

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ TANILI HASTALARDA KARSİNOGENEZDE YER ALAN ceRNA HOTAIR YOLAĞININ İNCELENMESİ

TIBBİ GENETİK UZMANLIK TEZİ

Dr. PELİN ERCOŞKUN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MEHMET SEVEN

Doç. Dr. AYSEL KALAYCI YİĞİN

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ TANILI HASTALARDA KARSİNOGENEZDE YER ALAN ceRNA HOTAIR YOLAĞININ İNCELENMESİ

TIBBİ GENETİK UZMANLIK TEZİ

Dr. PELİN ERCOŞKUN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MEHMET SEVEN
Doç. Dr. AYSEL KALAYCI YİĞİN

İSTANBUL-2022

ÖNSÖZ

Tıbbi Genetik bölümünde özveriyle bizi aydınlatmaya çalışan aynı zamanda tez danışmanım olan kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet Seven'e, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve ikinci tez danışmanım olan değerli hocam Doç. Dr. Aysel Kalaycı Yiğin'e ve tezime olan katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Deniz Ağırbaşlı'ya,

Uzmanlık eğitimime bulundukları değerli katkılarından ötürü saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Abdulgani Tatar ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Yüce Kahraman'a,

Zorlu tez döneminde birbirimize destek olduğumuz can dostum Aynur İslamova'ya, bana yardımcı ve destek olan sevgili asistan arkadaşlarım Çisem Çınar, Gizem Nur İzgi, Betül Kesriklioğlu, Beyza Karaca, Hilal Kaya, Muhammet Güllük, Tarık Alay'a ve GETAM'ın özverili çalışanlarına,

Tez projemin çalışmasında bilgileriyle bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Güller Özkan, Sümeyye Öztürk, İlknur Çiltaş ve İsmail Taş'a,

Beni bu günlere getiren, sabırla büyüten canım annem ve babam Aliye ve Cengiz Tütüncüoğlu'na, her zaman bana destek olmaya çalışan sevgili kardeşim Berk Tütüncüoğlu'na, beni ders çalıştırıp azimli ve çalışkan bir insan olmamı sağlayan teyzelerim Nevin Özkan ve Zehra Yılmaz'a,

Beni kendi evlatlarından ayırmayan kıymetli kayınvalidem ve kayınpederim Gülten ve Mücahit Ercoşkun'a, bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan ve yol gösteren değerli ablam ve abim Doç. Dr. Kübra Ercoşkun Şenol ve Doç. Dr. Cem Şenol'a, canımın içi yeğenim Baybars Şenol'a

Ömrümü paylaştığım ve desteğini her daim hissettiğim sevgili eşim Av. Ali Rıza Ercoşkun'a ve son olarak bana annelik duygusunu tattıran hayatımın biricik hazinesi oğlum İlteriş Ercoşkun'a…

SONSUZ

TEŞEKKÜRLER

Dr. Pelin ERCOŞKUN

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR……...……i

ŞEKİLLER DİZİNİ.....ii

TABLOLAR DİZİNİ……..…….....iii

ETİK KURUL ONAYI……...……..…….....iv

ÖZET (TÜRKÇE)……..…….....v

ÖZET (İNGİLİZCE)…….…….……...vii

1. GİRİŞ VE AMAÇ……1

2. GENEL BİLGİLER……4

2.1. Meme Kanseri…….…….....4

2.1.1. Epidemiyoloji……4

2.1.2. Risk Faktörleri…….……..4

2.1.2.1. Yaş ve Cinsiyet……..4

2.1.2.2. Gebelik ve Hormon İlişkili Faktör……..….....5

2.1.2.3. Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler…….……5

2.1.2.4. Yaşam Tarzı Faktörleri…….....6

2.1.2.5. Meme Yapısı ve Benign Meme Hastalıkları.....6

2.1.3. Histopatolojik Sınıflandırma.....6

2.1.3.1. İnvaziv Duktal Karsinom.....6

2.1.3.2. İnvaziv Lobuler Karsinom.....7

2.1.3.3. Nadir Tipler.....7

2.1.4. Moleküler Sınıflandırma.....8

2.1.4.1. Luminal A.....8

2.1.4.2. Luminal B.....8

2.1.4.3. HER2-Aİ…….....8

2.1.4.4. Basal-like/Triple Negatif.....9

2.1.5. Tarama ve Tanı.....9

2.1.6. Görüntüleme Yöntemleri.....9

2.1.7. Evreleme.....10

2.1.7.1. İn Situ Kanser.....10

2.1.7.2. Evre 1 ve Evre 2: Erken Evre.....11

2.1.7.3. Evre 3: Lokal İleri Evre.....11
2.1.7.4. İnflamatuvar Meme Kanseri.....12
2.1.7.5. Evre 4: Metastatik Evre.....12
2.2. Karsinogenez Mekanizmaları.....13
2.2.1. Büyüme Sinyallerinde Kendi Kendine Yeterlilik.....13
2.2.2. Büyüme Engelleyici Sinyallere Karşı Duyarsızlık.....14
2.2.3. Apopitozdan Kaçış.....14
2.2.4. Sınırsız Replikasyon.....15
2.2.5. Anjiyogenezis.....15
2.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz.....15
2.2.7. Genomik İnstabilite.....15
2.2.8. Tümör Mikroçevresi.....16
2.2.9. Epigenetik Değişiklikler.....16
2.3. Meme Kanserinde Genetik Mekanizmalar.....17
2.3.1. Meme Kanseri Gelişiminde Temel Sinyal Yolakları.....17
2.3.1.1. ER İlişkili Sinyal Yolağı.....17
2.3.1.2. HER2 İlişkili Sinyal Yolağı.....18
2.3.1.3. Wnt İlişkili Sinyal Yolağı.....19
2.3.1.4. Notch Sinyal Yolağı.....19
2.3.1.5. Sonic Hedgehog (SHH) Sinyal Yolağı.....20
2.3.2. Meme Kanseri ile İlişkili Genler.....20
2.4. Kodlama Yapmayan RNA Ailesi.....22
2.4.1. Tanımı ve Türleri.....22
2.4.2. LncRNA.....22
2.4.2.1. LncRNA'nın Post-transkripsiyonel Etkinliği.....23
2.4.2.2. LncRNA'nın Transkripsiyonel Etkinliği.....23
2.4.3. MikroRNA.....24
2.4.4. Rekabetçi Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi.....25
2.4.5. HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* Yolağı.....26
2.4.5.1. HOTAIR.....26
2.4.5.2. miR-20a-5p.....27

2.4.5.3. *HMGA2*.....28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....30
3.1. Çalışma ve Kontrol Grubu Özellikleri…….....30
3.1.1.Çalışma Grubu…….....30
3.1.2. Kontrol Grubu…….....31
3.2. Plazma Eldesi ve Total RNA İzolasyonu.....31
3.3. cDNA Sentezi.....32
3.3.1. miRNA ve lncRNA'dan cDNA Sentezi.....32
3.3.2. mRNA'dan cDNA Sentezi.....33
3.4. Real-Time PCR Çalışması.....34
3.4.1. miRNA ve lncRNA RT-PCR Çalışması.....34
3.4.2. mRNA RT-PCR Çalışması.....35
3.5. İstatistiksel Analiz.....36
4. BULGULAR.....37
4.1. Çalışma ve Kontrol Grubu Bulguları.....37
4.2. RNA İfade Düzeyleri.....42
4.2.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının HOTAIR Yolağı İfadeleri.....43
4.2.2. Çalışma Grubunun Klinikopatolojik Parametrelerine Göre HOTAIR Yolağı İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması…….....45
4.2.2.1. Premenapozal/Postmenapozal.....45
4.2.2.2. Erken Evre/İleri Evre……...46
4.2.2.3. İDK/Diğerleri.....47
4.2.2.4. ER pozitif/ER negatif.....48
4.2.2.5. HER2-Aİ/Diğerleri.....49
4.2.2.6. Triple negatif/Diğerleri.....50
4.2.2.7. Nüks hasta/Nüks olmayan hasta.....51
4.2.3. Korelasyon Analizi.....52
5. TARTIŞMA.....54
6. SONUÇ.....62
7. KAYNAKLAR.....63
8. ÖZGEÇMİŞ.....74
9. İNTİHAL TARAMA RAPORU.....76

SİMGE VE KISALTMALAR

AJCC: American Joint Committee on Cancer

BAX: Bcl-2-associated X protein

cDNA: Komplementer DNA

ceRNA: Competing endogenous RNA

circRNA: Circular RNA

DKIS: Duktal Karsinoma in-situ

ER: Östrojen reseptörü

ERE: Östrojen cevap elementi

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

HER2-Aİ: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2-Aşırı ifadeli

HMGA2: High Mobility Group AT-Hook 2

HOTAIR: HOX transcript antisense intergenic RNA

İDK: İnvaziv duktal kanser

lncRNA: Long non-coding RNA

miRNA: MikroRNA

MKC: Meme koruyucu cerrahi

MRE: miRNA response element

ncRNA: Non-coding RNA

NST: Non-special type

PCR: Polymerase Chain Reaction

PR: Progesteron reseptörü

RNA: Ribonükleik asit

snoRNA: Small nucleolar RNA

T1mi: T1 mikroinvazyon

SO: Sıra ortalaması

ST: Sıra toplamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Normal dokunun meme kanserine progresyonu, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı

Şekil 2: ER dimerlerinin DNA üzerindeki östrojen cevap elementlerine bağlanması sonucu meydana gelen transkripsiyonel düzenlenme

Şekil 3: HER2 reseptörüne ligand bağlanması sonucu hücre proliferasyonu ve meme kanseri gelişimi

Şekil 4: Meme kanseri gelişimine yatkınlık oluşturan genler

Şekil 5: Fonksiyonel miRNA'nın oluşum basamakları

Şekil 6: *HMGA2* geni lokalizasyonu, mRNA ve protein yapısı

Şekil 7: Hasta ve kontrol gruplarında HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması.

Şekil 8: Premenapozal ve postmenapozal kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 9: Erken evre ve ileri evre meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 10: Meme kanseri hastalarında histopatolojik tanılara göre HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 11: ER+ ve ER- meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 12: HER-Aİ alt tipi ve diğer alt tip meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 13: Triple negatif alt tipi ve diğer alt tip meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 14: Nüks olan ve nüks olmayan meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

Şekil 15: Çalışma grubunda HOTAIR ve miR-20a-5p (A), HOTAIR ve *HMGA2* (B), miR-20a-5p ve *HMGA2* (C), yaş ve *HMGA2* (D), yaş ve miR-20a-5p (E) arasındaki korelasyon

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: miRNA ve lncRNA ters transkripsiyon protokolü

Tablo 2: mRNA ters transkripsiyon protokolü

Tablo 3: miRNA ve lncRNA primer dizileri

Tablo 4: Real-time PCR çalışması için uygun reaksiyon karışımı

Tablo 5: Real-time PCR reaksiyon basamakları

Tablo 6: Kullanılan mRNA primer dizileri

Tablo 7: mRNA real-time PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Tablo 8: mRNA RT-PCR çalışması protokolü

Tablo 9: Çalışma grubunun demografik, klinik ve patoloji verileri

Tablo 10: Real-Time PCR çalışması sonrasında elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Tablo 11: HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* ifadelerinin sıra ortalaması, sıra toplamı ve *p* değerleri

ÖZET

ERCOŞKUN P. Meme kanseri tanılı hastalarda karsinogenezde yer alan ceRNA HOTAIR yolağının incelenmesi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2022.

Amaç: Meme kanseri dünyada kansere bağlı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri gelişiminde çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin rol oynadığı bilinmektedir. Kodlama yapmayan RNA ailesi, kanser gelişimine katkı sağlayan epigenetik mekanizmalardan birisidir ve nükleotit uzunluklarına göre tiplere ayrılmaktadır. Kodlama yapmayan uzun RNA dizileri (lncRNA), protein kodlama fonksiyonu olmayan 200 nükleotitten uzun RNA'lardır. LncRNA'ların ifadelerindeki düzensizlikler, kanser başlangıcında, progresyonunda ve metastazında etkili olabilmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada lncRNA'ların, rekabet eden endojen RNA (ceRNA) işlevi yoluyla mikroRNA'ları süngerleyerek hedef gen ifadesini düzenleyebileceği gösterilmiştir. HOX transkript antisens intergenik RNA (HOTAIR) ceRNA fonksiyonu iyi bilinen lncRNA'lardan bir tanesidir. Kanser oluşumuyla ilgili süreçlerde yer alan HOTAIR'in meme kanseri gelişiminde de önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. HOTAIR ile ilişkili olduğu düşünülen High Mobility Group Protein 2 (HMGA2) proteininin, DNA'nın adenin-timin dinükleotidi açısından zengin kısımlarına bağlanarak gen ifadesini etkilediği belirtilmektedir. Literatürde, lncRNA-HOTAIR'in ceRNA işlevi görerek miR-20a-5p aracılığıyla *HMGA2* geninin ifadesini artırabildiği ve bu yolağın meme kanseri oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, daha önce hücre hattı ve ksenograftlarda meme kanseri ile ilişkisi bildirilmiş HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının ilk kez meme kanserli hastalarda moleküler düzeyde incelenmesi ve klinikopatolojik bulgularının genetik açıdan değerlendirilmesi, aynı zamanda hedefe yönelik tedavi ve biyobelirteç çalışmalarına moleküler temel sağlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının incelendiği bu çalışmaya, meme kanseri tanısı konulmuş 40 kadın hasta ve 10 sağlıklı kadın gönüllü dahil edildi. Çalışma grubu, klinikopatolojik özelliklerine göre alt gruplara ayrıldı. Çalışma grubunun plazma örneklerinden cell-free RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapıldıktan sonra Real-Time PCR ile hedef genlerin ifade düzeyleri incelendi. Çalışma ve kontrol grupları, HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* gen ifadeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışma grubunda tespit edilen HOTAIR ifadesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,025). Ayrıca HOTAIR ifadesi, östrojen reseptör (ER) pozitif grupta ER negatif gruba göre anlamlı olarak düşük iken (p=0,006), HER2 aşırı ifadeli grupta HER2 negatif bulunan gruba göre daha yüksekti. Nüks olan hastalarda, nüks olmayanlara göre kıyaslandığında ise *HMGA2* ifadeleri anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,048). Premenapozal grupta postmenapozal gruba göre MiR-20a-5p ifadesinde anlamlı artış görülürken, bunun tam tersi olarak *HMGA2* ifadesinde ise anlamlı azalma saptandı (her ikisinde p=0,002). Ayrıca ileri evrede erken evreye göre HOTAIR ifadesinde artış görüldü. Korelasyon katsayıları değerlendirildiğinde *HMGA2* ve miR-20a-5p arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu tespit edildi (p=0,027)(korelasyon katsayısı=-0,35). Hastaların yaşı ile *HMGA2* arasında pozitif korelasyon varken miR-20a-5p arasında negatif korelasyon mevcuttu (sırasıyla korelasyon katsayısı=0,296, -0,391 (p=0,037, p=0,006)).

Sonuç: HOTAIR'in özellikle ER negatif meme kanserlerinde, *HMGA2*'nin ise postmenapozal veya nüks eden hastalarda non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılabileceği, HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının periferik kanda insan cell-free RNA'sında ilk kez bu çalışmada incelendiği ve bu kapsamda literatüre önemli bilimsel katkı sağlayacağı düşünülmektedir. HOTAIR yolağında tespit edilen genetik değişikliklerin, fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi halinde, bilinmeyen biyolojik işlevleri ortaya çıkarılarak meme kanserlerinin moleküler patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir yer tutabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *HMGA2*, HOTAIR, Meme kanseri, ceRNA, miR-20a-5p

ABSTRACT

ERCOSKUN P. Investigation of the ceRNA HOTAIR pathway involved in carcinogenesis in patients with breast cancer, Istanbul University-Cerrahpasa, Cerrahpasa Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics. Specialization in Medicine Thesis. 2022.

Aims: Breast cancer ranks first among cancer-related deaths in the world. It is known that various genetic and epigenetic changes play a role in the development of this cancer type. The non-coding RNA family is one of the epigenetic mechanisms that contribute to cancer development and divided into types based on their nucleotide length. Long non-coding RNAs (lncRNA) are RNAs longer than 200 nucleotides that do not have a protein-coding function. However, the irregularities in their expression can be effective in the onset, progression and metastasis of cancer. Many studies in recent years have shown that lncRNAs can regulate target gene expression by sponge microRNAs through competing endogenous RNA (ceRNA) function. HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) is one of the lncRNAs whose ceRNA function is well known. It is known that HOTAIR, which is involved in the processes related to cancer formation, also has an important role in the development of breast cancer. The HMGA2 protein, thought to be associated with HOTAIR, is reported to affect gene expression by binding to adenine-thymine dinucleotide-rich portions of DNA. In the literature, it is thought that the long non-coding RNA HOTAIR can act as a ceRNA and increase the expression of the *HMGA2* gene via miR-20a-5p, and this pathway plays an important role in the formation of breast cancer. In this study, it was aimed to examine the HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* pathway, which has been previously reported to be associated with breast cancer in cell lines and xenografts, at the molecular level for the first time in breast cancer patients, to evaluate clinicopathological findings from a genetic perspective, and to provide a molecular basis for targeted therapy and biomarker studies.

Material-Method: Fourty female patients diagnosed with breast cancer and 10 healthy female volunteers were included in this study, in which the HOTAIR/miR-

20a-5p/*HMGA2* axis was investigated. The study group was divided into subgroups according to their clinicopathological features. Cell-free RNA was isolated from the plasma samples of the patients. After cDNA synthesis from isolated RNAs, expression of target genes was analyzed by Real-Time PCR. Study and control groups were compared using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values of HOTAIR, miR-20a-5p and *HMGA2* expressions. **Results:** HOTAIR expression detected in the study group was found to be significantly higher than the control group (p=0.025). While HOTAIR expression was significantly lower in the estrogen positive (ER) group than in the ER negative group (p=0.006), it was higher in the HER2 overexpressed group than in the HER2 negative group. *HMGA2* expression level was found to be significantly higher in patients with relapse compared to patients without relapse (p=0.048). MiR-20a-5p expression was significantly higher in the premenopausal group compared to the postmenopausal group, and *HMGA2* expression was significantly higher in the postmenopausal group compared to the premenopausal group (both p=0.002). An increase in HOTAIR expression level was observed in advanced stages. When the correlation coefficients were evaluated, it was determined that there was a significant negative correlation between *HMGA2* and miR-20a-5p (p=0.027) (correlation coefficient=-0.35). While there was a positive correlation between the age of the patients and *HMGA2,* there was a negative correlation between miR-20a-5p (correlation coefficient=0.296, -0.391 (p=0.037, p=0.006), respectively).

Conclusion: As a result, it is thought that HOTAIR can be used as a non-invasive biomarker especially in ER negative breast cancers and *HMGA2* in postmenopausal or relapsed patients. The HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* pathway was investigated for the first time in human cell-free RNA in this study. Therefore, it is expected that it will make a significant contribution to the literature. It is predicted that the genetic changes detected in the HOTAIR pathway, when supported by functional studies, may play an important role in elucidating the molecular pathogenesis of breast cancers by revealing their unknown biological functions.

Key words: *HMGA2*, HOTAIR, Breast cancer, ceRNA, miR-20a-5p

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, 2020 Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory-GLOBOCAN) verilerine göre dünyada en sık tanı konulan kanser türüdür. Bu yüzden kanserden ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır (1). Risk faktörleri arasında yaş, ırk, kadın cinsiyet ve genetik yatkınlık gibi nedenler yer alsada insidansının perimenapozal dönemde pik yapması, gelişiminde hormonal mekanizmaların da yer aldığını düşündürmektedir (2).

Meme kanseri heterojen bir kanser türüdür ve birçok şekilde sınıflandırılmaktadır. Histopatolojik olarak invaziv duktal ve invaziv lobuler karsinom olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılır. Ayrıca ondan fazla nadir alt tipi mevcuttur (3). Moleküler sınıflandırma ise daha ziyade prognoz ve tedavide kullanılmaktadır. Meme kanseri moleküler olarak luminal A, luminal B, HER2-Aİ (Aşırı ifade) ve basal-like olmak üzere 4 alt tipe ayrılır. Luminal A ve luminal B tipleri görece olarak daha iyi prognozla seyrederken, HER2-Aİ ve basal-like meme kanserleri ise daha agresif klinik seyir gösterir (4).

Meme kanseri gelişiminde çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler rol oynamaktadır. Genetik değişiklikler sadece tümör hücresinde meydana gelip somatik olarak tanımlanabileceği gibi germ-line olarak meydana gelip sonraki nesillere aktarılabilir (5). Epigenetik değişiklikler ise genetik mutasyonlardan farklı olarak DNA dizisini değiştirmeden DNA fonksiyonunu etkiler. DNA metilasyonu, Histon modifikasyonu, kodlama yapmayan RNA (ncRNA) etkileşimi epigenetik faktörlerden bazılarıdır. Kodlama yapmayan RNA dizileri nükleotit uzunluklarına göre 2 ana kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; uzun RNA dizileri lncRNA'dan, kısa RNA dizileri ise mikroRNA (miRNA), sirkülerRNA (circRNA) ve small nükleolar RNA (snoRNA)'lardan oluşmakta ve sayıları giderek artmaktadır (6). Kodlama yapmayan RNA ailesi çeşitli epigenetik mekanizmalarda bozulmalara yol açarak karsinogenezde yer aldığı bildirilmektedir (7).

LncRNA’lar, protein kodlama fonksiyonu olmayan 200’den fazla nükleotit içeren uzun RNA dizileridir. LncRNA’ların ifadesindeki düzensizlikler kanser başlangıcında, progresyonunda ve metastazında etkili olabilmektedir (8). Son yıllarda yapılan bir çok çalışma Hox Transkript Antisens İntergenik RNA (HOTAIR), Metastaz İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkript 1 (MALAT1) ve Maternal İfade Edilen 3 (MEG3) gibi bazı lncRNA’ların, rekabet eden endojen RNA (ceRNA) işlevi görerek mikroRNA’ları süngerleme yoluyla spesifik genlerin ifadesini düzenleyebileceği gösterilmiştir (9–11). Özetle, lncRNA'ların, paylaşılan hedef mRNA'ları etkileyebilmek için miRNA'larla rekabet ettikleri belirtilmektedir (12).

HOTAIR kanserle ilişkili lncRNA’lardan biridir (13). Birçok çalışmada HOTAIR’in çeşitli solid tümörlerde, kanser başlangıcında, progresyonunda, anjiyogenezinde ve metastazında aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (14–16). Kanser biyogenezinde önemli süreçlerde rol oynayan HOTAIR’in, meme kanserinin de altında yatan epigenetik mekanizmalarda yer aldığı bildirilmiştir (17).

High Mobility Group Protein 2 (HMGA2), DNA'nın adenin-timin (AT) dinükleotidi açısından zengin bölgelerine bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedir. Embriyogenezis boyunca embriyonik kök hücrelerde yüksek oranda ifade edilirken gelişimin ilerleyen basamaklarında ifade düzeyi oldukça azalır. Normal süreç bu şekilde işlerken, kanser oluşan erişkinlerde ifade düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir (18). Meme kanserli hücre hatları ve ksenograftlar üzerinde yapılan bir çalışmada, lncRNA HOTAIR’ın ceRNA fonksiyonu görerek miR-20a-5p aracılığıyla *HMGA2* geninin ifadesini artırdığı ve meme kanseri oluşumunda yer aldığı bildirilmiştir (19).

NcRNA seviyeleri, kanser gelişimi ve progresyonu sırasında kansere özgü ifade profilleri göstermektedir. Kanda düzensiz şekilde ifade edilen ncRNA'ların, kanser tanısı ve hastalığın seyri için cell-free RNA’ların biyobelirteç olarak işlev görebileceği, etki mekanizmalarının anlaşılmasıyla birlikte tedavi rejimlerinin ve hedeflerinin geliştirilebileceği öngörülmektedir (20). Kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde hem genetik hem de epigenetik değişikliklerin hedeflenmesiyle tedavide etkili sonuçlar alınabileceği belirtilmektedir (20). Gelişen tedavi seçeneklerine rağmen yüksek mortalite oranları, meme kanserlerinin altında yatan moleküler mekanizmaların hala tam olarak aydınlatılamadığını göstermektedir. Hastalığın gelişiminde yer alan biyobelirteçleri ve moleküler değişiklikleri anlamak, meme

kanserlerinde hedefe yönelik tedavilerin daha etkili bir şekilde uygulanabileceğini öngörmektedir (21).

Bu çalışmanın amacı, meme kanseri hastalarında karsinogenezde rol oynadığı düşünülen HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının moleküler düzeyde incelenmesi ve klinik öneminin değerlendirilmesidir. Aynı zamanda hedefe yönelik tedavi ve biyobelirteç çalışmalarına moleküler temel sağlanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

Uluslararası kanser araştırmaları ajansı tarafından oluşturulan GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünyada yaklaşık 19 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir. 2020 yılında meme kanseri en sık teşhis edilen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır. Kadınlarda en sık tanı konulan ve mortaliteye sebep olan kanser olmasına rağmen erkeklerde insidansı oldukça düşüktür (1).

Türkiye Kanser İstatistikleri 2017 yılı verilerine göre ülkemizde kanser insidansının dünya ortalamasından biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Ülkemizde kadınlarda teşhis edilen her 4 kanserden 1'i meme kanseridir. Bir yılda yaklaşık 19 bin kadına meme kanseri tanısı konulmuştur. Yine bu verilere göre tanı anında hastaların yaklaşık yarısında tümör lokalize, %10'unda ise metastatiktir (22).

Meme kanseri gelişiminde genetik faktörler arasında gen mutasyonları ve epigenetik değişiklikler yer alırken, çevresel faktörler ise iyonize radyasyon, hormonal terapi, alkol, obezite ve geç doğum yaşı olarak sıralanabilir. Ailede kanser öyküsü meme kanserine yatkınlık yapan nedenlerden biridir (23).

