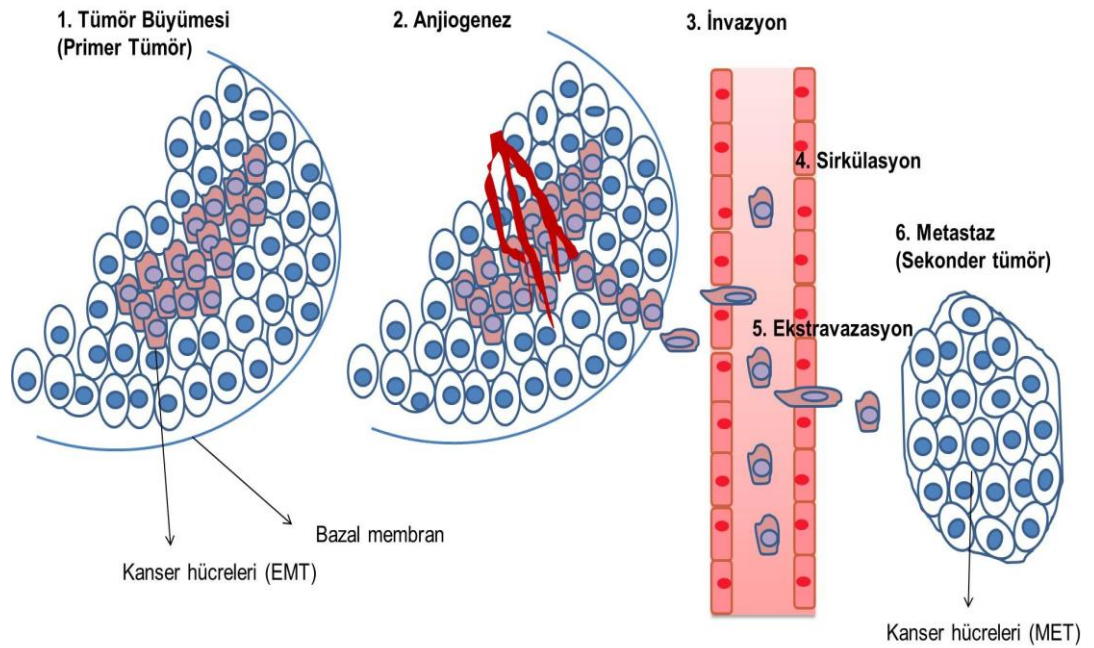
Metastaz, invazyon-metastaz kaskadında hücrenin çok basamaklı biyolojik sürecinin son aşamasıdır. Kanseri hücrelerinin anatomik olarak uzak organlara yayılması ve bununla birlikte yabancı doku mikroçevresine adaptasyonu bu kaskadlar ile sağlanmaktadır (Valastyan ve Weinberg, 2011). Ayrıca metastaz kendi özgün çevresinden ayrılarak zorlu fizyolojik engelleri aşan nadir tümör hücrelerinin yayılması ile sonuçlanan bir süreç olarak da görülebilmektedir (Nguyen ve Massague, 2007).

Metastaz sırasında adezyon kaybı, intravazasyonu gerçekleştirebilmek için invazivlik ve motilitenin artışı, lenf düğümleri ve kan damarları aracılığıyla dolaşıma katılma ve kan damarlarına bağlanma gibi olayları içeren oldukça karmaşık bir süreç olarak bilinmektedir (Fidler, 2003). Metastaz, kanser nedeniyle ölümlerin %90'ından sorumludur (Hanahan ve Weinberg, 2000). Sınırlı primer tümörler cerrahi müdahale ve adjuvan tedaviler ile tedavi edilebilirken, metastatik kanserlerin terapötik ajanlara tümör hücrelerinin direnci ve onların sistemik doğası nedeniyle tedavi edilmeleri oldukça zor bir durumdur (Steeg, 2006).

Metastazın gerçekleşmesi için kanser hücresi ve stromasının birlikte değişim göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle metastatik süreçte stroma yani mikroçevre oldukça önemlidir. Stroma, ekstraselüler matriks ve ekstraselüler moleküller ile birlikte fibroblast, glial, epitelyal, vasküler, düz kas ve immün hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler kanser hücreleri ve birbirleriyle direkt ya da dolaylı olarak etkileşerek anormal fonksiyonlar göstermektedirler. Bu anormallikler ile birlikte kanser stroma fenotipi ortaya çıkmaktadır. Fibroblastlar ve immün hücreler tarafından büyüme faktörü ve kemokin üretimi anormal tümör hücre büyümesinin direkt uyarımına neden olabilmektedir (Li ve ark., 2007).

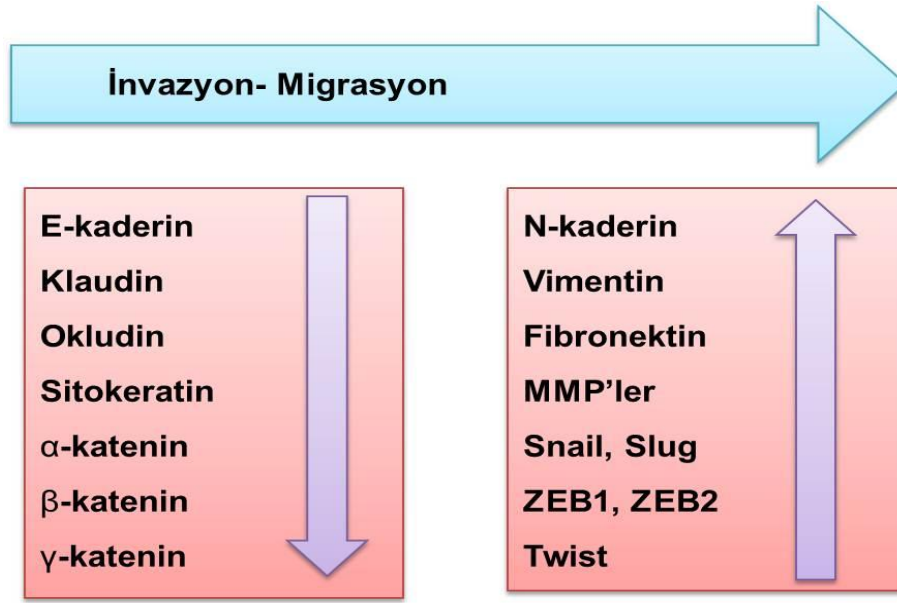
Kanser metastazı, birbiriyle bağlantılı ve arka arkaya meydana gelen birçok olay dizisinden oluşan kompleks bir süreç ile birlikte ortaya çıkmaktadır. Bu olaylardan herhangi birinde yetersizlik veya başarısızlık meydana geldiği durumda bu süreç durdurulabilir. Aşağıdaki olaylar bu sürecin ana basamaklarını oluşturmaktadır (Fidler, 2003; Şekil 2.10).

1. Hücresel değişim ve tümör büyümesi (tümör ilk aşamada basit difüzyon ile beslenir).
2. Tümör çapının 1-2 mm'yi aşması için anjiogenez olması gerekmektedir. Angiogenik faktörlerin sentezi ve salınımı konak doku etrafında kılcal ağ oluşturur (Folkman, 1986).
3. Tümör hücrelerinin konak stromaya lokal invazyonu gerçekleşir (Liotta, 1986).
4. Tümör hücreleri ayrılır ve dolaşıma geçtikten sonra ya kapiller endotel hücrelere ya da subendotelyal bazal membrana yapışarak uzak organların kapillerine geçerler (Nicolson, 1988).
5. Tümör hücreleri damar dışına çıkar (ekstravazasyon).
6. Organ içinde tümör hücrelerinin çoğalması ile metastatik süreç tamamlanır. Mikrometastazın çoğalması için bir damar ağı geliştirilmelidir. Hücreler kan damarlarına geçerek ek metastaz gerçekleştirebilmektedir (Folkman, 1986).



Şekil 2.10. Metastatik kaskadın ana basamakları.

Tümör metastazı sürecinin meydana gelmesi için öncelikle hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalan hücrelerin oluşması olarak adlandırılan tümöröenez sürecinin gerçekleşmesi ve ardından da metastazda önemli olan olayların işlemesi gerekmektedir. Bu önemli olaylar hücre fenotipini değiştiren ve hücre hareketini arttıran genlerin ifadesindeki değişiklikler ile ortaya çıkmaktadır (Nguyen ve Massague, 2007; Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Kanser metastazı sürecinde genetik belirleyiciler.

Tümör hücreleri genellikle lenfatik sistem aracılığıyla lokal lenf nodlarına invazyonu ile yayılmaktadır. Ancak agresif tümör hücreleri genellikle kan dolaşımına girer ve uzak dokulara ulaşır (Nguyen ve Massague, 2007). Tümör hücreleri invaziv özellik kazanmak için epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe dönüşmek eğilimindedir ve metastaz da bu epitelyal-mezenkimal geçiş metastazın oluşmasında anahtar noktalardan biridir.

2.4. Apoptoz

İnsan vücudu yaklaşık 10^{14} hücreden oluşmakta ve organizmanın işlevselliğini sağlamak için her gün milyarlarca hücre ölmektedir. Hücre homeostazının sağlanması amacıyla normal süreçte hücre ölümü ve hücre bölünmesi arasında bir denge söz konudur (Raff, 1992). Apoptoz, fizyolojik ve patolojik

koşullarda oluşabilen programlı bir hücre ölüm sürecidir. Kanser sürecinde apoptoz mekanizmasının baskılanması nedeniyle kontrolsüz hücre çoğalmasının meydana geldiği görülmektedir. Bu süreçte hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki denge bozulmuş ve ölmesi gereken hücreler ölüm sinyalini alamamaktadır (Wong, 2011). Apoptoz 1970'lerde Kerr ve ark. tarafından tanımlandığından beri biyolojik araştırmaların en çok araştırılan konularından biri olmaya devam etmektedir (Kerr ve ark., 1972). Apoptoza olan bu büyük ilginin nedenleri arasında özellikle apoptozun kanserde az görülmesi, parkinson, Alzheimer, spinal müsküler atrofi gibi hastalıklarda da çok görülmesi yer almaktadır (Leist ve Jaattela, 2001).

Programlı hücre ölümü terimi aslında gelişim sırasında hücre ölümünün rastgele olmadığının ve bir dizi kontrollü adım izlediğinin öne sürülmesiyle 1964 yılında ortaya atılmıştır (Lockshin ve Williams, 1964). Apoptoz, belli durumlarda bir dizi sinyal basamakları ile düzenlenen bir hücre ölümü türüdür. Apoptozun uyarılması için reseptörler, enzimler ve proteinleri içeren çeşitli sinyal moleküllerinin işbirliği gerekmektedir (Launay ve ark., 2005). Apoptotik hücre morfolojik olarak kompakt sitoplazma, hücre membranında vakuollerin oluşması, kromatin kondenzasyonu, DNA parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşması ile karakterizedir (Ziegler ve Groscurth, 2004). Apoptozda kaspazların aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması, fagositik hücreler tarafından tanınabilen hücre zarı değişiklikleri üç ana biyokimyasal farklılıkları oluşturmaktadır (Kumar ve ark., 2010).

Apoptozda kaspazlar adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivitesi önemli rol oynamaktadır. Sistein (c) proteazları olmaları, hedef proteinleri C-uçlarında bulunan aspartik asit (asp) rezidülerinden kesmeleri ve enzim (ase) olmaları nedeniyle kaspaz (caspase) olarak isimlendirilmiştir (Lavrik ve ark., 2005). Kaspaz aktivasyonu çeşitli yollar ile gerçekleşebilmektedir. Ekstrinsik veya ölüm sinyalleri aracılı hücre ölümü ve intrinsik veya mitokondri aracılı hücre ölümü olarak iki ana yolak ile kaspazlar aktive edilebilmektedir (Wong, 2011).

2.4.1. Ölüm Sinyalleri Aracılı Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak)

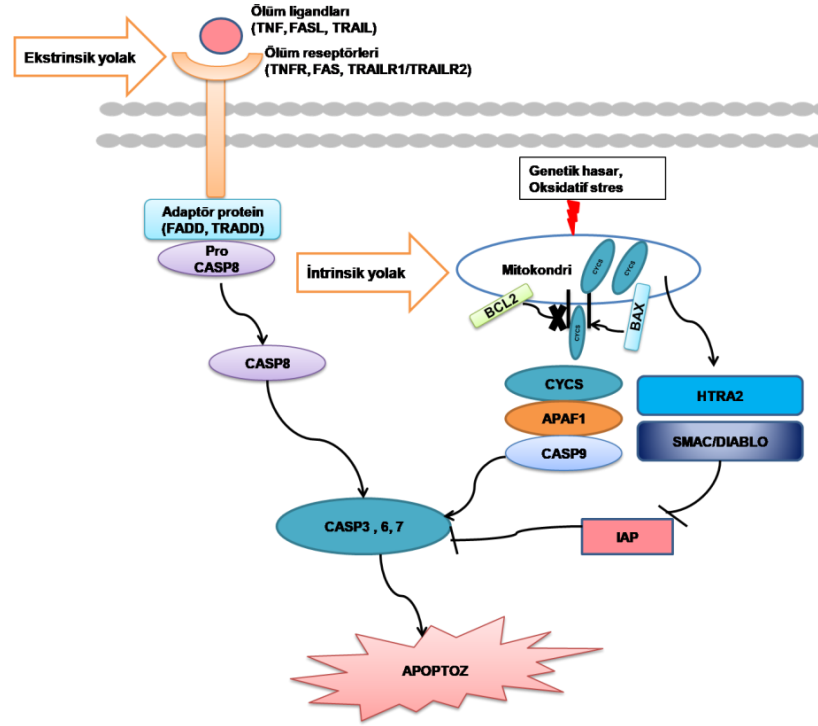
Ekstrinsik ölüm yolağı ölüm ligandlarının ölüm reseptörünü uyarması ile başlamaktadır. En iyi bilinen ölüm reseptörleri TNFR, FAS ve TRAILR1/TRAILR2 olmakla birlikte TNF, FASL ve TRAIL sırasıyla bu ölüm reseptörlerinin ligandları

olarak bilinmektedir (Hengartner, 2001). Bu ölüm reseptörleri TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) gibi adaptör proteinleri bağlayan hücre içi bir ölüm alanına sahiptir. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör proteini için bir bağlanma bölgesi oluşumu ile sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC; death-inducing signalling complex) olarak bilinmektedir. DISC daha sonra pro CASP8'in bağlanmasını ve aktivasyonunu başlatmaktadır. Aktifleşen ve başlatıcı kaspaz olan CASP8 hücre ölümü ile sonuçlanan spesifik substratları parçalayan efektör kaspazları (CASP3, 6, 7) aktive etmekte ve apoptoz gerçekleşmektedir (Schneider ve Tschopp, 2000; Wong, 2011; Şekil 2.12).

2.4.2. Mitokondri Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)

İntrinsik ölüm yolağı ekstrinsik ölüm yolağının aksine hücre içinden gelen uyarı ile başlatılmaktadır. Bu yolak hipoksi, genetik hasar, yüksek sitozolik kalsiyum iyonları konsantrasyonu ve aşırı oksidatif stres gibi faktörlerin mitokondri geçirgenliğini arttırması ile tetiklenmektedir (Schultz ve Harrington, 2003). CYCS gibi proapoptotik moleküllerin zarlararası bölgeden sitozole salınımı mitokondriyal geçirgenliğin artmasının bir sonucudur (Danial ve Korsmeyer, 2004). Bu yolak BCL2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinler BAX, BAK, BAD, BCL-XS, BID, BIK ve BIM gibi proteinleri içeren proapoptotik ve BCL2, BCL-XL ve BCL-W gibi proteinleri içeren antiapoptotik üyelerden oluşan iki ana gruba ayrılmaktadır. Antiapoptotik proteinler CYCS'nin mitokondriden salınmasını bloke ederek, proapoptotik proteinler ise CYCS'nin mitokondriden salınmasını teşvik ederek apoptozu düzenlemektedirler. Apoptozun başlaması bu proapoptotik proteinler ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlıdır (Reed, 1997). Mitokondriyal zarlar arası alandan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında AIF (apoptosis inducing factor), SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase), DIABLO (direct IAP Binding protein with Low pI) ve HTRA2 (Omi/high temperature requirement protein A) bulunmaktadır. CYCS'nin sitoplazmik salınımı, CYCS, APAF1 ve CASP9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla CASP3'ü aktive eder. Diğer yandan, SMAC/ DIABLO veya HTRA2, IAP'lara (inhibitor of apoptosis proteins) bağlanarak IAP'ların CASP3 veya CASP9'a bağlanmasını engelleyerek

kaspaz aktivasyonunu tetikler (Kromer ve ark., 2007; LaCasse ve ark., 2008; Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Apoptotik sinyal iletim yollarının basamakları.

2.5. Hipotez

Kodlamayan RNA'ların biyolojik öneminin anlaşılması bu konu ile ilgili çalışmaların sayısının her geçen gün artmasına neden olmuştur. Bu ailenin bir üyesi olan lncRNA'ların kanser biyolojisinde ki önemi de ortaya konmaya başlanmıştır. EMT, metastaz ve apoptoz da dahil olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde lncRNA'ların kritik rolünü tanımlamaya yönelik çalışmalar halen büyük hızla devam etmektedir. Bu tez çalışmasının hipotezi; ZEB2 geninin bir doğal antisense transkripti ve ZEB2 ifadesinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu ortaya konulan lncRNA ZEB2NAT'ın, MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde apoptoz, invazyon ve koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkili olacağı ve bu etkilerini bu yollarda rol alan önemli bazı genlerin ifadesini etkileyerek gerçekleştireceğidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışma için 17.03.2017 tarih ve 2017/845 karar sayısı ile N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Kararı alınmıştır (Bkz. EK A). Çalışmada insan meme kanseri hücre hatlarından ER+ özellikte olan MCF7 (ATCC® HTB-22™) ve ER- özelliğe sahip MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) hücreleri kullanılmıştır. Her iki hücre hattında da WNT7B onkogen ifadesi mevcuttur. Ayrıca MCF7 hücre hattında IGFBP2, IGFBP4 ve IGFBP5 ifadesi vardır. MDA-MB-231 hücre hattında büyüme faktörlerinden olan TGF ve EGF ifadesi mevcuttur (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=tr, http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=tr). Farklı özelliklere sahip bu hücrelerin çoğalmaları %10 fetal sıgır serumu (Heat Inactivated FBS, Capricorn; FBS-HI-11B), 2 mM L-glutamin (Pan Biotech; P04-80100) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco) içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (RPMI Medium 1640 (1X); Gibco) kültür ortamı kullanılarak %95 nemli ve %5 CO₂'li etüvde 37°C'de sağlanmıştır.