2.1.2. Risk Faktörleri

2.1.2.1. Yaş ve Cinsiyet

Meme kanserinde ilerleyen yaş, cinsiyet faktörü ile beraber önemli risk faktörlerinden biri olup artan yaşla birlikte insidansı da artmaktadır. Meme kanseri ilişkili ölümlerin yaklaşık %99'u 40 yaş üzerinde, %70'i 60 yaş üzerinde meydana gelmektedir (24).

2.1.2.2. Gebelik ve Hormon İlişkili Faktörler

Meme kanserinin özellikle menapozal geçiş dönemindeki kadınlarda insidansı yüksektir (24). Erken menarş ve geç menapoz meme kanserinde hormon ilişkili risk faktörlerindendir. On bir yaşından önce menstruasyonu başlayan kızlar 13 yaşında başlayanlara göre %20, 55 yaşından sonra menapoza giren kadınlarda 50-54 yaş arası giren kadınlara göre %12 daha fazla riske sahip olduğu bildirilmektedir (25).

İlk gebelik yaşının erken olması ve artan gebelik sayısı uzun vadeli bir risk azalması ile ilişkilidir. Otuz yaşından sonra ilk doğumunu yapmış bir kadın, hiç doğum yapmamış bir kadınla yaklaşık aynı riske sahip olmaktadır. Her bir gebelik post menapozal meme kanseri riskinde %12 azalmaya neden olmaktadır. Emzirme, meme kanserinden koruyan önemli faktörlerden bir tanesi olup gelişmiş ülkelerdeki emziren anne populasyonunun düşük olması bu ülkelerdeki artmış meme kanseri insidansıyla ilişkilendirilmiştir. Bir yıllık emzirme ile meme kanseri riski yaklaşık %4 azalmaktadır (25,26).

Risk faktörlerinde biri de eksojen hormon maruziyetidir. Doğum kontrol hapı kullanan kadınlarda, kullanılan dönemde ve bıraktıktan sonraki 10 yıl içerisinde düşük bir risk artışı olmakla birlikte hormon replasman tedavisi alan kadınlarda belirgin risk artışı mevcuttur. Uzun tedavi süresi ve menapoz sonrası hemen başlanan tedavi, risk miktarı ile korelasyon gösterir (25). Fakat bu risk, tedavi kesildikten sonraki 5 yıl içerisinde büyük oranda kaybolmaktadır (27).

2.1.2.3. Aile öyküsü ve Genetik Faktörler

Soy geçmişinde meme kanseri öyküsü bulunan kadınlar artmış riske sahiptir. Birinci derece yakınlarında meme kanseri öyküsü olan kadının meme kanseri olma ihtimali %80 artmıştır. İki veya daha fazla birinci derece yakında kanser öyküsü varsa risk 3-4 kat artmaktadır (27). Meme kanseri ilişkili yüksek penetran genlerde (örn; *TP53, PTEN, CDH1*) mutasyon taşıyan kişiler taşımayanlara göre 10-20 kat daha fazla meme kanseri riskine sahiptir. Orta penetran genlerdeki (örn; *CHEK2, PALB, STK11* vb.) mutasyonlar ise yaklaşık 2 kat risk artışına neden olmaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri meme kanseri yatkınlığına sebep olan genlerdir ve ailesel meme kanserinin yaklaşık %16'sından sorumludur (28,29).

2.1.2.4. Yaşam Tarzı Faktörleri

Alkol meme kanseri için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Bazı çalışmalar doz bağımlı ilişki olduğunu gösterirken farklı çalışmalarda maruz kalma süresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Günlük 10 g alkol alımı meme kanseri riskini yaklaşık %10 artırmaktadır (25). Doymuş yağdan, tuzdan ve şekerden zengin diyet risk artışına sebep olurken lifli gıdalardan, meyve ve sebzeden zengin diyet riskte azalma sağlar (30).

Postmenapozal obez kadınlarda meme kanseri riski %10 ila 60 oranında artmaktadır. Bunun muhtemel sebebi yağ dokusunda bulunan aromataz enziminin vücuttaki androjenleri östrojene çevirmesiyle beraber artan östrojen seviyeleridir (27). Ayrıca, artan insülin seviyeleri de meme kanseri oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (31). Fiziksel aktivite ise bu sebeplerle ilişkili olarak meme kanserinden koruyucudur (30).

2.1.2.5. Meme Yapısı ve Benign Meme Hastalıkları

Unilateral meme kanseri teşhisi almış veya dens meme yapısına sahip kadınların meme kanseri riski artmıştır. Ayrıca, artan meme dansitesi mamografide kanser tespit edilmesini zorlaştırmaktadır. Adenozis, intraduktal papillom gibi atipisiz proliferatif lezyonu olan kadınlarda hafif risk artışı olduğu görülmüştür. Atipi içeren proliferatif lezyona sahip kadınlarda ise yaklaşık 4 kat risk artışı mevcuttur (32).

2.1.3. Histopatolojik Sınıflandırma

Meme kanseri oldukça heterojen bir kanser türüdür. Tipleri arasındaki değişken biyolojik ve morfolojik özelliklerden dolayı farklı klinik davranışlar gösterir. Histopatolojik sınıflandırma, kanser dokusunun patolojik büyüme paternine göre belirlenir. İnvaziv meme kanserinin 20'den fazla histolojik tipi mevcuttur (3).

2.1.3.1. İnvaziv Duktal Karsinom

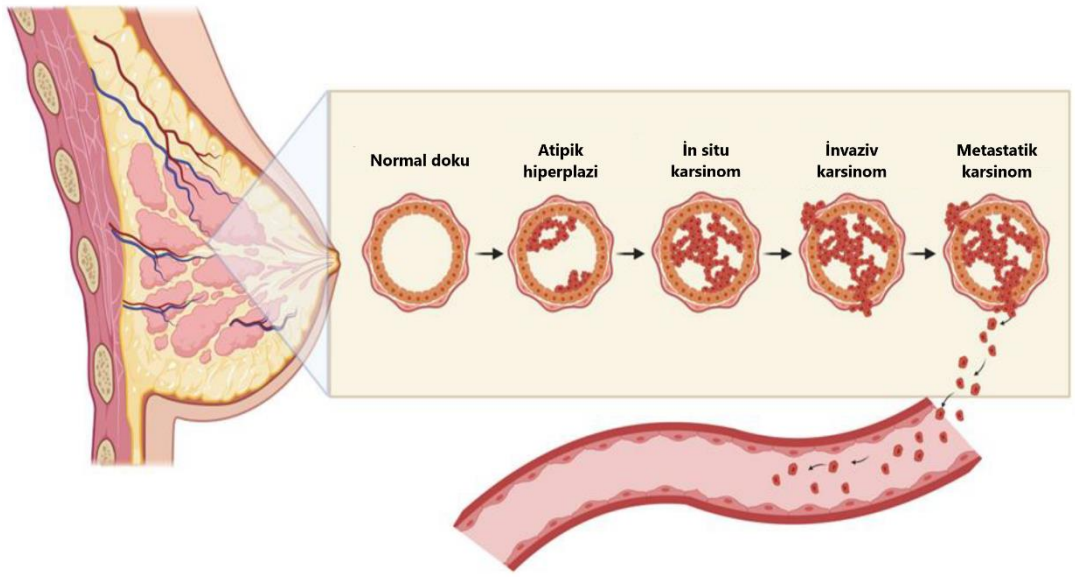
İnvaziv duktal karsinom meme parankimini infiltre eden tübüllerden meydana gelir (Şekil 1). Meme kanseri tanılı hastaların yaklaşık %80'ine invaziv duktal karsinom tanısı konulmaktadır. Bu tipin yaklaşık %20'si tübüler, medüller, papiller ve müsinöz alt tipler ile karakterize edilir. Yaklaşık %80'i ise spesifik olmayan alt tiptir (NST). Bu alt tipin büyük bir kısmında hormon reseptörleri pozitifken HER-2 negatiftir (33,34).

2.1.3.2. İnvaziv Lobüler Karsinom

İnvaziv lobüler karsinom, meme kanserlerinin yaklaşık %10'undan sorumludur. Çoğunlukla postmenapozal kadınlarda görülür ve bilateral olma eğilimi vardır. Neredeyse tamamı östrojen ve progesteron reseptörü pozitiftir. İnvaziv lobüler karsinom iyi huylu kanalların çevresinde tek sıralı düzende infiltrasyon yapan küçük, tek tip hücrelerden oluşur. Bu tip, düşük mitotik orana sahip, çok az atipi içeren bir tümördür. Duktal karsinomlardan farklı olarak invaziv lobuler karsinomların sınırları net değildir ve mikrokalsifikasyon oluşumuna sebep olmazlar. Bu durum mamografi ve ultrasonda lobüler karsinomun tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (33,34).

2.1.3.3. Nadir Tipler

Meme kanserinin farklı patolojik özelliklerine göre belirlenmiş çok sayıda nadir tipi mevcuttur. Müsinöz adenokarsinom, kribriform, tübüler karsinom ve invaziv papiller kanser tipleri sıklıkla hormon reseptör pozitifliği gösterir ve genellikle iyi prognozludur. Medüller karsinom, apokrin karsinom ve sekretuar karsinom tipleri ise hormon reseptör pozitifliği göstermese dahi iyi prognoza sahiptir. Buna ek olarak, pleomorfik lobüler, inflamatuar karsinom, metaplastik karsinom, mikropapiller karsinom ve memenin nöroendokrin karsinomu kötü prognostik özellikler gösterir (3).



Şekil 1: Normal dokunun meme kanserine progresyonu, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı (Moroni ve ark. 2022'den uyarlanmıştır (35)).

2.1.4. Moleküler Sınıflandırma

Gen ifadesi profilleme çalışmaları moleküler özelliklerine göre meme kanserini 5 farklı sınıfa ayırmaktadır. Bu sınıflar, luminal A, luminal B, HER2-Aşırı ifadeli, basal-like ve normal-like olarak adlandırılır. Luminal A ve Luminal B tipleri ER pozitif özellik gösterir ve çok iyi prognozlu tümörlerdir. HER2 pozitif, basal-like ve normal-like tümörler ise ER negatif tümörlerdir. Normal-like tümörler ilk çalışmalarda normal epitel hücrelerin özelliklerine benzeyen tümörler olarak sınıflandırılsalar da sonraki çalışmalar bu grubun düşük malign hücre içeren tümörün normal epitelle kontaminasyonu sonucu oluşan artefaktlar olduğunu göstermiştir (4,36).

2.1.4.1. Luminal A

Luminal A tümörler, normal luminal epitel hücrelerin gen ifadesi profillerine benzeyen özellikler sergiler. İnvaziv meme kanserilerinin %40-50'sinden sorumlu olup en sık görülen moleküler alt tiptir. Tipik olarak düşük dereceli ve çok iyi prognoza sahip tümörlerdir. ER ve PR pozitif HER2 negatif moleküler özellikler gösterir. ER ilişkili genlerde ifade artışı gözlenirken proliferasyon ilişkili genlerde düşük ifade gözlenir. Luminal A tümöre sahip hastalar hormona dayalı tedaviden oldukça fayda görmektedir (4).

2.1.4.2. Luminal B

Luminal B tipi, luminal A tipinden genelde daha yüksek derecelidir ve daha kötü prognoza sahiptir. Düşük seviyede ER pozitifliği, proliferasyonla ilgili genlerde daha yüksek gen ifadesi ve HER2 ile ilgili genlerde değişken seviyede ifade düzeyi gösterirler. Luminal B tümöre sahip hastalar hormona dayalı tedavinin yanında kemoterapiye de ihtiyaç duymaktadır (4,36).

2.1.4.3. HER2-Aşırı İfadeli

HER2-Aİ tipi invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini içerir. HER2 ilişkili yolaklarda bulunan genlerdeki ifade artışı ve HER2 amplifikasyonu ile karakterizedir. Hormon reseptörleri negatiftir ve klinik olarak agresif seyir gösterirler. Bununla birlikte HER2 hedefli tedavilerden oldukça fayda görmektedir. HER2 pozitif tümörler ER ifade ederlerse luminal B olarak sınıflandırılır (4,37).

2.1.4.4. Bazal-like/Triple negatif

Bazal-like meme kanseri normal bazal/myoepitelyal hücrelerdeki gen ifade profillerine benzer özellikler gösterirler. Tipik olarak yüksek dereceli tümörlerdir. ER, PR ve HER2 açısından negatiftir. Yüksek proliferasyon indeksine sahiptir ve prognozları oldukça kötüdür. Tanı sonrası 5 yıl içerisinde nüks gelişebilmektedir (36,37).

2.1.5. Tarama ve Tanı

Meme kanseri genellikle memede kitle ve ağrı şikayetiyle başvuran kadınların muayenesinde ya da kanser taramalarında tespit edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 20 yaşından sonra her kadının ayda bir kendi kendine meme muayenesini yapmasını tavsiye etmektedir. Amerikan Kanser Topluluğu 20-39 yaş arası kadınlarda 3 yılda bir, 40 yaşından sonra da yılda bir klinik meme muayenesi yapılmasını önermektedir. Mamografi taraması ile meme kanserinin erken teşhisi bu hastalıktan ölüm riskini oldukça azaltır. Amerikan Kanser Topluluğu 45-54 yaş arası kadınlarda tarama için yılda bir mamografi çekilmesini önermektedir (1,25).

Rutin klinik uygulamada, kanser dokusu genellikle ince iğne aspirasyonu, kor biyopsi veya cerrahi eksizyon ile elde edilir. Kritik tedavi kararları, tümör morfolojisine bakılmaksızın protein ifade profillerine göre verilmektedir. Parafin dokuların immunohistokimyasal analizi ile tümörün ER, PR, HER2 ve Ki-67 durumu rutin olarak değerlendirilmektedir. HER2 amplifikasyonu ise in-situ hibridizasyon ile tek başına değerlendirilebilmektedir. Bunlara ek olarak Oncotype ve MammaPrint gibi çoklu genleri içeren genetik analizler erken evre meme kanserinde progresyonu tahmin etmek ve sistemik tedavi ile ilgili etkili kararlar verebilmek için kullanılmaktadır (38).

2.1.6. Görüntüleme Yöntemleri

Ultrason, memenin hemen hemen her lezyonunda değerli bilgiler sağlar. Özellikle 30 yaş altı kadınlarda ve dens meme görüntülemesinde önemli bir yeri vardır. Ultrason basit ve komplike kistleri, iyi huylu ve kötü huylu kitleleri ve normale karşı anormal lenf düğümlerini belirlemede oldukça hassastır (2).

Primeri bilinmeyen aksiller lenf nodu malignitesinde, kemoterapiye yanıtın izlenmesinde ve yüksek riskli bireylerin taranmasında manyetik rezonans görüntüleme (MRI) endikasyonu vardır. Yaklaşık %100'e yakın duyarlılığa sahip olsa da yanlış

pozitiflik oranları nedeniyle mamografik ve ultrasonografik değerlendirmenin yerini alamaz (2).

2.1.7. Evreleme

Primer tümör, lenf nodu ve metastaz (TNM) durumlarının değerlendirildiği evreleme sistemi ilk olarak 1959'da American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından yayınlandı ve 2017 yılında revize edildi. Evrelemenin amacı hastanın prognozunu tahmin etmek ve buna göre bir tedavi planı belirlemektir (39).

AJCC evreleme sisteminin sekizinci baskısına göre maksimum tümör boyutu 1 mm ve altında olan tümörler T1mi (mikroinvazyon), 1-20 mm aralığında olanlar T1, 20 mm-50 mm aralığında olanlar T2, 50 mm'den büyük olanlar T3, göğüs duvarı ya da cilde invazyon olanlar T4 olarak tanımlanır. İnflamatuar meme kanseri ise T4d olarak değerlendirilir (40).

Lenf noduna göre; hastanın 1-3 aksiller lenf nodunda mikrometastaz veya metastaz varsa ve internal sentinel meme lenf nodları negatifse N1, aksiller lenf nodu metastazı 4-9 arasında veya pozitif ipsilateral internal meme lenf nodları varsa N2, 10 ve daha fazla aksiller lenf nodu metastazı veya infraklavikular/supraklavikular lenf nodu metastazı veya aksiller metastazla beraber ipsilateral internal meme lenf nodu metastazı varsa N3 olarak tanımlanır (40,41).

Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz tespit edilirse M1 olarak değerlendirilmektedir. Yeni AJCC evreleme sistemindeki en büyük değişiklik evrelemeye ER, PR, ve HER2 gibi biyolojik belirteçlerin dahil edilmesidir (41).

2.1.7.1. İn Situ Kanser

Duktal karsinoma in situ (DKIS) yeni tanı meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Altın standart tedavi yöntemi mastektomi olsada küçük lezyonlarda meme koruyucu cerrahi (MKC) önerilebilir. MKC sonrası adjuvan radyoterapi ve hormonal tedavi uygulamasının invaziv karsinom riskini azalttığı gösterilmiştir (42).

Lobüler karsinoma in situ 10 yıl içerisinde meme kanseri riskini %7 artırmaktadır. Bu nedenle lobüler karsinoma in situ tespit edilen hastalara cerrahi ve

aromatazlar önerilmemekte ve genellikle sıkı kontrolle gözetim altında tutulmaktadır (43).

2.1.7.2. Evre 1 ve Evre 2: Erken Evre

Modifiye radikal mastektomi erken evre meme kanserinde uzun yıllar uygulanan standart tedavi yöntemidir. Bununla birlikte eğer hastanın klinik durumu uygunsa meme koruyucu cerrahi uygulanmaktadır. Meme koruyucu cerrahiyi takip eden radyoterapi uygulamasının hastalarda sağ kalımı artırdığı ve rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (44).

Aksiller lenf nodu ve sentinel lenf nodu biyopsisi hastanın radyoterapi ve sistemik tedavi ihtiyacını belirlemek açısından önemlidir. Pozitif sentinel lenf nodu veya palpabl lenf nodu varsa aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılması gerekmektedir (44).

Erken evre meme kanserine sahip hastaların büyük çoğunluğuna lokal tedaviye ek olarak kemoterapi, endokrin tedavi ve/veya hedefe yönelik tedavi gibi sistemik tedaviler verilmektedir. Özellikle lenf nodu pozitif çıkan hastalar sistemik tedaviye ihtiyaç duyar. Bir santimetreden büyük tümörlerde ve lenf nodu pozitifliğinde taksanlar ve antrasiklinler gibi kemoterapi ajanları standart tedavi olarak kullanılmaktadır (44).

Hormon reseptör pozitif hastalar endokrin tedaviden fayda görmektedir. Endokrin tedavinin amacı östrojenin reseptör seviyesinde etkisini bloke etmek veya östrojen üretimini inhibe etmektir. Selektif östrojen reseptör modülatörleri (Tamoksifen), selektif östrojen reseptör down-regülatörleri (Fulvestrant) ve aromataz inhibitörleri (Anastrazol, Letrozol, Eksemestan) endokrin terapilerden bazılarıdır (45). Trastuzumab ise HER2 ifadesi fazla olan kanserlerde kullanılan hedefe yönelik tedavi ajanıdır. Kemoterapi sonrası 1 yıllık adjuvan trastuzumab kullanımı uzun vadeli hastalıksız sağ kalımı artırmaktadır (46).

2.1.7.3. Evre 3: Lokal İleri Evre

Lokal ileri evre meme kanseri hastalarında antrasiklin ve taksan bazlı neoadjuvan kemoterapi rejimlerini takiben cerrahi uygulama ve radyoterapi standart tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Preoperatif kemoterapi tedavisi uygulaması tümör boyutlarında küçülme sağlar ve meme koruyucu cerrahiyi kolaylaştırır.

Neoadjuvan kemoterapiye tümörün cevabı tedavinin sonraki aşamasını belirler. Hastanın durumuna göre mastektomi veya meme koruyucu cerrahi ile beraber radyoterapi verilebilir (44).

2.1.7.4. İnflamatuvar Meme Kanseri

İnflamatuvar meme kanseri memede eritem ve ödemle karakterize agresif klinik seyir gösteren nadir bir meme kanseri türüdür. Kötü prognozlu olsada inflamatuvar olmayan lokal ileri evre meme kanserine benzer şekilde tedavi edilir. Neoadjuvan kemoterapi sonrası agresif lokal tedavi rutin olarak kullanılmaktadır (47).

2.1.7.5. Evre 4: Metastatik Evre

Metastatik evrede sistemik tedavi endikasyonu vardır. Kemoterapi veya endokrin tedavi ile birlikte uygulanan radyoterapi kemik metastazlarından meydana gelen ağrıyı hafifletmektedir. Endokrin tedavi kemoterapiden daha iyi tolere edilsede hızlı ilerleyen hastalığı olan kadınlara kemoterapi uygulanması daha iyi sonuçlar verir. HER2 aşırı ifadesi olan hastalarda kemoterapi ile beraber trastuzumab uygun seçenektir (44).

2.2. Karsinogenez Mekanizmaları

Normal gelişim ile kanser gelişimi arasında moleküler düzeyde benzerlikler vardır. Normal doku gelişimi, hücrelerin çevreleriyle iletişim kurmasını sağlayan karmaşık sinyal yolakları ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kanser dokusu gelişimi ise hücrelerin normalde çoğalmasını, hayatta kalmasını ve göç etmesini kontrol eden moleküler mekanizmalardan kaçmasını sağlayan genetik ve epigenetik değişiklikler tarafından düzenlenir (48). Kanser genetiği, DNA dizisindeki mutasyon nedeniyle meydana gelen anormal protein ifadesine odaklanırken, kanser epigenetiği, genom dizisini değiştirmeden gen ifadesinin düzenlenmesine odaklanmaktadır. Onkojenler ve tümör baskılayıcı genler, kanser gelişiminde rol oynayan en iyi bilinen gen gruplarıdır (49).

Hanahan ve Weinberg tarafından 2000 yılında tanımlanan karsinogenez mekanizmaları günümüzde yaygın olarak kabul görmektedir. Bunlar; büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme engelleyici sinyallere karşı duyarsızlık, apopitozdan kaçış, sınırsız replikasyon, anjiyogenezis, doku invazyonu ve metastaz ve genomik instabilitedir (50).

2.2.1. Büyüme Sinyallerinde Kendi Kendine Yeterlilik

Farklılaşmış hücrelerin büyük kısmı dinlenme (G0) fazında bulunur. Hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve apopitoz arasında bir denge halindedir. Eğer hücreye mitojenik bir uyarı gelirse hücre döngüsü aktifleşmeye başlar ve bir dizi aşamadan geçerek genetik materyali kopyalayıp hücre sayısını artırır. Bu aşamalar hücre bölünmesi için hazırlık aşaması olan G1 fazı, DNA kopyalanmasının olduğu S fazı, G2 fazı ve mitoz bölünmenin meydana geldiği M fazıdır. Hücre döngüsü protoonkogenler ile aktive edilmektedir. Protoonkogenler, çeşitli mutasyonlar sonucu onkogen haline dönüşerek hücrenin dış uyarıma ihtiyaç kalmadan proliferasyonuna sebep olurlar (51).

Mitojen sinyalleri hücre içine ileten hücre yüzeyi reseptörleri, tümör gelişiminde yer alan onkojenik hedeflerden biridir. Tirozin kinaz aktivitesi taşıyan büyüme faktörü reseptörleri, birçok kanserde aşırı miktarda ifade edilir. Örneğin bir reseptör tirozin kinaz olan HER2 (neu) meme ve mide kanserinde aşırı ifade edilirken, büyüme faktörü reseptörü olan EGF-R ve c-erbB beyin ve mide kanser hücrelerinde aşırı ifade edilir.

Ras, MAPK ve PI3K/Akt yolakları tirozin kinaz reseptörü aktivasyonu sonucu hücre içi etkinliği artan yolaklardır. Kromozom 9'da lokalize ABL geninin 22. kromozoma translokasyonu sonucu BCR-ABL onkogeni kodlanır ve aşırı aktivasyon, lösemi kliniğine sebep olur. H-RAS, K-RAS, N-RAS membrana bağlı G proteinlerdir ve fonksiyon artışı sonucu onkojenik özellik gösterirler (50). Kanserojen dokularda sık rol oynayan bir diğer faktör de Myc transkripsiyon faktörüdür. Myc, birkaç mekanizma yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini uyarabilmektedir. Pozitif hücre döngüsü düzenleyicilerinin çoğu, Myc hedef genleri tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca, p21 ve p27 gibi hücre döngüsü inhibitörlerine karşı görev almaktadır (52).

2.2.2. Büyüme Engelleyici Sinyallere Karşı Duyarsızlık

Normal hücre siklusunda proliferasyon, doku dengesinin sağlanması için çeşitli sinyallerle inhibe edilmektedir. Bu sinyaller özellikle G1 fazından geçişi inhibe ederek döngüyü düzenler. *RB* ve *TP53* genleri en iyi bilinen tümör baskılayıcı genlerdir. *RB* geni tarafından kodlanan protein, hipofosforile formda aktive olup E2F transkripsiyon faktörünü inhibe eder. Bu şekilde hücre siklusu G1 fazından S fazına ilerleyemez. Buna ek olarak RB proteini hiperfosforile duruma geçerse E2F serbest kalarak döngünün aktivasyonuna sebep olur. CDK4, siklin D ve p16 hücre döngüsünü kontrol eden diğer faktörlerdendir (53).

TP53 geninin kodladığı p53 proteini, DNA hasarına ve hücre içi strese bağlı olarak aktive olur. Sonrasında hücre döngüsünü baskılayarak ve apopitozu indükleyerek kanser gelişimini önlemektedir. p53 proteinindeki fonksiyon kaybında biriken hücre hasarı neoplastik dönüşüme neden olmaktadır. *APC* ve *TGFB1* (TGFβ) neoplastik dönüşümü engelleyen genlerden bazılarıdır (50,53).