3.2. siRNA Transfeksiyon Yöntemi

MCF7 (3,3x10⁵ hücre/ kuyucuk) ve MDA-MB-231 (1,6x10⁵ hücre/ kuyucuk) hücrelerinin ekimleri 6 kuyucuklu plakalara %10 FBS içeren ancak antibiyotik içermeyen RPMI 1640 besiyerleri ile yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir kuyucuk için 2 ayrı ependorf hazırlanmıştır. Birinci tüpe 5 µM siRNA'dan (Dharmacon; N-188372-01-0002, ZEB2NAT-siRNA-1: GGACUGGAUCCCAAUAUUA, N-188372-02-0002, ZEB2NAT-siRNA-2: CAUCUUAGGGCAUGUGUAU, D-001320-10-05, Kontrol-siRNA: UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUUCUA) 10 µl ve serum içermeyen besiyerinden 190 µl konulmuş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İkinci tüpe ise 7 µl transfeksiyon solüsyonu (Dharmacon; T-2001-03) ve serum içermeyen besiyerinden 193 µl konulmuştur. Birinci ve ikinci tüp birleştirilip 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra birleştirilen tüpün üzerine 1600 µl antibiyotiksiz ancak serumlu besiyerinden konulmuştur.

siRNA içeren toplam 2000 µl besiyeri 24 saat inkübe edilen ve besiyerleri çekilen kuyucuklara aktarılmıştır. Deney protokollerinde hücreleri toplama süresi değişiklik arz etmektedir. İnkübasyon sonrası 24 saati aşan deneyler için 24 saat sonra siRNA içeren besiyeri çekilip yerine antibiyotiksiz ancak serumlu besiyerinden eklenmiştir.

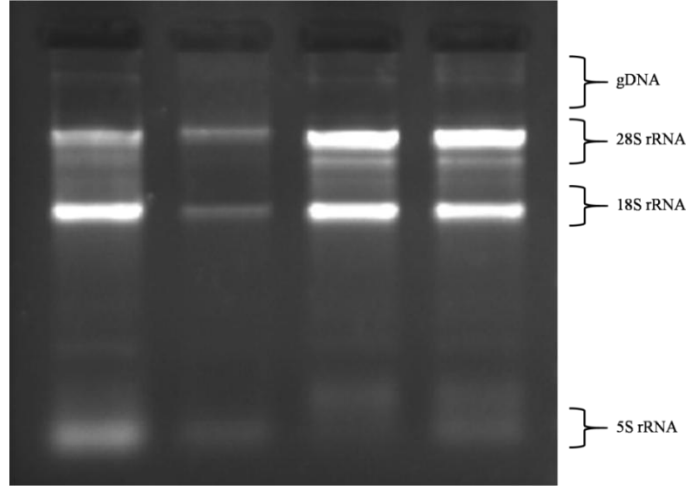
3.3. Gerçek-Zamanlı PZR Analizi

3.3.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

Kontrol ve lncRNA ZEB2NAT susturulmuş MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinden mRNA ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi için total RNA izolasyonu RiboEx (GeneAll; 301-001) total RNA izolasyon solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 1 ml RiboEx total RNA izolasyon solüsyonu eklenerek hücre kazıyıcı ile kazınmıştır. Toplanan hücreler ependorf tüplere alınmış ve 10 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir ependorfa 200 µl kloroform eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ependorflar 15 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra +4°C’ de 15.000 g’de 20 dk santrifüj (Hettich 200R, Almanya) edilmiş ve renksiz olan üst faz toplanıp, ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır. Toplanan üst fazın üzerine 500 µl isopropanol eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından tüpler 15 dk +4°C’de 15.000 g’de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılıp oluşan pellet üzerine %70’lik etanol ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler +4°C’de 12.000 g’de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant tekrar atılıp pellet kısa bir süre kurutulmuştur. Kurumaya bırakılan pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözülmüştür.

3.3.2. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen RNA’ların kalitesi ve miktarı Nanodrop cihazı (Maestrogen; Tayvan) kullanılarak belirlenmiştir. İzolasyon sırasında oluşabilecek fenol, protein ve genomik DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirilmiştir. UV ölçümleri A260/A280 için 2±0,1 ve A260/A230 için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1 µg/10 µl konsantrasyonundaki RNA üzerine 6X yükleme boyasından 2 µl konularak %1’lik agaroz jel elektroforez sonrası ethidium bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantlarının kalitesi görüntüleme sisteminden (Syngene Gbox Chemi 16) alınan resim ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Örnek RNA agaroz jel görüntüsü.

Olası genomik DNA kontaminasyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla DNase-I-RNase-free (Thermo Scientific; #EN0521) enzim reaksiyonu ve üretici firmanın protokolüne göre uygulanmıştır. Bu protokole göre 2 µg/20 µl total RNA üzerine 1 U/µl DNase-I enziminden 2 µl konularak 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 50 mM EDTA’dan 2 µl ilave edilip 65°C’de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Total RNA örnekleri -80°C derecede muhafaza edilmiştir.

3.3.3. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ile cDNA Sentezi

Kalite kontrolü yapılmış RNA örneklerinden cDNA sentez kiti (Bio-Rad iScript™ cDNA Synthesis Kit #170-8891, A.B.D.) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre cDNA sentezlenmiştir. Kısaca, 2 µg/20 µl total RNA’dan tek zincir cDNA üretilmesi için 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı ve 1 µl Reverz Transkriptaz 2 µg/20 µl RNA üzerine ilave edilmiştir. Ardından 25°C’de 5 dk, 42°C’de 30 dk ve 85°C’de 5 dk protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Primer Dizaynı

Bu tez çalışmasında EMT, metastaz ve apoptozda önemli rol oynayan genlerden qPZR analizlerinde kullanılanların listesi Tablo 3.1’de verilmiştir. Çalışılan genlere ait mRNA dizi bilgilerine Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) üzerinden ulaşılmıştır. Alınan sekanslar Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/>) ve IDT Primer Quest (<http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>) programları kullanılarak gerçek-zamanlı

PZR’de kullanılabilecek primerler dizayn edilmiştir (Tablo 3.2). Gerçek-zamanlı PZR için özellikle primerlerin self- ve/veya hetero-dimer oluşturmamasına dikkat edilmiştir.

Tablo 3.1. EMT, metastaz, apoptoz ile ilişkili genler ve bu çalışmada kullanılan diğer genlerin tanımlamaları.

No	Gen Sembolü	Tanımlama
1	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
2	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
3	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
4	COL5A2	Collagen, type V, alpha 2
5	CTNNB1	Catenin, beta 1
6	DSP	Desmoplakin
7	EGFR	Epidermal growth factor receptor
8	ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
9	ESR1	Estrogen receptor 1
10	FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1
11	FN1	Fibronectin 1
12	FZD7	Frizzled family receptor 7
13	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
14	IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4
15	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
16	ILK	Integrin-linked kinase
17	ITGA5	Integrin, alpha 5
18	ITGAV	Integrin, alpha V
19	ITGB1	Integrin, beta 1
20	JAG1	Jagged 1
21	NOTCH1	Notch 1
22	OCLN	Occludin
23	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
24	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E
25	SNAI1	Snail homolog 1
26	SNAI2	Snail homolog 2
27	SNAI3	Snail homolog 3
28	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
29	STEAP1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
30	TCF3	Transcription factor 3
31	TCF4	Transcription factor 4
32	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
33	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
34	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
35	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
36	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
37	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
38	TWIST1	Twist homolog 1
39	VIM	Vimentin
40	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
41	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

Tablo 3.1. EMT, metastaz, apoptoz ile ilişkili genler ve bu çalışmada kullanılan diğer genlerin tanımlamaları (devamı).

No	Gen Sembolü	Tanımlama
42	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
43	ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
44	ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
45	BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1
46	CD44	CD44 molecule
47	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin
48	CDH2	Cadherin 2, N-cadherin
49	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
50	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2
51	CTNNA1	Catenin, alpha 1
52	HGF	Hepatocyte growth factor
53	KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor
54	KISSIR	KISS1 receptor
55	MMP2	Matrix metalloproteinase 2
56	MMP10	Matrix metalloproteinase 10
57	MMP11	Matrix metalloproteinase 11
58	MMP13	Matrix metalloproteinase 13
59	MMP3	Matrix metalloproteinase 3
60	MMP7	Matrix metalloproteinase 7
61	MTA1	Metastasis associated 1
62	MTSS1	Metastasis suppressor 1
63	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
64	RB1	Retinoblastoma 1
65	SMAD2	SMAD family member 2
66	SMAD4	SMAD family member 4
67	TP53	Tumor protein p53
68	BAX	BCL2-associated X protein
69	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
70	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
71	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
72	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
73	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
74	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
75	CYCS	Cytochrome c, somatic
76	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
77	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
78	TNF	Tumor necrosis factor
79	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
80	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
81	ZEB2NAT	ZEB2 antisense RNA 1
82	ACTB	Aktin, Beta

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan genlerin simgeleri, primer dizileri ve baz çifti uzunlukları.

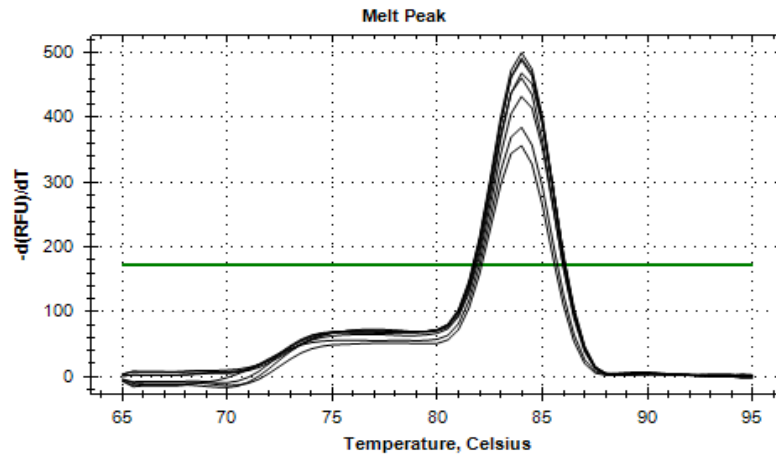
Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Uzunluk (bp)
AKT1	CAAGGACGGGCACATTAAGA	CATTGTCCTCCAGCACCTC	125
COL1A2	TCCTGGTGCTGTAGGTG	AGGACCAGCAAATCCATTG	154
COL3A1	GCTGGGATTGGAGGTGAAA	TGTCCATTAAACAGACTTGAGTGA	116
COL5A2	CAGGGAATTGATGGAGAACCA	TCATCCAACCCAGCCATTT	128
CTNNB1	AGATGATGGTCTGCCAAGTG	GCTGGTCAGATGACGAAGAG	116
DSP	CACGGGAGGTCTTGTTGAC	ATAGCTGCTGGTGTCTTGC	115
EGFR	TTTGCCAAGGCACGAGTAA	AAATTCCCAAGGACCACCTC	106
ERBB3	CACACACCAGAGTGATGTC	CCCTTCTCTAGCAGGTCT	117
ESR1	CGAGTCCTGGACAAGATCAC	GTACAGATGCTCCATGCCTT	150
FGFBP1	CCTCACCTGCTCTCCTT	TGGCTTGGTCTTTGGTGAC	185
FN1	CCCTAAAGGACTGGCATTCA	CTCGAGTAGGTCACCCTGTA	102
FZD7	GCAGACGTGCAAGAGCTATG	TCCAGAAGCCAGTGGTGAT	128
GSK3B	CTAACACCACTGGAAGCTTGT	TCTTGAGTGGTGAAGTTGAAGAG	113
IGFBP4	GGCGACGAAGCCATCCA	CGCAAGTGGCGCAACAG	118
IL1RN	GACCTTCTATCTGAGGAACAACC	CACAGGACAGGCACATCTT	146
ILK	CTCAGCAGACATGTGGAGTTT	TCATGAGCTTACACACATGAGG	164
ITGA5	AAGGCAGAAGGCAGCTATG	GGAGGGAGCGTTTGAAGAAT	124
ITGAV	CTTTCTCCGATTCCAACTGG	GCCTTGCTGAATGAACTGG	120
ITGB1	ACAGATCCGAAGTTTCAAGGG	TCTCCTTTATTGAAGGCTCTGC	107
JAG1	CAAAGTGTGCCTCAAGGAGTA	AGGCGAAACTGAAAGGCA	158
NOTCH1	CAATGAGTGCAACAGCAACC	GTAGCCACTGGTCATGTCTTT	175
OCLN	TCGAAGAAAGATGGACAGGTATG	CTCTTTCCACATAGTCAGATGGG	155
PDGFRB	TGGTGATCTCAGCCATCCT	CTCTTTCCACATAGTCAGATGGG	117
SERPINE1	TGGTTCTGCCCAAGTTCTC	CGTTCACCTCGATCTTCACTT	171
SNAI1	AAGATGCACATCCGAAGCC	GGCTTCTCGCCAGTGTG	113
SNAI2	TCAGTGCAATTTATGCAATAAGACC	GCTCACATATTCTTGTCACAGTAT	127
SNAI3	AGCTGCACTGCCACCTG	GTGCGGATGTGCATCTTGAG	97
STAT3	GCTGAAATCATCATGGGCTATAAG	ATACTTTCCGAATGCCTCCTC	108
STEAP1	GACATCTATTCCATCTGTGAGTGA	TCTATCCACTTATTCCAGGCAAA	132
TCF3	GGTCTTCCATCCTCGGTGTA	TGCCATCTGCCACGTAGA	124
TCF4	ATCACAGCAGTGACCCTTG	GGATAGCTCAAACGTTTCATGTG	136
TGFB1	GCCTGGACACGCAGTACA	TTGCAGGAGCGCACGAT	172
TGFB2	AAAGACAGGAACCTGGGATTTA	TGTGGAGGTGCCATCAATAC	135
TGFB3	CTTGCAAAGGGCTCTGGT	CTAATGGCTTCCACCCTCTTC	120
TIMP1	GCGTTATGAGATCAAGATGACCA	AACTCCTCGCTGCGGTT	141
TIMP2	GCTGCGAGTGCAAGATCA	CTCTTGATGCAGGCGAAGAA	136
TIMP3	GCAAGATCAAGTCCTGCTACTAC	GGATGCAGGCGTAGTGTTC	123
TWIST1	CCGCAGTCTTACGAGGAG	TTGCTCAGCTTGTCCGA	137
VIM	TCCAAGCCTGACCTCAC	CACCTGTCTCCGGTACTC	189
WNT11	CTATTTGCTTGACCTGGAGAG	GTTGTCCGCACATCCTC	184
WNT5A	CTGCAGCTGGCAGACTT	GCTGTTGACCTGTACCAACT	108
WNT5B	CTTCGCCAAGGAGTTTGTG	AGCCAGCAGGTCTTGAG	189
ZEB1	CCCTGTGCAGTTACACCTTT	GGGCATTTCATATGGCTTCTCT	205
ZEB2	TTTGCCCAACTGCTGACC	GCTACAGAGAGGGCAGGAA	123
BRMS1	GGCTTCTGTCTGGATGTGAT	GTCTCCTCCAGCCTCT	141
CD44	TTCTGGATCAGGCATTGATGA	GTCCAGTCCTGGTTCTGTTT	99

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan genlerin simgeleri, primer dizileri ve baz çifti uzunlukları (devamı).

Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Uzunluk (bp)
CDH1	GAGAGCGGTGGTCAAAGAG	AGCTGGCTCAAGTCAAAGT	117
CDH2	GCTGACCAGCCTCCAAC	CATGTGCCCTCAAATGAAACC	112
CDKN2A	TTCCTGGACACGCTGGTG	CATGGTTACTGCCTCTGGTG	160
COL4A2	AAGTACAGCTTCTGGCTGAC	AGCGGCTGATGTGTGTG	103
CTNNA1	ACAACCCTTGTAACACCAAT	CAAGAAATTCTCAGTTGCTTGTTT	111
HGF	TTTGCCTTCGAGCTATCGG	CAGGTCATGCATTCAACTTCTG	156
KISS1	TCTGTGCCACCCACTTTG	TAGCAGCTGGCTTCCTCT	144
KISS1R	TCAACTACATCCAGCAGGTCTC	CCAGATGCTGAGGCTGACA	149
MMP2	TGGCAGTGCAATACCTGAA	GCATGGTCTCGATGGTATTCT	147
MMP10	GCATTCTTGTGCTGTTGTG	CTAGGTATTGCTGGGCAAGAT	103
MMP11	AGGTGCTCAGTACTGGGTGTA	CAGACCAAGGCAGCATGGA	105
MMP13	CCTGGACAAGTAGTTCCAAAGG	GGTCTTCATCTCCTGGACCATA	201
MMP3	GGAGATGCCCACTTTGATGA	AGGTCCATAGAGGGACTGAAT	219
MMP7	GTGCCAGATGTTGCAGAATAC	GTTTCCTGGCCCATCAAATG	258
MTA1	ACCAAAGTGC GCCTGATCC	CAGGGCGATGGGCTTG TAG	183
MTSS1	CACAAACTGCCCTCCTCAA	GAGTCACTGCTGTTGACACT	155
PTEN	CGTTACCTGTGTGTGGTGATA	CTCTGGTCCTGGTATGAAGAATG	116
RB1	CCCTACCTTGTCACCAATACC	TGTTGGCAGACCTTCTGAAA	136
SMAD2	GCTAACTAGAATGTGCACCATAAG	GGGATCCCATCTGAGTTAATACTT	155
SMAD4	GGAAAGGATTTCCTCATGTGATCTA	ATGGATTCACACAGACACTATCAC	132
TP53	GAGATGTTCCGAGAGCTGAATG	TTTATGGCGGGAGGTAGACT	129
BAX	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	GGCCTTGAGCACCAGTTT	151
BCL2	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA	125
CASP3	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	TCAATGCCACAGTCCAGTTC	162
CASP7	CGAAACGGAACAGACAAAGATG	TTAAGAGGATGCAGGCGAAG	169
CASP8	GCCCCAACTTCACAGCATTAG	GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT	160
CASP9	CGACCTGACTGCCAAGAAA	CATCCATCTGTGCCGTAGAC	153
CASP10	CTGCCAAGGTGAAGAGATACAG	CCACATGCCGAAAGGATACA	158
CYCS	GGAGAGGATACACTGATGGAGTA	GTCTGCCCTTTCTTCTTCTT	102
FADD	TGACCGAGCTCAAGTTCCTATG	CCAGGTGCTTCTGCTCCAG	108
FAS	GTGATGAAGGACATGGCTTAGA	GTGTGCATTCTTGATGATTCC	156
TNF	CCTCCTCTTGCCATCAAG	CCAGATAGATGGGCTCATACC	86
TNFRSF1A	CGAGATCGATCGGCTGGAG	GTCCATGTCGCGGAGCA	139
TRADD	TTTCTGTTCCAGGGTCAGC	GCCATTTGAGACCCACAGA	89
ZEB2NAT	GCATGGGAGCTGCATCTTA	TAATATTGGGATCCAGTCCAGAAAT	75
ACTB	AGCACGGCATCGTCACCAACT	TGGCTGGGGTGTTGAAGGTCT	179

3.3.5. Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonu

Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında EMT, metastaz ve apoptozda rol oynayan genlerin ve ayrıca lncRNA ZEB2NAT'ın mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad CFX Connect™ Optics Module; Singapur) kullanılarak değerlendirilmiştir. Boya olarak çift iplikli DNA'ya bağlanabilen EvaGreen (Solis BioDyne, 5X Hot FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus) kullanılmıştır. Reaksiyon final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 5X EvaGreen miksi, 5 pMol ileri, 5 pMol geri primer, 2µl cDNA templeyt ve toplam 20µl'ye steril RNase-DNase free su ile tamamlanmış ve reaksiyon, steril 8'li PZR stripleri içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ısı profili +95°C 15 dakika, 40 siklus (95°C 15 saniye, 60°C 20 saniye, 72°C 20 saniye) olacak şekilde çalışılmıştır. Daha sonra 60°C'den 95°C'ye 0.5°C artışla kademeli olarak ısıtma işlemi gerçekleştirilmiş ve ısılar içerisindeki her 0.5°C artışta optik ölçümler yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi ile erime eğrisi grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Gerçek zamanlı PZR'de optik analiz sonucu elde edilen veriler (Ct) olarak kayıt edilmiş ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri ACTB referans geni ile normalize edilmiştir.



Şekil 3.2. Örnek erime eğrisi grafiği.

3.4. Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş hücre grupları karşılaştırıldığında mRNA düzeyinde anlamlı değişim görülen

genlerin protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri western blot analizi ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için 6 kuyucuklu plakalara ekilen ve kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA uygulanmış hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra buz üzerine alınmıştır. Kuyucuklara 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (Protease inhibitor cocktail kit, Thermo Scientific; 78410) içeren 1 ml RIPA lizis solüsyonu (RIPA Lysis Buffer, VWR, N653, A.B.D.) eklenmiş ve hücreler 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra lizis solüsyonu ile hücreler toplanmış ve 10.000 rpm ve 4°C’de santrifüj sonrasında hücre döküntüleri çöktürülmüş ve total proteini içeren süpernatant ayrı bir ependorf tüpe alınmıştır. Proteinler çalışılincaya kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

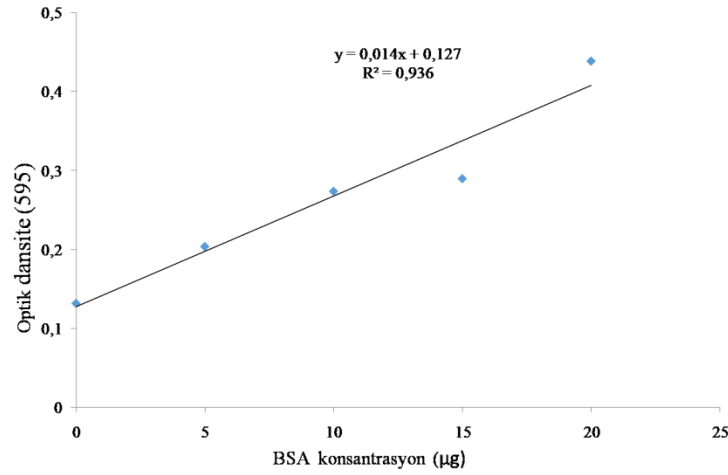
3.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jelinin Hazırlanması

Proteinlerin jelde yığılması amacıyla yığınlama (stacking) ve proteinlerin ayrılması amacıyla ayırma (separating) jelleri hazırlanmıştır. Bu jeller 10x10 cm’lik 1mm kalınlığındaki cam kalıplar arasına dökülmüştür. Önce ayırma jel çözeltisi 3,1 ml su, 2,4 ml %30’luk bisakrilamit çözeltisi, 1,9 ml ayırma jeli çözeltisi, %10’luk amonyum persülfattan 150 µl ve TEMED’den 8,3 µl konularak hazırlanmıştır. TEMED ve amonyum persülfat ekleme işlemleri her iki jeline hazırlanma aşamalarında hızlıca yapılmıştır. Ayırma jeli döküldükten sonra üst kısımda oluşan hava kabarcıklarını gidermek amacıyla butanol eklenmiş ve donma sonrası butanol uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli donduktan sonra yığınlama jeli 1 ml su, 300 µl %30’luk bisakrilamit çözeltisi, 444 µl yığınlama jeli çözeltisi, %10’luk amonyum persülfattan 33 µl ve TEMED’den 5 µl olacak şekilde hazırlanmaya başlanmıştır. Daha sonra cam kalıbın ¼’lik kısmına yığınlama jeli dökülmüş ve taraklar kuyucukların oluşması amacıyla camlar arasına yerleştirilmiştir.

3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş hücre gruplarından izole edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford solüsyonu (Bradford dye Reagent, Thermo; Almanya) ve mikrolaka okuyucu (Biotek Epoch;

A.B.D.) kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan BSA dilüsyonları ile birlikte protein örnekleri mikropalakalara konulmuş ve 595 nm dalga boyunda okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Proteinler konsantrasyonları BSA dilüsyonları ile oluşturulan grafiğe göre hesaplanmıştır (Şekil 3.3). Eşit miktarda protein örneklerine 6x yükleme tamponu (7 ml 4X Tris-HCL, 3,6 ml gliserol, 1 gr SDS, 2 mg Brom fenol mavisi, 400 µl β-mercapto-etanol olacak şekilde 10 ml ye su ile tamamlanmıştır) eklenerek 5 dakika 90°C'de kaynatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir protein örneğinden 30 µg protein ve protein markerdan (HiMark Pre-Stained Protein Standard, Thermo Fisher Scientific) 7 µl jellere yüklenmiştir. Kullanılan 10X elektroforez yürütme tamponu 6,005 gr Tris, 28,82 gr glisin, %10'luk SDS çözeltisinden 20 ml ve üzeri 200 ml ye su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. 1X elektroforez yürütme tamponu ile 90 V'de yürütme işlemi başlatılmıştır. Ayırma jeline gelindiğinde 110 V'de yürütme işlemine devam edilmiştir.



Şekil 3.3. Bradford protein standart eğrisi.

3.4.4. Protein Transferi ve Bloklama

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra camlar arasından çıkarılan jel Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistemi (BioRad Laboratories, Inc, Singapur) kullanılarak 1,3 A elektrik akımı, 25 V'da 7 dk boyunca transfer solüsyonunda PVDF membrana (EMD Millipore, Immobilon-P Transfer Membrane, A.B.D.) transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer solüsyonu 3,03 gr Tris, 14,41 gr glisin, %10'luk SDS çözeltisinden 10 ml, 150 ml metanol ve üzeri 250 ml ye su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Transfer işleminin ardından membran %3 yağsız süt tozu (BioShop, Skim milk, A.B.D.) içeren TBST içerisinde 1 saat inkübe edilerek protein bloklama

işlemi gerçekleştirilmiştir. TBST; 2,42 gr Tris, 9 gr NaCl, 1 ml Tween 20'nin su ile 1 lt'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

3.4.5. Western Blot Analizi

Protein ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla primer antikorlardan anti-ZEB2 (St John's Laboratory; STJ29919), anti-E kaderin (St John's Laboratory; STJ97370), anti-N kaderin (St John's Laboratory; STJ94353) 1:1000 oranında, housekeeping antikoru olarak kullanılan GAPDH (Santa Cruz Biotechnology; sc-25778) 1:5000 olacak şekilde sulandırılmıştır. Sekonder antikör olarak kullanılan goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology; sc-2054) 1:5000 olacak şekilde bloklama solüsyonunda sulandırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bloklama sonrası membranlar primer antikorlarda +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membranlar 3X10 dakika TBST ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından membranlar sekonder antikora alınmıştır ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrar membranlar 3X10 dakika TBST ile yıkanmıştır. Görüntüleme işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla yıkama işlemi sonrası membranlar kemilüminesans solüsyonu (Boster Biological Technology, Hypersensitive ECL Chemiluminescence substrate AR1170, A.B.D.) ile 5 dk muamele edilmiştir. Muamele sonrası membranların görüntüsü, görüntüleme sistemi (Azure Biosystems, Bioanalytical Imaging System c 280; A.B.D.) ile alınmıştır.

3.5. Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılık testi XTT metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. XTT (2,3-bis- (2- methoxy- 4- nitro- 5- sulfophenyl)- 2H- tetrazolium- 5-carboxanilide) canlı hücreler tarafından turuncu renkli formazan kristallerine indirgenmektedir. Metabolik olarak aktif hücre sayısı formazan kristallerinin oluşumu ile doğru orantılı olması nedeniyle hücre canlılığının tespitinde kullanılan yöntemlerden biri de XTT yöntemidir. Formazan oluşumu bir spektrofotometre ile belirli dalga boylarında okutularak tespit edilebilmektedir. Kısaca, MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültür kapları transfeksiyon işleminin ardından 24, 48, ve 72. saatlerde her bir kuyucuğa XTT

solüsyonunun eklenmesinden 4 saat sonra ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okutulmuştur. Hücre canlılığı yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

% Hücre Canlılığı =(Ölçülen optik dansite değeri)/(Kontrol optik dansite değeri)x100

3.6. Akım Sitometri Analizi ile Apoptoz Tayini

Kontrol ve siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş olan MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranının belirlenmesi amacıyla FITC annexin V apoptoz kiti (BioLegend FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD, 640922, A.B.D.) kullanılmıştır. Yöntem üretici firmanın talimatlarına göre kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş hücrelere 24 saat inkübasyon sonrasında siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işleminin ardından 24 saat sonra hücreler toplanmış ve PBS ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonları oluşturulmuş ve iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından hücre süspansiyonundan 100 µl 5 ml'lik bir tüpe aktarılmış ve üzerine 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl 7-AAD ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir tüpe 400 µl Annexin V bağlanma tamponu ilave edilmiştir. Tüpler bağlanma tamponu ilavesi sonrası akım sitometri cihazı (BD FACSAria™ III) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.7. İnvazyon Testi

Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyonunun ardından MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon kapasiteleri “BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-invazyon odaları” (Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber, 354480, A.B.D.) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakaları içerisinde araştırılmıştır. Kısaca; hücrelerin invazyon kapasitesinin belirlenmesi amacıyla invazyon kuyucuğunun alt odacığına serum içeren kültür ortamı konulmuştur. 8 µm por-açıklıklı matrigel membranın üst kısmına ise Kontrol siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyonunun gerçekleştirildiği hücrelerden 2.5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler serumsuz kültür ortamında 22 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membranın üzerinde kalan invaze olmamış hücreler uzaklaştırılmış, membranın alt kısmına geçen invaze olmuş hücreler ise %5 kristal

violet boyası ile boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve ışık mikroskopunda sayım yapılarak değerlendirilmiştir.

3.8. Koloni Oluşum Testi

Kontrol siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 10 gün boyunca 2 günde bir ortamları değiştirilerek 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler 10-15 günün sonunda soğuk metanol ile -20°C 'de 10 dk fiks olmaları için bekletilmiştir. Fikse olmuş koloniler %5 kristal violet boyası ile boyanmıştır. Boyandığı gözlenen koloniler Kontrol siRNA ve ZEB2NAT-siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen gruplarda ayrı ayrı sayılıp koloni oluşum kapasiteleri değerlendirilmiştir.

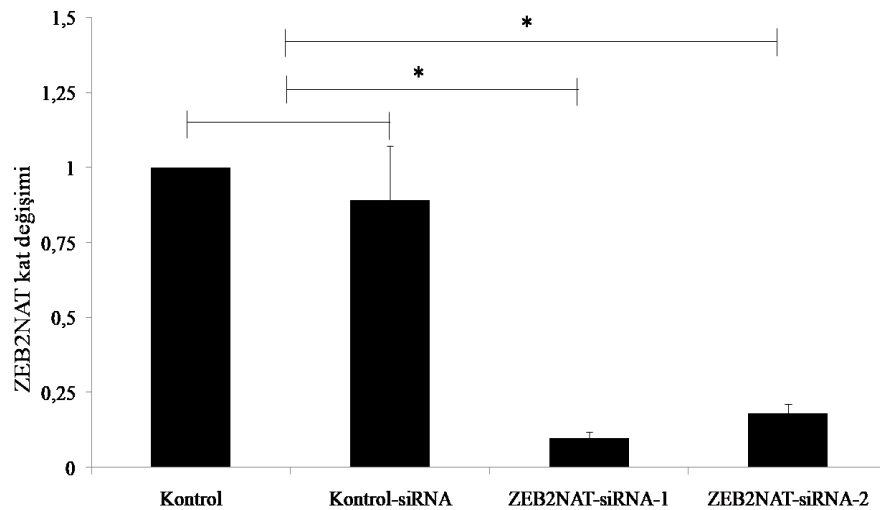
3.9. İstatistiksel Analizler

Aday genlerin gerçek zamanlı-PZR ekspresyon verileri housekeeping gen verileri ile normalize edilmiştir. Genlerin kantitasyon değerlerinin istatistiksel analizi için $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ metodu ile “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” olarak isimlendirilen web tabanlı program ile Volcano Plot analizi yapılmıştır. Grupların karşılaştırılması “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “Student t-testi” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Diğer analizlerde gruplar arasındaki karşılaştırma SPSS 20.0 programı kullanılarak Student t-testi ile değerlendirilmiştir. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

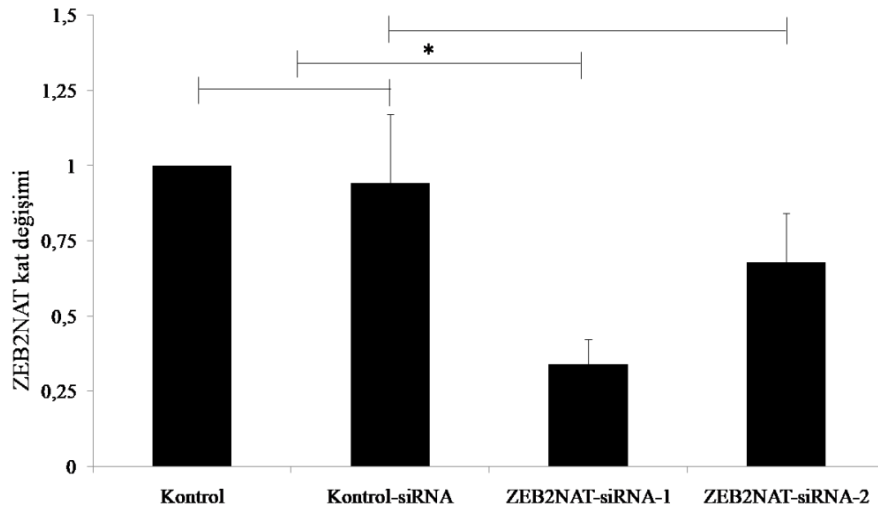
4.1. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Gerçek-Zamanlı PZR Analizi ile Kontrolü

MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine 25 nM Kontrol-siRNA ve 25 nM ZEB2NAT-siRNA'larının (ZEB2NAT-siRNA-1: N-188372-01-0002, ZEB2NAT-siRNA-2: N-188372-02-0002) 24 saat uygulaması sonrası Gerçek-Zamanlı PZR ile ZEB2NAT ifadesinin kontrolü yapılmıştır. Susturulma oranlarının hesaplanması sonrası MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA uygulanmış grupla karşılaştırıldığında, ZEB2NAT-siRNA-1 kullanılması durumunda %88, ZEB2NAT-siRNA-2 kullanılması durumunda ise %79 oranında mRNA düzeyinde ZEB2NAT ifadesinin susturulduğu görülmüştür. MDA-MB-231 hücre hattında ise Kontrol-siRNA uygulanmış grupla karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA-1 kullanıldığı durumunda %64, ZEB2NAT-siRNA-2 kullanılması durumunda ise %28 oranında mRNA düzeyinde ZEB2NAT ifadesinin susturulduğu görülmüştür. Ayrıca kat değişimleri dikkate alındığında MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubuyla karşılaştırıldığında ZEB2NAT mRNA ifadesinin ZEB2NAT-siRNA-1 grubunda 9 kat, ZEB2NAT-siRNA-2 grubunda 4,9 kat anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. siRNA kullanılmayan Kontrol ve Kontrol-siRNA'nın kullanıldığı grup arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile kontrolü
*p<0,05.

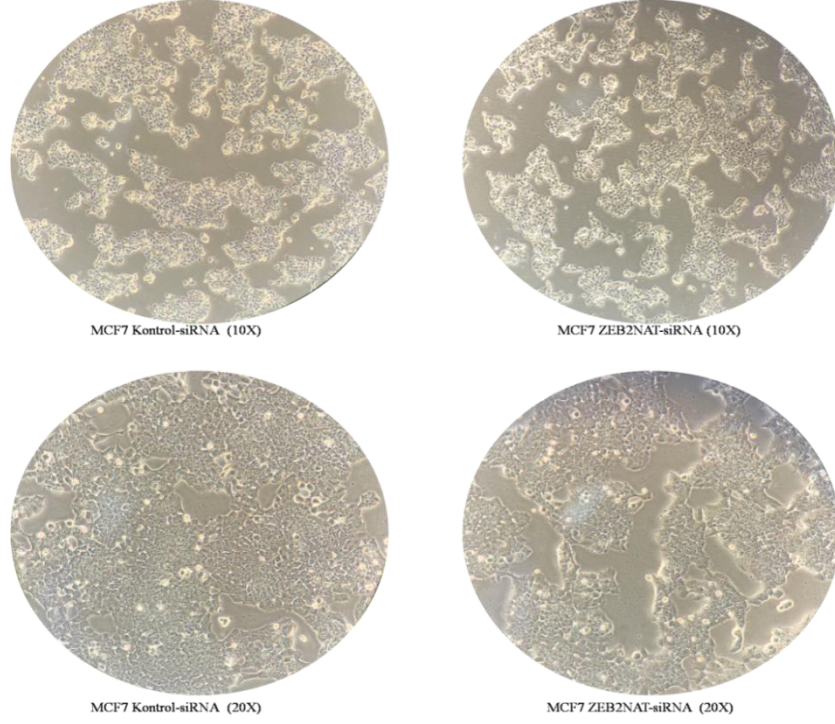
MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubuyla karşılaştırıldığında ZEB2NAT mRNA ifadesinde ZEB2NAT-siRNA-1 grubunda 2,7 kat, ZEB2NAT-siRNA-2 grubunda 1,4 kat azalış olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizler sonucunda ZEB2NAT-siRNA-1 grubundaki azalmanın anlamlı ZEB2NAT-siRNA-2 grubundaki azalmanın ise anlamlı olmadığı bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında da siRNA kullanılmayan Kontrol ve Kontrol-siRNA'nın kullanıldığı grup arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlardan yola çıkarak sitotoksosite deneyi hariç sonraki analizlerde her iki hücre hattında da ZEB2NAT-siRNA-1 kullanılmıştır ve “ZEB2NAT-siRNA” olarak tanımlanmıştır.



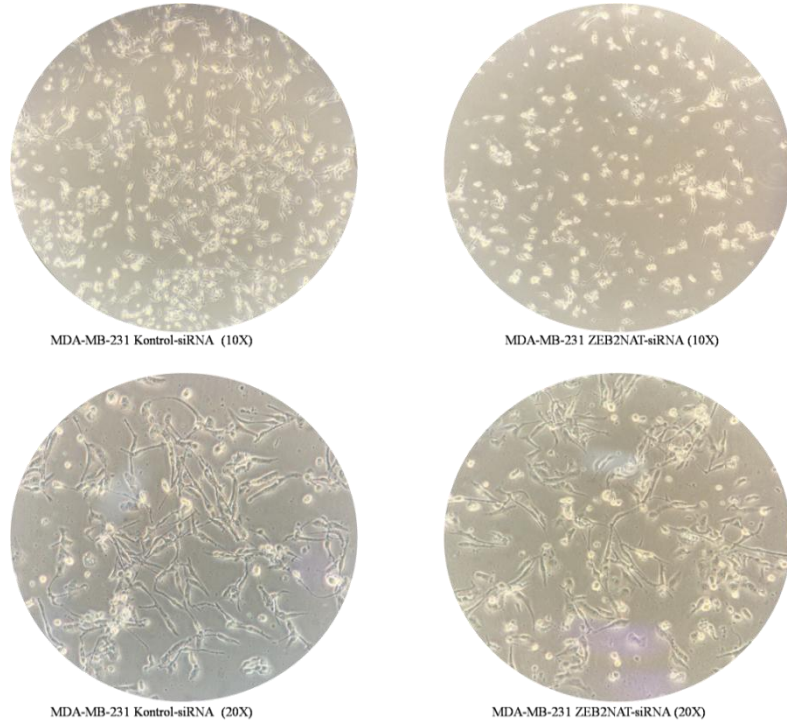
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile kontrolü
*p<0,05.