2.2.3. Apopitozdan Kaçış

Hücrelerde DNA'da meydana gelen hasar tamir edilmezse apopitotik kaskatlar aktive olmaktadır. p53 proteini fosforile hale geldiğinde anti apopitotik protein olan BCL-2'nin ifadesini baskılarken bir proapopitotik protein olan BAX'a bağlanıp apopitozu indüklemektedir. Aktive olan BAX ve BAK proteini mitokondri geçirgenliğini artırarak sitokrom c'nin hücre içine salınmasını ve bunun sonucunda kaspazların aktivasyonunu başlatır. BCL-2 proteininin lenfoid neoplazmlarda apopitozu engelleyici etkisi oldukça önemlidir (53,54).

2.2.4. Sınırsız Replikasyon

Normal insan hücrelerinde her bir hücre döngüsünde kromozomların uç bölgesinde bulunan TTAGGG dizileri olan telomerler kısalmaktadır. Telomeraz, ters transkriptaz aktivitesiyle telomer uzunluğunun korunmasına ve genomik stabilitenin sağlanmasına yardımcı olur. Olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerde sessizleşen telomeraz aktivitesi kanser hücrelerinde artış göstermektedir. Bu sayede kanser hücresi sınırsız replikasyon özelliği gösterir (55).

2.2.5. Anjiyogenezis

Tümörün büyürken gerekli olan besin ve oksijeni alabilmesi için yeni damar oluşumu şarttır. Oluşan kanser hücrelerindeki hipoksi sonucu hipoksi indükleyici faktör-a (HIF-a) salgılanır. Bu şekilde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) proteinlerinin ifadesi artar ve damar oluşumunu başlatır (56).

2.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz

Epitel hücreleri normal şartlar altında birbirlerine ve komşu ekstraselüler matrikse sıkı sıkıya bağlanmıştır. E-cadherin gibi adhezyonu sağlayan proteinlerin kaybı bu bağlantılarda bozulmalara neden olur. Aynı zamanda proteolitik enzimlerin ekstraselüler matriks ve bazal membranı parçalaması ile beraber kanser hücrelerinin migrasyon ve metastaz süreci başlamaktadır (57).

Epitelyal mezenkimal transizyon (EMT), epitel hücrelerinin invazyon yapma, strese direnme ve yayılım yeteneği gibi mezenkimal özellikler geliştirdiği farklılaşma sürecidir. Bu süreç kanser progresyonu ve metastazı için oldukça önemlidir (50,57).

2.2.7. Genomik İnstabilite

Genomda normal mutasyon oranlarından daha fazla mutasyon olması genomik instabilite olarak tanımlanmaktadır. Genom tamir sistemlerinin DNA'daki hataları tespit etme ve düzeltme konusundaki yeteneği, hücre döngüsü sırasında meydana gelen mutasyon sayısını oldukça azaltmaktadır. Baz eksizyon onarımı, yanlış eşleşme onarımı (Mismatch repair-MMR) ve nükleotid eksizyon onarımı genomik tamir mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalarda meydana gelen fonksiyon kayıpları genomik instabilitenin artmasına yol açarak hücresel dönüşüme neden olur (58).

2.2.8. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi, tümörün insan sisteminde bulunduğu hücresel ortamdır. Kan damarlarını, fibroblastları, bağışıklığa katkıda bulunan hücreleri, inflamatuar hücreleri, lenfositleri, sinyal ağını ve ekstraselüler matriksi içerir. Kanser hücreleri ekstra selüler matriksle etkileşime girerek anjiyogenezi uyarıcı ve bağışıklığa karşı tolerans geliştirebilecek sinyaller üretebilir. Mikroçevredeki bağışıklık hücreleri kanser hücrelerinin büyümesini ve evrimini etkileyebilir. Buna ek olarak mikroçevre, kanser hücresinin invazyonuna ve metastazına katkıda bulunmaktadır (59).

2.2.9. Epigenetik Değişiklikler

DNA dizisinde değişiklik olmadan meydana gelen gen ifadesi değişiklikleri epigenetik değişiklik olarak ifade edilmektedir. Epigenetik regülasyon değişiklikleri karsinogenezde rol alabilmektedir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlama yapmayan RNA'lardaki bozukluk ve düzensizlikler epigenetik olarak gen fonksiyonunu değiştirip malign hücre transformasyonuna neden olabilir (21).

DNA metilasyonu genellikle CpG dinükleotidinin içindeki sitozin halkasının 5' pozisyonunda gerçekleşir. Bu bölgelerde spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanması inhibe edilir ve kodlama yapılmayan genomik bölgeler susturulur (60).

Histon modifikasyonu gen düzenlenmesi ve karsinogenezde önemli rol oynayan kromatin yapısını etkileyerek epigenetik değişikliklere neden olmaktadır. Histon kuyruklarındaki translasyon sonrası modifikasyonlar, kromatinin yapısal durumunu ve sonuçta belirli genlerin transkripsiyonel durumunu yönetir (61).

Kodlama yapmayan RNA'lar ise transkripsiyon sonrası mRNA'ya bağlanıp degredasyonunu uyarabilir veya gen ifadelerini düzenleyebilir. Bu şekilde kanser gelişimi, progresyonu, metastazı ve ilaç direncinde yer alırlar. Güncel çalışmalar kanserde genetik ve epigenetik tedavi hedefleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (62).

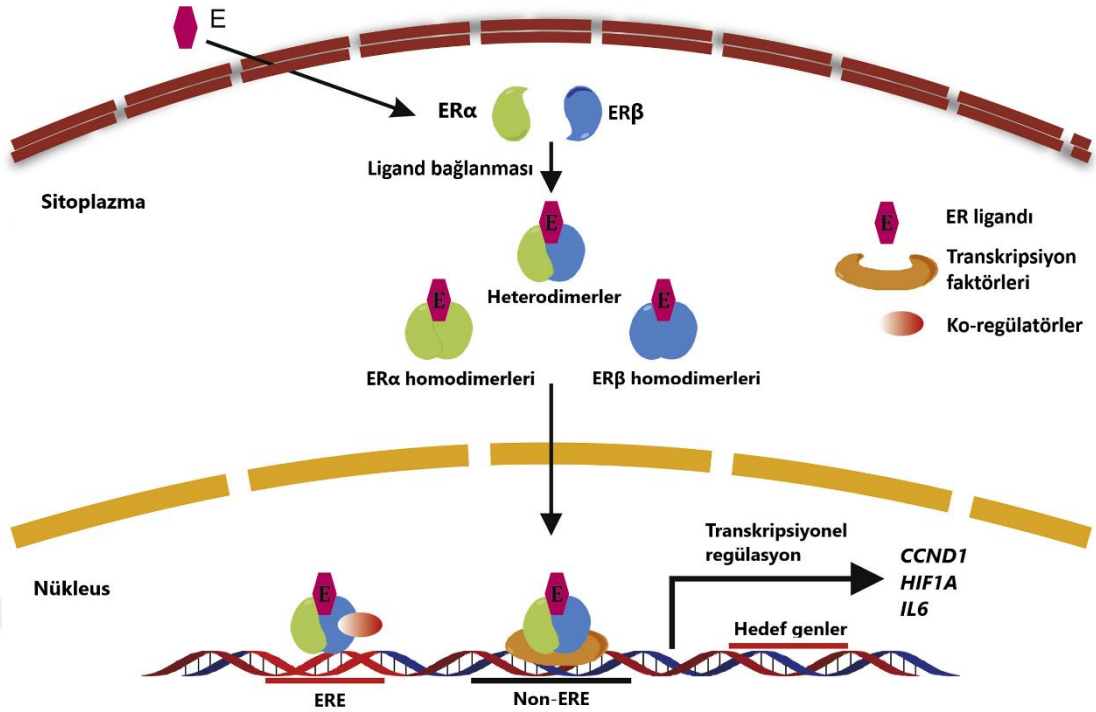
2.3. Meme Kanserinde Genetik Mekanizmalar

Meme tümörleri genellikle duktal proliferasyon artışı ile başlar ve çeşitli kanserojen faktörlerle uyarıldıktan sonra metastatik karsinomlara dönüşür. Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesi ile alakalı iki teori vardır: Kanser kök hücre teorisi ve stokastik teori. Kanser kök hücre teorisi, tüm tümör alt tiplerinin aynı kök hücreden veya progenitör hücreden geldiğini öne sürer. Kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde kazanılmış genetik ve epigenetik mutasyonlar, farklı tümör fenotiplerine yol açacaktır. Stokastik teori ise her bir kanser hücresi alt tipinin, tek bir hücre tipinden başladığını öne sürmektedir. Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme hücresinde kademeli olarak birikebilir ve yeteri kadar biriktiğinde kanser hücresi dönüşümüne yol açar (24).

2.3.1. Meme Kanseri Gelişiminde Temel Sinyal Yolakları

2.3.1.1. ER İlişkili Sinyal Yolağı

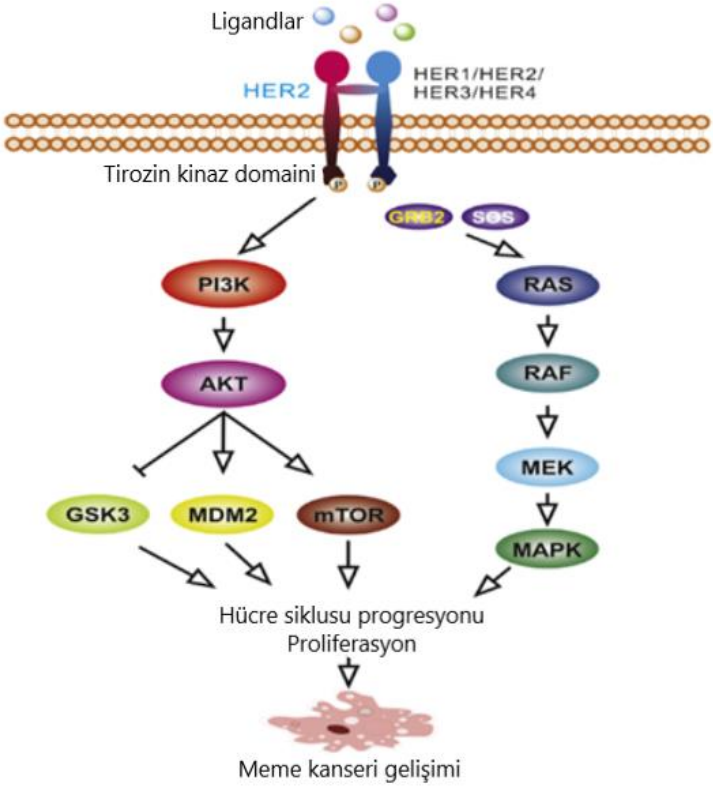
Nükleer östrojen reseptörleri ERα ve ERβ olmak üzere birbirine çok benzeyen iki farklı transkripsiyon faktöründen oluşur. Bu reseptörler ligand bağlanması ile birlikte homodimer veya heterodimer yapı haline gelerek hedef gende ifade artışına veya azalmasına neden olmaktadır. ER dimerleri, DNA üzerindeki östrojen cevap elementleri'ne (Estrogen response elements-ERE) bağlanarak veya bağlanmaksızın etkisini gösterebilir (Şekil 2). ER aracılı transkripsiyon düzenleme sürecinde, BRCA1 dahil birçok koaktivatör ve korepresör görev alır. BRCA1, ERα sinyalini parsiyel olarak inhibe eder ve tümör baskılayıcı olarak görev yapar. Meme kanserlerinin yaklaşık %75'inde ERα'nın ifade artışı görülmektedir. ERα aynı zamanda bir hücre döngüsü aktivatörü olan siklin D1 ile etkileşime girerek tümör hücresi büyümesine neden olmaktadır (48).



Şekil 2: ER dimerlerinin DNA üzerindeki östrojen cevap elementlerine bağlanması sonucu meydana gelen transkripsiyonel düzenlenme (Feng ve ark. 2018'den uyarlandı (48)).

2.3.1.2. HER2 İlişkili Sinyal Yolağı

HER2 reseptörü, insan epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ailesinden olan tirozin kinaz aktivitesine sahip bir reseptördür. Ligand bağlanması ile reseptör dimerizasyonu oluşur. Bu şekilde sitozoldeki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile meme kanseri oluşumunda yer alan RAS/MAPK ve PI3K/Akt gibi sinyal yolaklarının aktivasyonu sağlanmaktadır (Şekil 3). Meme kanseri hastalarının yaklaşık %15'inde HER2 proteininin aşırı ifadesi görülmektedir. HER2 pozitif meme kanseri, kötü prognozlu meme kanseri olmasına rağmen HER2 hedefli tedavilerden oldukça fayda görmektedir (63).



Şekil 3: HER2 reseptörüne ligand bağlanması sonucu hücre proliferasyonu ve meme kanseri gelişimi (Feng ve ark. 2018'den uyarlandı (48)).

2.3.1.3. Wnt İlişkili Sinyal Yolağı

Wnt proteinleri çeşitli gelişimsel süreçlerde rol oynayan glikozillenmiş moleküllerdir. Wnt ligandının, Frizzled ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ilişkili protein 5 ve 6 reseptörlerine bağlanması sonucu Wnt/β-katenin yolu aktifleşir. Wnt reseptör bağlantısı oluştuktan sonra axin proteini membrana yönelir ve normalde β-katenin degredasyonunu kontrol eden glikojen sentaz kinaz 3-β ve APC kompleksi inhibe edilir. Bu şekilde sitoplazmada β-katenin birikimi olmaktadır. Artan β-katenin proteininin nükleusa translokasyonu sonucu *MYC*, *CCND1* gibi bazı onkogenlerin transkripsiyonu artmaktadır. Meme kanserinde Wnt/β-katenin yolağının muhtemelen otokrin mekanizma ile aktive olduğu düşünülmektedir (64).

2.3.1.4. Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolağı hücre farklılaşmasında, çoğalmasında ve gelişimsel süreçlerde yer alır. Yapılan çalışmalarda bu yolağın disregülasyonunun karsinogenezise, tedavi direncine ve anjiyogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir. İnsanda dört farklı Notch reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler ekstraselüler

domain, transmembran domain ve intraselüler domain olmak üzere 3 farklı kısımdan oluşur. Ekstraselüler domain epidermal büyüme faktörü benzeri tekrarlar içerir. Notch reseptörlerine bağlanan 5 farklı ligand bulunmaktadır. Bunlar delta-like ligand 1 (Dll1), Dll3, Dll4, jagged 1 ve jagged 2'dir. Başarılı ligand reseptör etkileşimi sonrası γ-sekretaz aktivitesi ile reseptörün intraselüler domaini ayrılır ve nükleusa doğru yer değiştirir. Bu şekilde hedef genlerin transkripsiyon aktivitesi düzenlenmektedir (65).

2.3.1.5. Sonic Hedgehog (SHH) Sinyal Yolağı

SHH sinyal yolağı meme duktusları gelişiminde kritik rollere sahiptir. Bu yolaktaki bozulmalar *PTCH-1* ve *GLI-2* genlerinde ifade artışına ve meme kanseri gelişimine katkıda bulunur (48).

2.3.2. Meme Kanseri İle İlişkili Genler

Meme kanserinin yaklaşık %70'i sporadik olarak meydana gelirken % 30'u ailesel olarak meydana gelmektedir. Ailesel meme kanserlerinden yüksek, orta ve düşük penetranslı yatkınlık genleri sorumludur (Şekil 4). *BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11* ve *CDH1* yüksek penetran genlere, *CHEK2, ATM* ve *PALB2* orta penetran genlere örnek olarak verilebilir (29).

BRCA1 ve *BRCA2,* mutasyonları meme ve yumurtalık kanserine yatkınlık yapan tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genler tarafından kodlanan proteinler genomik stabilite, DNA onarımı ve homolog rekombinasyon süreçlerinde yer almaktadır. Buna ek olarak hücre döngüsü ve apopitoz ile ilgili diğer genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir. BRCA1, DNA hasar yanıtını kontrol eden ATM ve ATR'nin substratıdır. BRCA2 ise temel olarak homolog rekombinasyon sürecinde rol oynamaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının taşıyıcıları, yaşam boyu yüksek meme ve yumurtalık kanseri riskine sahiptir. *BRCA1* mutasyon taşıyıcıları için 70 yaşına kadar meme kanseri riskinin %40-87 ve yumurtalık kanseri riskinin %16-68 arasında olduğu tahmin edilmektedir (29,66).

TP53 geni hücre döngüsü, DNA onarımı, apopitoz, hücresel yaşlanma ve metabolizma süreçlerinde rol oynamaktadır. Bu genin germ-line mutasyonları Li-fraumeni sendromuna sebep olmaktadır. *TP53* mutasyonuna sahip kadınlar hayatları boyunca %100'e yakın kanser riskine sahiptir (67).

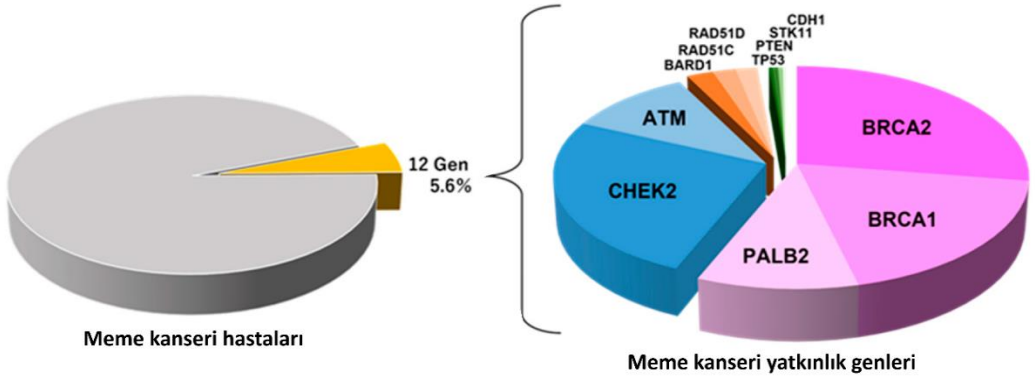
Bir tümör baskılayıcı gen olan *PTEN* tarafından kodlanan protein PI3K/Akt/mTOR yolağında rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda *PTEN* geninde hastalık yapıcı varyant taşıyan kişilerin artmış meme kanseri riskine sahip olduğu gösterilmiştir (68).

STK11 geni hücre döngüsü düzenlenmesinde ve apopitozda yer alarak tümör baskılayıcı görev üstlenmektedir. *STK11* mutasyonu taşıyıcısı kişiler %32 ila 54 arasında meme kanseri riskine sahiptir (69).

CDH1 geni hücreler arasında tutunmayı sağlayan cadherin proteinini kodlamaktadır. Bu genin hastalık yapıcı mutasyonlarının herediter diffüz mide kanseri ve bilateral lobuler meme kanseri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (70).

PALB2 geni homolog rekombinasyon ve çift zincir kırıklarının onarımı esnasında *BRCA2* ile etkileşime giren bir protein kodlamaktadır. Biallelik *PALB2* mutasyonlarının ise FANC-N'ye neden olduğu bildirilmiştir (71).

CHEK2, DNA onarımında rol oynayan bir hücre döngüsü kontrol noktası kinazını kodlar ve tümör baskılayıcı olarak rol oynar (29). Bir protein kinaz geni olan *ATM* ise; *TP53*, *BRCA1* ve *CHEK2* genlerine benzer şekilde çift zincir kırıklarının onarımında yer almaktadır (71).



Şekil 4: Meme kanseri gelişimine yatkınlık oluşturan genler (Yoshimura ve ark. 2022'den uyarlandı (59)).

2.4. Kodlama yapmayan RNA Ailesi

2.4.1. Tanımı ve Türleri

İnsan genomunun sadece %2'lik kısmı protein kodlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar genomun kodlama yapmayan kısmının normal gelişim ve hastalık sürecindeki yerini araştırmaya yoğunlaşmıştır. Kodlama yapmayan RNA terimi, protein ifadesinde yer almayan RNA'lar için kullanılmaktadır. Bugüne kadar hastalık patogenezinde yer alan çok sayıda kodlama yapmayan RNA tanımlanmıştır (6).

Kodlama yapmayan RNA'lar nükleotit uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. Mikro RNA (miRNA) ve PIWI-interacting RNA (piRNA) nükleotit uzunlukları 19-30 baz çifti aralığında olan kodlama yapmayan kısa RNA'lardır. Protein kodlamayan genomun işlevselliği miRNA'lar için oldukça belirgindir. İnsan hastalıklarında, özellikle kanserde, miRNA'lardaki epigenetik ve genetik değişikliklerin hastalık başlangıcında ve progresyonunda rol aldığı gösterilmiştir (6,72). Ayrıca, normal gelişimsel süreçlerde de yer almaktadırlar. piRNA'lar germ hücrelerindeki genom stabilizasyonunda yer alan PIWI proteinleri ile etkileşime giren 24-30 nükleotit uzunluğundaki kodlama yapmayan RNA'lardır (72).

SnoRNA'lar, 60-300 baz çifti uzunluğunda olan orta uzunluktaki kodlama yapmayan RNA'lar olup küçük nükleolar ribonükleoproteinlerin bir komponentidir ve ribozomal RNA'ların post-transkripsiyonel modifikasyonlarında yer almaktadır (73).

Kodlama yapmayan uzun RNA dizileri (lncRNA), 200 baz çiftinden uzun olan ve kodlama fonksiyonu olmayan heterojen bir gruptur. Memelilerde kodlama yapmayan transkriptomun en büyük kısmını oluştururlar. Transkripsiyonel baskılamada, nükleer yapının regülasyonunda, mRNA stabilizasyonunda ve bunun gibi birçok biyolojik mekanizmalarda yer alırlar (74)

2.4.2. LncRNA

İnsanda 60 binden fazla lncRNA olduğu öne sürülmektedir ve bunların büyük çoğunluğu nükleusta lokalizedir. Düzensiz lncRNA profilinin, hücre çoğalması, hücre göçü, tümör invazyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), apopitoz ve kemoterapi direncinde yer aldığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmalar, lncRNA'ların kanser teşhisi ve progresyonu için potansiyel hedef ve biyolojik belirteçler olabileceğini göstermektedir. Genomdaki protein kodlayan genlerin

konumuna göre lncRNA'lar sense, antisense, intergenik, intron, enhancer ve çift yönlü lncRNA olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Şimdiye kadar birçok lncRNA'nın transkripsiyon ve post-transkripsiyonel süreçlerde yer aldığı rapor edilmiştir (75).

2.4.2.1. LncRNA'nın Post-transkripsiyonel Etkinliği

Birçok lncRNA geni, ekzon veya intron bölgesinde yer alabilen gömülü miRNA dizileri içermektedir. Bu şekilde konakçı lncRNA geni promotör bölgesinin metilasyonu ile içermiş olduğu miRNA geninin ifadesi düzenlenebilmektedir. Örneğin meme kanserinde ifadesi azalan *miR-31* geni, bir lncRNA olan LOC554202'nin intronik bölgesinde gömülüdür ve LOC554202'nin promotör metilasyonu ile ifadesi düzenlenmektedir (76).

LncRNA'lar birçok miRNA'nın negatif düzenleyicisi olarak işlev görebilmektedir. LncRNA'ların miRNA'lar için bağlanma bölgesi mevcuttur ve miRNA'lara bağlanarak hücre içindeki konsantrasyonlarını sınırlayıp mevcut miRNA havuzunu azaltabilirler. Bu mekanizma ile lncRNA'lar, miRNA fonksiyonunun negatif düzenleyicisi ve bu bağlamda gen ifadesinin pozitif düzenleyicisi olarak hareket eder. Bu mekanizmaya "rekabet eden endojen RNA (ceRNA)" denilmektedir. Bazı lncRNA'lar miRNA'dan bağımsız olarak mRNA degredasyonunu uyarabilmektedir (75,76).

2.4.2.2. LncRNA'nın Transkripsiyonel Etkinliği

Gen ifadesi, genin proksimal promotör bölgesi ve transkripte edilen kısımdan uzakta olan enhancer dizilerinin etkileşimi ile düzenlenmektedir. Bir genin ifadesini birden fazla enhancer etkileyebilir. Bu konuda yapılmış çalışmalar enhancer bölgelerden kaynaklanan bazı kodlama yapmayan RNA'ların gen ifadesini etkileyebileceğini düşündürmektedir (76,77).

Enhancer bölgelerden kaynaklanmayan lncRNA genleri de enhancer benzeri aktivite gösterebilirler. Mediatör denilen protein kompleksi, enhancer ve promotör bölge arasında köprü kurulmasını sağlamaktadır. Bu şekilde transkripsiyonel aktivasyon gerçekleşir (76).

LncRNA'lar, kromatin modifikasyonu, yeniden düzenlenmesi, histon modifikasyonu ve nükleozom lokalizasyon değişiklikleri aracılığıyla gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik rollere sahiptir. DNA metilasyonu, demetilasyonu ve histon

asetilasyonu yoluyla kromatin yeniden düzenlemesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, polycomb repressive complex 2 (PRC2) ile etkileşime girip histon metilasyonunu düzenleyerek kromatin yapısı ve fonksiyonunu değiştirebilmektedir (75). Kodlama yapmayan bir RNA'nın potansiyel olarak işlevselliğini ve hastalıkla ilişkisini belirlemede önemli adımlardan biri lncRNA'nın ifadesiyle hastalığın bulguları veya sonuçları arasındaki korelasyonu araştırmaktır (77).

2.4.3. MikroRNA

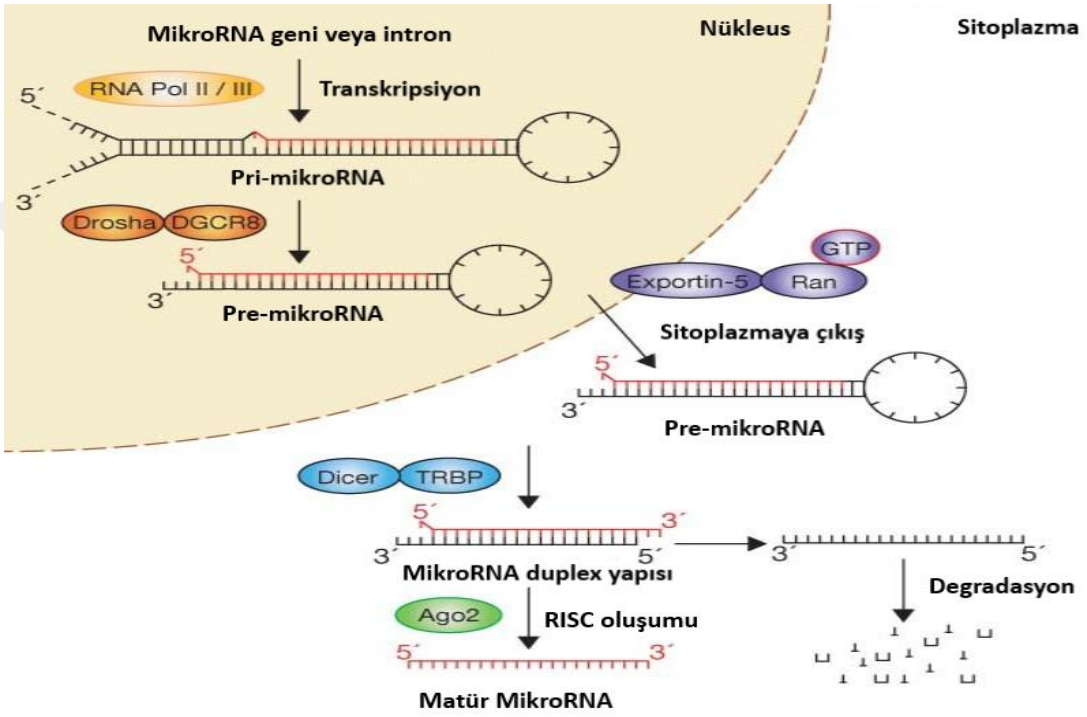
MikroRNA'lar yaklaşık 22-24 baz çifti uzunluğunda kodlama yapmayan transkriptlerdir. Hücre siklusu kontrolü, apopitozis, metabolizma benzeri normal gelişimsel süreçlerde yer aldığı gibi kanser, nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar gibi hastalıkların patogenezinde de yer almaktadırlar (78).

MikroRNA genleri genomda intergenik alanlarda veya protein kodlayan genlerin ekzon veya intron bölgelerinde lokalizedir. RNA polimeraz 2 ile transkribe olduktan sonra başlık eklenmesi ve poliadenilasyon gibi modifikasyonlara uğrar. Oluşan bu uzun primer transkriptin adı pri-miRNA'dır. Pri-miRNA nükleusta Drosha/DGCR8 heterodimeri ile miRNA öncülü olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (79). Oluşan pre-miRNA Eksportin5 ve Ran-GTP aracılığı ile nükleustan sitozole yer değiştirir (80). Sitozole geçen pre-miRNA'yı tanıyan RNAse DICER 3 enzimi, pre-miRNA'yı 22 nükleotitli olgun miRNA'ya çevirir. Çift zincirli olgun miRNA, RNA tarafından indüklenen sessizleştirici komplekse (RISC) bağlanır. RISC, Argonaute2 ve transaktivasyon cevabı RNA bağlayıcı protein'den (TRBP) oluşmaktadır. Bu bağlanma sonucu miRNA'nın komplementer ipliği degrade olur ve fonksiyonel miRNA meydana gelir (Şekil 5) (78).

MiRNA'lar, mRNA'daki 3'UTR elementlerine bağlandıktan sonra RISC aracılığıyla degredasyona sebep olmaktadır. Aynı zamanda bu bağlanma transkriptin translasyonuna engel olabilir. MiRNA'lar bu sayede gen ifadesini düzenlenmesinde yer almaktadır. Tıpkı lncRNA ifadeleri gibi, miRNA ifadeleri de meme kanseri dahil birçok kanserde düzensizdir. MiRNA'lar, temel gen düzenleyicileri olarak kabul edilir ve tümör baskılayıcı miRNA'lar veya oncomiR'ler olarak işlev görmektedir (81).

MiRNA genlerindeki amplifikasyon veya delesyonlar, miRNA biyogenezindeki kusurlar ve miRNA genlerini etkileyen epigenetik değişiklikler, miRNA ifade

düzensizliklerine yol açmaktadır. MiRNA'lar, proliferatif sinyali sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, istila ve metastazı aktive etmek ve anjiyogenezi indüklemek gibi tümör gelişimi sırasında edinilen biyolojik yeteneklerde rol oynamaktadır (82).



Şekil 5: Fonksiyonel miRNA'nın oluşum basamakları (Peng ve ark 2016'dan uyarlanmıştır (82)).

2.4.4. Rekabetçi Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi

MiRNA'lar çok sayıda transkripti 3'UTR bölgelerindeki miRNA yanıt elemanları (MRE) denilen tamamlayıcı dizilere bağlanarak düzenlemektedir. MRE'leri içeren hem kodlama yapan hem de yapmayan endojen RNA molekülleri ceRNA olarak isimlendirilir ve miRNA'ların mRNA hedefleri üzerindeki etkisini rekabetçi bir şekilde engelleyebilir. Sadece lncRNA'lar değil aynı zamanda protein kodlayan transkriptler, circRNA'lar ve psödogenler de ceRNA fonksiyonu görebilir (83,84). İnsan mRNA'larının yarısından fazlasının MRE'ler içerebileceği tahmin edilmektedir. Tek bir miRNA, kendine spesifik olan MRE bölgesini içeren birden fazla transkripti düzenleyebilmektedir (85). Kodlayan genlerin %60'tan fazlasının miRNA'ların

potansiyel hedefleri olduğu ve kanser dahil birçok hastalıkta miRNA–mRNA etkileşiminin rolü olduğu düşünülmektedir (86).

CeRNA modeline göre iki transkript aynı MRE'yi barındırdığında, paylaşılan miRNA'ya rekabetçi bir şekilde bağlanabilirler. Bir transkriptin yukarı regülasyonu, paylaşılan miRNA'nın daha fazla kopyasının sekestre edilmesine ve dolayısıyla diğer transkriptin de-represyonuna neden olur. Özetle bir lncRNA, hedef mRNA ile paylaşılan miRNA'yı sekestre edebilir ve normalde miRNA tarafından baskılanan mRNA'nın ifadesi artabilir. CeRNA aktivitesinin belirleyicileri hakkındaki çalışmalar netlik kazanmamıştır. Mevcut bilgiler, ceRNA bileşenlerinin miktarı ve hücre altı lokalizasyonu, miRNA/ceRNA afinitesi, RNA düzenlemesi ve RNA bağlayıcı proteinler ile etkileşim mekanizmalarının ceRNA aktivitesini etkilediğini düşündürmektedir (85).

CeRNA modeli sadece karsinogenezde yer alan karmaşık bir düzenleyici ağı ifade etmez aynı zamanda kanser teşhisi için molekül ağları panelinin kullanılabilmesini mümkün kılar. Ek olarak, birden fazla miRNA bağlanma bölgesi içeren ceRNA'ların fonksiyonlarını taklit eden yapay miRNA süngerleri, RNA bazlı terapötik uygulamalarda yerini almaktadır (87).

2.4.5. HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* Yolağı

2.4.5.1. HOTAIR

HOTAIR, HOXC kümesinin düzenleyici sınırında, kromozom 12q13.13'te lokalize olup 6 ekzondan oluşur. Dört farklı kromozomal lokustan kodlanan HOX protein ailesi, embriyo gelişiminde, organ ve doku oluşumunda yer almaktadır. Bununla birlikte anormal ifadeleri tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (13)

HOTAIR, onkojenik fonksiyon gösteren bir lncRNA'dır. HOTAIR'in kanserli hücrelerdeki yüksek ifadesi ilk olarak meme kanserinde keşfedilmiş olup kötü sağ kalım ve metastaz ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (88). HOTAIR, DNA metilasyonunu, histon modifikasyonunu ve nükleozom lokalizasyonunu etkilemektedir. Transkripsiyon sonrası işlev görür ve DNA'nın fonksiyonelliğini değiştirebilir (13,88).

PRC2 ve LSD1/CoREST/REST protein kompleksleri kromatin düzenleyici komplekslerdir. HOTAIR bir moleküler köprü gibi iki proteini bağlayarak onları farklı

histon modifikasyon bölgelerine (H3K27 ve H3K4) yönlendirebilir. Bu durum H3K27 trimetilasyonuna ve H3K4 demetilasyonuna sebep olarak HOXD lokusunun ve farklı lokalizasyondaki genlerin epigenetik olarak susturulmasını sağlar. HOTAIR hem miRNA ifadelerini epigenetik olarak düzenleyebilir hem de ceRNA işlevi görerek hedef miRNA'ları bağlayıp sekestre edebilir (13).

HOTAIR kanser hücrelerinin büyümesini, migrasyonunu ve epitelyal-mezenkimal transformasyonu indüklerken apopitozisi inhibe etmektedir. Bu etkilerini karsinogenezde yer alan çeşitli sinyal yolaklarını düzenleyerek göstermektedir. Tümör gelişiminde yer alan WNT/β-katenin yolunu WNT İnhibitör Faktör 1'i baskılayarak aktive eder. Aynı zamanda bir tümör supresör gen olan *PTEN*'i baskılayarak Akt yolağının aktivasyonuna ve p53 baskılanmasına neden olur. Birçok kanserde HOTAIR ifade değişikliği rapor edilmiştir (13,16).

HOTAIR, meme kanserinde kritik bir rolü olan BRCA1 proteini ile rekabet ederek c-myc'nin karsinogenik etkisine katkıda bulunmaktadır (89). Literatürdeki çalışmalarda, primer meme karsinomlarında HOTAIR ifade artışının kötü sağ kalım ve metastazla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, HOTAIR yukarı regülasyonunun (up regulation) ER-negatif meme kanseri tanılı hastalarda, lenf nodu metastazlarında prognostik biyobelirteç olabileceği öne sürülmektedir. HOTAIR'in otofaji ve ilaç direnci gibi meme kanseri gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili kritik moleküler yolaklarda (90), immun regülasyon ve inflamasyon gelişiminde yer aldığı bildirilmiştir (91).

Güncel çalışmalar HOTAIR'in kanser tedavisinde yeni bir hedef olarak kullanılabileceğini göstermiştir (13,14,17). Tamoksifen direnci olan meme kanserinde ifade seviyelerinin yüksek olması ER sinyal yolağında yer almasıyla ilişkilendirilmiştir (92). HOTAIR, kanser evrelemesini belirlememize ve hasta sonuçlarını tahmin etmemize yardımcı olabileceğinden çeşitli tümörlerin tanı ve tedavisi için yeni bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (93). HOTAIR tabanlı tanı kitleri, kanser hastalarının serumundaki HOTAIR ifade seviyelerinin tespiti sayesinde prognoz ve erken tanı için kullanılabilir (13).

2.4.5.2. MiR-20a-5p

MiR-20a-5p, karsinogenezde yer alan miR-17-92 kümesinin bir üyesidir. MiR-20a-5p'nin ifadesindaki düzensizlikler, kolorektal kanser, serviks kanseri, over kanseri

ve hepatoselüler karsinom gibi birçok kanserde rapor edilmiştir. 2012 yılında yapılan bir çalışmada endometriyum kanserli dokuda normal endometriyum dokusuna kıyasla miR-20a-5p'nin önemli ölçüde ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (94,95).

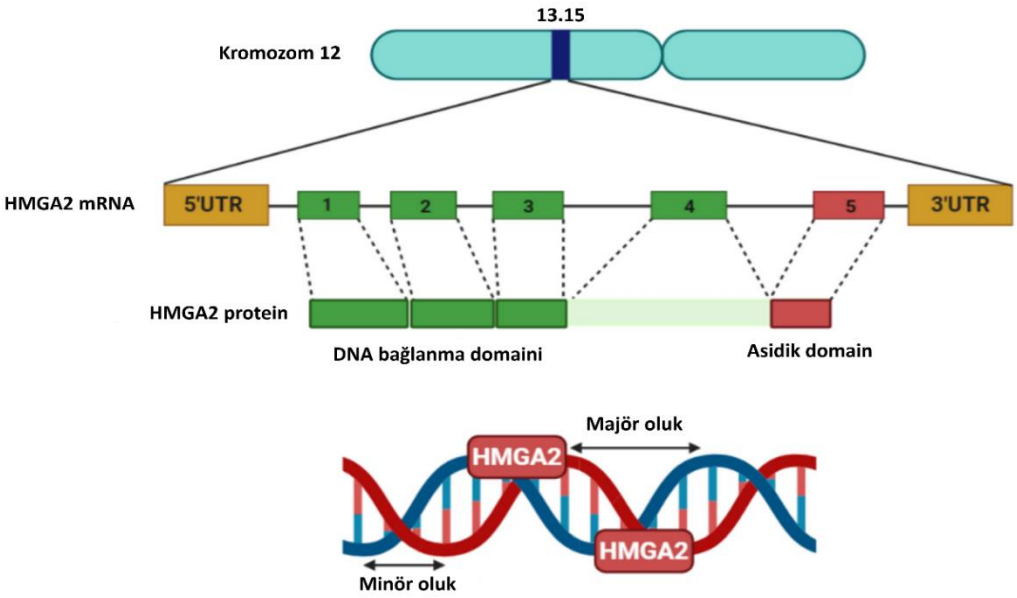
2.4.5.3. *HMGA2*

Yüksek mobilite grup (HMG) proteinleri, DNA'nın replikasyon, rekombinasyon transkripsiyon ve onarım süreçlerinde yer alan histon bağımsız düzenleyicilerdir. Bu ailenin üyeleri DNA'nın minör oluğuna bağlandıktan sonra bu bölgeyi yapısal değişikliğe uğratarak fonksiyonel düzenlemeye katkıda bulunur. HMG ailesi HMGA, HMGB ve HMGN olmak üzere 3 gruba ayrılır. HMGA proteinleri, DNA'nın minör oluğunda bulunan AT açısından zengin bölgelere bağlanarak kromatin yapısını değiştirir ve birçok transkripsiyon faktörünü organize eder (96).

HMGA2 geni 12. kromozomda lokalize olup 5 ekzona sahip bir gendir (Şekil 6). Erken gelişim dönemlerinde ve embriyogenez sırasında farklılaşmamış hücrelerden yaygın olarak ifade edilir ve ilerleyen yaşla birlikte ifadesi kısıtlanır. Bununla birlikte erişkin dönemde oluşan malignitelerde ifadesinin yeniden arttığı gözlemlenmiştir (97).

HMGA2 proteini, çeşitli mekanizmalarla kanser proliferasyonunu indüklemektedir. Siklin D1, siklin E ve siklin A'yı aktive eder ve pRB'nin fosforilasyonunu destekler. Bu değişiklik, E2F1 proteinini serbest bırakılmasıyla ve S fazına girişi sağlayan hedef genlerin transkripsiyonundaki artışla sonuçlanır. *HMGA2,* kanserli hücrelerde apoptozu engelleyerek tümör gelişimine katkıda bulunur. *HMGA2*'de artmış ifadeye sahip tümörler, düşük ifadeye sahip tümörlere kıyasla yüksek proliferasyon ve düşük apopitoz oranları gösterir. Kaspaz 2,3,9 gibi proapopitotik proteinleri baskılarken Bcl-2 gibi antiapopitotik proteinleri destekler. Bunlara ek olarak DNA onarım mekanizmalarında ve kanser kök hücre oluşumunda yer aldığı bildirilmiştir (18,97).

HMGA2 proteini, epiteltal mezenkimal transformasyon, invazyon ve metastazı MAPK/ERK, TGFβ/Smad, PI3/Akt/mTOR ve NFκB gibi iyi bilinen sinyal yolaklarını etkileyerek gerçekleştirmektedir. Ayrıca, anjiyogenezde ve kanser hücrelerindeki ilaç direnci mekanizmalarında da yer almaktadır (18).



Şekil 6: *HMGA2* geni lokalizasyonu, mRNA ve protein yapısı (Mansoori ve ark. 2021'den uyarlandı (18)).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı mikroRNA'ların yukarı akış (upstream) sinyallerine odaklanarak HOTAIR/mikroRNA ağının kanserle ilişkili olabileceğini belirttiler ve bu durumun lncRNA-miRNA ağının umut verici bir anti kanser ilaç hedefi olabileceğini öne sürdüler (19,98,99).

Bu tez çalışmasında, HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının meme kanseri hastalarında klinikopatolojik bulgular ile ilişkisinin araştırılması ve klinik öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma grubuna, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa (İUC), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF), Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniklerine 2022 yılında başvuran meme kanseri tanısı konulmuş 40 kadın hasta, kontrol grubuna ise 10 sağlıklı kadın gönüllü dahil edilmiştir. Çalışma, İUC-CTF, Genetik Hastalıklar Tanı ve Değerlendirme Merkezi (GETAM) laboratuvarlarında, İUC-CTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12.04.2022 tarihli etik kurul onamı alınarak Helsinki Bildirgesine uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. Çalışma ve Kontrol Grubu Özellikleri

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubuna dahil edilen hastaların demografik verileri, risk faktörleri, öz geçmiş ve soygeçmiş bilgileri hastaların anamnezleri alınarak elde edilmiştir. Hastaların mamografi, meme MRI, meme USG ve patoloji raporu sonuçları retrospektif olarak hasta dosyalarından taranmıştır.

A. Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri;
    - Kadın olan,
    - Histolojik olarak meme kanseri tanısı alan,
    - Meme tümörü eksizyonu yapılmayan,
    - Son 3 yıldır kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi ve hedefe yönelik tedavi almayan,
    - Tanı anında vücudunun başka bir bölgesinde primer kanser tanısı olmayan hastalar dahil edilmiştir.

B. Hastaların çalışmadan dışlanma kriterleri;
    - Erkek olan,
    - Histolojik olarak benign veya borderline tümör tanısı alan,
    - Memedeki kitlenin eksizyonu yapılan,
    - Kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi veya immunoterapi alan,

- Son 3 yıldan daha kısa sürede nüks geliştirmiş olan ,
- Tanı anında vücudunun farklı bir bölgesinde primer kanser tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.1.2. Kontrol grubu

Kontrol grubuna dahil edilme kriterleri;

- Kadın olan,
- 25-65 yaş aralığında olan,
- Akut veya kronik bir hastalığı bulunmayan gönüllüler dahil edilmiştir.

3.2. Plazma Eldesi ve Total RNA İzolasyonu

Çalışma ve kontrol grubundaki bireylerden 2'şer cc periferik kan EDTA'lı tüplere alındı ve 2 saat içerisinde çalışılarak plazma elde edildi. Plazma eldesi için, ilk aşamada 3000 rpm'de 10 dk, ikinci aşamada ise 14000 g'de 10 dk santrifüjlendi ve hücre artıkları uzaklaştırıldı. Elde edilen numune çalışma gerçekleştirilene kadar -80°'de alikotlanarak saklandı.

Total RNA izolasyonu yapılmadan önce dondurulmuş olan plazmalar oda ısısında eritildi. Total RNA, miRNeasy Serum/Plazma Advanced Kit (QIAGEN, Almanya) ile kit çalışma prosedürüne göre aşağıda belirtilen aşamalarla izole edildi:

1. 200 µl plazma 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
2. Üzerine 60 µl Buffer RPL eklendikten sonra 10 saniye vortekslendi. 3 dk oda sıcaklığında beklendi.
3. Üzerine 20 µl Buffer RPP eklendikten sonra 25 saniye vortekslendi ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Oda sıcaklığında 12000 g'de 3 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Üzerine 1 volüm isopropanol eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
6. Elde edilen numunenin tamamı spin kolona aktarıldı. 40 saniye 12000 rpm'de santrifüj yapıldı ve altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Toplama tüpleri atıldı ve yeni toplama tüplerine aktarıldı.
7. Üzerine 700 µl Buffer RWT spin kolona eklendikten sonra 40 saniye 12000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve yeni toplama tüplerine aktarıldı.

8. Üzerine 500 µl RPE spin kolona eklendikten sonra 40 saniye 12000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve yeni toplama tüplerine aktarıldı.
9. Spin kolon üzerine %80'lik etanolden 500 µl eklendi ve 12000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı.
10. Spin kolon 2 ml'lik yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kapaklar açık şekilde 5 dk tam hızda santrifüj edilerek kurutuldu. Altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Akan kısım ve toplama tüpleri atıldı.
11. Spin kolon yeni 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. 20 µl RNaz içermeyen su direkt kolon membranının merkezine eklendi ve 5 dk inkübasyondan sonra kapaklar kapalı bir şekilde tam hızda 1 dakika santrifüj edildi.

Total RNA izolasyonu yaklaşık 18 µl elüat ile sonuçlandı. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon, kalite ve saflık tayini spektrofotometre (Nanodrop, Thermofisher) cihazı ile yapıldı. Elde edilen RNA ters transkripsiyon çalışması yapılana kadar -20°C'de saklandı.

3.3. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'dan miRNA ve lncRNA için miRCURY LNA RT Kiti (QIAGEN, Almanya), mRNA için RT2 First Strand Kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak kit protokollerine göre çalışmaya devam edildi.

3.3.1. miRNA ve lncRNA'dan cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi için miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Almanya) protokolüne uygun olarak kullanıldı. Total RNA örnekleri buz üzerinde eritildi. Her bir RNA örneği 25-35 nanogram olmak üzere eşitlendi. Revers transkripsiyon enzim karışımından 1 µl, reaksiyon tamponundan 2 µl kullanılarak nükleaz içermeyen su ile birlikte 10 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım 42°C'de 60 dakika inkubasyon sonrasında 95°C'de 5 dakika ısıtılıp 4°C'ye soğutularak çalışma tamamlandı (Tablo 1). Nükleaz içermeyen sudan 30 µl eklenerek seyreltildi ve Real-Time PCR çalışması yapılana kadar -20°C'de saklandı. MiRNA ve lncRNA ters transkripsiyon işlemi protokolü Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: miRNA ve lncRNA için ters transkripsiyon işlemi protokolü

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
Revers Transkripsiyon	42°C	60 dk
Enzim inaktivasyonu	95°C	5 dk
Bekleme	4°C	Süresiz

3.3.2. mRNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi için RT2 First Strand Kit (QIAGEN, Almanya) protokolüne uygun olarak kullanıldı. İçeriklerin tüp dibinde birikmesi için 10-15 sn nazikçe santrifüj edildi. RNA örnekleri 25-35 µg olacak şekilde eşitlendi. Her bir RNA örneği için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Total RNA üzerine 2 µl Buffer GE eklenerek nükleaz içermeyen su ile reaksiyon karışımı miktarı 10 µl'ye tamamlandı.

Genomik DNA eliminasyon karışımı 42°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlıca buz üzerine alınarak en az 1 dk bekletildi. 4 µl Buffer BC3, 1 µl Kontrol P2, 2 µl RE3 Revers Transkriptaz karışımı ve 3 µl nükleaz içermeyen su ile revers transkripsiyon karışımı hazırlandı. Genomik DNA eliminasyonu içeren her tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı eklendi ve pipetlenerek hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan karışım 42°C'de 15 dakika inkubasyon sonrası 95°C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra çalışma durduruldu (Tablo 3). Reaksiyon karışımı buz üzerinde alındı ve içerisine 20 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Elde edilen cDNA örnekleri Real-time PCR çalışması yapılana kadar -20°C sıcaklıkta saklandı. mRNA ters transkripsiyon protokolü Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: mRNA ters transkripsiyon protokolü

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
Revers Transkripsiyon	42°C	15 dk
Enzim inaktivasyonu	95°C	5 dk

3.4. Real-Time PCR Çalışması

3.4.1. miRNA ve lncRNA RT-PCR Çalışması

MiR-20a-5p ve U6-Sno primer tüplerine (miRCURY LNA miRNA PCR Assay, QIAGEN) nükleaz içermeyen su eklenerek reaksiyon için hazırlandı (Tablo 3). HOTAIR primeri reaksiyona hazır halde temin edildi (19). Real-time PCR reaksiyonu için gerekli olan master mix, cDNA örnekleri ve nükleaz içermeyen su buz kalıp üzerinde eritildi. miRCURY LNA SYBR Green Master Mix (QIAGEN, Almanya), dilue cDNA örnekleri ve primerler KİT protokolünde belirtilen miktarlara uygun olarak reaksiyona hazırlandı (Tablo 4). Kullanılan primerler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: MiRNA ve lncRNA primer dizileri Zhao ve ark. 2018'den uyarlanmıştır (19).

HOTAIR	**ileri** **geri**	CAGTGGGGAACTCTGACTCG GTGCCTGGTGCTCTCTTACC
miR-20a-5p	**ileri** **geri**	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG CUACCUGCACUAUAAGCACUUUA
Kontrol (U6)	**ileri** **geri**	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC

Tablo 4: Real-time PCR çalışması için uygun reaksiyon karışımı

Karışım bileşeni	**Miktar**
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
PCR primer mix	0,4 µl
Şablon cDNA	4 µl
RNaz içermeyen su	0,6 µl
Toplam	**10 µl**

0,1 ml hacimli strip tüplerdeki reaksiyon karışımı Rotor Gene® (QIAGEN, Almanya) real-time PCR cihazına yüklendi. Cihaz kit protokolüne uygun olarak Tablo 5'te yer alan basamaklara göre ayarlanıp çalışma başlatıldı. HOTAIR ve miR-20a-5p geninin ifade verilerinin rölatif kantifikasyonunda U6-sno geni ifadesi normalizasyon için kullanıldı.

Tablo 5: Real-time PCR reaksiyon basamakları

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
PCR aktivasyonu	95°C	2 dk
Denaturasyon	95°C	10 sn
Kombine bağlanma ve uzama	56°C	60 sn
Siklus sayısı	40	

RT-PCR çalışması sonrasında erime eğrisi analizleri yapıldı. Her bir örneğin reaksiyon eğrisi ve Ct değeri kontrol edilerek uygun kalitede olanlar istatiksel yöntemlerle analiz edildi.