4.2. siRNA Uygulaması Sonrası Hücrelerin Morfolojilerinin Gözlenmesi

MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine 25 nM Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA muamelesinden 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri invert mikroskop altında 10X ve 20X büyütmelemlerde incelenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. MCF7 hücrelerine Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA muamelesinden 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri



Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücrelerine Kontrol-siRNA ve ZEB2NAT-siRNA muamelesinden 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri.

4.3. ZEB2NAT'ın Susturulmasının EMT, Metastaz ve Apoptoz ile İlişkili Genler Üzerindeki Etkilerinin Gerçek-Zamanlı PZR Analizi ile Belirlenmesi

MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında ZEB2NAT'ın susturulması durumunda EMT, metastaz ve apoptozda önemli olan genlerin ifadesine olan etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT ifadesinin susturulması Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında EMT ve metastazda önemli olan DSP, TIMP1, TIMP3, CDH1 ve COL4A2 genlerinde sırasıyla 1,16, 7,94, 1,28, 3,12 ve 8,63 kat anlamlı ($p<0,05$) artışa neden olmuştur. Ayrıca ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında EMT ve metastazda önemli olan CTNNB1 (1,07), IGFBP4 (3), ITGA5 (1,27), PDGFRB (1,39), TCF4 (1,47), TGFB1 (1,32), VIM (1,08), WNT5B (1,35), ZEB2 (1,62), CDH2 (4,06), MMP2 (21,48), MMP3 (14,98), MMP7 (2,48) ve SMAD2 (1,14) gen ifadelerinde anlamlı derecede ($p<0,05$) kat azalışı görülmüştür. Aynı hücre hattında apoptozda önemli olan PTEN, RB1, CASP9, CYCS, TNF ve TRADD gen ifadeleri ZEB2NAT susturulduğunda Kontrol-siRNA grubuna göre sırasıyla 1,34, 49,87, 4,17, 179,15, 1,68 ve 2,62 kat anlamlı ($p<0,05$) derecede artmıştır (Tablo 4.1).

MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda EMT ve metastazda önemli rol oynayan genlerden DSP, GSK3B, CDH1 ve MTSS1 ifadelerinde Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla 1,23, 1,35, 4,01 ve 1,68 kat anlamlı artış görülmüştür. Aynı hücre grubunda ZEB2NAT'ın baskılandığı durumda Kontrol-siRNA grubuna göre EMT ve metastazda önemli rol oynayan FN1 (1,56), PDGFRB (1,25), SNAI2 (1,42), STEAP1 (1,64), TCF4 (1,62), TGFB1 (4,39), TGFB2 (1,43), VIM (1,65), WNT11 (2,22), WNT5A (44,79), ZEB2 (1,51), CD44 (1,55), CDH2 (1,61), MMP3 (1,97), MMP7 (4,65) ve SMAD2 (2,56) gen ifadelerinde anlamlı ($p<0,05$) kat azalışı bulunmuştur. Ayrıca, bu hücrelerde ZEB2NAT'ın baskılanması Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında apoptozda önemli olan PTEN, CASP3 ve CASP9 gen ifadelerinde sırasıyla 1,78, 1,34 ve 1,66 kat anlamlı ($p<0,05$) artışa neden olmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. ZEB2NAT'ın susturulmasının MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Kontrol-siRNA gruplarına göre genler üzerine etkisi.

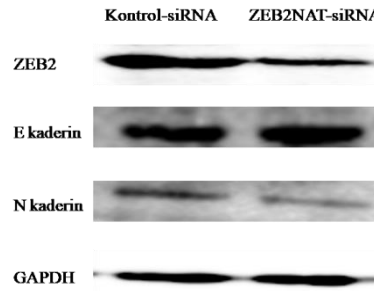
Gen	MCF7		MDA-MB-231	
	Artış/Azalış	P değeri	Artış/Azalış	P değeri
AKT1	-1,04±0,01	0,1285	1,03±0,09	0,7353
COL1A2	1,67±1,06	0,3738	1,15±0,28	0,7389
COL3A1	2,09±0,75	0,1003	-3,34±0,18	0,1304
COL5A2	1,06±0,2	0,8909	1,31±0,17	0,1073
CTNNB1	-1,07±0,02	0,0236	1,51±0,45	0,2446
DSP	1,16±0,04	0,0153	1,23±0,07	0,0278
EGFR	1,28±0,13	0,0848	1,12±0,26	0,8079
ERBB3	-1,14±0,26	0,7114	1,18±0,21	0,3947
ESR1	-1,13±0,07	0,2568	-1,91±0,14	0,0883
FGFBP1	1,22±0,09	0,0745	1,23±0,16	0,1929
FN1	1,34±0,15	0,0731	-1,25±0,03	0,0061
FZD7	1,81±1,24	0,3567	1,23±0,38	0,6350
GSK3B	1,01±0,09	0,9634	1,35±0,08	0,0060
IGFBP4	-3±0,07	0,0094	1,06±0,06	0,3015
IL1RN	1,2±0,15	0,2207	-1,11±0,16	0,5450
ILK	1,44±0,34	0,1918	1,09±0,05	0,1639
ITGA5	-1,27±0,06	0,0331	1,01±0,07	0,8594
ITGAV	1,03±0,06	0,7115	-1±0,08	0,9521
ITGB1	-1,01±0,07	0,8941	1,41±0,33	0,2288
JAG1	1,23±0,16	0,1799	-1,16±0,13	0,3951
NOTCH1	-1,01±0,01	0,5047	-1,15±0,18	0,6025
OCLN	-1,16±0,1	0,3097	-1,29±0,08	0,0923
PDGFRB	-1,39±0,05	0,0179	-1,56±0,05	0,0030
SERPINE1	-1,09±0,06	0,2698	1,4±0,48	0,4849
SNAI1	1,18±0,12	0,1745	-1,33±0,08	0,0735
SNAI2	-1,67±0,11	0,0684	-1,42±0,04	0,0046
SNAI3	1,54±0,39	0,1675	-1,18±0,17	0,3648
STAT3	1,01±0,02	0,4250	-1,19±0,08	0,1363
STEAP1	1,11±0,07	0,2077	-1,64±0,11	0,0321
TCF3	-1,79±0,11	0,0744	-1,19±0,08	0,1363
TCF4	-1,47±0,06	0,0137	-1,62±0,09	0,0239
TGFB1	-1,32±0,02	0,0016	-4,39±0,06	0,0007
TGFB2	-3,43±0,13	0,0821	-1,43±0,07	0,0189
TGFB3	1,01±0,04	0,6948	-1,13±0,16	0,5904
TIMP1	7,94±3,27	0,0002	-1,11±0,16	0,7010
TIMP2	1,64±0,71	0,2904	-1,12±0,11	0,4040
TIMP3	1,28±0,11	0,0418	-1,43±0,24	0,3255
TWIST1	-82,14±0,03	0,1167	-2,23±0,25	0,3168
VIM	-1,08±0,01	0,0109	-1,65±0,03	0,0009
WNT11	-1,08±0,46	0,7954	-2,22±0,11	0,0485
WNT5A	-1,33±0,11	0,1365	-44,79±0,04	0,0378
WNT5B	-1,35±0,046	0,0469	1,07±0,16	0,7308
ZEB1	-1,46±0,61	0,8734	-1,14±0,11	0,3185
ZEB2	-1,62±0,07	0,0333	-1,51±0,03	0,0001
BRMS1	-1,49±0,17	0,1882	1,04±0,12	0,6778

Tablo 4.1. ZEB2NAT'ın susturulmasının MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Kontrol-siRNA gruplarına göre genler üzerine etkisi (devamı).

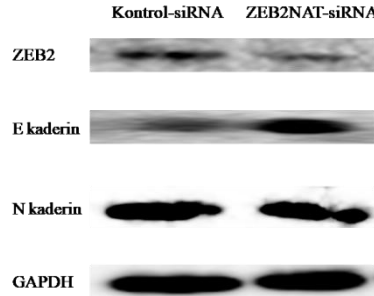
Gen	MCF7		MDA-MB-231	
	Artış/Azalış	P değeri	Artış/Azalış	P değeri
CD44	-1,7±0,19	0,1772	-1,55±0,03	0,0016
CDH1	3,12±0,09	0,0000	4,01±0,87	0,0004
CDH2	-4,06±0,01	0,0000	-1,61±0,08	0,0158
CDKN2A	-1,23±0,64	0,8428	-1,19±0,12	0,3083
COL4A2	8,63±0,58	0,0000	-1,03±0,16	0,7506
CTNNA1	-1,14±0,07	0,1944	-1,37±0,08	0,0712
HGF	2,05±1,83	0,1945	1,50±0,25	0,0931
KISS1	1,51±0,42	0,2233	-1,08±0,12	0,5097
KISS1R	1,18±0,12	0,1950	1,14±0,31	0,8183
MMP2	-21,48±0,01	0,0012	-1,13±0,25	0,5354
MMP10	1,87±0,98	0,1876	-1,39±0,11	0,1205
MMP11	1,05±0,19	0,9267	1,19±0,11	0,1204
MMP13	-1,24±0,16	0,3189	-2,66±0,16	0,1051
MMP3	-14,98±0,03	0,0002	-1,97±0,07	0,0276
MMP7	-2,48±0,04	0,0004	-4,65±0,18	0,0196
MTA1	1,02±0,02	0,3129	1,04±0,17	0,8908
MTSS1	-10,8±0,21	0,2526	1,68±0,33	0,0350
PTEN	1,34±0,11	0,0146	1,78±0,33	0,0177
RB1	49,87±8,07	0,0007	-1,05±0,18	0,8162
SMAD2	-1,14±0,03	0,0442	-2,56±0,06	0,0173
SMAD4	1,02±0,07	0,8555	2,1±0,79	0,0977
TP53	1,33±0,24	0,1823	1±0,11	0,8922
BAX	5,53±4,78	0,1168	-1,38±0,11	0,1164
BCL2	8,28±8,01	0,0601	-1,13±0,15	0,5946
CASP3	-1,02±0,63	0,6701	1,34±0,06	0,0024
CASP7	1,26±0,11	0,0591	1,25±0,15	0,1389
CASP8	1,02±0,02	0,3776	1,85±1,16	0,6228
CASP9	4,17±0,43	0,0010	1,66±0,06	0,0000
CASP10	-1,23±0,25	0,4834	1,11±0,09	0,2820
CYCS	179,15±27,4	0,0000	-1,79±0,05	0,2050
FADD	1,19±0,13	0,2005	1,23±0,17	0,2178
FAS	1,04±0,08	0,6477	-1,19±0,07	0,1184
TNF	1,68±0,06	0,0000	-1,02±0,02	0,4083
TNFRSF1A	1,12±0,11	0,2831	1,09±0,69	0,5839
TRADD	2,62±0,74	0,0447	1,04±0,21	0,7330

4.4. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Bazı Genlerin Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonucunda mRNA seviyesinde her iki hücre hattında da anlamlı derecede değişiklik görülen ZEB2, E kaderin ve N kaderin proteinlerinin seviyelerindeki olası değişiklikler western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Western blot analizi sonucunda her iki hücre hattında da Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA grubunda ZEB2 ve N kaderin protein seviyelerinin azaldığı E kaderin protein seviyesinin ise arttığı görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulmasının ZEB2, E kaderin ve N kaderin protein ifadeleri üzerine etkisi.

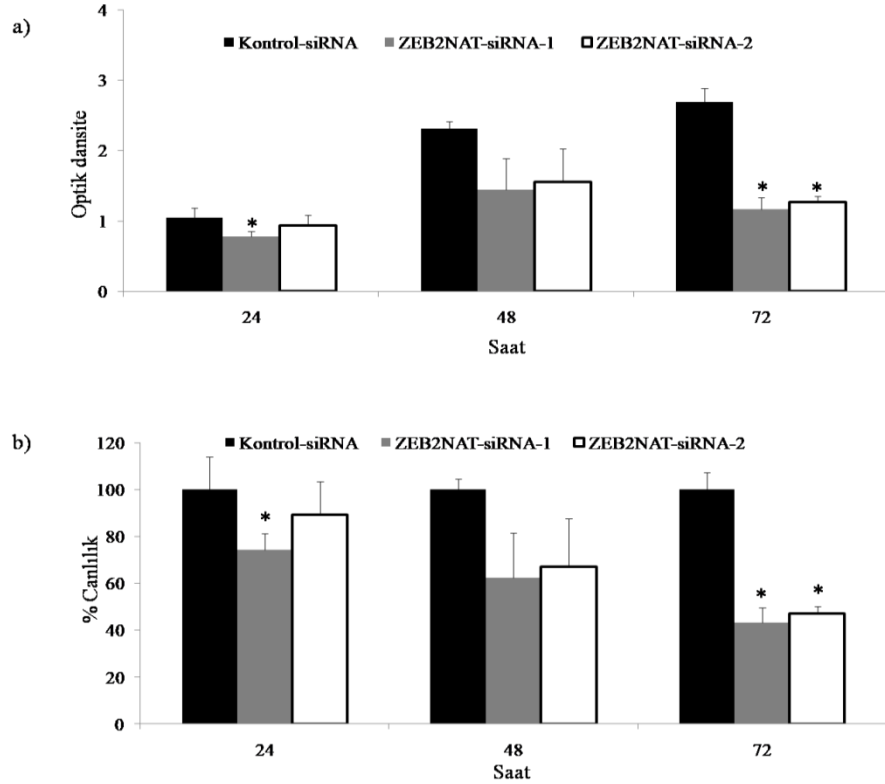


Şekil 4.6. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulmasının ZEB2, E kaderin ve N kaderin protein ifadeleri üzerine etkisi.

4.5. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

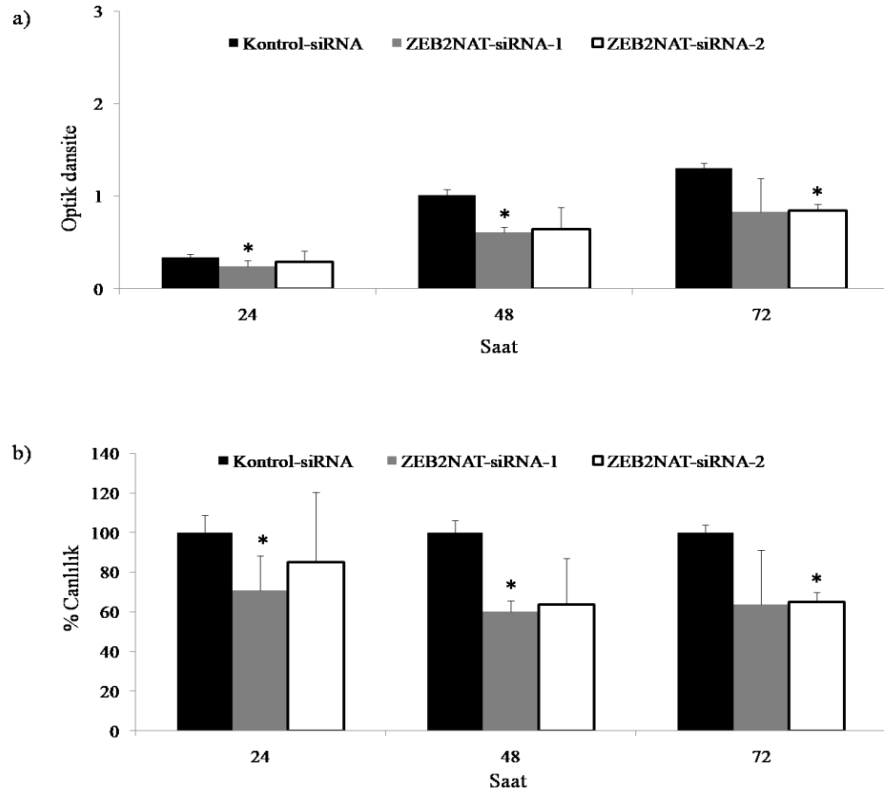
Meme kanserinde ZEB2NAT'ın rolünü ortaya çıkarmak amacıyla ZEB2NAT'ın susturulması ZEB2NAT-siRNA'larının transfeksiyonu ile sağlanmıştır. MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulmasının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı

üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla XTT testi kullanılmıştır. Hücre canlılığı oranları dikkate alındığında, MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA-1 grubunda sırasıyla 24., 48. ve 72. saatlerde %74, %62 ve %43 olduğu görülmüştür. Aynı hücre hattında ZEB2NAT-siRNA-2 grubunda ise 24., 48. ve 72. saatlerde bu oranların sırasıyla %89, %67 ve %47 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. ZEB2NAT'ın MCF7 hücre canlılığı üzerine (a) optik dansite değerlerine (b) % canlılık oranlarına göre etkisi *p<0,05.

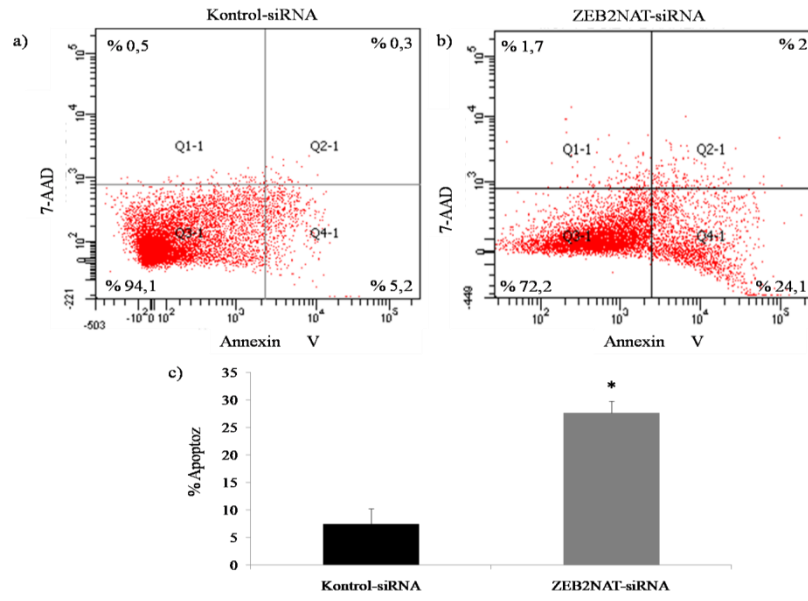
MDA-MB-231 hücre hattında kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı oranının ZEB2NAT-siRNA-1 grubunda sırasıyla 24., 48. ve 72. saatlerde %70, %60 ve %63 olduğu bulunmuştur. Aynı hücre hattında ZEB2NAT-siRNA-2 grubunda ise 24., 48. ve 72. saatlerde bu oranların sırasıyla %85, %63 ve %64 olduğu saptanmıştır. İki hücre hattında da kontrol-siRNA uygulanmış gruplarla karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA tranfekte edilen gruplarda hücre canlılığının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.8). Her iki siRNA'nın uygulanması sonrası hücre canlılığı azalmıştır. Ancak ZEB2NAT-siRNA-1 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi daha fazla bulunmuştur.



Şekil 4.8. ZEB2NAT'ın MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine (a) optik dansite değerlerine (b) % canlılık oranlarına göre etkisi * $p < 0,05$.

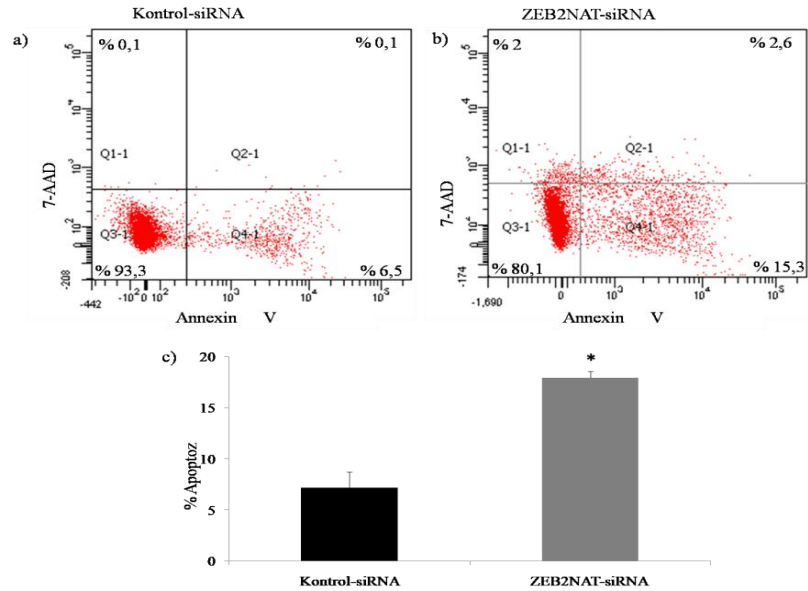
4.6. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Apoptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde canlı (annexin V-/7-AAD-), erken apoptoz (annexin V+/7-AAD-), geç apoptoz (annexin V+/7-AAD+) ve nekroz (annexin V-/7-AAD+) oranının belirlenmesi amacıyla FITC annexin V yöntemi kullanılmıştır. Akım sitometri analiz sonuçları, MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubunda ortalama toplam apoptoz oranının $7,45 \pm 2,7$ olduğunu göstermiştir. ZEB2NAT-siRNA grubunda toplam apoptoz oranı ise $27,6 \pm 2,1$ olarak hesaplanmıştır. ZEB2NAT'ın susturulması MCF7 hücre hattında anlamlı derecede apoptozu uyarmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. ZEB2NAT'ın MCF7 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi * $p<0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA akım sitometri analizi, c) % apoptoz oranları.

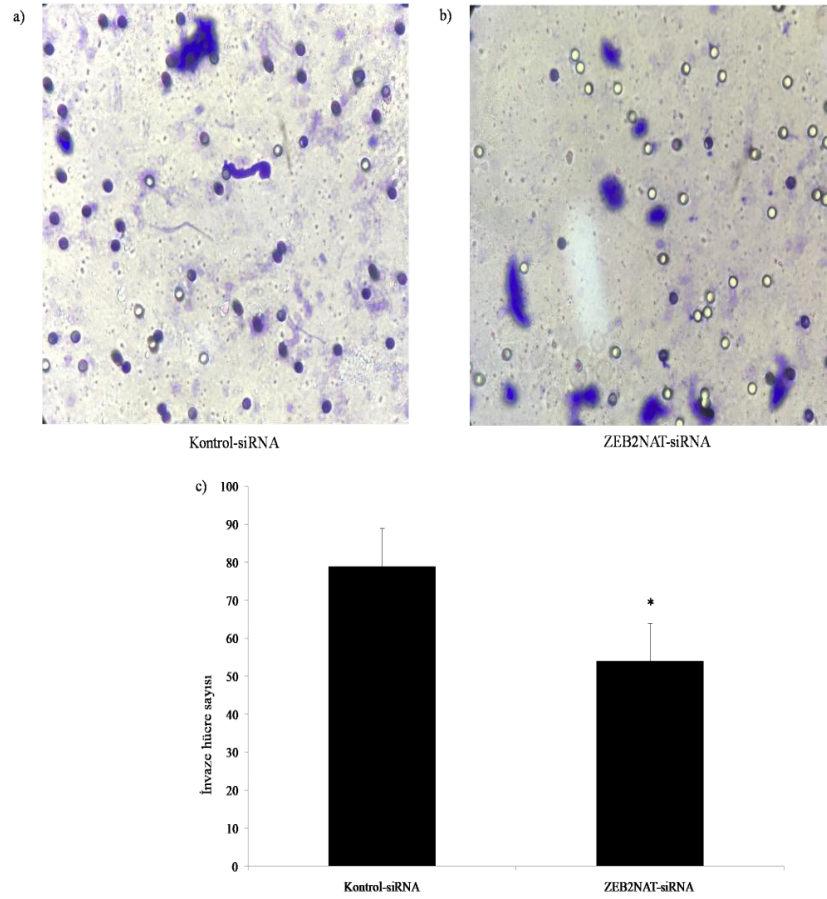
MDA-MB-231 hücrelerinde akım sitometri analizleri sonucunda Kontrol-siRNA grubunda toplam apoptoz oranının $6,7\pm1,5$, ZEB2NAT-siRNA grubunda ise $18,45\pm0,7$ olduğu görülmüştür. ZEB2NAT'ın susturulması durumunda MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz oranının anlamlı derecede arttığı görülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. ZEB2NAT'ın MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi * $p<0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA akım sitometri analizi, c) % apoptoz oranları

4.7. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Hücre İnvazyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

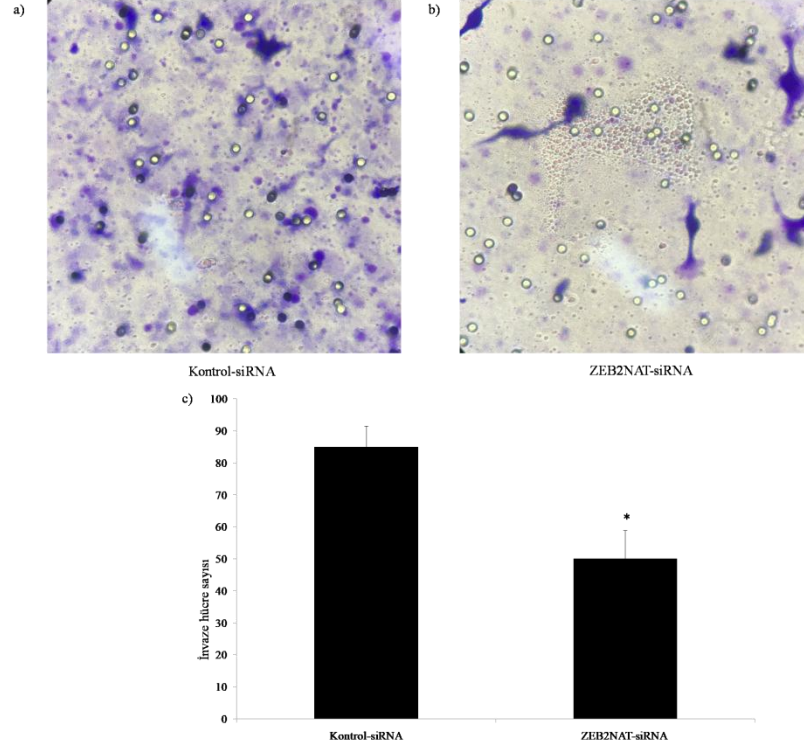
ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi invazyon odacıkları ile değerlendirilmiştir. İnvazyon odacıklarından diğer tarafa geçen hücreler invaze hücreler olarak kabul edilmiş ve mikroskopta sayılmıştır. MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubunda ortalama invaze hücre sayısının 79 ± 11 olduğu görülmüştür. ZEB2NAT-siRNA grubunda ise ortalama invaze hücre sayısı 54 ± 5 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında ZEB2NAT'ın susturulması durumunda MCF7 hücre hattında invazyonun $\%31,6 \pm 9$ oranında baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. ZEB2NAT'ın MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi * $p < 0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA invazyon görüntüsü, c) Kontrol- siRNA ve ZEB2NAT-siRNA grupları invaze hücre sayısı.

MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubunda ortalama invaze hücre sayısı 85 ± 6 olarak hesaplanmıştır. ZEB2NAT-siRNA grubunda ise ortalama invaze hücre sayısının 50 ± 8 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar dikkate alındığında

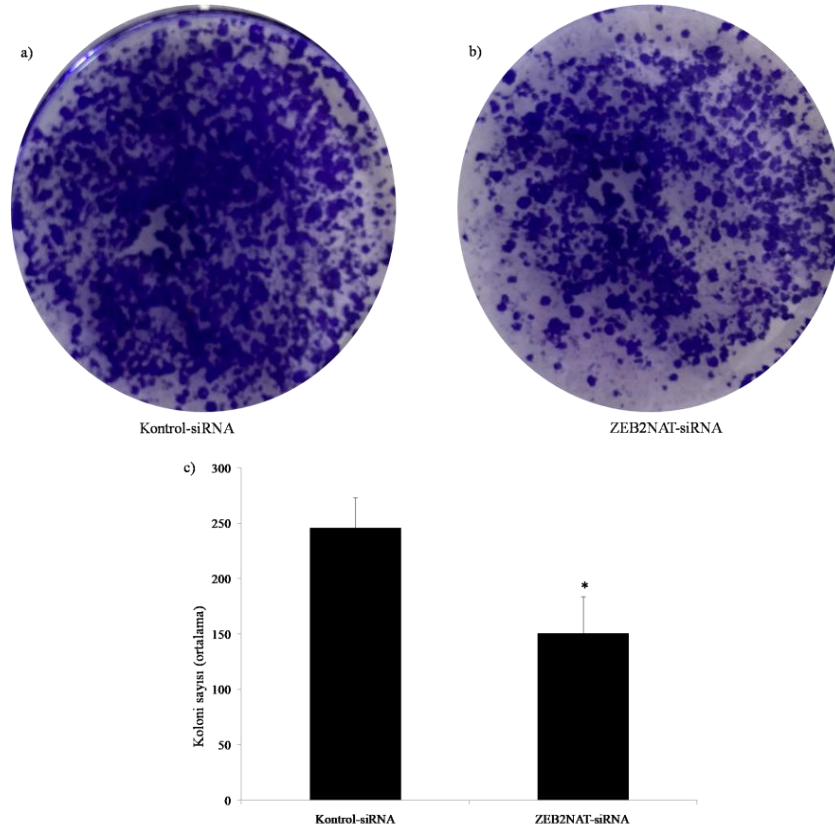
ZEB2NAT'ın susturulması durumunda MDA-MB-231 hücre hattında invazyonun $41 \pm 6,2$ oranında baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. ZEB2NAT'ın MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi $*p < 0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA invazyon görüntüsü, c) Kontrol- siRNA ve ZEB2NAT-siRNA grupları invaze hücre sayısı.

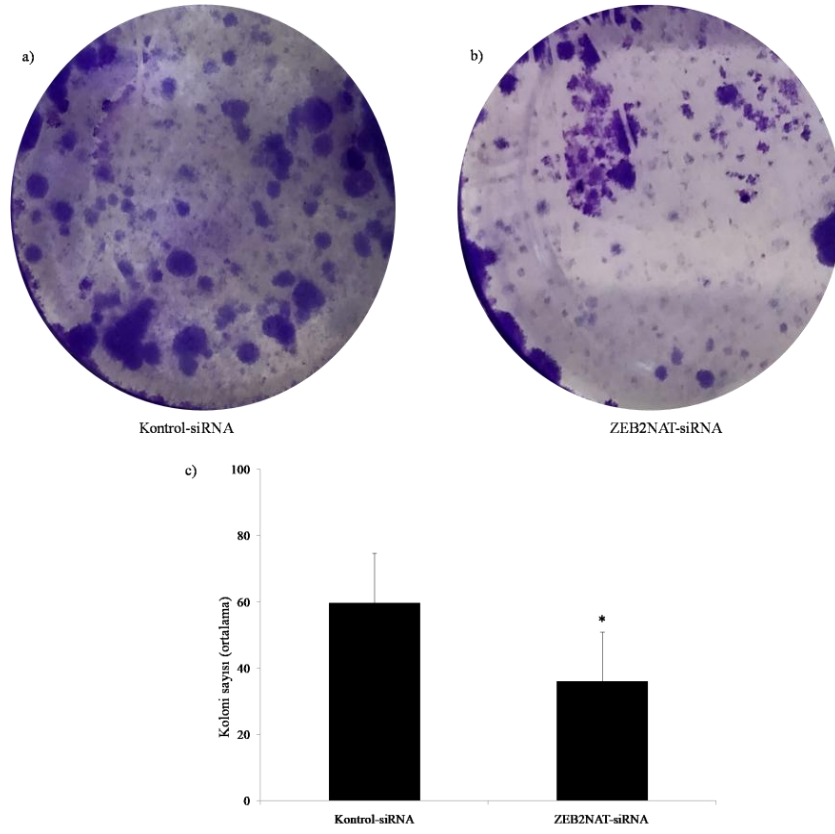
4.8. ZEB2NAT'ın Susturulmasının Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi koloni testi ile değerlendirilmiştir. Bu test sonucunda ZEB2NAT'ın susturulması bu hücrelerde koloni oluşum kapasitesini anlamlı derecede inhibe etmiştir. MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubunda koloni sayısının ortalama 246 ± 27 ZEB2NAT-siRNA grubunda ise ortalama 151 ± 33 olduğu görülmüştür. MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA grubunda koloni oluşumunun $38 \pm 7,3$ oranında baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.13). Bu sonuçlar, aşırı ZEB2NAT ifadesinin MCF7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.13. ZEB2NAT'ın MCF7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi * $p < 0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA invazyon görüntüsü, c) Kontrol- siRNA ve ZEB2NAT-siRNA grupları ortalama koloni sayısı.

MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubunda ortalama 59 ± 15 koloni sayılmıştır. Ancak ZEB2NAT-siRNA grubunda koloni sayısı ortalama 36 ± 14 olarak hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA grubunda koloni oluşumunun $\%40 \pm 15,3$ oranında baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.14). Bu sonuçlar aşırı ZEB2NAT ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.14. ZEB2NAT'ın MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi * $p < 0,05$. a) Kontrol-siRNA ve b) ZEB2NAT-siRNA invazyon görüntüsü, c) Kontrol- siRNA ve ZEB2NAT-siRNA grupları ortalama koloni sayısı.

5. TARTIŞMA

Son yıllara kadar kanser üzerine yapılan çalışmalarda proteinlere odaklanılmıştır. Ancak gelişen teknoloji ile birlikte transkriptlerin %2'sinin protein kodladığı %98'inin ise kodlamayan RNA'lar olduğu anlaşılmıştır (Gezer ve ark., 2014). Daha sonra artan çalışmalar ile birlikte kodlamayan RNA'ların çeşitli biyolojik rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Çoğu kodlamayan RNA >200 nükleotidden oluşur ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) olarak tanımlanmaktadır (Wang ve ark., 2016). lncRNA'ların özellikle son yıllarda birçok hastalığın yanı sıra kanser biyolojisindeki yeri de ortaya konmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015a; Zhao ve ark., 2015).

siRNA ve miRNA gibi küçük kodlamayan RNA'lar ile ilgili oldukça veri bulunmasına rağmen, lncRNA'lar konusunda literatür daha sınırlıdır (Kapranov ve ark., 2007; Meseure ve ark., 2015). lncRNA'ların anjiyogenez, metastaz (Zhan ve ark., 2016) ve apoptoz (Wang ve ark., 2015b) gibi farklı süreç ve yolaklarda görevli genlerin düzenlenmesinde önemli işlevleri olduğu ve bu nedenle de kanser patogenezinin moleküler düzeyde anlaşılmasına katkıda bulunması kaçınılmazdır.

lncRNA'lardan MALAT1 (Gutschner ve ark., 2013), HOTAIR (Ding ve ark., 2014) ve TRE (Gumireddy ve ark., 2013); kromatin modifikasyonu, epigenetik düzenlenme, alternatif splayzing ve translasyonel kontrol aracılığı ile hücre migrasyonu, invazyon, EMT ve metastazın kontrolünün önemli örneklerini oluşturmaktadır. Ancak, son yıllarda daha çok transkriptin kanser metastazı ile ilişkilendirilmesi ve fonksiyonlarının açığa çıkarılması potansiyel araştırma konularını oluşturmaktadır (Dhamija ve Diederichs 2016). Örneğin, lncRNA LEIGC'nin mide kanserinde EMT'nin engellenmesinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada mide kanserinde LEIGC'nin baskılandığı durumda EMT sürecinde önemli olan SNAIL, Slug, TWIST ve ZEB transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinde önemli artışa neden olduğu gösterilmiştir (Han ve ark., 2014).

Antisense uzun kodlamayan RNA'lar bir protein kodlama lokusuna karşı antisense yönde ifade olan lncRNA'lardır. Antisense lncRNA'lar insan hücrelerinde sıklıkla ifade edilmektedir. Ayrıca, tüm transkribe edilen bölgelerin %61-72'si

antisense lncRNA'lara sahiptir (He ve ark., 2008). lncRNA ZEB2NAT, EMT sürecinde önemli role sahip ZEB2'nin doğal antisense transkriptidir. ZEB2 mRNA'sının 5'-UTR bölgesinde yer alan bir intron, aktif translasyona neden olan iç ribozom giriş bölgesi (IRES) içermektedir. Bu intronun splayzinginin önlenmesi ZEB2'nin doğal antisense transkriptinin varlığına bağlıdır. Epitelyal hücrelerde bu doğal antisense transkriptin ifadesi ZEB2 5'-UTR'sinin splayzingini önlediği durumda ZEB2 protein ifadesinin artışına neden olmakla birlikte E-kaderin ifadesinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca aynı çalışmada kolon kanserinde ZEB2NAT, ZEB2 intron ve E-kaderin ifadeleri arasında bir uyum olduğu rapor edilmiştir (Beltran ve ark., 2008).