3.4.2. mRNA RT-PCR Çalışması

Real-time PCR çalışması için RT^2 Sybr Green Mastermix Kiti (QIAGEN, Almanya) kit protokolüne uygun olarak kullanıldı. HMGA2 ve ACTB primerleri reaksiyona hazır halde temin edildi (1).Kullanılan primerler Tablo 6'da verilmiştir. RT^2 Sybr Green Mastermix Kiti ve primer tüpleri, içerikleri tüpün dibine toplamak amacıyla nazikçe santrifüj edildi. 12,5 µl RT^2 Sybr Green Mastermix, 6 µl dilue edilmiş şablon cDNA, 1 µl primer ve 5,5 µl nükleaz içermeyen su ile real-time PCR reaksiyonu hazırlandı (Tablo 7). 0,1 ml hacimli strip tüplerdeki PCR karışımı Rotor Gene® (QIAGEN, Almanya) PCR cihazına 72'lik platformda yerleştirildi. Tablo 8'de yer alan sıcaklık protokolüne uygun olarak çalışma yapıldı. *HMGA2* geni ifade verilerinin rölatif kantifikasyonu için ACTB (β-actinin) geni housekeeping gen olarak kullanıldı.

Tablo 6: Kullanılan mRNA primer dizileri Zhao ve ark. 2018'den uyarlanmıştır (19).

HMGA2	**ileri** **geri**	GGGCGCCGACATTCAAT ACTGCAGTGTCTTCTCCCTTCAA
ACTB (Kontrol)	**ileri** **geri**	CATGTACGTTGCTATCCAGGC CTCCTTAATGTCACGCACGAT

Tablo 7: mRNA için real-time PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Karışım bileşeni	**Miktar**
RT^2 Sybr Green Mastermix	12.5 µl
Şablon cDNA	6 µl
PCR primer mix	1 µl
RNaz içermeyen su	5.5 µl
Toplam miktar	**25 µl**

Tablo 8: mRNA RT-PCR çalışması protokolü

Basamaklar	**Sıcaklık**	**Süre**
PCR aktivasyonu	95°C	10 dk
Denatürasyon	95°C	15 sn
Kombine bağlanma ve uzama	60°C	30 sn
Siklus sayısı	40	

3.5. İstatiksel Analiz

Çalışma grubunun demografik ve klinik verileri IBM SPSS Statistics 26.0 programı kullanılarak analiz edildi. RNA ifade değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak belirlendi.

Çalışma ve kontrol grubu arasındaki ifade değişikliklerini analiz etmek için non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi kullanıldı. Hastalar östrojen ve progesteron reseptörü pozitifliği, HER2 pozitifliği, triple negatif, grade ve lenf nodu metastazı durumuna göre gruplandırıldı. Gruplar arası analizler için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatiksel olarak $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

MiRNA, lncRNA ve mRNA ifadelerinin korelasyon analizi için Spearman Rho korelasyon katsayısı kullanıldı. İstatiksel olarak $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma ve Kontrol Grubu Bulguları

Çalışmaya meme kanseri tanısı ile izlenen 40 hasta dahil edildi. Çalışma grubunun yaş aralığı 27-78 arasında olup ortalama yaş 50,6 (±11,073)'ydı. Bunlardan 37'si (%92,5) yeni tanı almış, herhangi bir tedavi almamış ve kitle eksizyonuyla ilgili operasyon geçirmemişti; 3'ü (%7,5) ise tedavisiz uzun dönem sonrası nüks geliştirmiş hastalardı.

Hastaların soy geçmişi incelendiğinde 32'sinin (%80) birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarında kanser öyküsü olduğu tespit edildi. Bunlardan birinci derece akrabalarında meme kanseri olanlar 5 (%12,5) kişiydi. Hastaların 8'inde (%20) ise soy geçmişinde herhangi bir kanser öyküsü mevcut değildi. Pariteleri değerlendirildiğinde ise hastaların 6'sının (%15) hiç doğum yapmamış (nullipar), 7'sinin (%17,5) bir kez doğum yapmış (primipar), 27'sinin (%67,5) birden fazla doğum yapmış (multipar) olduğu öğrenildi.

Çalışma grubunun 29'u (%72,5) invaziv duktal karsinom, 4'ü (%10) in situ kanser, 3'ü (%7,5) invaziv lobuler kanser ve 4'ü (%10) diğer nadir tiplerdi. Kanser lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde 30'u (%75) sol memede, 8'i (%20) sağ memede ve 2'si (%5) bilateraldi.

İmmunofenotiplendirme açısından ER, PR, HER2 ve Kİ-67 indeksleri değerlendirildiğinde, invaziv kanserlerin 26'sı (%72,2) ER pozitif, 24'ü (%66,6) PR pozitif, 4'ü (%11,1) triple negatif ve 6'sı (%16,6) HER2-Aİ alt tipiydi. Ayrıca invaziv kanserlerin 2'si (%5,8) grade 1, 21'i (%61,7) grade 2 ve 11'i (%32,3) grade 3 olarak tespit edildi. Ki-67 indeksleri değerlendirildiğinde 14'ünde (%40) %15 altı, 21'inde (%60) %15 üzerindeydi.

Hastalara AJCC evreleme sistemine göre TNM evrelemesi yapıldı. 40 hastanın 4'ü (%10) evre 0, 9'u (%22,5) evre 1, 17'si evre 2 ve 6'sı (%15) evre 3'tü. Uzak metastazı bulunan 4 (%10) hasta ise evre 4 'tü. Hastaların 17'sinde (%42,5) lenf nodu metastazı yokken 23'ünde (%57,5) metastaz vardı.

Risk faktörlerinden menarş durumuna bakıldığında; bütün hastaların menarş başlangıcı 11-14 yaş aralığında, 19'u (%47,5) premenapozal, 21'i (%52,5) postmenapozal durumdaydı.

Çalışma grubunun 13'ünde sigara kullanımı mevcuttu. Hormon maruziyeti değerlendirildiğinde ise 24'ünün (%60) herhangi bir oral kontraseptif (OKS) veya hormon replasman tedavisi (HRT) almadığı ancak 12'sinin (%30) hayatlarının bir döneminde oral kontraseptif kullandığı saptandı. 3'ü (%7,5) hormon replasman tedavisi, 1'i (%2,5) ise hem OKS hem HRT kullandığını ifade etti. Çalışmaya dahil edilen hastaların verileri Tablo 9'da yer almaktadır.

Kontrol grubunun yaş ortalaması 37 olup 28-62 aralığındaydı. Bunlardan 5'inin (%50) hiç doğum yapmamış (nullipar), 4'ünün (%40) bir kez doğum yapmış (primipar), 1'inin (%10) birden fazla doğum yapmış (multipar) olduğu öğrenildi. 8 birey (%80) premenapozal, 2 birey (%29) ise postmenapozal dönemde olduğunu ifade etti. Kontrol grubunda 1 bireyin (%10) sigara kullanımı mevcuttu. 4'ü (%40) hayatlarının bir döneminde OKS kullandığını ifade etti.

Tablo 9: Çalışma grubunun demografik, klinik ve patoloji verileri tabloda yer almaktadır.

Protokol No	Yaş	Parite	Menapoz durumu	Hormon kullanımı	Aile öyküsü	Tanı	Lokalizasyon	ER pozitifliği	PR pozitifliği	HER2 pozitifliği	Ki67 pozitifliği	Grade	Lenf nodu metastazı	Nüks	Evre
2022/980	62	Nullipar	Postmenapozal	OKS	Birinci derece akrabada meme kanseri	İn situ kanser	Bilateral	Var	Var	Yok	Yok	3	Yok	Evet	Evre 0
2022/1102	66	Multipar	Postmenapozal	OKS	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Var	2	Yok	Hayır	Evre 2
2022/854	51	Multipar	Premenapozal	OKS	Birinci derecede akrabada diğer kanser	Tubüler karsinom	Sol	Var	Var	Yok	Yok	1	Yok	Hayır	Evre 1
2021/5651	33	Multipar	Premenapozal	Yok	Üçüncü derece akrabada meme kanseri	İnvaziv duktal kanser	Sol	Yok	Yok	Var	Var	3	Var	Hayır	Evre 3
2022/825	42	Primipar	Premenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/823	52	Nullipar	Postmenapozal	HRT	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Bilateral	Var	Var	Yok	Var	1	Var	Hayır	Evre 2
2022/735	57	Multipar	Postmenapozal	Yok	Üçüncü derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Yok	Yok	Yok	Var	3	Var	Hayır	Evre 4
2022/822	60	Primipar	Postmenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv lobuler kanser	Sol	Yok	Yok	Yok	Var	3	Yok	Hayır	Evre 1
2022/824	60	Multipar	Postmenapozal	Yok	Birinci derece akrabada meme kanseri	Müsinöz karsinom	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Yok	Hayır	Evre 1
2022/703	48	Multipar	Postmenapozal	OKS	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Var	Yok	2	Yok	Hayır	Evre 1
2022/619	48	Multipar	Premenapozal	Yok	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Var	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/685	66	Multipar	Postmenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Yok	Var	Var	Var	2	Var	Hayır	Evre 3

2022/4102	61	Multipar	Postmenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Yok	Yok	Var	Var	2	Var	Hayır	Evre 3
2022/1091	29	Primipar	Premenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Var	Var	3	Yok	Hayır	Evre 1
2022/1092	47	Multipar	Premenapozal	OKS	İkinci derece akrabada diğer kanser	İn situ kanser	Sol	Yok	Yok	Var	*	3	Yok	Hayır	Evre 0
2022/1135	54	Multipar	Postmenapozal	OKS	Birinci derece akrabada meme kanseri	İnvaziv duktal kanser	Sol	Yok	Yok	Var	Yok	2	Var	Hayır	Evre 4
2022/1163	64	Multipar	Postmenapozal	Yok	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	*	*	*	*	*	Var	Hayır	Evre 4
2022/1247	78	Multipar	Postmenapozal	HRT	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Yok	Yok	Yok	Var	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/1226	51	Multipar	Premenapozal	OKS ve HRT	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv lobuler kanser	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/1249	46	Multipar	Premenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Yok	Var	Var	2	Var	Hayır	Evre 3
2022/1429	46	Multipar	Premenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Var	Var	*	Var	Hayır	Evre 2
2022/1341	45	Multipar	Premenapozal	Yok	Birinci derece akrabada meme kanseri	Papiller karsinom	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/1387	41	Nullipar	Premenapozal	OKS	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İğsi hücreli metastatik meme kanseri	Sol	Yok	Yok	Yok	Var	*	Yok	Hayır	Evre 3
2022/1420	61	Multipar	Postmenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Var	2	Var	Hayır	Evre 3
2022/1561	27	Nullipar	Premenapozal	OKS	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Yok	Hayır	Evre 1
2022/1588	38	Nullipar	Postmenapozal	HRT	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Var	2	Yok	Hayır	Evre 1
2022/1595	59	Primipar	Postmenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Yok	3	Var	Evet	Evre 2

2022/1596	54	Nullipar	Postmenapozal	Yok	Birinci derece akrabada meme kanseri	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Var	Var	Yok	Var	2	Yok	Hayır	Evre 2
2022/1757	43	Primipar	Premenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Var	Var	2	Var	Hayır	Evre 4
2022/1763	53	Multipar	Premenapozal	OKS	Üçüncü derece akrabada diğer kanser	İnvaziv lobuler kanser	Sağ	Var	Var	Yok	Yok	2	Yok	Hayır	Evre 2
2022/1762	47	Multipar	Premenapozal	Yok	İkinci derece akrabada meme kanseri	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Var	Var	Yok	Var	3	Yok	Hayır	Evre 1
2022/1838	57	Multipar	Postmenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Var	3	Var	Evet	Evre 2
2022/1880	54	Primipar	Postmenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Var	Yok	Var	Var	*	Var	Hayır	Evre 2
2022/2028	61	Multipar	Postmenapozal	OKS	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Yok	Var	Var	3	Var	Hayır	Evre 2
2022/2029	46	Multipar	Premenapozal	Yok	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sağ	*	*	*	*	*	Var	Hayır	Evre 2
2022/3115	48	Multipar	Premenapozal	OKS	İkinci derece akrabada meme kanseri	İn situ kanser	Sol	*	*	*	*	*	Yok	Hayır	Evre 0
2022/2030	37	Primipar	Premenapozal	OKS	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sol	*	*	*	*	2	Yok	Hayır	Evre 1
2022/3852	51	Multipar	Postmenapozal	Yok	Yok	İnvaziv duktal kanser	Sol	Var	Var	Yok	Yok	2	Var	Hayır	Evre 2
2022/3116	39	Multipar	Premenapozal	Yok	İkinci derece akrabada diğer kanser	İn situ kanser	Sol	Yok	Yok	Var	Yok	3	Yok	Hayır	Evre 0
2022/2858	52	Multipar	Postmenapozal	Yok	Birinci derecede akrabada diğer kanser	İnvaziv duktal kanser	Sağ	Var	Var	Yok	Yok	2	Var	Hayır	Evre 2

*Verisine ulaşılamayan parametre

[+]Diğer kanser: Kolon, endometriyum, akciğer, over, prostat, mide kanseri vb.

4.2. RNA İfade Düzeyleri

Housekeeping gen olarak HOTAIR ve miR-20a-5p genlerinde U6-Sno geni, *HMGA2* geninde ise β-Aktin kullanıldı. HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2*'nin RNA ifadeleri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak karşılaştırıldı (Tablo 10).

Tablo 10: Çalışma ve kontrol grubunun Real-Time PCR çalışmasıyla elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Protokol No	**HOTAIR Ct**	**Mir-20a-5p Ct**	**U6(kontrol) Ct**	**HOTAIR $2^{-\Delta\Delta Ct}$**	**Mir-20a-5p $2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***HMGA2* Ct**	**β-Aktin (Kontrol) Ct**	***HMGA2* $2^{-\Delta\Delta Ct}$**
Çalışma Grubu								
2022/980	30,12	22,86	33,86	9,41	0,34	30,65	29,35	1601,27
2022/1102	26,86	16,5	23,67	0,08	0,02	30,9	23,94	31,67
2022/854	28,97	25,22	29,77	1,23	0,01	32,64	23,9	9,22
2021/5651	29,87	18,43	33,05	6,38	4,23	36,49	32,5	248,14
2022/825	27,71	19,61	14,93	3,44	0,01	38,47	25,31	0,43
2022/823	24,84	17,06	25,59	1,18	0,06	32,97	17,77	0,10
2022/735	25,58	19,5	30,4	19,89	0,32	33,71	25,49	13,22
2022/822	26,67	18,93	24,22	0,13	0,01	32,17	26,55	80,17
2022/824	31,63	22,74	33,4	2,40	0,27	33,43	28,88	168,31
2022/703	26,87	20,86	28,05	1,60	0,02	32,67	24	9,68
2022/619	28,76	15,35	31,04	3,42	8,87	29,78	14,12	0,08
2022/685	28,46	20,5	31,6	6,21	0,37	31,59	25,44	55,52
2022/4102	28,72	*	32,97	13,40	*	35,7	25,78	4,07
2022/1091	27,01	19,02	28,98	2,76	0,17	35,23	20,52	0,15
2022/1092	27,8	17,17	30,7	5,26	1,98	36,81	21,8	0,12
2022/1135	26,65	26,36	30,93	13,68	0,01	30,99	19,5	1,37
2022/1163	32,73	22,11	33,7	1,38	0,52	32,91	21,58	1,53
2022/1247	29,94	22,89	33,63	9,09	0,29	33,12	27,33	71,26
2022/1226	29,91	16,96	31,36	1,92	3,63	36,17	18,48	0,02
2022/1249	29,12	16,77	28,62	0,50	0,62	32,02	20,64	1,48
2022/1429	29,58	19,53	29,19	0,54	0,14	35,64	24,14	1,36
2022/1341	28,55	18,65	31,29	4,70	1,07	30,42	17,79	0,62
2022/1387	27,81	15,66	30,77	5,48	5,93	31,63	20,16	1,39
2022/1420	28,96	20,76	32,05	6,00	0,42	32,65	20,78	1,05
2022/1561	34,58	21,8	37,26	4,51	7,56	35,99	25,8	3,38
2022/1588	27,85	17,62	29,34	1,98	0,57	34,85	26,52	12,25
2022/1595	27,29	15,91	30,1	4,94	3,14	31,26	23,05	13,32
2022/1596	26,97	18,48	29,64	4,48	0,38	33,89	22,97	2,03
2022/1757	29,75	20,34	31,97	3,28	0,53	31,47	22,95	10,74
2022/1763	28,26	17,75	31,37	6,08	2,11	31,89	18,72	0,43
2022/1762	32,03	17,46	33,05	1,43	8,28	31,03	13,71	0,02
2022/1838	28,12	14,82	29,01	1,30	3,14	33,74	25,58	13,78
2022/1880	33,47	22,73	35,61	3,10	1,26	37,11	23,5	0,32
2022/2028	29,41	19,37	30,36	1,36	0,34	31,36	21,06	3,13

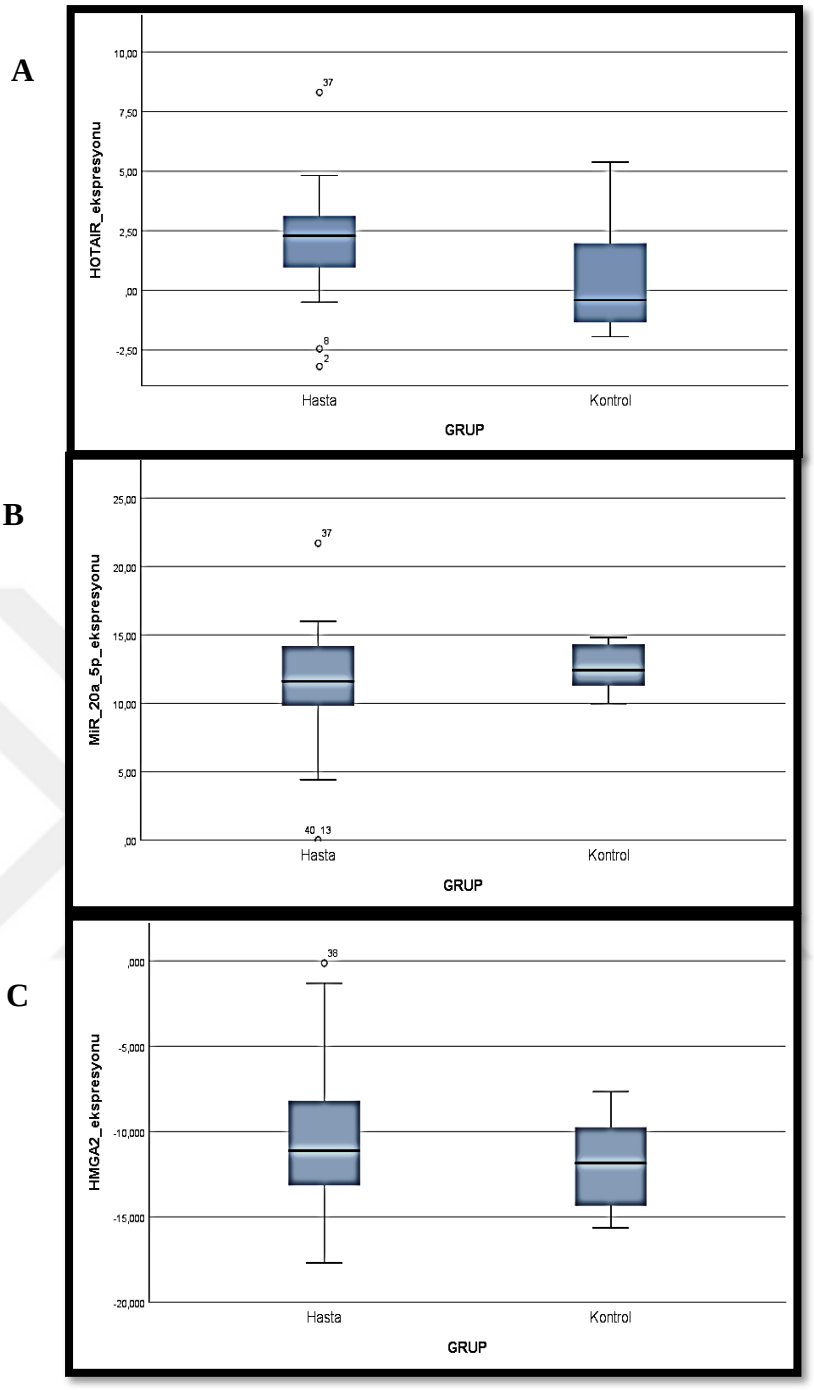
2022/2029	27,75	16,91	31,12	7,28	3,18	31,81	18,38	0,36
2022/3115	30,81	17,51	33,5	4,54	10,92	32,9	21,06	1,08
2022/2030	30,93	17,54	39,24	223,48	571,65	32,48	19,37	0,45
2022/3852	29,92	21,9	33,85	10,73	0,66	24,1	23,97	3603,04
2022/3116	28,09	14,23	28,98	1,30	4,62	31,11	17,56	0,33
2022/2858	*	27,79	*	*	*	34,27	27,66	40,36
Kontrol Grubu								
K1	28,52	11,77	26,58	0,18	4,82	31,76	24,09	19,36
K2	32,82	21,37	38,11	0,86	0,57	32,41	20,42	0,97
K3	29,19	16,56	31,17	2,78	4,20	32,33	22,12	3,33
K4	29,62	17,44	28,76	0,39	0,43	30,38	18,66	1,17
K5	29,68	16,06	29,54	0,64	1,92	31,37	17,02	0,19
K6	30,37	18,29	29,03	0,28	0,29	32,08	22,34	4,61
K7	29,07	20,13	34,45	29,32	3,43	33,44	18,58	0,13
K8	30,67	20,02	30	0,44	0,17	31,45	17,21	0,20
K9	32,63	19,97	31,25	0,27	0,42	33,18	17,54	0,08
K10	29,8	20,41	33,54	9,41	1,50	31,73	22,7	7,54

* Çalışma verisi elde edilemeyen parametreler

4.2.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının HOTAIR Yolağı İfadeleri

Housekeeping gen olarak HOTAIR ve miR-20a-5p genlerinde U6-Sno geni, *HMGA2* geninde ise beta-aktin kullanıldı. Çalışma ve kontrol grupları, HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* ifadeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak karşılaştırıldığında çalışma grubunda kontrol grubuna göre HOTAIR ifadesi anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,025)(Şekil 7a)(Tablo 11).

Çalışma ve kontrol grubu birlikte değerlendirildiğinde; çalışma grubunda miR-20a-5p'nin ifadesi daha düşüktü. *HMGA2*'ninse daha yüksekti. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla p=0,591, p=0,224)(Şekil 7b, Şekil 7c)(Tablo 11).

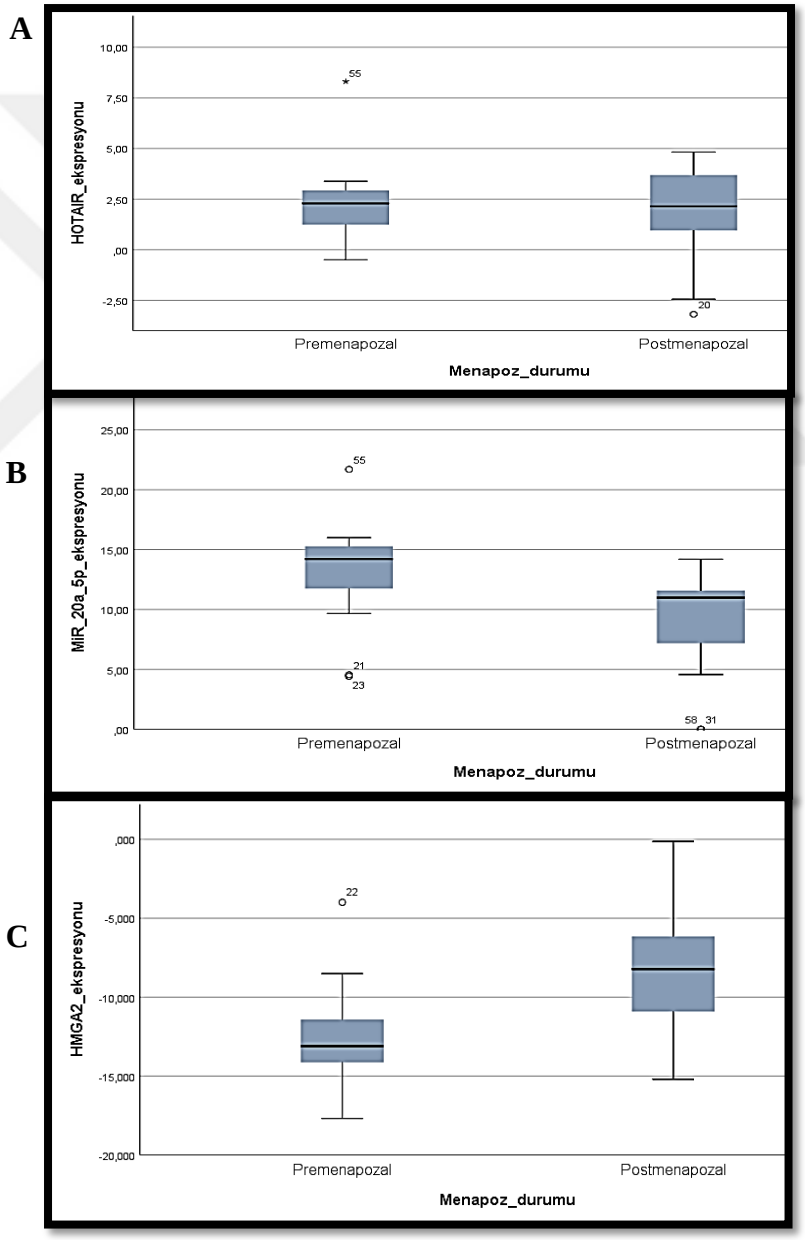


Şekil 7: Çalışma ve kontrol gruplarında HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması.