Çalışmalar ZEB2NAT'ın mide kanseri (Wang ve ark., 2019), kolon kanseri (Jianqiang ve ark., 2018), akciğer kanseri (Guo ve ark., 2018), mesane kanseri (Wu ve ark., 2017) ve hepatoselüler karsinomun (Lan ve ark., 2016) ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir. Ancak ZEB2NAT'ın meme kanserindeki rolü henüz açığa çıkarılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, ZEB2NAT'ın meme kanseri üzerindeki rolünün açığa çıkarılması amacıyla iki farklı özelliğe sahip MCF7 (ER+) ve MDA-MB-231 (ER-) insan meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Bu amaçla hücrelerde ZEB2NAT ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanmıştır. Yapılan çalışmalarda sentetik siRNA'ların kullanılması ile hedef genin susturulması yoluyla genlerin fonksiyonları araştırılabilmektedir. siRNA yöntemi ile genin tamamen baskılanması mümkün olmamakla birlikte uygun diziler kullanılarak yüksek oranda gen baskılama işlemi gerçekleştirilmektedir. Daha önce ZEB2NAT'ı Wu ve ark. (2019) mide kanseri hücrelerinde, Jin ve ark. (2017) hepatoselüler karsinoma hücrelerinde, Guo ve ark. (2018) ise akciğer kanseri hücrelerinde siRNA yöntemi ile yüksek oranda baskılamayı başarmış, ancak hiçbir çalışmada tamamen baskılandığı gösterilmemiştir. Bu tez çalışmasında susturma işlemi, ZEB2NAT ifadesinin gerçek-zamanlı PZR metodu ile kontrol edilmiştir. MCF7 hücre hattında en yüksek susturma oranı %88 olarak hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde de ZEB2NAT ifadesi %64 oranında baskılanmıştır. Daha sonra ZEB2NAT'ın meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi EMT, metastaz ve apoptoz yollarında önemli genlerin ifadeleri, ZEB2, E kaderin, N kaderin protein ifadeleri, hücre proliferasyonu, apoptoz,

invazyon ve koloni oluşturma kapasitesi sırasıyla, gerçek-zamanlı PZR, western blot analizi, XTT metodu, FITC annexin V yöntemi, invazyon ve koloni testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kolorektal kanserli hastalarda lncRNA ZEB2NAT'ın ifadesinin klinik öneminin araştırıldığı bir çalışmada kolorektal kanserli 87 hastadan kanser dokusu ve komşu normal mukozal dokular alınmıştır. Alınan dokularda ZEB2NAT ifadesi ile kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik özellikleri karşılaştırılmıştır. Normal doku ile kıyaslandığında kolorektal kanser dokusunda ZEB2NAT ifadesinin 18,75 kat anlamlı bir şekilde artmış ifadesi görülmüştür. Ayrıca kolorektal kanserdeki ZEB2NAT ifadesinin bu hastalarda ölüm ile de pozitif korele olduğu rapor edilmiştir. Hastaların 5 yıllık sağkalım oranları dikkate alındığında yüksek ZEB2NAT ifadesinin görüldüğü hastalarda sağkalım oranının %43,2, düşük olan hastalarda ise %76,7 olduğu görülmüştür. Ayrıca, düşük ZEB2NAT ifadesinin hastaların daha iyi sağkalım ile ilişkili prognostik faktörü olduğu gösterilmiştir (Jianqiang ve ark., 2018).

TGF β sinyal yolağı EMT'de önemli bir yolaktır ve invaziv kanserlerde ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Van Belle ve ark., 1996). Zhuang ve ark. (2015) tarafından insan mesane kanseri dokularında ZEB2NAT transkribi ve ZEB2 protein ifadesinin TGF β 1 mRNA seviyesi ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mesane kanseri hücrelerinde ZEB2NAT aracılığıyla EMT'nin indüklendiği rapor edilmiştir (Zhuang ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında da ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda Kontrol-siRNA grupları ile karşılaştırıldığında MCF7 hücre hattında TGFB1 ifadesinin 1,32 kat ($p=0,0016$), MDA-MB-231 hücrelerinde 4,39 kat anlamlı ($p=0,0007$) derecede azaldığı görülmüştür. TGFB2 ifadesi ise MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sırasıyla 3,43 ($p=0,0821$) ve 1,43 ($p=0,0189$) kat azalmıştır. Tümör büyümesinde önemli role sahip diğer bir büyüme faktörü olan IGFBP4 gen ifadesi de MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda 3 kat anlamlı derecede ($p=0,0094$) azalmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında ise IGFBP4 ifadesinde 1,06 kat artış ($p=0,3015$) görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü) sinyal yolağı anjiyogeneze önemli rol oynamaktadır. Bu yolak tirozin kinaz aktivitesi gösteren PDGFRA ve PDGFRB olarak tanımlanan farklı iki PDGF reseptörü tarafından aktiflenmektedir (Uutela 2004). PDGF reseptörlerinin ekspresyonunun meme kanserindeki ifadesinin araştırıldığı bir çalışmada meme kanseri doku örneklerinde komşu normal dokulara göre PDGFRB ifadesinde önemli pozitif bir fark olduğu, ancak PDGFRA ifadesinde anlamlı fark görülmediği rapor edilmiştir (Vrekoussis ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında ZEB2NAT'ın susturulması anjiyogeneze önemli role sahip PDGFRB ifadesini MCF7 hücre hattında 1,39 kat ($p=0,0179$) MDA-MB-231 hücre hattında ise 1,56 kat ($p=0,0030$) anlamlı derecede azaltmıştır.

Ayrıca β -katenin ve TGF-beta/Smad sinyalleri transkripsiyon faktör kompleksi olarak görev alan TCF/LEF ve Smad aracılığı ile EMT sürecinde önemli rol oynayan genlerin aktivasyonunda birlikte rol oynamaktadırlar (Labbe ve ark., 2000). Bu tez çalışmasında gerçek-zamanlı PZR sonuçları ZEB2NAT'ın baskılanmasının TGF-beta sinyal yolağında önemli role sahip SMAD2 ifadesinde de önemli değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. ZEB2NAT'ın baskılanması MCF7 hücre hattında SMAD2 ifadesinin 1,14 kat ($p=0,0442$), MDA-MB-231 hücre hattında ise 2,56 kat ($p=0,0173$) anlamlı derecede azalmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar TGFbeta sinyal yolağı üzerinden ZEB2NAT'ın EMT'yi indükleyebileceğini düşündürmektedir.

İnvazyon ve metastazda primer tümör bölgesinde hücre-hücre bağlantı kaybı oldukça önemli bir süreçtir. Desmosomlar, hücre-hücre bağlantısını sağlayan hücreler arası bağlantılardır ve epitel doku bütünlüğünün sağlanmasında önemlidir (Thomason ve ark., 2010). Desmozomal protein ifadesinin meme kanserinin (Oshiro ve ark., 2005) yanı sıra orofaringeal skuamöz hücreli karsinoma (Papagerakis ve ark., 2009), servikal karsinoma (Alazawi ve ark., 2003), kolorektal kanser (Cui ve ark., 2011) ve pankreas kanserinde (Hamidov ve ark., 2011) düşük olduğu daha önceden yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Bu tez çalışmasında hücre-hücre bağlantısında önemli olan ve dolayısıyla hücre hareketini kısıtlayan DSP gen ifadesi çalışılmıştır. ZEB2NAT ifadesinin susturulması MCF7 hücre hattında 1,16 kat ($p=0,0153$), MDA-MB-231 hücre hattında ise 1,23 kat anlamlı artışa ($p=0,0278$) neden olmuştur.

Dolayısıyla ZEB2NAT'ın baskılanması hücre-hücre bağlantısında önemli role sahip DSP'nin artışına neden olarak EMT'yi baskılayabileceği ve metastazı da azaltılabileceği düşünülmektedir.

ZEB2, E kaderin ve epitelyal hücreler arası bağlantılar için gerekli olan diğer genlerin ifadesini baskılayarak EMT'yi aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. ZEB2 proteinin sentezi, kendisinin doğal bir antisensi olan ZEB2NAT isimli lncRNA ile kontrol edilmektedir. Yapılan bir çalışmada yetişkin fare fibroblastlarında ZEB2NAT ifadesinin susturulmasının hem ZEB2NAT hem de ZEB2 ifadesinin azalmasını indüklediği ve yaşlı fibroblastların pluripotent hücrelere yeniden programlanmasını artırdığı rapor edilmiştir. Daha önceden yapılan bu çalışma ile birlikte bir antisense transkript olan ZEB2NAT'ın yaşlı hücrelerin yeniden programlanmasında, farklılaşmasında ve pluripotenside etkileri olan yeni bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Bernardes ve ark., 2018). Hem EMT sürecinde hemde kök hücrede önemli olan Wnt yolağının aktivasyonu ve β -katenin'in nükleer birikimi kolon kanserinde E kaderin kaybını arttırmış birkaç meme kanseri hücre hattında vimentin ifadesini ve EMT sürecini indüklemiştir (Brabletz ve ark., 2001; Gilles ve ark., 2003).

Bu tez çalışmasında, ZEB2NAT susturulduğu durumda gerçek-zamanlı PZR sonuçları EMT sürecinde önemli olan WNT yolağından bazı genlerin anlamlı derecede değiştiğini göstermiştir. ZEB2NAT'ın susturulması MCF7 hücre hattında WNT5B gen ifadesinde 1,35 kat ($p=0,0460$) anlamlı azalışa, MDA-MB-231 hücre hattında 1,07 kat ($p=0,7308$) anlamlı olmayan artışa neden olmuştur.

Ayrıca ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda MCF7 hücre hattında WNT11 ve WNT5A gen ifadelerinde sırasıyla 1,08 ($p=0,7954$) ve 1,33 kat ($p=0,1365$) azalış görülmüştür ancak, istatistiksel olarak anlamlı değildir. MDA-MB-231 hücre hattında ise aynı genlerde sırasıyla 2,22 ve 44,79 kat anlamlı derecede azalış saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca WNT yolağının önemli bir bileşeni olan CTNNB1 (Katenin beta 1) gen ifadesinde MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda 1,07 kat ($p=0,0236$) anlamlı derecede azalmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda CTNNB1 ifadesinin 1,51 kat arttığı görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0,2446$).

GSK3B sitoplazmada β -katenini fosforilleyerek proteozomal degradasyonuna neden olmakta ve β -katenin ifadesini negatif olarak düzenlemektedir. Bu nedenle Wnt/ β -katenin sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olarak rol oynamaktadır (Mishra, 2010; Aristizabal-Pachon ve ark., 2015). 2005 yılında yapılan kapsamlı bir çalışmada *in vitro* koşullarda kinaz inaktif GSK3B'nin β -katenin ifadesini stabilize ettiği ve onun nükleusta lokalizasyonunu katalizlediği gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* koşullarda kinaz inaktif GSK3B transgenik farelerde β -katenin ve siklin D1 aşırı ifadesi ile meme tümör gelişimin arttığı rapor edilmiştir (Farago ve ark., 2005).

Bu tez çalışmasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan GSK3B'nin ifadesi MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB2NAT ifadesi susturulduğunda 1,35 kat anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$). MCF7 hücre hattında GSK3B gen ifadesinde anlamlı değişim saptanmamakla birlikte 1,01 kat artış görülmüştür ($p=0,9634$).

İnvazyonun önemli basamaklarından olan bazal membran yıkımında önemli role sahip MMP'lerden MMP2, MMP9 ve MT1-MMP'nin ovaryum, meme ve prostat kanser invazyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (Jones ve ark., 1999; Schmalfeld ve ark., 2001; Morgia ve ark., 2005). β -katenin/TCF/LEF transkripsiyonel aktivitesi MT1-MMP, MMP-7 ve MMP-26'nın ifadesi aracılığıyla invazyon ve metastazı indüklemektedir (Marchenko ve ark., 2002; Takahashi ve ark., 2002). *İn vitro* koşullarda E-kaderin ifadesinde azalma ve vimentin ifadesinde artma ile karakterize EMT'li prostat kanser hücrelerinde MMP2, MMP9 ve MT-MMP ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür (Daja ve ark., 2003). Bu tez çalışmasında hücrelerin invazyon ve migrasyonunda önemli rol oynayan matriks metalloproteinaz (MMP) üyelerinden bazılarının ifadelerinde ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda değişiklikler görülmüştür. Bunlar; MCF7 hücre hattında MMP2, MMP3 ve MMP7 gen ifadesinde sırasıyla 21,48, 14,98 ve 2,48 kat anlamlı azalış bulunmuştur ($P<0,05$). MDA-MB-231 hücre hattında ise ZEB2NAT'ın susturulması MMP2, MMP3 ve MMP7 gen ifadesinde sırasıyla 1,13 ($p=0,5354$), 1,97 ($p=0,0276$) ve 4,65 ($p=0,0196$) kat azalışa neden olmuştur. Ayrıca MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması matriks metalloproteaz inhibitörleri olarak bilinen TIMP'lerden (metalloproteazların spesifik doku inhibitörleri) TIMP1 ve TIMP3 gen ifadelerinde sırasıyla 7,94 ve 1,28 kat anlamlı artışa neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$). MDA-

MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması TIMP1 ve TIMP3 gen ifadeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

WNT ile aktive edilen β -katenin/TCF kompleksi, EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu değiştirerek meme kanseri metastazını güçlendirmektedir (Wu ve ark., 2012). Daha önce yapılan bir araştırmada β -katenin/TCF4'ün doğrudan ZEB1 promotörüne bağlanarak ZEB1 transkripsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca β -katenin ve TCF4'ün baskılanması ZEB1 ifadesinin inhibisyonuna neden olduğu da rapor edilmiştir (Sánchez-Tilló ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında da EMT'de önemli bir transkripsiyon faktörü olan TCF4 gen ifadesinde ZEB2NAT'ın baskılanması MCF7 (1,47 kat) ve MDA-MB-231 (1,62 kat) hücre hatlarında anlamlı azalmaya neden olmuştur ($p < 0,05$).

MTSS1 (Metastaz supresor 1) bir hücrede kanser ilerlemesi veya tümör metastazı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. MTSS1'in azalan ifadesinin meme kanseri metastazını arttırdığı daha önce yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Xie ve ark., 2018). MTSS1 normal ve bazı metastatik olmayan kanser hücrelerinde ifade edilmektedir. Ancak MTSS1'in ifadesi meme (Parr ve Jiang, 2009), mesane (Nixdorf ve ark., 2004), prostat (Loberg ve ark., 2005), mide (Liu ve ark., 2010) ve böbrek kanseri (Du ve ark., 2012) gibi farklı kanser türlerinde azalmış veya yoktur. Bu tez çalışmasında, önemli bir tümör baskılayıcı olan MTSS1 ifadesinin MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması durumunda 1,68 kat arttığı görülmüştür. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda bu genin ifadesinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

Fibronektin (FN1) ile fibronektin reseptörü olan $\alpha_5\beta_1$ integrinin bağlanması hücresel uzantıların oluşturulması ve hücre hareketini indüklemeye önemlidir (Davidson ve ark., 2006). Fibronektinin prostat ve mide kanser hücrelerinde invazyon ve hücre hareketini arttırdığı görülmüştür (Zeng ve ark., 2006; Yang ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında, önemli bir ECM proteini olan FN1 (Fibronektin 1) gen ifadesinin MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması durumunda 1,25 kat anlamlı azalışa neden olmuş ve MCF7 hücre hattında FN1 gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca ITGA5 (integrin subunit alfa 5) gen ifadesi

MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu grupta 1,27 kat anlamlı derecede azalmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması ITGA5 gen ifadesini anlamlı derecede değiştirmemiştir.

STEAP1 (Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1) prostat kanseri ve diğer birçok dokudan elde edilen insan kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen prostat spesifik hücre yüzey antijeni olarak tanımlanmıştır. STEAP1'in insan meme kanserlerinde aşırı ifade olduğu daha önce yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. Ayrıca STEAP1 transkripsiyonunun meme kanseri vakalarında tümör derecelendirmesi ile pozitif korelasyon gösterdiği de rapor edilmiştir (Maia ve ark., 2008). Mevcut tez çalışmasında, STEAP1 gen ifadesinin MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda 1,64 kat anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ayrıca MCF7 hücre hattında STEAP1 gen ifadesinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

ECM'nin majör komponentlerinden hyaluronan (HA) direk ve indirek olarak hücre biyolojisinin temel yönlerini etkilemektedir. Bu nedenle, HA'da ortaya çıkan anormallikler enflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta rol oynamaktadır (Toole, 2004). HA, N-asetil glukozamin ve glukuronik asit disakkarit tekrarlarından oluşan büyük bir polisakkarittir. Normal fizyolojik şartlarda HA 25,000 disakkarit birimlerinden oluşmaktadır. Ancak patolojik durumlarda HA, daha küçük ve daha dağınık hale gelebilmektedir (Heldin ve ark., 2013). HA hücre yüzey reseptörleri ile etkileşip hücre içi sinyal iletimini aktive ederek fibroblast motilitesini uyandırır. Spesifik olarak bu molekül miyofibroblastların HA bağımlı invazyon kapasitesini hücre-hücre bağlantılarında önemli rol oynayan hücre yüzey molekülü CD44 ile bağlanarak arttırabilir (Li ve ark., 2011). 6-mer HA oligosakkaritleri fibroblast migrasyonunu uyarmak için CD44 tarafından ligandın tanınmasında gereklidir (Tolg ve ark., 2014). HA sentez inhibitörü 4-methylumbelliferone (4-MU)'un CD44 sinyalini azaltarak osteosarkoma hücrelerinin akciğere metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Arai ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında da hücre migrasyonunda önemli role sahip CD44 gen ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda 1,55 kat anlamlı derecede ($p=0,0016$) azaldığı görülmüştür. Ancak, MCF7 hücre hattında da

ZEB2NAT'ın susturulması CD44 gen ifadesini 1,7 kat azaltmış ancak istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0,1772$) bulunmamıştır.

Tip IV kollajen bazal membranın ana bileşenidir ve altı farklı α zincir ($\alpha1$ - $\alpha6$) arasından üç zincirin kombinasyonu ile oluşmaktadır. Bu altı zincir de farklı altı gen (COL4A1-COL4A6) tarafından kodlanmaktadır (Ricard-Blum, 2011). Arresten, canstatin ve tumstatin tip IV kollajenin sırasıyla $\alpha1$, $\alpha2$ ve $\alpha3$ zincirlerinden salınan antianjiyogenik fragmentlerdir (Monboisse ve ark., 2014). 2015 yılında yapılan bir çalışmada meme kanseri hücre hatlarında azalan kollajen IV ifadesinin kollajenin yeniden düzenlenmesine neden olduğu ve bununla ECM'ye tümör invazyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Afzan ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında bazal membranın ana komponentlerinden biri olan COL4A2 (Kollajen tip IV alfa 2) ifadesi MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda 8,63 kat anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Ancak MDA-MB-231 hücre hattında ZEB2NAT'ın baskılanması COL4A2 gen ifadesinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır.