4.2.2. Çalışma Grubunun Klinikopatolojik Parametrelerine Göre HOTAIR Yolağı İfadelerinin Karşılaştırılması

4.2.2.1. Premenapozal/Postmenapozal

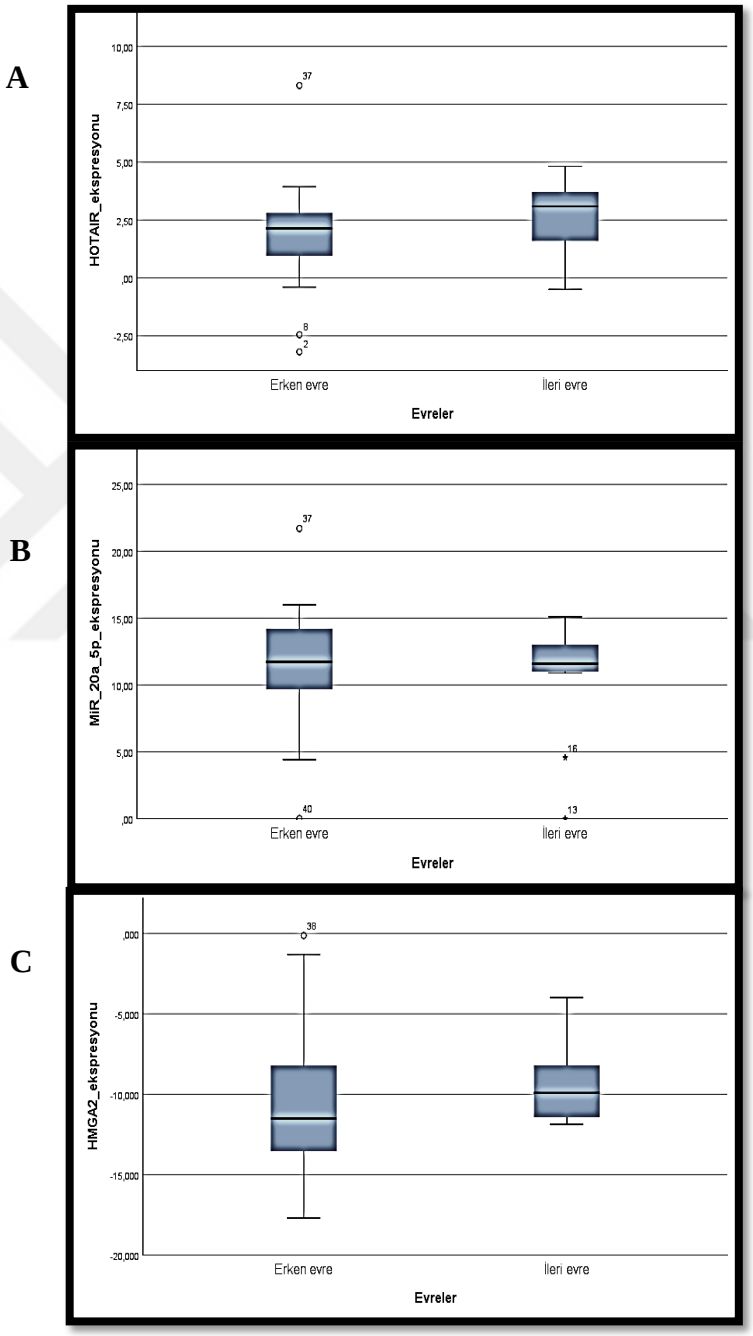
Premenapozal ve postmenapozal bireyler değerlendirildiğinde *HMGA2* ifadesinin postmenapozal grupta premenapozal gruba göre, miR-20a-5p ifadesininse premenapozal grupta post menapozal gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (sırasıyla p=0,002, p=0,002)(Tablo 11). HOTAIR ifadelerinde ise anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı.



Şekil 8: Premenapozal ve postmenapozal kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.2. Erken evre/İleri evre

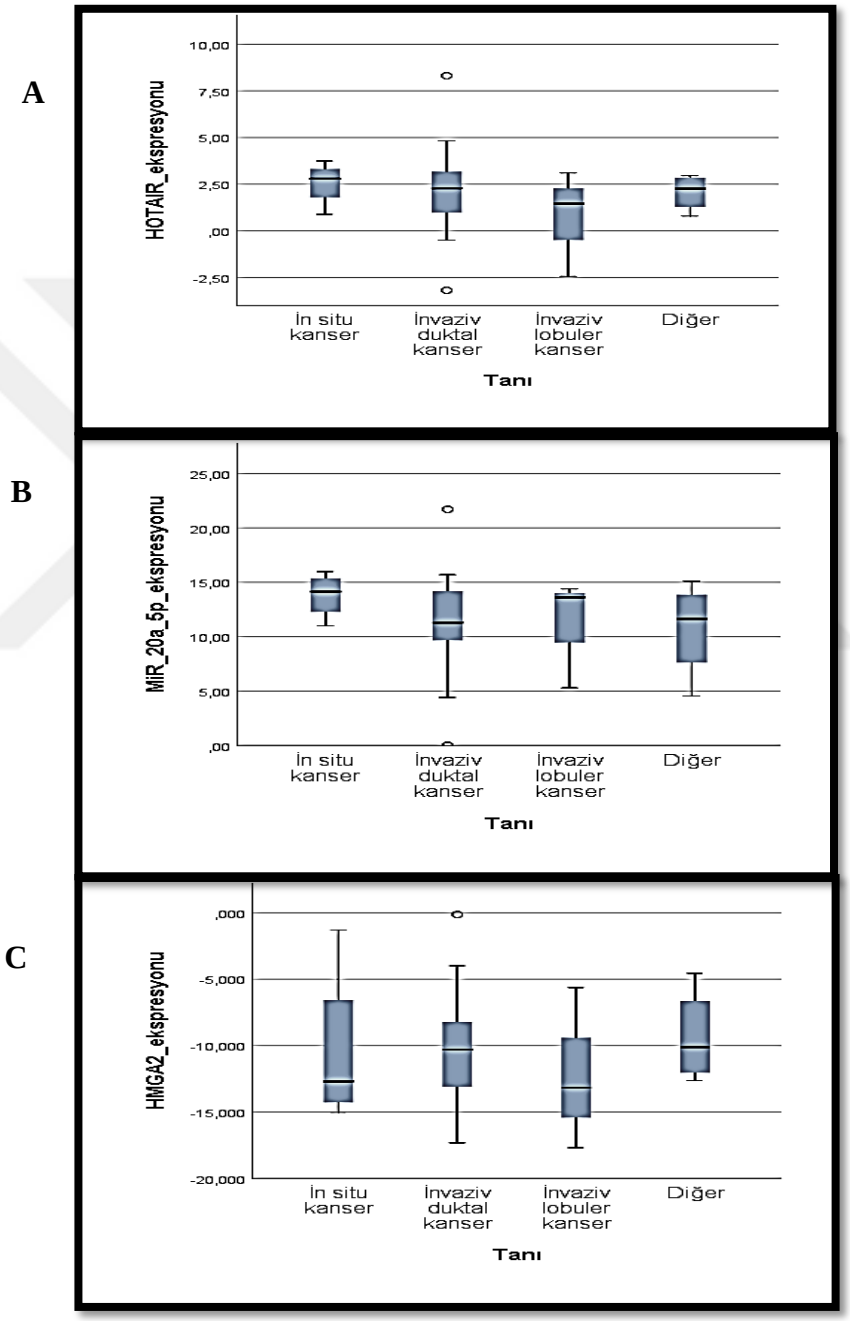
Erken evre (Evre 0,1,2) ve ileri evre (Evre 3-4) meme kanserli kadınlarda HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* RNA ifadeleri değerlendirildiğinde istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 11)(Şekil 9). Ancak HOTAIR ifadesi ileri evre meme kanseri hastalarında daha yüksekti.



Şekil 9: Erken evre ve ileri evre meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B) ve *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.3. İDK/Diğerleri

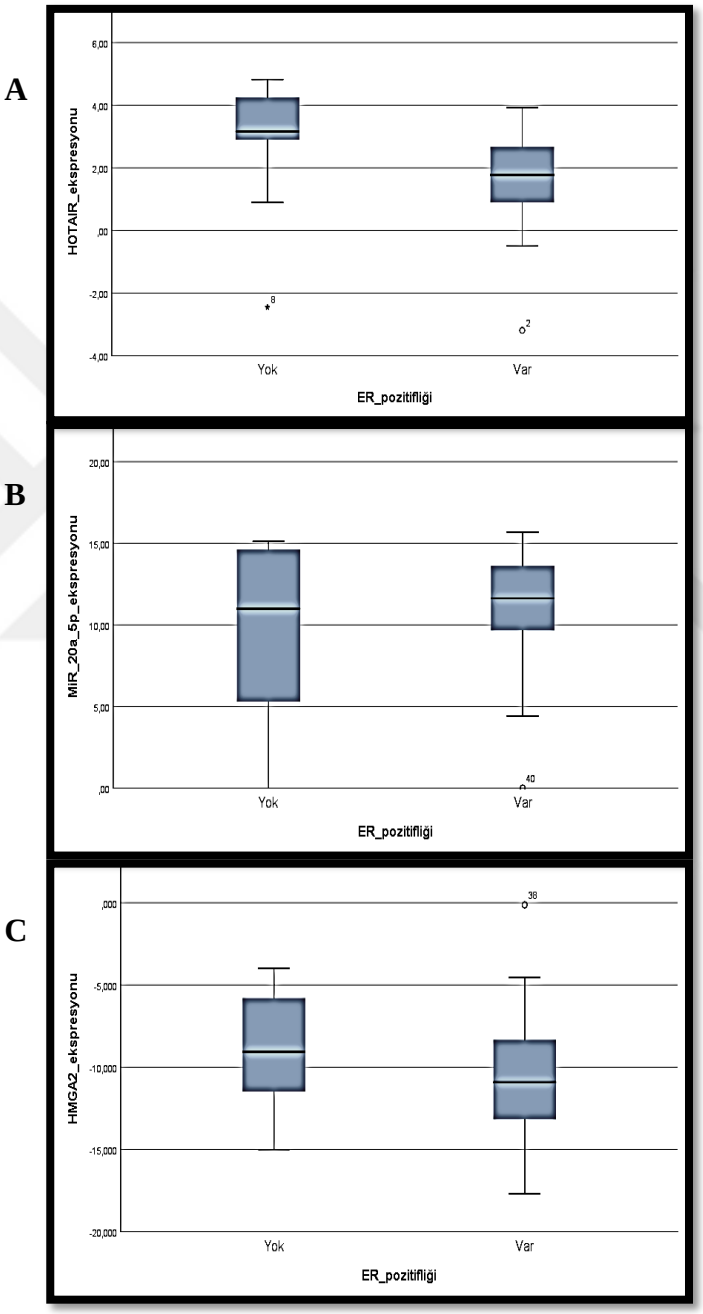
Çalışma grubundaki kadınların tanılarına göre RNA ifadeleri değerlendirildiğinde HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* seviyelerinde istatiksel anlamlılık saptanmadı (Şekil 10)(Tablo 11). İDK ve diğer gruplar değerlendirildiğinde ise HOTAIR ifadelerinin, İDK'de daha yüksek olduğu görüldü.



Şekil 10: Meme kanseri hastalarında histopatolojik tanılara göre HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.4. ER Pozitif/ER Negatif

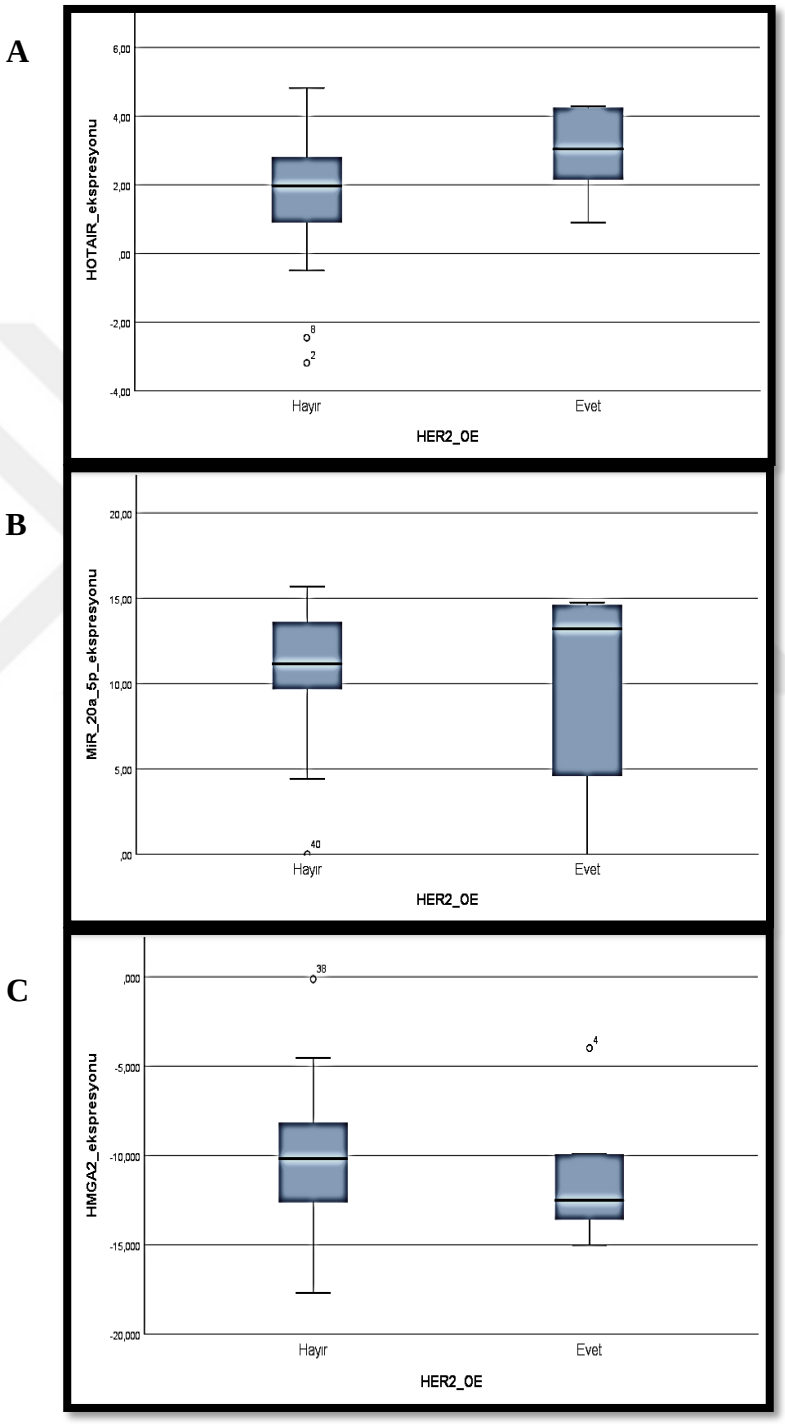
ER negatif meme kanseri olan hastalarda, ER pozitif olanlara göre HOTAIR ifadesi anlamlı olarak yüksek bulunurken (*p*=0,006)(Şekil 12A)(Tablo 11), miR-20a-5p ve *HMGA2* ifadeleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 11B,C). Ancak *HMGA2* ifadesi ER-'lerde daha yüksekti (Şekil 11C).



Şekil 11: ER+ ve ER- meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.5. HER2-Aİ/Diğerleri

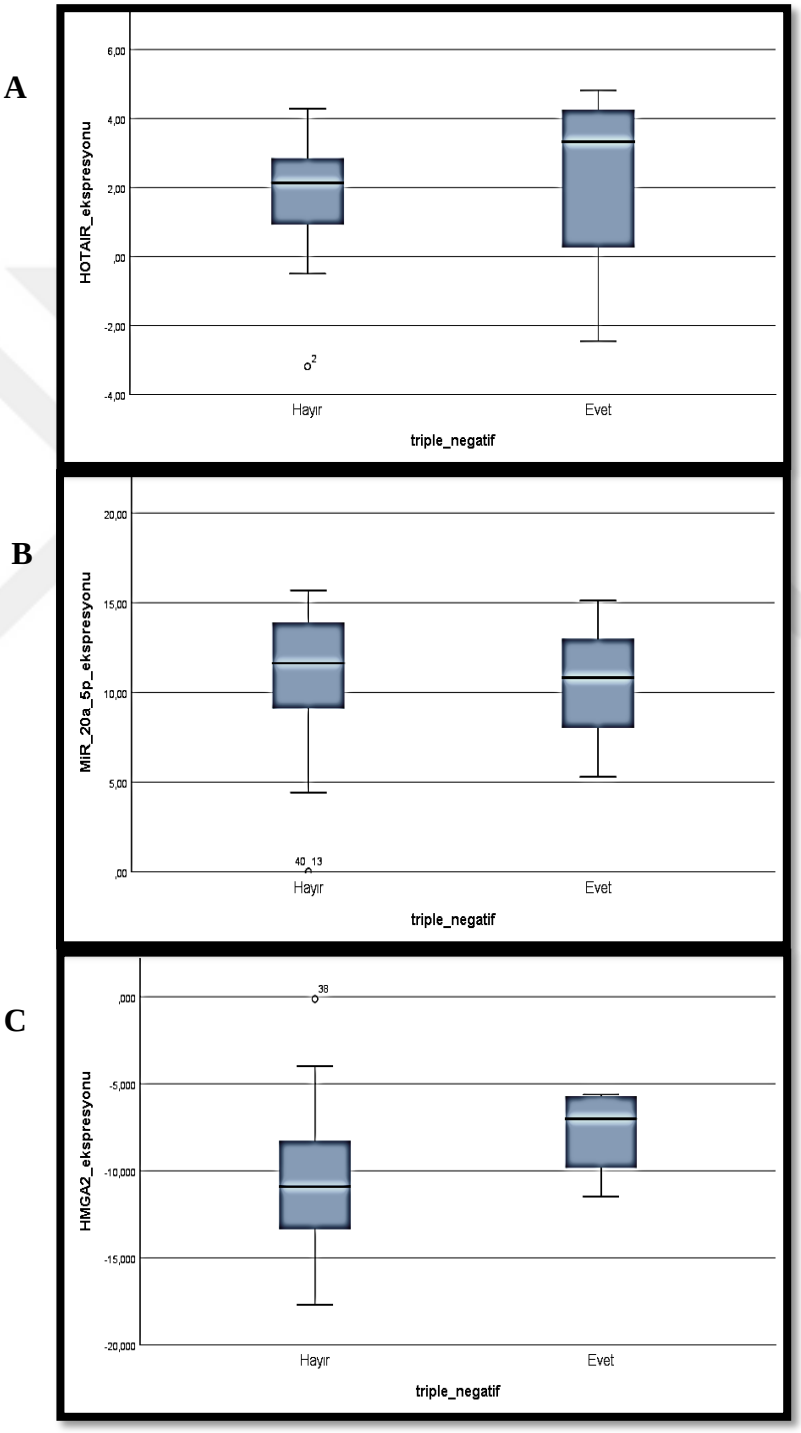
Çalışma grubunda HER2-Aİ ve diğerleri kıyaslandığında her 3 RNA için de ifade düzeyleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo 11). Ancak HOTAIR ifadesi HER2-Aİ alt tipi olan hastalarda daha yüksekti (Şekil 12A).



Şekil 12: HER-Aİ alt tipi ve diğer alt tip meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.6. Triple Negatif/Diğerleri

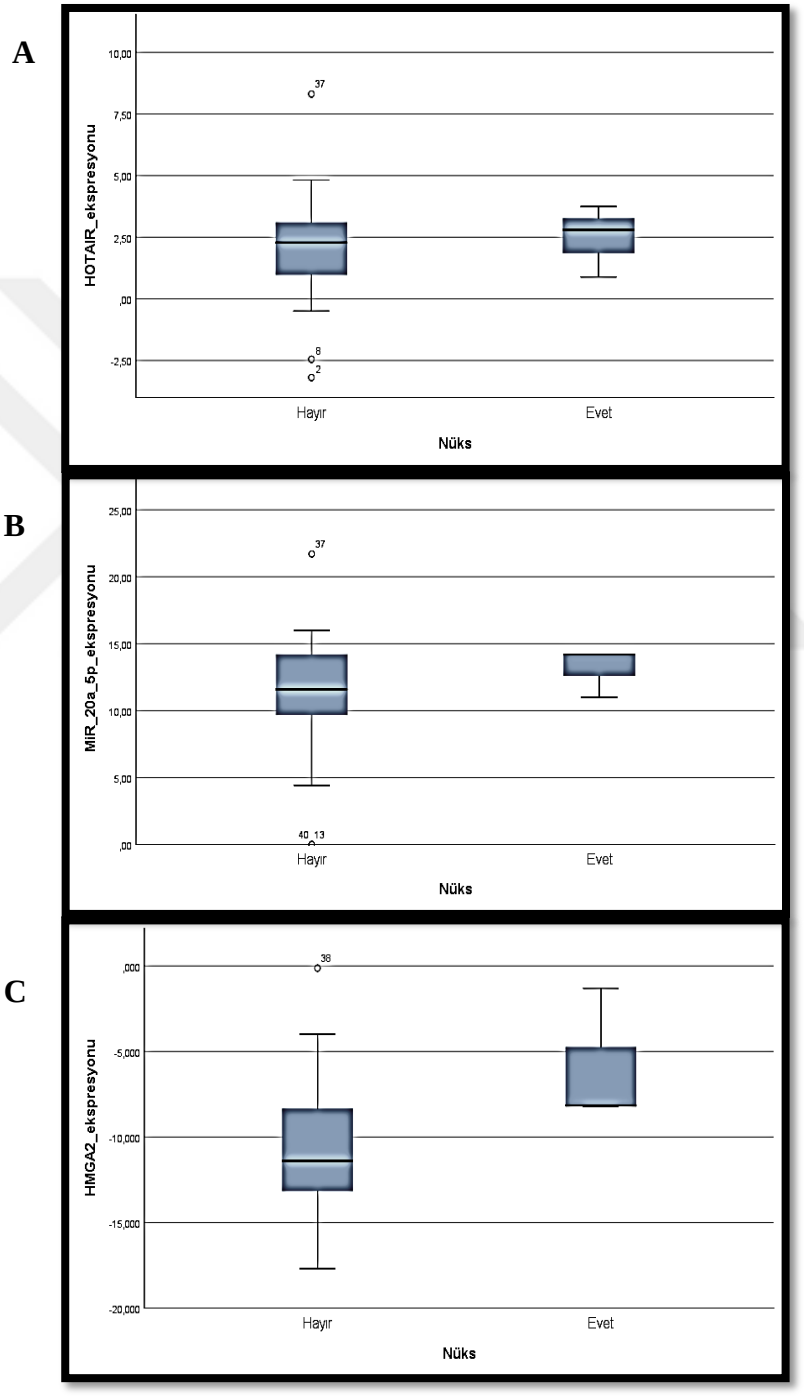
Çalışma grubunda, triple negatif ve diğerleri kıyaslandığında her 3 RNA için de ifade düzeyleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo 11). Ancak *HMGA2* ifadesi triple negatif alt tipi olan kadınlarda daha yüksek saptandı (Şekil 13C).



Şekil 13: Triple negatif alt tipi ve diğer alt tip meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2.7. Nüks Hasta/Nüks Olmayan Hasta

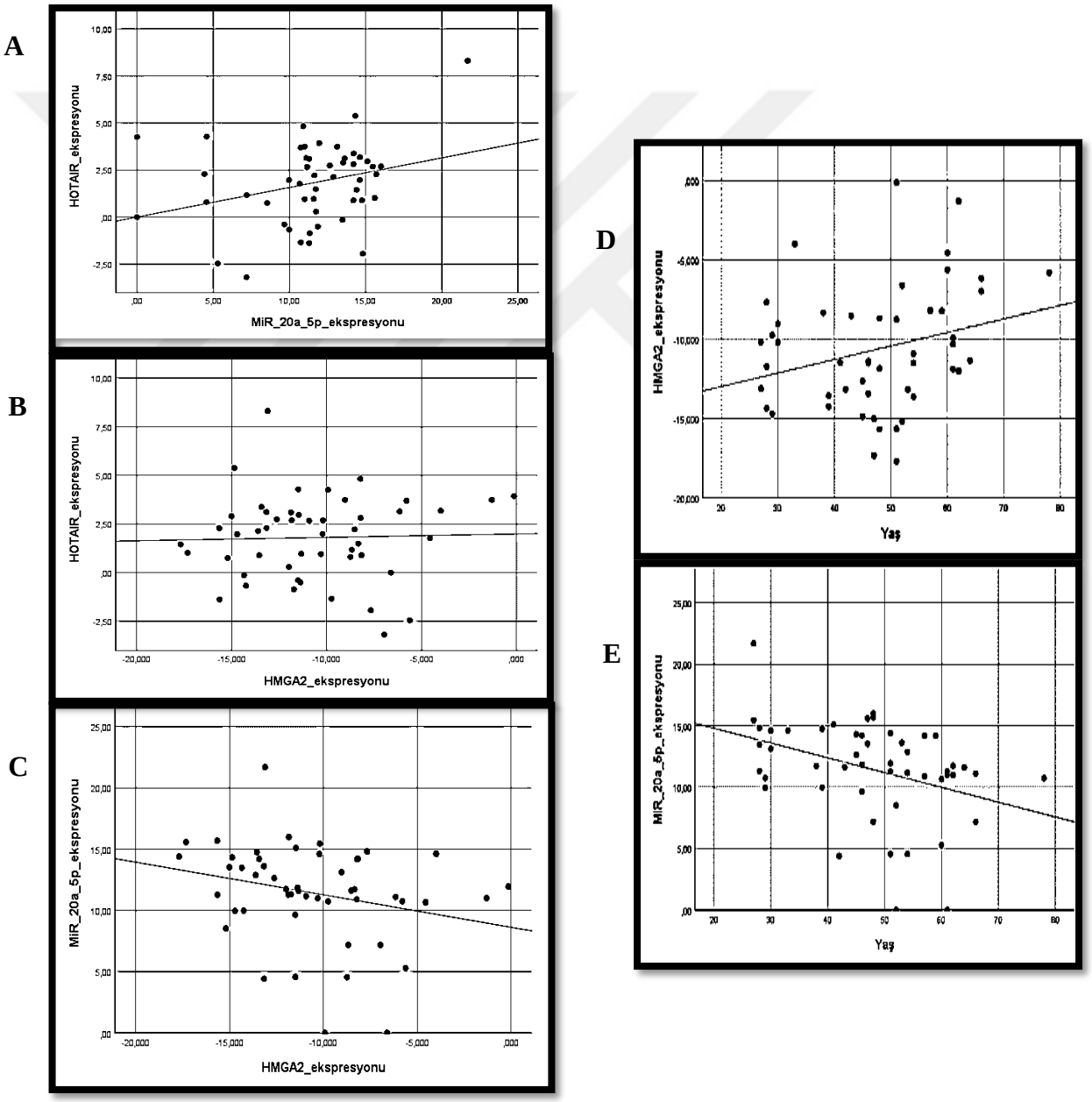
Nüks meme kanseri tanısı konulan hastalarda nüks olmayanlara göre *HMGA2* ifadesi daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,048). Ancak HOTAIR ve miR-20a-5p ifadeleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 11)(Şekil 14).



Şekil 14: Nüks olan ve nüks olmayan meme kanserli kadınlarda HOTAIR (A), miR-20a-5p (B), *HMGA2* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.3. Korelasyon analizi

Çalışma grubu değerlendirildiğinde miR-20a-5p ve hedef geni *HMGA2* arasında istatiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı (Şekil 15B). Analizin *p* değeri 0,027 iken korelasyon katsayısı -0,35 olarak tespit edildi (Tablo 11). Ancak, HOTAIR, *HMGA2* arasındaki ve HOTAIR, miR-20a-5p arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde istatiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Artan yaşla beraber *HMGA2* ifadesinde artma ve miR-20a-5p ifadesinde azalma saptandı (sırasıyla *p*=0,037, *p*=0,006)(Tablo 11).



Şekil 15: Çalışma grubunda HOTAIR ve miR-20a-5p (A), HOTAIR ve *HMGA2* (B), miR-20a-5p ve *HMGA2* (C), yaş ve *HMGA2* (D), yaş ve miR-20a-5p (E) arasındaki korelasyon

Tablo 11: HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* ifadelerinin sıra ortalaması, sıra toplamı ve *p* değerleri

		HOTAIR			MiR-20a-5p			*HMGA2*	
	N	**SO/ST**	***p* değeri**	**N**	**SO/ST**	***p* değeri**	**N**	**SO/ST**	***p* değeri**
Çalışma grubu	39	27,29 /1064,50	***p=0,025****	38	23,93/909,50	*p=0,591*	40	26,78/1071,00	*p=0,224*
Kontrol grubu	10	16,05/160,50		10	26,65/266,50		10	20,40/204,00	
Premenapozal	27	24,41/659,00	*p=0,748*	27	30,09/812,50	***p=0,002****	27	19,56/528,00	***p=0,002****
Postmenapozal	22	25,73/566,00		21	17,31/363,50		23	32,48/747,00	
Erken evre	28	18,38/514,50	*p=0,158*	28	19,45/544,50	*p=0,961*	29	18,93/549,00	*p=0,175*
İleri evre	11	24,14/265,50		10	19,65/196,50		11	27,64/271,00	
İDK	28	20,48/573,50	*p=0,678*	27	18,70/505,00	*p=0,505*	29	21,14/613,00	*p=0,591*
Diğer tanı	11	18,77/206,50		11	21,45/236,00		11	18,82/207,00	
ER+	24	14,60/350,50	***p=0,006****	24	16,96/407,00	*p=0,984*	25	16,64/416,00	*p=0,225*
ER-	10	24,45/244,50		9	17,11/154,00		10	21,40/214,00	
HER2-Aİ	6	23,58/141,50	*p=0,100*	5	21,00/105,00	*p=0,338*	6	14,67/88,00	*p=0,403*
Diğerleri	28	16,20/453,50		28	16,29/456,00		29	18,69/542,00	
Triple negatif	4	22,75/91,00	*p=0,285*	4	14,25/57,00	*p=0,576*	4	25,75/103,00	*p=0,116*
Diğerleri	30	16,80/504,00		29	17,38/504,00		31	17,00/527,00	
Nüks	3	22,17/66,50	*p=0,746*	3	23,00/69,00	*p=0,607*	3	33,33/100,00	***p=0,048****
Diğerleri	36	19,82/713,50		35	19,20/672,00		37	19,46/720,00	

Korelasyon parametreleri	**Korelasyon katsayısı**	***p* değeri**
Yaş ve miR-20a-5p	**-0,391**	***p=0,006****
Yaş ve *HMGA2*	**0,296**	***p=0,037****
***HMGA2* ve miR-20a-5p**	**-0,350**	***p=0,027****
HOTAIR ve miR-20a-5p	0,230	*p=0,153*
HOTAIR ve *HMGA2*	0,090	*p=0,582*

*İstatistiksel olarak anlamlı *p* değerleri

SO: Sıra ortalaması

ST: Sıra toplamı

5. TARTIŞMA

Meme kanseri dünyada kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır (1) Ölüm oranlarının yüksek olması ve artan tedavi maliyetleri nedeniyle küresel bir sorun haline gelmiştir. Ülkemizde de kadınlarda tanı konulan kanserlerin %25'inin meme kanseri olduğu bildirilmektedir (22). İnsidansının yüksek olması ve önlenebilir bir kanser olması nedeniyle ilerleyen teknolojiyle beraber meme kanseri mekanizmasının altında yatan moleküler genetik değişiklikleri anlamak hem kanser taraması/tanısında hem de kanserin kişiselleştirilmiş tedavisinde yol gösterici olacaktır (21).

Güncel araştırmalar, epigenetik değişikliklere ve kodlama yapmayan RNA ailesinin düzenleyici işlevlerine odaklanmaktadır (100,101). LncRNA ve mikroRNA'lardaki regülasyon bozukluklarının birçok hastalığın oluşum mekanizmasında yer aldığı bildirilmiştir (14,16,101). Oluşum ve progresyon mekanizmasında yer alan bu biyobelirteçlerin tespit edilmesi, kanserin non-invaziv erken tanısından hedefe yönelik tedavisine kadar birçok alanda kullanılmasına olanak sağlayacaktır (6).

LncRNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ifadesine etki edebilmektedir. Etkilerini miRNA'lara baz eşleşmesi yaparak (75), genlerin enhancer bölgeleri aracılığıyla veya histon modifikasyonu yoluyla transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel aşamadaki değişimlerle göstereceği ifade edilmektedir (76). MiRNA'ların ise hedef mRNA ile baz eşleşmesi yaparak RISC kompleksi aracılığıyla mRNA degradasyonuna ve/veya translasyon inhibisyonuna neden olacağı belirtilmektedir (78).

LncRNA'lardan biri olan HOTAIR, kromozom 12q13.13'te lokalizedir. HOXC gen kümesinin anti-sens dizisinden kopyalanır ve daha uzak olan HOXD gen kümesinin ve diğer kromozomlardaki bazı genlerin ifadesini epigenetik olarak susturmak için bir yapı iskelesi görevi görür (88). DNA metilasyonu ve histonların modifikasyonu gibi DNA fonksiyonelliğini düzenleyen süreçlerde yer alır (13). Güncel çalışmalarda, HOTAIR'in protein-protein etkileşimini kolaylaştırdığını ve böylece kanserde epigenetik yeniden düzenleme, protein stabilitesi ve sinyal iletimi

gibi çeşitli yolları etkilediği gösterilmiştir (15,102). Ayrıca literatürde, HOTAIR'in miRNA ifadesini ve işlevini etkileyerek tümör ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (15). HOTAIR'in anormal aktivitesi farklı şekillerde oluşabilir; ya kromatin durumunu ve transkripsiyonel susturmayı düzenleyen moleküler bir yapı iskelesi olarak ya da farklı miRNA'ları direk süngerleme yoluyla aşağı akış (downstream) gen ifadesini modüle ederek gerçekleştirir (103,104). HOTAIR'in miRNA'larla ilişkisi, "sünger etkisi" de dahil olmak üzere birçok karmaşık fonksiyonel etkileşimler ağı boyunca hücresel işlemlerin düzenlenmesinde de kritik rol oynadığı anlaşılmaktadır.

MiR-20a-5p hücre sinyal yolaklarıyla etkileşimde olan miRNA'lardan biri olup, çeşitli kanserlerde oldukça önemli bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesine rağmen (98), HOTAIR yolağıyla ilişkisi sadece birkaç çalışmada gösterilmiştir (19,95). Bu nedenle HOTAIR yolağıyla ilişkisinin belirlenmesi meme kanseri progresyonunda önem arz etmektedir.

HMGA2, DNA'daki AT açısından zengin bölgelere bağlanarak, transkripsiyonel güçlendiricilerin etkisini desteklemek için kromatin yapısını değiştirir (105). *HMGA2'*nin, pankreas (106), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (107) ve meme kanseri de (108) dahil olmak üzere çoğu malign epitelyal tümörde yüksek oranda ifade edildiği bildirilmesine rağmen, meme kanserlerinde tümör oluşum ve progresyonuyla ilişkili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (19,109,110)

Bu çalışma, daha önce hücre hattı ve ksenograftlarda meme kanseri ile ilişkisi gösterilmiş olan HOTAIR/miR-20a-5p/HMGA2 yolağının ilk kez meme kanserli hastalarda moleküler düzeyde incelenmesi ve klinikopatolojik bulguların genetik açıdan değerlendirilmesi, hedefe yönelik tedavi ve biyobelirteç çalışmalarına moleküler düzeyde katkı sağlanması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak, HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağından HOTAIR'in ifade düzeylerini çalışma ve kontrol grubunda inceledik ve meme kanseri hastalarında HOTAIR ifade düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirledik. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,025). Literatürde de benzer şekilde HOTAIR ifadesinin meme kanseri hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (19,111). Son yıllarda yapılan çalışmalar, solid kanserlerin çoğunda meydana gelen düzensiz *HOTAIR* gen ifadesinin tümör başlangıcı, büyüme,

anjiyogenez, progresyon, nüks, ilaç direnci ve kötü prognozdaki rolünü göstermektedir (17,88,112,113). Literatürde; HOTAIR ifadesinin, kastrasyona dirençli prostat kanserinde androjenden bağımsız olarak androjen reseptörü aktivitesi ve progresyonunda arttığı gösterilmiştir (113). Mesane kanseri hastalarında idrarda HOTAIR ifade artışıyla birlikte kemoterapi direncinde de rol oynadığı tespit edilmiştir (114). Artan HOTAIR ifadesinin akciğer kanserinde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve kanser hücrelerinde proliferasyon, hayatta kalma, invazyon, metastaz ve ilaç direncini desteklediği belirtilmektedir (115). Serviks kanserinde yapılan bir diğer çalışmada ise plazma HOTAIR ifadesi klinikopatolojik bulgularla ilişkilendirilmiş olup progresyon ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (116). Endometriyum kanserinde prognoz, lenf nodu metastazı, grade ile korelasyonu rapor edilmiş ve sisplatin direncinde rolü olduğu belirtilmiştir (117). Luo ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, HOTAIR'in kolon kanseri dokularında yüksek oranda ifade edildiği ve tümör invazyonu, metastaz, tümör evresi ve hayatta kalma süresi ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir (118). Diğer bir çalışmada ise HOTAIR'in, florourasil ve platin kombinasyon kemoterapisi alan ileri evre mide kanseri hastaları için prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (119).

Literatürde HOTAIR'in meme kanseri için tanısal biyobelirteç olarak kullanılabileceği ve biyopsi yapılmadan periferik kandan numune alınması sonucu tanı koyma sürecini kolaylaştırabileceği öngörülmektedir (120). Bu bağlamda, çalışmamız bu öngörüleri destekler niteliktedir.

Çalışmamızda HOTAIR ifadesi meme kanserli hastaların klinikopatolojik bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde; ER negatif hastalarda ER pozitiflere göre HOTAIR ifadesi istatiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (p=0,006). Retrospektif bir klinik çalışmada, primer tümör teşhisi konan ve adjuvan tedavi almayan östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri hastalarında HOTAIR aşırı ifadesinin metastaz riski ile güçlü bir ilişkisi olduğunu ortaya koydu ve bu tip hastalarda potansiyel bir prognostik biyobelirteç olabileceğini düşündürdü (121). Diğer bir çalışmada ise ER- kanserlerde HOTAIR ifadesinin arttığı ve bu durumun kötü prognozla ilişkisi olduğu gösterildi (122). Çalışmamızda elde edilen verilerle birlikte değerlendirildiğinde, HOTAIR'in özellikle ER negatif meme kanseri hastalarında alt tip spesifik tanı koyma sürecinde ve prognoz tayininde yer alabileceği öngörülmektedir.

HOTAIR gen ifadesi diğer bir klinik parametre olan ileri evre ve erken evre kanser hastalarında kıyaslandığında; ileri evre meme kanserli grupta daha yüksek olarak tespit edilmiş olup, istatiksel olarak anlamlı değildi. Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada HOTAIR ifadesinin ileri evrelerde arttığı bildirilmiştir (120). 2020 yılında 60 meme kanseri tanılı hastada yapılan diğer bir çalışmada, HOTAIR'in meme kanseri evresiyle ilişkili olduğu, Evre 2,3,4 olan hastalarda Evre 1'e kıyasla ifadelerinin anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (123). Çalışma bulgularımız literatürle uyumlu bir şekilde, ileri evre hastalarda HOTAIR ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çalışmamızda, *HOTAIR* gen ifadeleri, HER2-Aİ ve diğer alt tipler değerlendirildiğinde HER2-Aİ olan grupta daha yüksek saptansada bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,100). Literatürde çalışmamıza benzer şekilde *HOTAIR* gen ifadesinin HER2 pozitifliğiyle korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (124,125). Başka bir çalışmada ceRNA HOTAIR'in miR-331-3p'yi süngerleyerek HER2 ifadesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (126). Aynı zamanda, dolaşımdaki HOTAIR ifadesinin, HER2 pozitif meme kanseri hastalarında duyarlı bir likit biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (125). Meme kanseri hücrelerinde HOTAIR ifadesi azalmasının, HER2 reseptörü monoklonal antikoru olarak kullanılan trastuzumaba duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (127). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu olup birlikte değerlendirildiğinde, meme kanseri prognoz ve tedavisinde etkin olarak kullanılan önemli bir hücre yüzey reseptörü olan HER2 yolağının yukarı akışında (upstream), HOTAIR'in de etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda meme kanseri triple negatif gruptakilerin *HOTAIR* gen ifadeleri triple negatif olmayan gruptakilerle kıyaslandığında; triple negatif grupta daha yüksek olarak tespit edildi. Ancak bu farklılık istatiksel olarak anlamlı değildi (p=0,285). 138 hasta ve 75 sağlıklı kontrolde yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada, HOTAIR ifadelerini triple negatif ve diğer alt tiplerle kıyasladıklarında anlamlı bir artış tespit etmişlerdir (128). Yapılan diğer bir çalışmada, triple negatif meme kanserlerinde HOTAIR ifadesi artışının, hücre migrasyonu ve invazyonu üzerinde etkileri bildirilmiştir (129). 2019 yılında 163 meme kanserli hastada yapılan diğer bir çalışmada ise, triple negatif meme kanseri lümen androjen reseptör alttipi ve lenf nodu metastazı ile HOTAIR ifadesi arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (112).

Ayrıca, triple negatif meme kanserinde HOTAIR ifadesi azalmasının östrojenle indüklenen hücre migrasyonunu azalttığı belirtilmiştir (130).

HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının ikinci basamağında yer alan miR-20a-5p kanser tanısı, prognozu ve tedavisi için umut verici ve etkili bir belirteç olarak öngörüldüğünden çalışmamızda değerlendirilen diğer bir parametre olmuştur. Çalışmamızda, miR-20a-5p ifadesi çalışma grubuna kıyasla kontrol grubunda minimal bir yükseklik gösterdi. İleri evre kanser hastalarında miR-20a-5p seviyeleri azalmaktaydı. ER pozitif grupta ER negatif gruba göre ve HER2-Aİ alt tipinde diğer alt tiplere göre ayrı ayrı kıyaslandığında ifadelerinde artış saptandı. Triple negatif alt tipi diğer alt tiplere göre kıyaslandığında ise miR-20a-5p ifadesinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca, klinikopatolojik grupların neredeyse tamamına yakınında miR-20a-5p ile HOTAIR ve miR-20a-5p ile *HMGA2* seviyeleri arasında ters korelasyon gözlenmesine rağmen bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürde yer alan bilgilere göre, miR-20a-5p lösemi, meme kanseri ve serviks kanseri gibi çeşitli kanserlerde anti-neoplastik rol oynamaktadır. MiR-20a-5p'nin ifade artışı ve azalışı PI3K-Akt, MAPK, TGF-β sinyal yolaklarını etkilediği bildirilmektedir (98). Tümör supresör etkisine rağmen, triple negatif meme kanseri ve serviks kanserinde RUNX3'ü hedefleyerek hücre proliferasyon ve migrasyonuna neden olabileceği bildirilmektedir (131,132). Bununla birlikte, Jak1 ve STAT3 sinyallerini etkileyerek endometriyum kanserinde anti-neoplastik rol üstlendiği belirtilmektedir (94). Diğer bir çalışmada miR-20a-5p 'nin hepatoselüler kanserde *ERBB3* genini hedefleyerek tümör metastazını inhibe ettiği (133), ancak baş boyun skuamöz kanserinde TNFRSF21'i baskılayarak onkogen rolü üstlendiği bildirilmektedir (134). Ayrıca literatürde osteosarkomda çoklu ilaç direncini regüle ettiği (135) mesane kanserinde ise tümör baskılayıcı bir gen olan *NR4A3* ifadesini baskılayarak hücre büyümesi ve metastazını desteklediği belirtilmektedir (136). Han ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dokularında komşu dokulara kıyasla miR-20a (miR-20a-5p) ifadesinin azaldığını ve miR-20a'nın PI3K/Akt yolağını etkileyerek tümör baskılayıcı rol oynadığını rapor ettiler. Çalışmalarında miR-20a'daki ifade artışının, in-vitro olarak KHDAK hücrelerinde proliferasyon ve endotelyal göçü baskıladığını aynı zamanda in-vivo olarak tümör büyümesini ve anjiyogenezi inhibe ettiğini bildirdiler (137). Akut myeloid lösemili hastalarda yapılan diğer bir çalışmada ise miR-20a-5p'nin lncRNA

HOTAIR ile etkileşerek adriamisin direncinde yer aldığı belirtilmiştir (95). Çalışmamızda meme kanserinin klinikopatolojik grupları arasında anlamlı ilişkinin belirlenememesi; literatürde bildirildiği üzere (98), miR-20a-5p'nin hedef sinyal yolaklarını promote ya da inhibe edebileceğinden, HOTAIR'in hedefi olarak miR-20a-5p'yi süngerleyememiş olmasından ya da etkisini başka bir miRNA üzerinden gösterebileceğinden veya hasta sayısının sınırlı olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının son üyesi olan *HMGA2* gen ifadeleri değerlendirildiğinde; ER+, HER2-Aİ ve Triple negatif grupta sırasıyla diğer alt tiplerine kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla p=0,225, p=0,403, p=0,116). Nüks olan hastalarda ise *HMGA2* ifadeleri, nüks olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı (p=0,048). Xu ve arkadaşları triple negatif meme kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmada *HMGA2* geninin ifade artışını ve *HMGA2* baskılanmasının kanser hücrelerinde metastaz ve invazyonu inhibe ettiğini gösterdiler (109). Literatürde diğer bir çalışmada, triple negatif meme kanserinde *HMGA2*'nin onkojeniteyi desteklediği ve *HMGA2* baskılanmasının hücre proliferasyonunu, invazyon ve migrasyonunu azalttığı için önemli bir terapötik hedef olabileceği ancak luminal tip ve HER2 pozitif tiplerde ise anlamlı derecede ifade artışı olmadığı rapor edilmiştir (110). Jun ve arkadaşları mide kanseri üzerine yaptıkları çalışmada *HMGA1* ve *HMGA2* ifadelerinin tümör nüksü için prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (138). Çalışma bulgularımız literatürle uyumlu olarak, *HMGA2* gen ifadesinin HER2 ve ER+ alttiplerinden ziyade triple negatif alt tipinde daha yüksek olduğunu ortaya çıkardı. Ayrıca, çalışmamızda nüks olan grupta gen ifadesinin anlamlı düzeyde yüksek olması, *HMGA2*'nin meme kanseri nüksü takibinde fonksiyonel çalışmalarla ve daha fazla sayıda örnekle desteklendiğinde biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda *HMGA2* gen ifadeleri premenapozal ve post menapozal grupta kıyaslandığında postmenapozal grupta, miR-20a-5p düzeyleri ise premenapozal grupta anlamlı olarak yüksek bulundu (her ikisinde p=0,002). Bu duruma benzer şekilde artan yaşla *HMGA2* ifadelerinin pozitif korelasyon gösterdiği, miR-20a-5p düzeylerinin ise negatif korelasyon gösterdiği saptandı. Bu durumun muhtemel sebebinin mikroRNA-hedef gen etkileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde *HMGA2* düzeylerinin embriyonik dönemde yüksek

seviyede olup artan yaşla birlikte azaldığı bildirilmesine rağmen (18), kanser hastalarının değerlendirildiği bazı çalışmalarda yaş ile anlamlı ilişki olmadığı gösterilmiştir (139,140). Bununla birlikte, bilgilerimize göre *HMGA2* ve miR-20a-5p gen ifadeleri ve meme kanserinde menapozal durumla ilişkisini inceleyen bir makale bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız *HMGA2* ifadelerinin yaş ve menapozal durum ile ilişkisi inceleyen ilk çalışma olup, postmenapozal bireylerde daha yüksek olduğunu saptadık. Postmenapozal kişilerde *HMGA2* gen ifadesinin daha yüksek olması, meme kanseri gelişimi altında yatan hormonal mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, artan yaşla beraber miR-20a-5p düzeyinin belirgin şekilde azalmasının, *HMGA2* düzeyi artışına neden olabileceğini öngörmekteyiz.

Mevcut çalışmamızda, HOTAIR, miR-20a-5p ve *HMGA2* ifadesinin meme kanserlerinin histopatolojik tanısıyla arasındaki ilişki değerlendirildiğinde gruplarda bulunan hasta sayılarının sınırlı olmasından dolayı anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Literatürde 133 meme kanserli hastada yapılan bir çalışmada HOTAIR ifadesi ile histoloji arasında güçlü bir ilişki görülmüştür. Lobüler karsinomlar gibi özel histolojik tiplerle kıyaslandığında duktal karsinomların daha düşük HOTAIR ifadesine sahip oldukları tespit edilmiştir (122).

Meme kanseri tanısı alan kadınlarda, HOTAIR/miR-20a-5p/HMGA2 yolağının klinikopatolojik bulgularla ilişkisinin ilk kez değerlendirildiği bu çalışmanın temelini oluşturan hedef RNA'ların kendi arasındaki korelasyonlar (HOTAIR ile miR-20a-5p, HOTAIR ile HMGA2 ve HMGA2 ve miR-20a-5p) ayrı ayrı ele alındığında; *HMGA2* ve miR-20a-5p gen ifadeleri arasında anlamlı düzeyde negatif korelasyon saptandı (korelasyon katsayısı= -0,35 (p=0,027)). Literatürde HOTAIR'in kompetitif endojen RNA olarak işlev gördüğü bir çok çalışma rapor edilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, HOTAIR'in miR-149-5p'yi süngerleyerek hücre büyümesi, invazyon ve migrasyonunu desteklediği bildirildi (141). Cai ve arkadaşları pankreas kanserinde HOTAIR ifadesinin miR-613'ü süngerleyerek NOTCH3 sinyal yolağını etkilediğini gösterdiler (142). Yine 2017 yılında yapılan bir çalışmada, malign melanom hücrelerinde HOTAIR ifade artışının miR-152-5p'yi süngerleyerek progresyona neden olduğu raporlandı (143). Zhao ve arkadaşlarının 20 meme kanseri dokusu ve meme kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmada HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* ifadeleri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, HOTAIR, miR20a-5p'ye bağlanarak miR-

20a-5p'nin aktivitesini ve yoğunluğunu azalttığı, bu azalmanın da miR-20a-5p'nin hedef geni olan *HMGA2*'nin ifadesini artırdığı gösterilmiştir. Çalışmaya göre HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının meme kanseri hücrelerinde proliferasyon, metastaz ve apopitozu etkileyerek karsinogenezde yer aldığı ve bu yolağın aktivasyonunun meme kanseri gelişimini indüklediği in-vivo olarak ksenograftlarda da gösterilmiştir (19). Çalışmamızda, HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağı moleküler düzeyde incelenmiş olup literatüre benzer şekilde, *HMGA2* ve miR-20a-5p arasında, miRNA-hedef gen etkileşiminden kaynaklandığı düşünülen negatif korelasyon saptandı.

Özet olarak, klinikopatolojik bulgular genetik açıdan değerlendirildiğinde; çalışma grubunda kontrol grubuna göre ve ER- grupta ER+ gruba göre HOTAIR ifadesinde anlamlı düzeyde artış tespit ettik. Ayrıca, nüks olan grupta nüks olmayan gruba göre ve postmenapozal grupta premenapozal gruba göre *HMGA2* ifadesinde anlamlı düzeyde artış saptadık. Hedef RNA'lar arasındaki korelasyonları incelediğimizde ise *HMGA2* ve miR20a-5p arasında anlamlı düzeyde negatif korelasyon olduğunu gördük.

Çalışmamız, HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının meme kanseri ile ilişkisi, önceki çalışmalarla hücre hatlarında ve ksenograftlarda gösterilmesine rağmen, meme kanseri tanısı alan hastaların periferik kanlarının cell-free RNA'sında incelenerek klinikopatolojik verilerle desteklendiği ilk çalışma özelliği taşımaktadır. HOTAIR'in özellikle ER negatif meme kanserlerinde, HMGA2'nin ise nüks olan hastalarda ve postmenapozal kadınlarda prognostik biyobelirteç olabileceği, bu bağlamda çalışmamızın literatüre önemli bilimsel katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. HOTAIR yolağındaki tespit edilen genetik değişikliklerin fonksiyonel çalışmalarla desteklendiğinde, bilinmeyen biyolojik işlevleri ortaya çıkarılarak meme kanserlerinin moleküler patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir yer tutabileceği öngörülmektedir. Bu yolağın meme kanserlerinin klinik seyrindeki rolünü göstermek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

HOTAIR/miR-20a-5p/*HMGA2* yolağının, meme kanseri tanısı alan hastalarda klinikopatolojik bulgularla ilişkisinin ilk kez incelendiği çalışmamızın sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir.

1. Meme kanseri hastalarında HOTAIR ifadesinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirledik. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,025).
2. ER negatif hastalarda ER pozitiflere göre HOTAIR ifadesi istatiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (p=0,006).
3. Nüks olan hastalarda *HMGA2* ifadeleri, nüks olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı (p=0,048).
4. Postmenapozal grupta premenapozal gruba göre, *HMGA2* ifadesinde artış görülürken miR-20a-5p ifadesinde ise azalma saptandı. Bu farklılıklar istatiksel olarak anlamlıydı (Her ikisinde p=0,002).
5. Artan yaşla, *HMGA2* ifadesi pozitif korelasyon gösterirken, miR-20a-5p negatif korelasyon gösterdi (sırasıyla korelasyon katsayısı=0,296, -0,391 (p=0,037, p=0,006)).
6. *HMGA2* ve miR-20a-5p arasında istatistiksel olarak anlamlı ters korelasyon saptandı ((p=0,027)(korelasyon katsayısı=-0,35)).
7. Triple negatif ve HER2-Aİ alt tiplerinde diğer alt tiplere göre HOTAIR ifadelerinin daha yüksek olduğu görüldü.
8. *HMGA2* gen ifadesi, triple negatif grupta triple negatif olmayan gruba kıyasla daha yüksekti.

Bulgularımıza göre; meme kanserinde HOTAIR'in (özellikle ER negatif alt tipi için) tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ve tanı koyma sürecini hızlandırabileceği, HMGA2'nin ise nüks takibinde yararlı bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, vd. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. Mayıs 2021;71(3):209-49.

2. Libson S, Lippman M. A review of clinical aspects of breast cancer. Int Rev Psychiatry Abingdon Engl. Şubat 2014;26(1):4-15.

3. Jenkins S, Kachur ME, Rechache K, Wells JM, Lipkowitz S. Rare Breast Cancer Subtypes. Curr Oncol Rep. 23 Mart 2021;23(5):54.

4. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. Adv Anat Pathol. Ocak 2020;27(1):27-35.

5. Walker-Smith TL, Peck J. Genetic and Genomic Advances in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. Nurs Womens Health. Aralık 2019;23(6):518-25.

6. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. Hum Mol Genet. 15 Nisan 2006;15 Spec No 1:R17-29.

7. Dumitrescu RG. Interplay Between Genetic and Epigenetic Changes in Breast Cancer Subtypes. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2018;1856:19-34.

8. Chi Y, Wang D, Wang J, Yu W, Yang J. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. Cells. 01 Eylül 2019;8(9):1015.

9. Jiao D, Li Z, Zhu M, Wang Y, Wu G, Han X. LncRNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by targeting miR-124/foxq1 in bladder transitional cell carcinoma (BTCC). Am J Cancer Res. 2018;8(4):748-60.

10. Ma J, Fan Y, Feng T, Chen F, Xu Z, Li S, vd. HOTAIR regulates HK2 expression by binding endogenous miR-125 and miR-143 in oesophageal squamous cell carcinoma progression. Oncotarget. 17 Ekim 2017;8(49):86410-22.

11. Qin N, Tong GF, Sun LW, Xu XL. Long Noncoding RNA MEG3 Suppresses Glioma Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Acting as a Competing Endogenous RNA of miR-19a. Oncol Res. 02 Kasım 2017;25(9):1471-8.

12. Kong X, Duan Y, Sang Y, Li Y, Zhang H, Liang Y, vd. LncRNA-CDC6 promotes breast cancer progression and function as ceRNA to target CDC6 by sponging microRNA-215. J Cell Physiol. Haziran 2019;234(6):9105-17.

13. Yuan C, Ning Y, Pan Y. Emerging roles of HOTAIR in human cancer. J Cell Biochem. Haziran 2020;121(5-6):3235-47.

14. Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, Shan B. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 10 Aralık 2014;7:90.

15. Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, Dunna NR. HOTAIR LncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. Nisan 2020;503:1-18.

16. Ge XS, Ma HJ, Zheng XH, Ruan HL, Liao XY, Xue WQ, vd. HOTAIR, a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma, inhibits WIF-1 expression and activates Wnt pathway. Cancer Sci. Aralık 2013;104(12):1675-82.

17. Cantile M, Di Bonito M, Cerrone M, Collina F, De Laurentiis M, Botti G. Long Non-Coding RNA HOTAIR in Breast Cancer Therapy. Cancers. 09 Mayıs 2020;12(5):E1197.

18. Mansoori B, Mohammadi A, Ditzel HJ, Duijf PHG, Khaze V, Gjerstorff MF, vd. HMGA2 as a Critical Regulator in Cancer Development. Genes. 13 Şubat 2021;12(2):269.

19. Zhao W, Geng D, Li S, Chen Z, Sun M. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. Cancer Med. 2018;7(3):842-55.

20. Müller V, Oliveira-Ferrer L, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Interplay of lncRNA H19/miR-675 and lncRNA NEAT1/miR-204 in breast cancer. Mol Oncol. 2019;13(5):1137-49.

21. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, vd. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. Anticancer Res. Mart 2014;34(3):1071-7.

22. 2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri [İnternet]. [a.yer 29 Ocak 2022]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-statistikleri.html

23. Kolak A, Kamińska M, Sygit K, Budny A, Surdyka D, Kukiełka-Budny B, vd. Primary and secondary prevention of breast cancer. Ann Agric Environ Med. 23 Aralık 2017;24(4):549-53.

24. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, vd. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci. 01 Kasım 2017;13(11):1387-97.

25. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;151:1-32.

26. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. Lancet Lond Engl. 14 Mayıs 2005;365(9472):1727-41.

27. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. Womens Health Med. 01 Ocak 2006;3(1):8-14.

28. Ahmed M, Lalloo F, Evans DG. Update on genetic predisposition to breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther. Ağustos 2009;9(8):1103-13.

29. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. Front Biosci Landmark Ed. 01 Haziran 2013;18(4):1358-72.

30. Youn HJ, Han W. A Review of the Epidemiology of Breast Cancer in Asia: Focus on Risk Factors. Asian Pac J Cancer Prev APJCP. Nisan 2020;21(4):867-80.

31. DeCensi A, Gennari A. Insulin breast cancer connection: confirmatory data set the stage for better care. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 01 Ocak 2011;29(1):7-10.

32. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. Clin Obstet Gynecol. Aralık 2016;59(4):651-72.

33. Watkins EJ. Overview of breast cancer. J Am Acad PAs. Ekim 2019;32(10):13-7.

34. Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. Breast J. 2007;13(2):172-9.

35. Moroni S, Casettari L, Lamprou DA. 3D and 4D Printing in the Fight against Breast Cancer. Biosensors. 26 Temmuz 2022;12(8):568.

36. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clin. 01 Temmuz 2018;13(3):325-38.

37. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, vd. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast. 01 Kasım 2015;24:S26-35.

38. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med. 01 Şubat 2016;57(Supplement 1):9S-16S.

39. Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). Jpn J Clin Oncol. 01 Mart 2019;49(3):228-31.

40. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, vd. 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.

41. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, vd. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. CA Cancer J Clin. Mart 2017;67(2):93-9.

42. Barrio AV, Van Zee KJ. Controversies in the Treatment of Ductal Carcinoma in Situ. Annu Rev Med. 14 Ocak 2017;68:197-211.

43. Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma in Situ. Surg Pathol Clin. Mart 2018;11(1):123-45.

44. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician. 01 Haziran 2010;81(11):1339-46.

45. Reinbolt RE, Mangini N, Hill JL, Levine LB, Dempsey JL, Singaravelu J, vd. Endocrine Therapy in Breast Cancer: The Neoadjuvant, Adjuvant, and Metastatic Approach. Semin Oncol Nurs. 01 Mayıs 2015;31(2):146-55.

46. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, vd. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. Lancet Lond Engl. 25 Mart 2017;389(10075):1195-205.

47. Menta A, Fouad TM, Lucci A, Le-Petross H, Stauder MC, Woodward WA, vd. Inflammatory Breast Cancer: What to Know About This Unique, Aggressive Breast Cancer. Surg Clin North Am. Ağustos 2018;98(4):787-800.

48. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, vd. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis. 01 Haziran 2018;5(2):77-106.

49. Park JW, Han JW. Targeting epigenetics for cancer therapy. Arch Pharm Res. 2019;42(2):159-70.

50. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 07 Ocak 2000;100(1):57-70.

51. N Kontomanolis E, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Kalagasidou S, Pagkalos A, vd. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. J BUON Off J Balk Union Oncol. Ekim 2021;26(5):1723-34.

52. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech. 01 Mayıs 2015;1849(5):506-16.

53. PehliVanoğlu B, Aysal A, Ekmekci S, ŞahiN Y, Toper MH, Gündoğdu B, vd. Molecular pathologic mechanisms of neoplastic diseases. J Curr Pathol. 2019;3(2):62.

54. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, vd. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. Anticancer Res. 01 Kasım 2020;40(11):6009-15.

55. Popli DB, Sircar K, Chowdhry A. Telomerase: An exploration toward the end of cancer. Indian J Dent Res. 09 Ocak 2017;28(5):574.

56. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. Oncol Lett. Temmuz 2018;16(1):687-702.

57. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduct Target Ther. 12 Mart 2020;5:28.

58. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. Cell. 09 Şubat 2017;168(4):644-56.

59. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. Eur Rev Med Pharmacol Sci. Haziran 2018;22(12):3855-64.

60. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, vd. DNA methylation, its mediators and genome integrity. Int J Biol Sci. 2015;11(5):604-17.

61. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, vd. Overview of Histone Modification. Adv Exp Med Biol. 2021;1283:1-16.

62. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. Clin Genet. Nisan 2012;81(4):303-11.

63. Kreutzfeldt J, Rozeboom B, Dey N, De P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. Am J Cancer Res. 01 Nisan 2020;10(4):1045-67.

64. Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. Cancer Cell. 01 Kasım 2004;6(5):497-506.

65. Krishna BM, Jana S, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Salgia R, vd. Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy. Cancer Lett. 01 Ekim 2019;461:123-31.

66. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci. 2004;95(11):866-71.

67. Wendt C, Margolin S. Identifying breast cancer susceptibility genes - a review of the genetic background in familial breast cancer. Acta Oncol Stockh Swed. Şubat 2019;58(2):135-46.

68. Ngeow J, Sesock K, Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. Breast Cancer Res Treat. Ağustos 2017;165(1):1-8.

69. Zyla RE, Hahn E, Hodgson A. Gene of the month: STK11. J Clin Pathol. Kasım 2021;74(11):681-5.

70. Benusiglio PR, Malka D, Rouleau E, De Pauw A, Buecher B, Noguès C, vd. CDH1 germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. J Med Genet. Temmuz 2013;50(7):486-9.

71. Lalloo F, Evans DG. Familial Breast Cancer. Clin Genet. 2012;82(2):105-14.

72. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. Aralık 2011;12(12):861-74.

73. Wajahat M, Bracken CP, Orang A. Emerging Functions for snoRNAs and snoRNA-Derived Fragments. Int J Mol Sci. 22 Eylül 2021;22(19):10193.

74. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. Adv Exp Med Biol. 2016;937:3-17.

75. Chi Y, Wang D, Wang J, Yu W, Yang J. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. Cells. 01 Eylül 2019;8(9):1015.

76. Dykes IM, Emanueli C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. Genomics Proteomics Bioinformatics. Haziran 2017;15(3):177-86.

77. Matsui M, Corey DR. Perspectives. Nat Rev Drug Discov. Mart 2017;16(3):167-79.

78. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer – A brief overview. Adv Biol Regul. 01 Ocak 2015;57:1-9.

79. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 15 Aralık 2004;18(24):3016-27.

80. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. Trends Cell Biol. 01 Nisan 2004;14(4):156-9.

81. Venkatesh J, Wasson MCD, Brown JM, Fernando W, Marcato P. LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack. Cancer Lett. 01 Temmuz 2021;509:81-8.

82. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduct Target Ther. 28 Ocak 2016;1:15004.

83. Qi X, Lin Y, Chen J, Shen B. Decoding competing endogenous RNA networks for cancer biomarker discovery. Brief Bioinform. 23 Mart 2020;21(2):441-57.

84. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? Cell. 05 Ağustos 2011;146(3):353-8.

85. Qi X, Zhang DH, Wu N, Xiao JH, Wang X, Ma W. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications. J Med Genet. Ekim 2015;52(10):710-8.

86. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, Guo B. Long Noncoding RNA (lncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 16 Kasım 2019;20(22):5758.

87. Yang C, Wu D, Gao L, Liu X, Jin Y, Wang D, vd. Competing endogenous RNA networks in human cancer: hypothesis, validation, and perspectives. Oncotarget. 08 Şubat 2016;7(12):13479-90.

88. Qu X, Alsager S, Zhuo Y, Shan B. HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) in cancer. Cancer Lett. 10 Temmuz 2019;454:90-7.

89. Pawłowska E, Szczepanska J, Blasiak J. The Long Noncoding RNA HOTAIR in Breast Cancer: Does Autophagy Play a Role? Int J Mol Sci. 03 Kasım 2017;18(11):E2317.

90. Abba MC, Fabre ML, Lee J, Tatineni P, Kil H, Aldaz CM. HOTAIR Modulated Pathways in Early-Stage Breast Cancer Progression. Front Oncol. 2021;11:783211.

91. Obaid M, Udden SMN, Deb P, Shihabeddin N, Zaki MH, Mandal SS. LncRNA HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced cytokine expression and inflammatory response in macrophages. Sci Rep. 23 Ekim 2018;8(1):15670.

92. Xue X, Yang YA, Zhang A, Fong KW, Kim J, Song B, vd. LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. Oncogene. Mayıs 2016;35(21):2746-55.

93. Wu Y, Zhang L, Wang Y, Li H, Ren X, Wei F, vd. Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. Ekim 2014;35(10):9531-8.

94. He Y, Ma H, Wang J, Kang Y, Xue Q. miR-20a-5p inhibits endometrial cancer progression by targeting janus kinase 1. Oncol Lett. Mayıs 2021;21(5):427.

95. Liu JM, Li M, Luo W, Sun HB. Curcumin attenuates Adriamycin-resistance of acute myeloid leukemia by inhibiting the lncRNA HOTAIR/miR-20a-5p/WT1 axis. Lab Investig J Tech Methods Pathol. Ekim 2021;101(10):1308-17.

96. Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Di Bernardo J, Altamura S, Fusco A, vd. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. FEBS Lett. 10 Eylül 2004;574(1-3):1-8.

97. Zhang S, Mo Q, Wang X. Oncological role of HMGA2 (Review). Int J Oncol. Ekim 2019;55(4):775-88.

98. Huang W, Wu X, Xiang S, Qiao M, Cen X, Pan X, vd. Regulatory mechanism of miR-20a-5p expression in Cancer. Cell Death Discov. 16 Mayıs 2022;8(1):262.

99. Wang BR, Chu DX, Cheng MY, Jin Y, Luo HG, Li N. Progress of HOTAIR-microRNA in hepatocellular carcinoma. Hered Cancer Clin Pract. 29 Ocak 2022;20(1):4.

100. Ali T, Grote P. Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes. eLife. 23 Ekim 2020;9:e60583.

101. Wang JY, Yang Y, Ma Y, Wang F, Xue A, Zhu J, vd. Potential regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in osteosarcoma. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. Ocak 2020;121:109627.

102. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. Anticancer Agents Med Chem. 2017;17(2):152-63.

103. Shengnan J, Dafei X, Hua J, Sunfu F, Xiaowei W, Liang X. Long non-coding RNA HOTAIR as a competitive endogenous RNA to sponge miR-206 to promote colorectal cancer progression by activating CCL2. J Cancer. 18 Mayıs 2020;11(15):4431-41.

104. Cantile M, Di Bonito M, Tracey De Bellis M, Botti G. Functional Interaction among lncRNA HOTAIR and MicroRNAs in Cancer and Other Human Diseases. Cancers. 02 Şubat 2021;13(3):570.

105. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. Nat Rev Cancer. Aralık 2007;7(12):899-910.

106. Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, vd. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. Br J Cancer. 01 Aralık 2003;89(11):2104-9.

107. Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M, Goldmann T, vd. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. Mol Carcinog. Temmuz 2007;46(7):503-11.

108. Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. Mol Carcinog. Temmuz 1997;19(3):153-6.

109. Xu J, Fang X, Long L, Wang S, Qian S, Lyu J. HMGA2 promotes breast cancer metastasis by modulating Hippo-YAP signaling pathway. Cancer Biol Ther. 22(1):5-11.

110. Mansoori B, Terp MG, Mohammadi A, Pedersen CB, Ditzel HJ, Baradaran B, vd. HMGA2 Supports Cancer Hallmarks in Triple-Negative Breast Cancer. Cancers. 16 Ekim 2021;13(20):5197.

111. Wu D, Zhu J, Fu Y, Li C, Wu B. LncRNA HOTAIR promotes breast cancer progression through regulating the miR-129-5p/FZD7 axis. Cancer Biomark Sect Dis Markers. 2021;30(2):203-12.

112. Collina F, Aquino G, Brogna M, Cipolletta S, Buonfanti G, De Laurentiis M, vd. LncRNA HOTAIR up-regulation is strongly related with lymph nodes metastasis and LAR subtype of Triple Negative Breast Cancer. J Cancer. 12 Mayıs 2019;10(9):2018-24.

113. Zhang A, Zhao JC, Kim J, Fong KW, Yang YA, Chakravarti D, vd. LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and Drives Castration-Resistant Prostate Cancer. Cell Rep. 06 Ekim 2015;13(1):209-21.

114. Wang W, Yin Z. Diagnostic value of long non-coding RNA H19, UCA1, and HOTAIR as promising biomarkers in human bladder cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2017;10(12):11659-65.

115. Ren MM, Xu S, Wei YB, Yang JJ, Yang YN, Sun SS, vd. Roles of HOTAIR in lung cancer susceptibility and prognosis. Mol Genet Genomic Med. Temmuz 2020;8(7):e1299.

116. Li J, Wang Y, Yu J, Dong R, Qiu H. A high level of circulating HOTAIR is associated with progression and poor prognosis of cervical cancer. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. Mart 2015;36(3):1661-5.

117. Smolle MA, Bullock MD, Ling H, Pichler M, Haybaeck J. Long Non-Coding RNAs in Endometrial Carcinoma. Int J Mol Sci. 04 Kasım 2015;16(11):26463-72.

118. Luo ZF, Zhao D, Li XQ, Cui YX, Ma N, Lu CX, vd. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. World J Gastroenterol. 14 Haziran 2016;22(22):5254-9.

119. Zhao W, Dong S, Duan B, Chen P, Shi L, Gao H, vd. HOTAIR is a predictive and prognostic biomarker for patients with advanced gastric adenocarcinoma receiving fluorouracil and platinum combination chemotherapy. Am J Transl Res. 2015;7(7):1295-302.

120. Zhang L, Song X, Wang X, Xie Y, Wang Z, Xu Y, vd. Circulating DNA of HOTAIR in serum is a novel biomarker for breast cancer. Breast Cancer Res Treat. Temmuz 2015;152(1):199-208.

121. Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, Bak M, Cold S, Burton M, vd. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat. Aralık 2013;142(3):529-36.

122. Gökmen-Polar Y, Vladislav IT, Neelamraju Y, Janga SC, Badve S. Prognostic Impact of HOTAIR Expression is Restricted to ER-Negative Breast Cancers. Sci Rep. 05 Mart 2015;5:8765.

123. Shi SH, Jiang J, Sun L, Zhang W, Zhuang ZG. Dynamic Regulative Biomarker: Long Noncoding RNA (lncRNA) in Metastatic Breast Cancer. Clin Lab. 01 Eylül 2020;66(9).

124. Bie L, Luo S, Li D, Wei Y, Mu Y, Chen X, vd. HOTAIR Competitively Binds MiRNA330 as a Molecular Sponge to Increase the Resistance of Gastric Cancer to Trastuzumab. Curr Cancer Drug Targets. 2020;20(9):700-9.

125. Wang YL, Liu LC, Hung Y, Chen CJ, Lin YZ, Wu WR, vd. Long non-coding RNA HOTAIR in circulatory exosomes is correlated with ErbB2/HER2 positivity in breast cancer. Breast Edinb Scotl. Ağustos 2019;46:64-9.

126. Liu XH, Sun M, Nie FQ, Ge YB, Zhang EB, Yin DD, vd. Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. Mol Cancer. 28 Nisan 2014;13:92.

127. Chen T, Liu Z, Zeng W, Huang T. Down-regulation of long non-coding RNA HOTAIR sensitizes breast cancer to trastuzumab. Sci Rep. 27 Aralık 2019;9:19881.

128. Yang Q, Mei K, Wu H, Tong Q, Nie Y, Ai X, vd. Expression of lncRNA-HOTAIR in patients with breast cancer and its effect on biological function. Int J Clin Exp Med. 2020;13(4):2675-83.

129. Liang H, Huang W, Wang Y, Ding L, Zeng L. Overexpression of MiR-146a-5p Upregulates lncRNA HOTAIR in Triple-Negative Breast Cancer Cells and Predicts Poor Prognosis. Technol Cancer Res Treat. Aralık 2019;18:1533033819882949.

130. Tao S, He H, Chen Q. Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer. J Transl Med. 25 Nisan 2015;13:131.

131. Bai X, Han G, Liu Y, Jiang H, He Q. MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. Temmuz 2018;103:1482-9.

132. Qin X, Zhou M, Lv H, Mao X, Li X, Guo H, vd. Long noncoding RNA LINC00657 inhibits cervical cancer development by sponging miR-20a-5p and targeting RUNX3. Cancer Lett. 01 Şubat 2021;498:130-41.

133. Liu DL, Lu LL, Dong LL, Liu Y, Bian XY, Lian BF, vd. miR-17-5p and miR-20a-5p suppress postoperative metastasis of hepatocellular carcinoma via blocking HGF/ERBB3-NF-κB positive feedback loop. Theranostics. 2020;10(8):3668-83.

134. Wu H, Pang P, Liu MD, Wang S, Jin S, Liu FY, vd. Upregulated miR-20a-5p expression promotes proliferation and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting of TNFRSF21. Oncol Rep. Ağustos 2018;40(2):1138-46.

135. Zhao F, Pu Y, Cui M, Wang H, Cai S. MiR-20a-5p represses the multi-drug resistance of osteosarcoma by targeting the SDC2 gene. Cancer Cell Int. 2017;17:100.

136. Yang H, Chen Z, Liu Z. MiR-20a-5p Negatively Regulates NR4A3 to Promote Metastasis in Bladder Cancer. J Oncol. 2021;2021:1377989.

137. Han J, Hu J, Sun F, Bian H, Tang B, Fang X. MicroRNA-20a-5p suppresses tumor angiogenesis of non-small cell lung cancer through RRM2-mediated PI3K/Akt signaling pathway. Mol Cell Biochem. Şubat 2021;476(2):689-98.

138. Jun KH, Jung JH, Choi HJ, Shin EY, Chin HM. HMGA1/HMGA2 protein expression and prognostic implications in gastric cancer. Int J Surg Lond Engl. Aralık 2015;24(Pt A):39-44.

139. Cui J, Dean D, Hornicek FJ, Yi G, Duan Z. Expression and Clinical Significance of High-Mobility Group AT-hook 2 (HMGA2) in Osteosarcoma. Orthop Surg. Mayıs 2022;14(5):955-66.

140. Liu Y, Fu QZ, Pu L, Meng QG, Liu XF, Dong SF, vd. HMGA2 Expression in Renal Carcinoma and its Clinical Significance. J Med Biochem. Temmuz 2015;34(3):338-43.

141. Li H, Cui Z, Lv X, Li J, Gao M, Yang Z, vd. Long Non-coding RNA HOTAIR Function as a Competing Endogenous RNA for miR-149-5p to Promote the Cell Growth, Migration, and Invasion in Non-small Cell Lung Cancer. Front Oncol. 2020;10:528520.

142. Cai H, Yao J, An Y, Chen X, Chen W, Wu D, vd. LncRNA HOTAIR acts a competing endogenous RNA to control the expression of notch3 via sponging miR-613 in pancreatic cancer. Oncotarget. 16 Mayıs 2017;8(20):32905-17.

143. Luan W, Li R, Liu L, Ni X, Shi Y, Xia Y, vd. Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote malignant melanoma progression by sponging miR-152-3p. Oncotarget. 17 Ekim 2017;8(49):85401-14.