Snail ailesi promotor analizleri sonucunda AP1 ve AP4, Smad bağlanma bölgeleri, LEF1 bağlanma bölgeleri ve bunların transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasına yardımcı olan iki E box bölgeleri tanımlanmıştır (Barbera ve ark., 2004; Sakai ve ark., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda AP4'ün kolon kanserinde invazyon ve hücre migrasyonunu arttırdığı ve EMT sürecini düzenlediği, ayrıca çoğu kanser tipinde yüksek seviyede ifade olduğu ve kanser hastalarında kötü prognoz ile bağlantılı olduğunda rapor edilmiştir (Buechler 2009; Jackstadt ve ark., 2013; Hu ve ark., 2013). Epitelyal sitokeratinlerin yanısıra sıkı bağlantılar ve epitelyal hücre polaritesi için gerekli olan kladin ve okludinleri içeren diğer yaygın epitelyal genlerin bir çeşidinin represörü olarak Snail ailesi gösterilmektedir (Peinado ve ark., 2007). Snail'in CAR, okludin, kladin-3 ve E kaderin'in promotorlarını hedef alan transkripsiyonel represör kompleksini şekillendirmek için Smad3 ve Smad4 ile etkileşim içinde olduğu görülmüştür (Vincent ve ark., 2009). Çok fazla kanser hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonucunda Snail ifadesinin ZEB1 ifadesini indüklediği de görülmüştür (Guaita ve ark., 2002). Meme kanserlerinde, Snail ve Slug ifadesi değerlendirilmiş ve E kaderin baskılanması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, Snail ve Slug ifadesi lenf nodu metastazında, tümör nüksünde ve kötü prognozda artmıştır

(Elloul ve ark., 2005; Come ve ark., 2006). Ayrıca, Snail MMP2 promotorunu aktive etmiş, vimentin ifadesini arttırmış ve skuamöz hücre karsinomlarının invazyonunu indüklemiştir. Snail çeşitli hücre hatlarında da MMP9, MT1-MMP ve MT2-MMP ifadelerini indüklemiştir (Yokoyama ve ark., 2003; Jorda ve ark., 2005; Ota ve ark., 2009). Özetle, bir transkripsiyon faktörü olarak Snail sıkı bağlantı stabilitesinde, epitelyal hücre polaritesi ve morfolojisini düzenleyen kontrol genlerinde anahtar rol oynayarak çeşitli kanser tiplerinde EMT, invazyon, kötü klinik sonuç ve metastazın gelişimi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında da SNAI2 (Slug) ifadesi ZEB2NAT ifadesinin baskılandığı durumda Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücre hattında 1,42 kat ($p=0,0046$) anlamlı derecede MCF7 hücre hattında 1,67 kat ($p=0,0684$) azalmıştır.

Daha önce yapılan bir araştırma da western blot analizleri sonucunda A549 ve NCI-H292 insan akciğer kanseri hücrelerinde ZEB2NAT ifadesinin susturulmasının BAX, CASP3, CASP9 protein ifadesini arttırdığı gösterilmiş ve CASP8 protein ifadesi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. H-125 ve H1975 insan akciğer kanseri hücrelerinde aşırı ZEB2NAT ifadesinin sağlanması durumunda BAX, CASP3 ve CASP9 protein ifadesinin de azaldığı rapor edilmiştir (Guo ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında da MCF7 hücrelerinde ZEB2NAT ifadesinin susturulmasının apoptozda önemli olan PTEN (1,34 kat), RB1 (49,87 kat), CASP9 (4,17 kat), CYCS (179,15 kat), TNF (1,68 kat) ve TRADD (2,62 kat) gen ifadelerinin anlamlı derecede artmalarına neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ile ilişkilendirilen PTEN, CASP3 ve CASP9 genlerinin ifadeleri ZEB2NAT baskılandığında Kontrol-siRNA grubuna kıyasla sırasıyla 1,78, 1,34 ve 1,66 kat anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Bu bulgular ZEB2NAT'ın baskılanmasının ifadeleri değişen genler üzerinden her iki hücre hattında da apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, ZEB2NAT ifadesinin baskılandığı durumda karaciğer kanseri hücrelerinde tümör büyümesinin ve metastazında baskılandığı belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada karaciğer kanseri dokularında ZEB2NAT ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Lan ve ark., 2016).

Wang ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ZEB2NAT'ın mide kanseri hücrelerinde susturulmasının Ki-67, PCNA, VEGF ve MMP9 ifadelerini azalttığı CASP3, CASP8, CASP9 ve PARP seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca daha önceden yapılan bu çalışmada ZEB2NAT'ın EMT markerlarından E kaderin, Vimentin and ZEB2 üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu hücrelerde ZEB2NAT'ın susturulması EMT markerlarından E kaderin protein ifadesini arttırdığı, vimentin ve ZEB2 protein seviyesini de önemli derecede azalttığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2019).

Bu tez çalışmasında da her iki hücre hattında, önemli EMT markerlarından E kaderin, N kaderin, ZEB2 ve vimentin ifadeleri değerlendirilmiştir. ZEB2NAT'ın susturulması E kaderin (CDH1) ifadesinde MCF7 hücre hattında 3,12, MDA-MB-231 hücre hattında 4,01 kat anlamlı artışa neden olmuştur ($p<0,05$). Ayrıca western blot sonuçları E kaderin (CDH1) protein ifadesinde de artış olduğunu iki hücre hattında da göstermiştir. ZEB2NAT'ın susturulması durumunda MCF7 hücre hattında N kaderin (CDH2), ZEB2 ve vimentin (VIM) ifadelerinde sırasıyla 4,06 ($p=0,0000$), 1,62 ($p=0,0333$) ve 1,08 ($p=0,0109$) kat anlamlı azalış görülmüştür. MDA-MB-231 hücre hattında da ZEB2NAT'ın susturulması N kaderin (CDH2), ZEB2 ve vimentin (VIM) ifadelerinde sırasıyla 1,61 ($p=0,0158$), 1,51 ($p=0,0001$) ve 1,65 ($p=0,0009$) kat anlamlı azalışa neden olmuştur. Ayrıca her iki hücre hattında da western blot sonuçları ZEB2NAT'ın susturulduğu durumda N kaderin (CDH2) ve ZEB2 protein seviyesinin azaldığını göstermiştir.

Wu ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, SGC-7901 insan mide kanseri hücrelerinde ZEB2NAT'ın hücre canlılığına etkisi CCK-8 hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada SGC-7901 insan mide kanseri hücrelerinde ZEB2NAT ifadesinin susturulduğu durumda hücre çoğalmasının baskılandığı belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulmasının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla XTT hücre canlılık testi yapılmıştır. Sitotoksikite deneyleri sonucunda MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulmasının Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı oranlarının sırasıyla 24., 48. ve 72. saatlerde %74, %62 ve %43 olduğu görülmüştür.

MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT'ın baskılandığı grupta hücre canlılığı oranının sırasıyla 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla %70, %60 ve %63 olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar dikkate alındığında ZEB2NAT'ın her iki hücre hattında da hücre canlılığını etkilediği görülmektedir.

Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada, mide kanserinde *in vitro* (hücre hattı) ve *in vivo* da (doku örneklerinde) ZEB2NAT ifadesi araştırılmıştır. Mide kanseri örneklerinde ZEB2NAT ifadesinin tümör ilerlemesi arasında pozitif bir korelasyon belirtilmiştir. Ayrıca mide kanseri hücrelerinde de ZEB2NAT ifadesinin yüksek olduğu göstermişlerdir. Araştırmacılar ZEB2NAT'ın mide kanseri hücre apoptozu üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla Annexin V FITC/PI yöntemini kullanmışlardır. ZEB2NAT'ın susturulmasının SGC-7901 ve BGC-823 mide kanseri hücrelerinde apoptozun artışına neden olduğunu rapor etmişlerdir (Wang ve ark., 2019).

Bu tez çalışmasında ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre apoptozu üzerine etkisi FITC annexin V apoptoz kiti ile değerlendirilmiştir. Akım sitometri analizi sonucunda MCF7 hücre hattında toplam apoptoz oranının Kontrol-siRNA grubu ($7,45 \pm 2,7$) ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT'ın baskılanması sonucu ($27,6 \pm 2,1$) anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Benzer şekilde MDA-MB-231 hücre hattında da Kontrol-siRNA grubu ($6,7 \pm 1,5$) ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT'ın baskılandığı durumda ($18,45 \pm 0,7$) apoptozun uyarıldığı sonucuna varılmıştır. Her iki hücre hattında da ZEB2NAT'ın baskılanması hücre apoptozu üzerine uyarıcı etki göstermiştir.

Hepatoselüler karsinoma hücrelerinde hepatit B virus X proteini tarafından indüklenen EMT'de lncRNA'ların fonksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada hepatoselüler karsinoma doku örneklerinde lncRNA array yapılmıştır. Hepatoselüler karsinoma dokularında hepatit B virus X proteinin 2002 lncRNA'nın ifadesini 2 kattan daha fazla değiştirdiği bulunmuştur. Önemli değişiklik gösteren lncRNA'lardan birinin de ZEB2NAT olduğu ifade edilmiş ve Hepatit B virus X proteini indüklü EMT'de ZEB2NAT ifadesinin 3,79 kat arttığı gösterilmiştir. ZEB2NAT ifadesinin susturulduğu durumda EMT'de önemli role sahip E kaderin, Vimentin ve ZEB2 ifadelerini düzenleyerek EMT'yi baskıladığı rapor edilmiştir.

Ayrıca invazyon odaları kullanılarak invazyon testi yapılmış ve ZEB2NAT'ın baskılanması durumunda hepatoselüler karsinoma hücrelerinin metastaz yeteneklerinin azaldığı gösterilmiştir (Jin ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında da ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi invazyon odaklıları ile değerlendirilmiştir. MCF7 hücre hattında ZEB2NAT'ın susturulması durumunda Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında invazyonun $31,6 \pm 9$ oranında baskılandığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücre hattında ise Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT'ın susturulması invazyonun $41 \pm 6,2$ oranında baskılanmasına neden olduğu belirlenmiştir.

Daha önce yapılan bir araştırmada, ZEB2NAT ifadesinin hem *in vivo* hem *in vitro* insan akciğer kanserinde belirgin şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca A549 ve NCI-H292 insan akciğer kanseri hücrelerinde ZEB2NAT'ın susturulmasının koloni oluşumunu azalttığı, H-125 ve H1975 insan akciğer kanseri hücrelerinde ZEB2NAT'ın aşırı ifadesinin sağlanması durumunda koloni oluşumunun arttığı rapor edilmiştir (Guo ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında da ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi koloni testi ile değerlendirilmiştir. MCF7 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA grubunda koloni oluşumunun $38 \pm 7,3$ oranında baskılandığı görülmüştür. Bu sonuçlar aşırı ZEB2NAT ifadesinin MCF7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini arttırabileceğini göstermektedir. Ayrıca, MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ZEB2NAT-siRNA grubunda koloni oluşumunun $40 \pm 15,3$ oranında baskılandığı bulunmuştur. Bu sonuçlar aşırı ZEB2NAT ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini arttırabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ER+ özellikte MCF7 ve ER- özelliğe sahip MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde lncRNA olan ZEB2NAT'ın etkisi araştırılmıştır. ZEB2NAT'ın insan meme kanseri üzerindeki etkileri aşağıda özetlenmiştir;

- ZEB2NAT ifadesinin baskılanması durumunda her iki hücre hattında da EMT, metastaz ve apoptoz genleri üzerindeki etkisi gerçek-zamanlı PZR ile değerlendirilmiş ve bazı genler üzerinden antimetastatik ve apoptotik etkiye neden olduğu gösterilmiştir.
- Yapılan sitotoksikite deneyleri sonucunda ZEB2NAT'ın baskılanmasının her iki hücre hattında da hücre çoğalmasını azalttığı gözlenmiştir.
- ZEB2NAT'ın baskılanmasının her iki hücre hattında da apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.
- İnvazyon testleri sonucunda her iki hücre hattında ZEB2NAT'ın baskılanmasının belli oranlarda anti-invaziv etki gösterdiği saptanmıştır.
- Koloni testi sonucunda ZEB2NAT'ın baskılanması her iki hücre hattında da koloni oluşumunu belli oranlarda azalttığı görülmüştür.

Tüm sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, EMT sürecinde önemli role sahip olan ZEB2 transkripsiyon faktörünün antisense transkribi olan ZEB2NAT'ın meme kanserinde EMT, metastaz ve apoptoz üzerinden önemli rollere sahip olduğu görülmektedir. Ancak, ZEB2NAT'ın meme kanserinde prognostik faktör olarak kullanılması ya da terapötik amaçla hedef alınması için *in vivo* modeller kullanılarak daha ileri araştırmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Afzan MY, Mardhiah M, Sharifah Norbaizura SB, Syahirah KM, Ridhwan R, Adibah P. Characterization of collagen (IV) mRNA in cell lines of breast cancer. *Jurnal Teknologi*. 2015; 77(25): 133-136.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4): 657–685.
- Alazawi WO, Morris LS, Stanley MA, Garrod DR, Coleman N. Altered expression of desmosomal components in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch*. 2003; 443(1): 51-56.
- Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res*. 2006; 66(7): 3365–3369.
- Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010; 2010(41): 134-138.
- Altieri F, Arcari P and Rippa E. Mozsik G (Ed.). Gastric cancer: molecular pathology state. *Current Topics in Gastritis-2012*. 2013; p: 249 doi: 10.5772/53757.
- Amatangelo MD, Stearns ME. Fatatis A (Ed.). Signaling pathways and molecular mediators in metastasis. Springer Science+Business Media B.V, 2012; Philadelphia, USA, p:13-49.
- American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015, Special Section: Breast Carcinoma In Situ. American Cancer Society, Inc. 2015.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003; 72(5): 1117-1130.
- Apter D, Reinila M, Vihko R. Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer*. 1989; 44(5): 783-787.
- Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N. Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo. *Br J Cancer*. 2011; 105(12): 1839–1849.
- Aristizabal-Pachon AF, Carvalho TI, Carrara HH, Andrade J, Takahashi CS. AXIN2 polymorphisms, the β -Catenin destruction complex expression profile and breast cancer susceptibility. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(16): 7277-7284.
- Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, Pelucchi C, Bellocco R, Negri E, Corrao G, Rehm J, Boffetta P, La Vecchia C. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2013; 24(2): 301-308.
- Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014; 23(3): 409-422.
- Barbera MJ, Puig I, Domínguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiró S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, García de Herreros A. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*. 2004; 23(44): 7345–7354.
- Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest*. 1983; 49(2): 140–147.
- Beltran M, Puig I, Peña C, García JM, Alvarez AB, Peña R, Bonilla F, de Herreros AG. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Genes Dev*. 2008; 22(6): 756–769.

- Bernardes de Jesus B, Marinho SP, Barros S, Sousa-Franco A, Alves-Vale C, Carvalho T, Carmo-Fonseca M. Silencing of the lncRNA Zeb2-NAT facilitates reprogramming of aged fibroblasts and safeguards stem cell pluripotency. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 94.
- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Rev Clin Oncol.* 2016;13(11): 674-690.
- Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010;7(5): e1000279.
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 3): 499–511.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix MetalloProteinases (MMP_s) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMP_s): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20(3): 161-168.
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(18): 10356–10361.
- Brunner AL, Beck AH, Edris B, Sweeney RT, Zhu SX, Li R, Montgomery K, Varma S, Gilks T, Guo X, Foley JW, Witten DM, Giacomini CP, Flynn RA, Pollack JR, Tibshirani R, Chang HY, van de Rijn M, West RB. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol.* 2012;13(8): R75.
- Bucholc M, Łepecka-Klusek C, Pilewska A, Kanadys K. Women's opinion of the risk of breast cancer. *Ginek Pol.* 2001; 72(12A): 1460-1456.
- Buechler S. Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Cancer.* 2009; 9: 243.
- Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Rowden D, Solky AJ, Stearns V, Winer EP, Griggs JJ. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol.* 2014; 32(21): 2255-2269.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; 490(7418): 61-70.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(2): 76–83.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(8): 2329-2334.
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs.* 2007; 185(1-3): 7–19.
- Cheang MC, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, Chia S, Shepherd L, Ruiz-Borrego M, Calvo L, Alba E, Carrasco E, Caballero R, Tu D, Pritchard KI, Levine MN, Bramwell VH, Parker J, Bernard PS, Ellis MJ, Perou CM, Di Leo A, Carey LA. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist.* 2015; 20(5): 474-482.
- Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24(2): 73–76.

- Clamp A, Danson S, Clemons M. Hormonal and genetic risk factors for breast cancer. *Surgeon*. 2003; 1(1): 23–31.
- Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012; 149(6): 1192–1205.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002; 360: 187–195.
- Come C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, Theillet C, Savagner P. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(18): 5395–5402.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*. 2001; 7(6): 1267–1278.
- Cui T, Chen Y, Yang L, Knösel T, Zöller K, Huber O, Petersen I. DSC3 expression is regulated by p53, and methylation of DSC3 DNA is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011; 104(6): 1013–1019.
- Cuzick J. Epidemiology of Breast Cancer selected highlights. *Breast*. 2003; 12 (6): 405–411.
- Daja MM, Niu X, Zhao Z, Brown JM, Russell PJ. Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2003; 6(1): 15–26.
- Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 116(2): 205–219.
- Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011; 378(9804): 1707–1716.
- Davidson LA, Marsden M, Keller R, Desimone DW. Integrin alpha5beta1 and fibronectin regulate polarized cell protrusions required for *Xenopus* convergence and extension. *Curr Biol*. 2006; 16(9): 833–844.
- Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011; 378(9793): 771–784.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhata R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*. 2012; 22(9): 1775–1789.
- Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer*. 2016; 139(2): 269–280.
- Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014; 19(8): 805–813.
- Ding C, Cheng S, Yang Z, Lv Z, Xiao H, Du C, Peng C, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. Long noncoding RNA HOTAIR promotes cell migration and invasion via down-regulation of RNA binding motif protein 38 in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 4060–4076.
- Du P, Ye L, Li H, Yang Y and Jiang WG. The tumour suppressive role of metastasis suppressor-1, MTSS1, in human kidney cancer, a possible connection with the SHH pathway. *J Exp Ther Oncol*. 2012; 10(2): 91–99.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FG, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. New York: Springer, 2010.

- Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005; 24(14): 2375–2385.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411(6836): 494–498.
- Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(8): 1631–1643.
- Elshof LE, Tryfonidis K, Slaets L, van Leeuwen-Stok AE, Skinner VP, Dif N, Pijnappel RM, Bijker N, Rutgers EJ, Wesseling J. Feasibility of a prospective, randomised, open-label, international multicentre, phase III, non-inferiority trial to assess the safety of active surveillance for low risk ductal carcinoma in situ – The LORD study. *Eur J Cancer*. 2015; 51(12): 1497-1510.
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012; 489(7414): 57-74.
- Engström PG, Suzuki H, Ninomiya N, Akalin A, Sessa L, Lavorgna G, Brozzi A, Luzi L, Tan SL, Yang L, Kunarso G, Ng EL, Batalov S, Wahlestedt C, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Bajic VB, Orlando V, Reid JF, Lenhard B, Lipovich L. Complex loci in human and mouse genomes. *PLoS Genet*. 2006; 2(4): e47.
- Erbas B, Provenzano E, Armes J, Gertig D. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 97(2): 135-144.
- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011; 12(12):861–874.
- Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD, Seldin DC. Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005; 65(13): 5792-5801.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 453-458.
- Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. *Future Oncol*. 2007; 3(1): 55–63.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806–811.
- Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1986; 46(2): 467–743.
- Francis A, Thomas J, Fallowfield L, Wallis M, Bartlett JM, Brookes C, Roberts T, Pirrie S, Gaunt C, Young J, Billingham L, Dodwell D, Hanby A, Pinder SE, Evans A, Reed M, Jenkins V, Matthews L, Wilcox M, Fairbrother P, Bowden S, Rea D. Addressing overtreatment of screen detected DCIS; the LORIS trial. *Eur J Cancer*. 2015; 51(16): 2296-2303.
- Francken AB, Schouten PC, Bleiker EM, Linn SC, Rutgers EJ. Breast cancer in women at high risk: the role of rapid genetic testing for BRCA1 and -2 mutations and the consequences for treatment strategies. *Breast*. 2013; 22(5): 561-568.
- Gezer U, Özgür E, Cetinkaya M, Isin M, Dalay N. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biol Int*. 2014; 38(9): 1076-1079.
- Ghelfod A, Hulpiau P, van Roy F, De Craene B, Berx G. Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(15): 2527–2541.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. 2011; 10: 38.
- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, Foidart JM. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63(10): 2658–2664.

- Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Hortobagyi GN. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(4): 290-303.
- Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Seelam S, Kimbuende E, Margenthaler JA. Poorer survival outcomes for male breast cancer compared with female breast cancer may be attributable to in-stage migration. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(7): 1837-1844.
- Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39209–39216.
- Guan D, Zhang W, Zhang W, Liu GH, Belmonte JC. Switching cell fate, ncRNAs coming to play. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e464.
- Gumireddy K, Li A, Yan J, Setoyama T, Johannes GJ, Orom UA, Tchou J, Liu Q, Zhang L, Speicher DW, Calin GA, Huang Q. Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step. *Embo J.* 2013; 32(20): 2672–2684.
- Guo Y, Hu Y, Hu M, He J, Li B. Long non-coding RNA ZEB2-AS1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in human lung cancer cells. *Oncol Lett.* 2018; 15(4): 5220–5226.
- Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G, Revenko A, Arun G, Stentrup M, Gross M, Zörnig M, MacLeod AR, Spector DL, Diederichs S. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013; 73(3):1180–1189.
- Hamidov Z, Altendorf-Hofmann A, Chen Y, Settmacher U, Petersen I, Knösel T. Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2011; 64(11), 990-994.
- Han Y, Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Chen J, Gao S, Huang J. LEIGC long non-coding RNA acts as a tumor suppressor in gastric carcinoma by inhibiting the epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2014; 14: 932.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100 (1): 57-70.
- Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, Shi J, Avila C, Polikoff J, Bernstein L, Enger SM, Press MF. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21(10): 1848-1855.
- Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017; 389(10074): 1134-1150.
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ 3rd, Visscher DW. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(3): 229-237.
- Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26(4): 678–690.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 1997; 89(7): 1165–1173.
- Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H, Tamai K, Kaneda Y. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 8): 1350–1357.
- He Y, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Kinzler KW. The antisense transcriptomes of human cells. *Science.* 2008; 322(5909): 1855-1857.
- Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P. Vimentin and cytokeratin expression in nodular hyperplasia and carcinoma of the prostate. *J Clin Pathol.* 1995; 48(11): 1031–1034.
- Heldin P, Basu K, Olofsson B, Porsch H, Kozlova I, Kahata K. Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem.* 2013; 154(5): 395–408.

- Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*. 2001; 104(3): 325-328.
- Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Ins*. 2001; 93(3): 178-184.
- Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*. 2003; 89(10): 1817-1821.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, BISHOP K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotta A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2017.
- Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: as sociations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*. 1990; 46(5): 796-800.
- https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=tr
- http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=tr.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/>
- <http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>
- Hu BS, Zhao G, Yu HF, Chen K, Dong JH, Tan JW. High expression of AP4 predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Tumor Biol*. 2013; 34(1): 271-276.
- Hu L, Lau SH, Tzang CH, Wen JM, Wang W, Xie D, Huang M, Wang Y, Wu MC, Huang JF, Zeng WF, Sham JS, Yang M, Guan XY. Association of vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 2004; 23(1): 298-302.
- Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, Stampfer MJ, Willett WC. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(10): 2496-2502.
- Jackstadt R, Röh S, Neumann J, Jung P, Hoffmann R, Horst D, Berens C, Bornkamm GW, Kirchner T, Menssen A, Hermeking H. AP4 is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *J Exp Med*. 2013; 210(7): 1331-1350.
- Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, Grieco M. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene*. 2006; 25(54): 7117-7130.
- Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene*. 2003; 22(46): 7155-7169.
- Jianqiang Jin, Xinyi Zhou, Yan Qin, Weijia Wang, Haiun Lv, Suhua Xia, Xiaowei Qi. Clinical significance of long non-coding RNA ZEB2-AS1 in locally advanced colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018; 11(2): 888-893.
- Jin Y, Wu D, Yang W, Weng M, Li Y, Wang X, Zhang X, Jin X, Wang T. Virol mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by regulating long-non-coding RNA. 2017; 14(1): 238.
- Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol*. 1999; 189(2): 161-168.
- Jorda M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 15): 3371-3385.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6): 1420-1428.
- Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 2015; 14(3): 196-202.

- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007; 316(5830): 1484-1488.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engström PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*. 2005; 309(5740): 1564–1566.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000; 6(6): 1365–1375.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-257.
- Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol*. 2013; 34(5): 2497-2506.
- Koh HS, Lee C, Lee KS, Park EJ, Seong RH, Hong S, Jeon SH. Twist2 regulates CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis in mature T-cells. *Mol Cells*. 2009; 28(6): 553–558.
- Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFX1A, and ZFX1B. *Cancer Res*. 2006; 66(5): 2725–2731.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiol Rev*. 2007; 87(1): 99-163.
- Kruk J, Aboul-Enein H.Y. Occupational physical activity and the risk of breast cancer. *Cancer Detect Prev*. 2003; 27(3): 187-192.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robins and Cotran: pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2010; 25–32.
- Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. 2013; 193(3): 651–669.
- La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist*. 2011; 16(6): 726–729.
- Labbe E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(15): 8358–8363.
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG: IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*. 2008; 27(48): 6252-6275.
- Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015; 4(9), e252.
- Lan T, Chang L, Wu L, Yuan Y. Downregulation of ZEB2AS1 decreased tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep*. 2016; 14(5): 4606–4612.
- Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AA, Villette JM, Stower MJ, Maitland NJ. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate*. 2002; 52(4): 253–263.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*. 2005; 24(33): 5137–5148.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005; 115(10): 2665–2672.

- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*. 2007; 4(4): 359–365.
- Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*. 2013; 152(6): 1308–1323.
- Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(8): 589–98.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003; 115(7): 787–798.
- Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 2007; 101(4): 805–815.
- Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene*. 2007; 26(31): 4489–4498.
- Li Y, Jiang D, Liang J, Meltzer EB, Gray A, Miura R, Wogensen L, Yamaguchi Y, Noble PW. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *J Exp Med*. 2011; 208(7): 1459–1471.
- Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*. 2006; 16(12): 649–656.
- Liotta LA. Tumour invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res*. 1986; 46(1): 1–7.
- Liu E, Liu Z, Zhou Y, Mi R, Wang D. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(11): 20565–20572.
- Liu K, Wang G, Ding H, Chen Y, Yu G, Wang J. Downregulation of metastasis suppressor 1(MTSS1) is associated with nodal metastasis and poor outcome in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Cancer*. 2010; 10: 428.
- Loberg RD, Neeley CK, Adam-Day LL, Fridman Y, St John LN, Nixdorf S, Jackson P, Kalikin LM and Pienta KJ. Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell biology. *Int J Oncol*. 2005; 26(6): 1699–1705.
- Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*. 1964; 10(4): 643–649.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20: 781–810.
- Maia CJ, Socorro S, Schmitt F, Santos CR. STEAP1 is over-expressed in breast cancer and down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells and in the rat mammary gland. *Endocrine*. 2008; 34(1-3): 108–16.
- Marchbanks PA, Curtis KM, Mandel MG, Wilson HG, Jeng G, Folger SG, McDonald JA, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Wingo PA, Simon MS, Norman SA, Strom BL, Ursin G, Weiss LK, Burkman RT, Spirtas R. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception*. 2012; 85(4): 342–350.
- Marchenko GN, Marchenko ND, Leng J, Strongin AY. Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*. 2002; 363(Pt 2): 253–262.
- Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*. 2010; 11(2): 97–105.
- Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8(2): 197–204.
- Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(3): 188–194.
- Mesure D, Drak Alsibai K, Nicolas A, Bieche I, Morillon A. Long Noncoding RNAs as New Architects in Cancer Epigenetics, Prognostic Biomarkers, and Potential Therapeutic Targets. *Biomed Res Int*. 2015; 320214:1–14.

- Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 10801–10809.
- Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer.* 2010; 9: 144.
- Mohamad HB, Apffelstaedt JP. Counseling for male BRCA mutation carriers: a review. *Breast.* 2008; 17(5): 441–450.
- Monboisse JC, Oudart JB, Ramont L, Brassart-Pasco S, Maquart FX. Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(8): 2589–2598.
- Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res.* 2005; 33(1): 44–50.
- Morrow M, Schnitt SJ, Norton L. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(4): 227–238.
- Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(9): 631–643.
- Nelles L, Van de Putte T, van Grunsven L, Huylebroeck D, Verschueren K. Organization of the mouse *Zfhx1b* gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1. *Genomics.* 2003; 82(4): 460–469.
- Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(5): 341–352.
- Nicolson GL. Cancer metastasis: tumour cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochem Biophys Acta.* 1988; 948(2): 175–224.
- Nixdorf S, Grimm MO, Loberg R, Marreiros A, Russell PJ, Pienta KJ and Jackson P. Expression and regulation of MIM (Missing In Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2004; 215(2):209–220.
- Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS. The role of EGF related peptides in tumor growth. *Front Biosci.* 2001; 6: D685–707.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006; 366(1): 2–16.
- Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, ten Berge D, Kalani Y. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008; 73: 59–66.
- Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int J Cancer.* 2007; 120(8): 1634–1640.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 51(3): 227–238.
- Oshiro MM, Kim CJ, Wozniak RJ, Junk DJ, Muñoz-Rodríguez JL, Burr JA, Fitzgerald M, Pawar SC, Cress AE, Domann FE, Futscher BW. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(5): R669–680.
- Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(48): 20318–20323.
- Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, Ishikawa T, Takagi Y, Kato K, Yamada H, Kojima K, Sugihara K. Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2011; 25(5): 1235–1242.

- Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E, Güllüoğlu BM, Işıkdöğen A, Topal U, Uhri M, Utkan Z, Zengin N, Tuncer M. Türkiye’de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması “sağlık bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu”. *J Breast Health*. 2009; 5(3): 125-134.
- Papagerakis S, Shabana AH, Pollock BH, Papagerakis P, Depondt J, Berdal A. Altered desmoplakin expression at transcriptional and protein levels provides prognostic information in human oropharyngeal cancer. *Hum Pathol*. 2009; 40(9): 1320-1329.
- Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775(1): 21–62.
- Parikh A, Lee C, Joseph P, Marchini S, Baccarini A, Kolev V, Romualdi C, Fruscio R, Shah H, Wang F, Mullokandov G, Fishman D, D’Incalci M, Rahaman J, Kalir T, Redline RW, Brown BD, Narla G, DiFeo A. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun*. 2014; 5: 2977.
- Parr C, Jiang WG. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009; 45(9): 1673- 1683.
- Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer*. 11(1): 59–67.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6): 415–428.
- Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 2003; 278(23): 21113–21123.
- Pekny M, Lane EB. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res*. 2007; 313 (10): 2244–2254.
- Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23(4): 450-457.
- Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2): pii: a003293.
- Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J*. 2003; 22(10): 2443–2452.
- Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Parshad R, Ralhan R. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC Cancer*. 2009; 9: 325.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(5): R68.
- Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*. 2011;1(5): 391–407.
- Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res*. 2002; 158(2): 220-235.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992; 356(6368): 397-400.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies. *Semin Haematol*. 1997; 34(4 Suppl): 9-19.
- Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3(1): a004978.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. 2007; *Cell* 129(7): 1311–1323.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353(16): 1673-1684.

- Sakai D, Tanaka Y, Endo Y, Osumi N, Okamoto H, Wakamatsu Y. Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by beta-catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling. *Dev Growth Differ.* 2005; 47(7): 471–482.
- Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 29; 108(48): 19204-19209.
- Sanders ME, Schuyler PA, Dupont WD, Page DL. The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer.* 2005; 103(12): 2481-2484.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 1994; 370(6484): 61–65.
- Saxe GA, Rock CL, Wicha MS, Schottenfeld D. Diet and risk for breast cancer recurrence and survival. *Breast Cancer Res Treat.* 1999; 53(3): 241-253.
- Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(8): 2396–2404.
- Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv.* 2000; 74(2-3): 281–286.
- Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 32(6): 345-369.
- Serviss JT, Johnsson P, Grandér D. An emerging role for long non-coding RNAs in cancer metastasis. *Front Genet.* 2014; 5: 234.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(1): 7-30.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19): 10869–10874.
- Speirs V, Shaaban AM. The rising incidence of male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115(2): 429-430.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006; 12(8): 895–904.
- Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: Regulators of disease. *J Pathol.* 2010; 220(2): 126–139.
- Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene.* 2002; 21(38): 5861–5867.
- Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, Baer HJ, Hankinson SE, Rosner B, Marotti J, Connolly JL, Schnitt SJ, Collins LC. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 131(1): 159-167.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5): 871–890.
- Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J.* 2010; 429(3): 419-433.
- Tolg C, Telmer P, Turley E. Specific sizes of hyaluronan oligosaccharides stimulate fibroblast migration and excisional wound repair. *PLoS ONE.* 2014; 9(2): e88479.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4 (7): 528–539.
- Travis LB, Hill DA, Dores GM, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Holowaty E, Glimelius B, Andersson M, Wiklund T, Lynch CF, Van't Veer MB, Glimelius I, Storm H, Pukkala E, Stovall

- M, Curtis R, Boice JD Jr, Gilbert E. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *JAMA*. 2003; 290(4): 465-475.
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(2): 116–129.
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2017. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/28709,210119saglik-istatistikleri-yilligipdf.pdf?0> (alındığı tarih: 26.02.2019). ed: Dr. Berrak BORA BAŞARA, İrem SOYTUTAN ÇAĞLAR, Asiye AYGÜN, Tuğcan Adem ÖZDEMİR. ANKARA 2018.
- Uehara Y, Kitamura N. Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology, motility, and anchorageindependent growth. *J Cell Biol*. 1992; 117(4): 889–894.
- Uutela M. PDGF-D, A Novel Member of the Platelet-Derived Growth Factor Family. ISBN 952-91-8091-8. Helsinki 2004.p:15-16.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insight and evolving paradisms. *Cell*. 2011; 147(2): 275-92.
- Van Belle P, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC and Elder DE. Melanoma associated expression of transforming growth factor-5 isoforms. *Am J Pathol*. 1996; 148(6): 1887-1894.
- Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(20): 6566–6578.
- Verschuere K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem*. 1999; 274(29): 20489–20498.
- Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, Crystal RG, de Herreros AG, Moustakas A, Pettersson RF, Fuxe J. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(8): 943–950.
- Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell cell adhesion depends on PI3 kinase and PTEN. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt20): 4901-4912.
- Vrekoussis T, Stathopoulos EN, Kafousi M, Navrozoglou I, Zoras O. Expression of endothelial PDGF receptors alpha and beta in breast cancer: up-regulation of endothelial PDGF receptor beta. *Oncol Rep*. 2007; 17(5): 1115-1119.
- Wang F, Zhu W, Yang R, Xie W, Wang D. LncRNA ZEB2-AS1 contributes to the tumorigenesis of gastric cancer via activating the Wnt/β-catenin pathway. *Mol Cell Biochem*. 2019; doi: 10.1007/s11010-018-03491-7.
- Wang W, Gao Z, Wang H, Li T, He W, Lv W, Zhang J. Transcriptome analysis reveals distinct gene expression profiles in eosinophilic and noneosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep*. 2016; 6: 26604.
- Wang Y, Wang Y, Li J, Zhang Y, Yin H, Han B. CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling, *Cancer Lett*. 2015; 367(2): 122–128.(b)
- Wang Y, Zhao X, Ju W, Flory M, Zhong J, Jiang S, Wang P, Dong X, Tao X, Chen Q, Shen C, Zhong M, Yu Y, Brown WT, Zhong N. Genome-wide differential expression of synaptic long noncoding RNAs in autism spectrum disorder, *Transl Psychiatry*. 2015; 5: e660.(a)
- Wazir U, Wazir A, Wells C, Mokbel K. Pleomorphic lobular carcinoma in situ: Current evidence and a systemic review. *Oncol Lett*. 2016; 12(6): 4863-4868.
- Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(1): 20-26.
- Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 151: 1-32

- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 87.
- Wu F, Gao H, Liu K, Gao B, Ren H, Li Z, Liu F. The lncRNA ZEB2-AS1 is upregulated in gastric cancer and affects cell proliferation and invasion via miR-143-5a/HIF-1 α axis. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 657-667.
- Wu X, Yan T, Wang Z, Wu X, Cao G, Zhang C. LncRNA ZEB2-AS1 promotes bladder cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by regulating miR-27b. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96: 299–304.
- Wu ZQ, Li XY, Hu CY, Ford M, Kleer CG, Weiss SJ. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic breast cancer 1, early onset (BRCA1) repression. *P Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41): 16654–16659.
- Xie W, Sun F, Chen L, Cao X. miR-96 promotes breast cancer metastasis by suppressing MTSS1. *Oncol Lett.* 2018; 15(3): 3464-3471.
- Yan C, Grimm WA, Garner WL, Qin L, Travis T, Tan N, Han YP. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2. *Am J Pathol.* 2010; 176(5): 2247–2258.
- Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(3): 295–305.
- Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2003; 22(4): 891–898.
- Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng HH, Jin JQ, Luh TM, Giroux-Leprieur E, Mo M, Zheng Q, Shi H, Zhang H, Hao X, Wang C, Jablons DM, He B. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014; 33: 34.
- Zeng ZZ, Jia Y, Hahn NJ, Markwart SM, Rockwood KF, Livant DL. Role of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in integrin fibronectin receptor-mediated, matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by metastatic prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66(16): 8091–8099.
- Zhan HX, Wang Y, Li C, Xu JW, Zhou B, Zhu JK, Han HF, Wang L, Wang YS, Hu SY. LincRNA-ROR promotes invasion, metastasis and tumor growth in pancreatic cancer through activating ZEB1 pathway. *Cancer Lett.* 2016; 374(2): 261–271.
- Zhao XY and Lin JD. Long noncoding RNAs: a new regulatory code in metabolic control, *Trends Biochem Sci.* 2015; 40(10): 586-596.
- Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, Huang R, Yan J, Guo H. TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep.* 2015; 5: 11924.
- Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 124–128.

8. ÖZGEÇMİŞ

Canan EROĞLU 1988 yılında İnegöl'de doğdu. Lise eğitimini İnegöl Lisesi'nde tamamladıktan sonra Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.), Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ÖYP araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Yüksek lisans eğitimi almak için Pamukkale Üniversitesi'ne görevlendirildi ve 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl N.E.Ü., Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Halen Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

9. EK

EK A. Etik Krul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:47	Toplantı Tarihi: 17.03.2017
--------------------	-----------------------------

Karar Sayısı:2017/845:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ercan KURAR' ın "Uzun kodlamayan RNA ZEB2NAT'ın MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında EMT, metastaz ve apoptoz üzerinden etkilerinin araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 13.03.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Canan EROĞLU' nun doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ercan KURAR' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Ercan KURAR

Yardımcı araştırmacı: Arş. Gör. Canan EROĞLU

ASLI GİBİDİR

17.03.2017

Prof. Dr. Saim ACIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı