T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

siRNA ARACILI GLUTAMİNAZ (GLS1) İNHİBİSYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNİN KANSEROJENİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Sakine AKAR

1. Danışman
Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2. Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Doktora Tezi

Temmuz 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

siRNA ARACILI GLUTAMİNAZ (GLS1) İNHİBİSYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNİN KANSEROJENİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Sakine AKAR

1. Danışman
Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2. Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-8166 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Temmuz 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunulduğunu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Sakine AKAR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"siRNA aracılı glutaminaz (GLS1) inhibisyonunun meme kanser hücrelerinin kanserojenik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması" adlı **Doktora** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Sakine AKAR

1. Danışman

Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2.Danışman

Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ danışmanlığında Sakine AKAR tarafından hazırlanan "siRNA aracılı glutaminaz (GLS1) inhibisyonunun meme kanser hücrelerinin kanserojenik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

--/--/2020

JÜRİ **İmza**

1. Danışman : Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) …….

2. Danışman : Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) …….

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) …….

Üye : Doç. Dr. Serpil TAHERİ

(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) …….

Üye : Prof. Dr. Serdal ARSLAN

(Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) …….

Üye : Dr. Öğret. Üyesi İzzet YELKOVAN

(Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) …….

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun …….tarih ve ……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, sadece tez çalışmamda değil hayatın her safhasında sabır ve ilgi ile desteklerini esirgemeyen, değerli hocalarım Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ ve Doç.Dr. Zuhal HAMURCU'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda beni destekledikleri için sevgili eşim H. Bayram Akar ve en çok ilgiliye, sevgiye ihtiyaç duyduğu zamanlarda yanında olamadığım, beni hep sevgisiyle rahatlatan sevgili oğlum Mehmet Akif'e teşekkür ederim.

Doktora tezimi TDK-2018-8166 proje kodu ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na (ÖYP) maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Sakine AKAR

Kayseri, Temmuz 2020

siRNA ARACILI GLUTAMİNAZ (GLS1) İNHİBİSYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNİN KANSEROJENİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sakine AKAR

Erciyes Üniveritesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi,

Temmuz 2020

1. Danışman: Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2.Danışman: Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Glutaminaz (GLS1), glutamin bağımlı bazı kanser hücreleri için vazgeçilmez olan glutamin metabolizmasının ilk basamağında yer alan fosfat bağımlı bir enzimdir. Meme kanser hücrelerinde glutamin bağımlılığı alt tiplere göre değişmektedir ve agresif alt tiplerden olan HER2+ ve üçlü reseptör negatif grupta yüksek glutamin metabolik aktivitesi olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında; glutamin bağımlılığı gösteren üçlü reseptör negatif MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun bu hücrelerin proliferasyon, koloni oluşumu, apoptoz, migrasyon gibi kanserojenik özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla; GLS1'i hedefleyen iki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonları, koloni oluşumu, migrasyonları, apoptoz oranları ve hücre döngüsü, sırasıyla annexin-V, yara oluşturma, MTS, klonojenite ve propidyum iyodür (PI) boyama yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre; kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerine göre iki faklı GLS1-siRNA aracılığı ile GLS1 enziminin baskılandığı MDA-MB-231 hücrelerinde, proliferasyonunun, koloni oluşumunun ve migrasyonun azaldığı bulundu. Bununla birlikte GLS1-siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücreler ile kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler arasında apoptoz oranında anlamlı bir değişiklik olmadığı bulundu. Hücre döngüsü analizi ile GLS1-siRNA ile transfekte edilen hücrelerin hücre döngüsünün G0/G1 fazında durduğu tespit edildi. Sonuçlarımız, GLS1 enziminin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin proliferasyonunda, klon oluşumunda,

migrasyonunda ve ayrıca bu hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak hücre döngüsünün G0/G1 evresinde bekletilmesinde de rol oynadığını göstermektedir. Sonuç olarak çalışmamızda, GLS1 siRNA aracılığı ile GLS1'in baskılanmasının, enerji metabolizmasının baskılanmasına ve buna bağlı olarak da hücrelerin proliferasyon oranında azalmaya yol açtığı gösterildi. Böylece bu verilerimiz agresif meme kanserinin tedavisinde; enerji metabolizmasını hedefleyen tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin etkili bir tedavi için önemli olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: GLS1, Glutamin, MDA-MB-231, Enerji metabolizması

INVESTIGATION OF THE EFFECTS ON CANCEROGENIC PROPERTIES OF BREAST CANCER CELLS OF siRNA-MEDIATED GLUTAMINASE (GLS1) INHIBITION

Sakine AKAR

Erciyes University, Institue of Health Sciences

Medical Faculty, Department of Medical Biology

Doctorate Thesis, July 2020

1. Supervisor: Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

2. Supervisor: Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

Glutaminase (GLS1) is a phosphate-dependent enzyme that takes place in the first step of glutamine metabolism, which is indispensable for some glutamine-dependent cancer cells. In breast cancer cells, glutamine dependence varies according to their subtypes and it is stated that there is high glutamine metabolic activity in aggressive subtypes HER2+ and triple negative group. Therefore, in the presented thesis study; It was aimed to investigate the effects of siRNA-mediated GLS1 inhibition on the carcinogenic properties of these cells such as proliferation, colony forming, apoptosis and migration in triple receptor negative MDA-MB-231 cells showing glutamine dependence. For this purpose; The proliferations, migrations, apoptosis and cell cycle of MDA-MB-231 cells transfected with two different GLS1 siRNA targeting GLS1 were analyzed using MTS, clonogenicity, migrations wounding, Annexin V and propidium iodine (PI) methods, respectively. According to our analysis results; It has been found that proliferation, colony formation and migration are reduced in MDA-MB-231 cells, when the GLS1 enzyme is suppressed via two different siRNAs compared to MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA. However, there was no significant change in the rate of apoptosis in MDA-MB-231 cells transfected with GLS1-siRNA compared to the control siRNA transfected cells. Cell cycle analysis determined that the cells cycle of GLS1-siRNA transfected cells was stopped in the G0/G1 phase. Our results show that the GLS1 enzyme plays a role in the proliferation, colony formation, migration of MDA-MB-231 breast cancer cells, as well as in the retention of the cell cycle at the G0/G1 phase by suppressing the proliferation of these cells. As a result in our study, it was

shown in our study that suppression of GLS1 via GLS1 siRNA leads to suppression of energy metabolism and consequently a decrease in the proliferation rate of cells. Thus, in the treatment of aggressive breast cancer, these data are shows that the development of treatment strategies targeting energy metabolism may be important for an effective treatment.

Keywords: GLS1, Glutamine, MDA-MB-231, Energy metabolism

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR VE SİMGELER xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Meme Kanseri 5
2.2. Meme Kanserinin Etyolojisi 6
2.2.1. Demografik özellikler 6
2.2.2. Reprodüktif Faktörler 7
2.2.3. Çevresel Faktörler 7
2.2.4. Yaşam Şekli 8
2.2.5. Genetik Faktörler 8
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması 11
2.3.1. Luminal A Tip Meme Kanserleri 11
2.3.2. Luminal B Tip Kanserler 12
2.3.3. HER-pozitif Meme Kanserleri 12
2.3.4. Bazal Benzeri/TNBC 12
2.4. Meme Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Tümör Supressör ve Onkogenler 13
2.4.1. Tümör Supressör Genler 13
2.4.2. Onkogenler 15
2.5. Meme Kanserinin Temel Özellikleri 16
2.5.1. Proliferatif Sinyallerin Sürdürülmesi 16
2.5.2. İnvazyon ve Metastazın Aktivasyonu 19
2.5.3. Hücresel Ölüme Direnç 21
2.5.4. Genom İnstabilitesi ve Mutasyon 22

2.5.5. İmmüniteden Kaçış 22
2.5.6. Kanserde Bozulan Enerji Metabolizması 23
2.6. Normal Hücrelerde Glutamin Kullanımı ve Metabolize Edilmesi 24
2.7. Kanserde Glutamin Metabolizması 26
2.8. Glutaminaz ve Kanserdeki rolü 28
2.9. Glutaminaz İnhibitörleri 29
2.10. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA) 30
2.10.1. Küçük interferans RNA'lar (siRNA) 31
2.10.2. siRNA Temelli Kanser Tedavileri 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. GEREÇLER 33
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 33
3.1.2. Sarf Malzemeler 34
3.1.3. Kitler 34
3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar 35
3.2. YÖNTEM 36
3.2.1. Kullanılan Hücre Hattı 36
3.2.2. Hücre Sayımı 37
3.2.3. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu 38
3.2.4. Western Blot Analizi 38
3.2.5. Proliferasyon Analizi 39
3.2.6. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay) 40
3.2.7. Yara iyileşme Testi (Wound Healing Scratch Assay) 40
3.2.8. Apoptoz Analizi 40
3.2.9. Hücre Döngüsü Analizi 40
3.2.10. İstatistiksel Analiz 41
4. BULGULAR 42
4.1. siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun GLS1 protein düzeyine etkisinin belirlenmesi 42
4.2. GLS1'in GLS1-siRNA aracılı inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu azaltmaktadır 43
4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1-siRNA aracılı GLS1'in inhibisyonu hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini azaltmaktadır 45

4.4. GLS1-siRNA aracılı GLS1'in inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu azaltmaktadır 46
4.5. GLS1'in siRNA aracılı inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz oranını etkilemez 49
4.6. Hücre Döngüsü Analizi 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 55
6. KAYNAKLAR 59
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER

ASCT2 : Alanin, serin, sistein transporter 2 membran proteini

ATM : Ataxia Telengiectasia Mutated gen

Bcl-2 : B hücreli lenfoma 2 proteini

BPTES : Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide

BRCA1 : Meme kanser yatkınlık geni 1

BRCA2 : Meme kanser yatkınlık geni 2

BSA : Sığır Serum Albümin

CB-839 : Telaglenastat GLS1 küçük molekül inhibitörü

CDH1 : E-Kadherin geni

CD44 : Hücre yüzey glikoproteini

CD24 : Hücre yüzey glikoproteini

CHEK2 : CHK2 protein kodlayan tümör süpressör geni

CHK2 : Kontrol noktası kinaz 2 proteini

CK : Sitokeratin

c-myc : Proto-onkogen

CLDN3 : Klaudin-3

DCIS : Duktal karsinoma *in sitü*

DDSB : DNA çift iplik kırığı

DMEM F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12

DMSO : Dimetil sülfoksid

EGFR : Epidermal büyüme faktör reseptörü

E2F : Transkripsiyon Faktörü

EMT : Epidermal Mezenkimal Dönüşüm

ER : Östrojen Reseptörü

ERBB2 : Reseptör tirozin kinaz

GAC : GLS splice varyantı

GATA3 : GATA bağlayıcı protein 3

GLS : Glutaminaz

HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2

IHK : İmmünohistokimya

KGA : Böbrek Tipi Glutaminaz

Ki-67 : Proliferasyon belirteci

MAPK : Mitojenle aktive olan protein kinaz

MBC **:** Metaplastik meme kanseri

MRE11 **:** Mayotik Rekombinasyon 11 homolog geni

mTOR **:** Rapamisin'in memeli hedef proteini

MTS **:** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium tuzu

MUC1 **:** Polimorfik epitelyal musin veya epitelyal membran antijeni

NBS1 **:** Nijmegen Kırılma Sendromu protein 1

PI3K **:** Fosfotidil Inozitol 3 Kinaz

PR **:** Progesteron Reseptörü

PTEN **:** Fosfataz ve Tensin Homoloji geni

PVDF **:** Polyvinylidene Difluoride

TNBC **:** Üçlü reseptör negatif meme kanser alt tipi

TP53 **:** Tümör süpresör P53 geni

RAD50 **:** Çift iplik kopmalarını onaran protein

Ras **:** Rat sarcoma viral onkogen

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

SDS **:** Sodyum dodesil sülfat

SLC **:** Solüt taşıyıcı gen ailesi

SNAI1 **:** Çinko parmaktranskripsiyonel repressör 1

STAT1 **:** Sinyal transdüktörü ve transkripsiyon faktör 1 aktivatörü

TBS **:** Tris buffer saline

TBS-T **:** Tris buffer saline- Tween 20

TCA **:** Trikarboksilik asit döngüsü

TNF-α **:** Tümör nekrozis faktör

TWIST1 **:** Basic-helix-loop-helix transkripsiyon faktörü

VIM **:** Vimentin geni

ZEB **:** Zinc finger E-box homeobox 1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. GLOBOCON 2018 Meme kanseri insidans ve mortalite oranları 6
Şekil 2.2. Herediter meme kanserinin genetik nedenleri 9
Şekil 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve Bazal Benzeri/TNBC alt tipleri 13
Şekil 2.4. L-Glutamin moleküler formülü 25
Şekil 2.5. Glutamin sentaz ve Glutaminaz enzimleri ile Glutamin ve Glutamat arasındaki sentez 25
Şekil 2.6. Glutamin ve Glutamat'ın rol aldığı biyosentetik olaylar 26
Şekil 2.7. Kanser hücrelerinde Glutamin metabolizması ve myc üzerinden düzenlenmesi. "Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach" çalışmasından uyarlanmıştır 27
Şekil 2.8. GLS1'in varyantı GAC'ın küçük molekül inhibitörleri 30
Şekil 3.1. Thoma lamı 37
Şekil 4.1.1. siRNA'larla transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki GLS1 protein ifadelerinin western blot analizi ile belirlenmesi. 42
Şekil 4.1.2. GLS1 ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1 protein ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması 43
Şekil 4.2.1. siRNA'ların canlılık üzerine etkilerini gösteren Eliza-Reader sonuçları 44
Şekil 4.2.2. MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranları 44
Şekil 4.3.1. GLS1 enziminin susturulması ile koloni oluşturma potansiyellerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması 45
Şekil 4.3.2. GLS1 siRNA uygulaması MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelini azaltır 46
Şekil 4.4.1. GLS1susturulmasının MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu üzerine etkileri. Yara iyileşmesi analizi ile hücre göçü ölçüldü. Belirtilen siRNA'lar ile transfekte edilmiş ve hücre doluluğu tamamlanmış kültür kabının merkezinde yara oluşturuldu. Işık mikroskobu ile 0., 24. ve 48. saatlerde görüntülendi. 47
Şekil 4.4.2. GLS1'in siRNA aracılı inhibisyonu, MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunu azaltır 48

Şekil 4.4.3. GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde integrin β1 ekspresyon seviyesi 49
Şekil 4.5.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'in baskılanması, MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ile hücre ölümünü etkilememektedir 50
Şekil 4.5.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'i baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde total kaspaz-3 protein ekspresyonu. 51
Şekil 4.5.2. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'i baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde, apoptotik proteinlerden olan total kaspaz-3'ün protein seviyesini değiştirmez 51
Şekil 4.6.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'in baskılanmasının, MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü evreleri üzerine etkisi 52
Şekil 4.6.2. İki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde p21 ekspresyonu 54

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında bütün kanser vakalarının % 23'ünü ve kanser nedeniyle ölümlerin % 14'ünü oluşturmaktadır (Jemal ve ark., 2011). Kompleks heterojen karakterde olan meme kanserinin bugüne kadar tanımlanmış 30'dan fazla histopatolojik alt tipi bulunmaktadır. Ayrıca meme kanserinin, Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2) ekspresyon durumuna göre tanımlanmış moleküler alt tipleri bulunmaktadır (Anderson ve ark., 2014).

Kanser, kontrol edilemeyen hücre çoğalması olarak literatürde yer almaktadır. Ancak kanserin kompleks neoplastik bir hastalık geliştirmek için çok basamaklı bir gelişim süreci göstermesi gerekmektedir. Kanserin bugüne kadar tanımlanmış altı temel özelliği bulunmaktadır. Bunlar; proliferasyon sinyallerinin sürdürülmesi, büyüme supressörlerinin baskılanması, hücre ölümüne direnç kazanılması, replikatif ölümsüzlüğün kazanılması, anjiyogenez ve metastaz olarak belirlenmiştir (Hanahan ve Weinberg., 2011).

Kronik ve kontrolsüz hücre çoğalması sergileyen neoplastik hastalıklar sadece hücre çoğalmasını kontrol eden mekanizmalardaki bozulmaları içermez, aynı zamanda hücre büyümesi ve bölünmesini destekleyebilmek için enerji metabolizmasında da bozulmalara neden olmaktadır. Bozulmuş enerji metabolizması kanserin ortaya çıkarılmış temel özelliklerinden biri olarak bilinmektedir (Hanahan ve Weinberg., 2011).

Tümörlerde bozulan enerjimetabolizmasının keşfi 1920'lerde Otto Warburg'un çalışmalarına dayanmaktadır. Warburg, kanser hücrelerinin artan bir glikoliz sergilediğini ve üretilen pirüvatın çoğunun oksidatif fosforilasyon için kullanılan trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü beslemekten ziyade laktata fermente edildiğini belirlemiştir. Bu olgunun oksidatif şartlarda bile gerçekleştiği belirlenmiştir (Warburg

ve ark., 1972). Çoğu kanser hücresinin merkezi metabolizmasında meydana gelen ikinci bir değişim de glutamin metabolizmasındaki bozulmadır. Glutamin, nükleotidlerin, birçok amino asidin ve glutatyonun sentezi için glukozun yerine TCA döngüsünü karbon ve azot kaynağı olarak beslemektedir (De Berardinis ve ark., 2007). Glutamin, glutaminolizis üzerinden yüksek oranda prolifere olan hücrelerin biyosentetik, enerjetik ve redüktif ihtiyaçlarını karşılamak için kullanılmaktadır (De Berardinis ve Cheng, 2010). Glutaminaz (GLS) bir amidohidrolazdır ve glutamini glutamata dönüştürerek biyosentetik reaksiyonlar için azot sağlayan glutaminolizisde ilk basamakta yer alan bir enzimdir. Glutaminaz 1 (GLS1) ve Glutaminaz 2 (GLS2) olarak adlandırılan iki izoformu bulunmaktadır (Aledo ve ark., 2000; Daye ve Wellen., 2012). GLS1, böbrek tipi glutaminaz (KGA), glutaminaz C (GAC) ve glutaminaz M (GAM) olmak üzere üç varyantdan oluşan fosfat bağımlı bir enzimdir (Katt ve Cerione., 2014). GLS1 karaciğer dokusu dışında bütün memeli dokularında ifade edilmektedir ve çok sayıda kanser tipinde invaziv aktiviteler ve tümör büyümesi ile ilişkilidir (Szeliga ve ark., 2014).

Glutaminolizis'in ya da GLS1 aktivitesinin inhibisyonubaş ve boyun (Yang ve ark., 2019), kolorektal (Huang ve ark., 2014), yumurtalık (Yuan ve ark., 2015) ve hepatoselluler karsinom (Wang ve ark., 2016) gibi kanser hücrelerinde proliferasyonu ve Xenograft tümör modellerinde (Jacque ve ark., 2015; Qiu ve ark., 2019) tümör büyümesini azaltırken beraberinde apoptozu da indüklediği gösterilmiştir (Hensley ve ark., 2013; Kett ve Cerione., 2014; Matre ve ark., 2016; Szeliga ve ark., 2014). Ayrıca glutamin sınırlamasının hücresel büyümeyi baskıladığı, hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu belirlenmiştir (Ye ve ark., 2016). Gross ve ark. (2014)'nın, üçlü reseptör negatif meme kanser (TNBC) hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerinde glutamin kullanan enzim ve taşıyıcılar üzerinde çoklu sitotoksik etkiler gösteren küçük molekül inhibitörü CB-839 uygulanarak glutamin kullanımının bloke edilmesi ile apoptozda artış olduğu gözlenmiştir. Ancak Lampha ve ark. (2017), çalışmalarında, TNBC hücre hatlarında shRNA aracılı GLS1 inhibisyonu ile glutamin metabolizmasını baskılayarak, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde apoptoz oranının değişmediğini, fakat doksisiklin indüksiyonu ile apoptozun arttığını göstermişlerdir. Literatürbilgisine göre; GLS1'in hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkileri dışında, kanser hücrelerinin koloni oluşumu, migrasyon gibi diğer özellikleri ve kanser hücrelerinin bu özellikleri kazanmasında rol oynayan sinyal

yolakları üzerindeki etkileritam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden sunulan çalışmada hücrenin enerji metabolizmasında yer alan önemli bir enzim olan GLS1'in, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde siRNA aracılığıyla hücrelerin proliferasyon, klonojenite, migrasyon ve apoptozdan kaçış gibiözellikler kazanmasında olası etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Böylece, GLS1'in, agresif meme kanser hücrelerinde bilinmeyen fonksiyonlarının ve bu hücrelerde teröpatik bir hedef olup olamayacağının ortaya çıkartılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

Meme kanseri, gelişmiş ülkelerin çoğunda kadınlar arasında en sık görülen neoplazm olup, yeni teşhis edilen malignitelerin üçte birini oluşturmaktadır (Spitale ve ark. 2009). Farklı meme tümör alt tiplerinin farklı risk faktörleri, klinik görünümleri, histopatolojik özellikleri, sonuçları ve sistemik tedavilere farklı yanıtı vardır (Desmedt ve ark., 2009; Sotiriou ve Pusztai., 2009). Bu nedenle, meme kanserinin klinik olarak ilgili alt tiplere evrelendirilmesi gereklidir. Evrelendirmede, immünohistokimyasal (IHK) belirteçler, tümör boyutu, tümör derecesi, nodal tutulumu, histolojik tip ve cerrahi sınırlar prognoz, tahmin ve tedavi seçimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Vallejos ve ark., 2010). 1970'lere kadar meme kanseri, östrojen reseptörünün (ER) durumuna göre iki alt türe ayrılmaktaydı. Yeni teknolojilerin ortaya çıkması ve karmaşık tümör oluşum mekanizmalarının çalışmalarla yavaş yavaş ortaya çıkarılması ile yeni biyobelirteçler ve yeni alt tipler tanımlanmıştır. Bu, bir yandan, daha doğru hastalık yönetiminde bize yardımcı olurken, öte yandan meme kanseri heterojenliğine yönelik anlayışımızı karmaşıklaştırmaktadır.

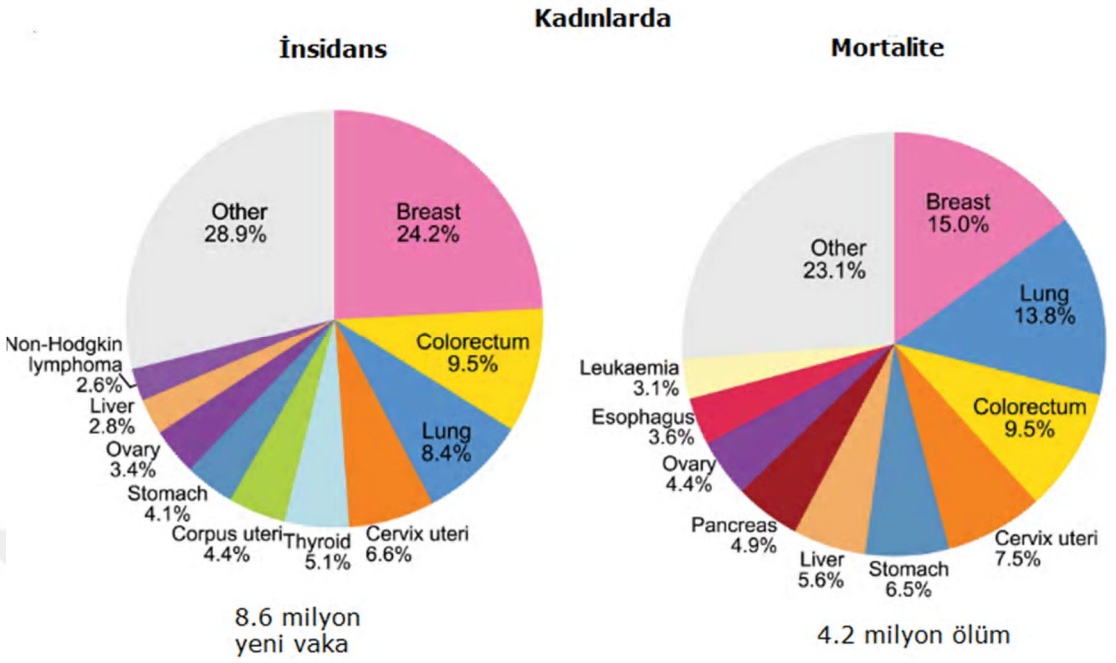
Geçtiğimiz 10-15 yılda tedavi seçenekleri, özellikle kemoterapi ve radyoterapiden doğan yan etkileri azaltmak için doğrudan tedavi denilen moleküler heterojenitenin hedeflendiği daha biyolojik yaklaşımlara yönelmiştir. Günümüz modern tedavilerine yön veren meme kanserinin moleküler heterojenitesine rağmen bölgesel tümör yükü ya da metastatik paternlerin etkileri gibi bazı özellikler tedaviyi etkilemektedir. Erken evre meme kanserleri yani memede ya da lenf nodlarında sınırlı kalan kanserler tedavi edilebilmektedir. Tedavi seçeneklerinin iyileştirilmesi bu grupta yer alan hastaların % 70-80'inin tedavi şansını arttırmaktadır. Tersi olarak ileri evre yani metastatik meme kanserleri mevcut tedavilerin kullanımı ile tedavi edilebilir görünmemektedir. Ancak ileri evre kanserler, yaşam kalitesini arttırmak, tedavideki toksisiteyi düşürecek semptomları kontrol etmek ve sağkalımı arttırmak için tedavinin ana hedefleri olarak belirlendiği takdirde tedavi edilebilir görünmektedir (Harbeck ve ark., 2019). Ancak

meme kanserindeki heterojenite ve uygulanan tedaviye karşı hastalarda meydana gelen direnç her durumda tedavi olasılığını ve sağkalımı olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir. Özellikle metastatik alt tiplerde hastalığın yeniden ve daha şiddetli bir şekilde nüks etmesi bu gruptaki hastaların tedavisi konusunda mevcut durumu daha da kötüleştirmektedir. Bu anlamda meme kanserinin erken evrede teşhisi için yeni ve daha etkili belirteçlere ihtiyaç duyulurken mevcut hastaların tedavisi içinde yeni hedefli tedaviler gerekmektedir.

2.1. Meme Kanseri

Kanser normal hücrelerin genellikle kanser öncesi bir lezyondan kötü huylu bir tümöre ilerleyen çok aşamalı bir süreçte tümör hücrelerine dönüştürülmesinden ortaya çıkmaktadır. Meme kanserlerinin çoğu ya süt üretiminin yapıldığı lobüllerde ya da lobüllerle meme başı arasında bağlantıyı sağlayan kanallarda başlamaktadır (Breast Cancer Facts ve Figures 2017-2018). Hücrelerdeki bu değişiklikler kişinin genetik faktörleri ile biyolojik, kimyasal ve fiziksel karsinojenleri içeren ajanlar arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Nüfus artışı ve yaşlanan nüfus gibi küresel ekonomik ve sosyodemografik eğilimler ile ilgili değişiklikler, yaşam biçimlerinde ve çevresel risklere eşlik eden değişiklikler düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu kadar yüksek gelirli ülkelerde de kanser yükünü arttırmaktadır (Bellanger ve ark., 2018).

GLOBOCAN 2018 verilerine göre tüm kanser tipleri ile kıyaslandığında meme kanseri % 11.6'lık bir oranla akciğer kanserinden sonra ikinci sıraya yerleşmektedir. Açıklanan veriler meme kanserinin kadınlar arasında % 24.2'lik görülme sıklığı ve % 15'lik ölüm oranı ile ilk sırada yer alan kanser türü olduğunu göstermektedir (Şekil 2.1) (Bray ve ark., 2018).



Şekil 2. 1. GLOBOCON 2018 Meme kanseri insidans ve mortalite oranları (Bray ve ark., 2018).

2.2. Meme Kanserinin Etyolojisi

Meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan etmenlerin tamamı belirlenebilmiş değildir, ancak yapılan deneysel ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bilgilere göre demografik nedenler, reprodüktif faktörler, çevresel faktörler, genetik faktörler ve yaşam şeklinin meme kanseri etiyolojisinde rol oynadığı belirtilmiştir (Majeed ve ark., 2014; Sen ve Aygın., 2014).

2.2.1. Demografik özellikler

Çoğu kanser tipi yaşlılık hastalığı olarak görülmektedir. Meme kanseri insidansı yaş ile artış göstermektedir ve yaklaşık her 10 yılda insidans ikiye katlanmaktadır. Meme kanserlerinin neredeyse % 80'i 50 yaşını aşmış kadınlarda teşhis edilmektedir (McPherson ve ark., 2000). 25 yaşından önce meme kanseri görülme insidansı oldukça düşükken 45 yaş ve üstünde artan yaş ile birlikte insidans 100 kat bir artış göstermektedir (Hulka ve Moorman., 2001).

Cinsiyet faktörünün de meme kanseri gelişiminde önemli bir etmen olduğu meme kanser insidanslarına bakılarak anlaşılmaktadır. Erkeklerde meme kanseri teşhisi

yapılmasına rağmen kadın meme kanserlerinden oldukça düşük bir orana sahip olduğu görülmektedir (Losurdo ve ark., 2017). Bu durumun ise kadınlarda hormonların değişkenliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

2.2.2. Reprodüktif Faktörler

Erken menarş yaşı, ilk canlı doğum yaşı, menapoz yaşı, emzirme süresi ve hamilelik sayısı gibi faktörler hormon maruziyet sürelerini etkilediğinden meme kanserinin etiyolojisinde yer alan etmenler arasındadır (Feigelson ve Henderson., 1996; Kelsey ve ark., 1993). İlk menarş yaşı 12 ve altında olan kadınlarda, 14 yaş ve sonrasında menarş başlamış kadınlara oranla meme kanseri gelişme olasılığı % 10 ila 20 arasında daha fazladır (Berkey ve ark., 1999; Titus-Ernstoff ve ark., 1998). Bu olgunun muhtemel nedeninin ise erken menstrual döngü nedeniyle meme epitelinin uzun süre östrojen ve progesteron hormonlarına maruz kalmasından kaynaklandığı şeklide ifade edilmiştir (Bernstein., 2002). Canlı doğum ile sonuçlanan hamilelik sayındaki artış özellikle ER+ meme kanser riskini azaltmaktadır (Nelson ve ark., 2012). Hamilelik nedeniyle risk oranınındaki azalmanın muhtemel nedeninin hamilelik boyunca ve sonrasında meme dokusunda meydana gelen farklılaşma olarak düşünülmektedir (Verma ve ark., 2012). Yukarıda belirtilen durumun tersi olarak doğum sayısındaki artış menapoz sonrasında üçlü negatif meme kanseri (TNBC) görülme ihtimalini arttırabilmektedir. Ancak geciken ilk doğum yaşı ve ilk menstürasyon yaşındaki her bir yıllık artış meme kanser riskini sırasıyla % 1.7 ve % 5 oranında arttırmaktadır (Toriola ve Colditz., 2013).

2.2.3. Çevresel Faktörler

Meme kanseri ile ilgili belirli risklerde yalnızca sınırlı veri bulunmaktadır. Hiroşima veya Nagazaki nükleer patlamalarına maruz kalan kadınların uzun süreli izlenmesi, özellikle ergenlik döneminde maruz kalan kadınlar için meme kanseri riskinde bir artış olduğunu göstermektedir (Tokunaga ve ark., 1987). Meslek ve meme kanseri ile ilgili sistematik incelemeler azdır ve bu da seçilen meslekler ve belirli kimyasal ve fiziksel maruz kalma risklerinin arttığını göstermektedir. Gece çalışması sırasında sirkadiyen ritmin bozulması ve gece çalışmasının meme kanseri ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda, ağırlıklı olarak geceleri çalışan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı belirtilmiştir (Davis ve ark., 2001; Schernhammer ve ark., 2001).

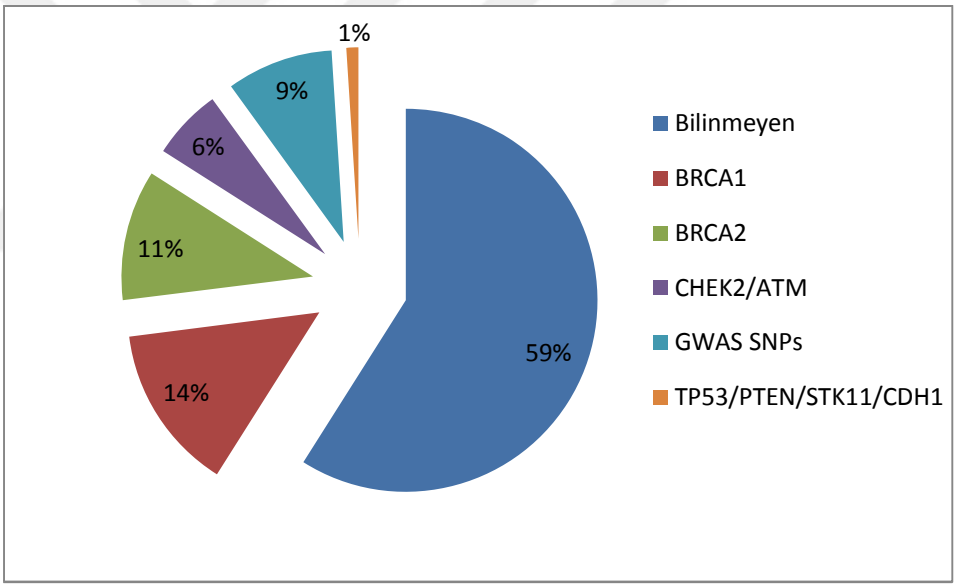
2.2.4. Yaşam Şekli

Günlük hayattaki rutinlerimizin, beslenme alışkanlıklarımızın kısacası yaşam şeklimizin meme kanseri üzerinde etkileri mevcuttur. Hızlı büyüme ve daha yüksek yetişkin boyları, kısmen, erken yaşlarda toplam gıda alımını yansıtan risk ile ilişkilidir (Harvie ve ark., 2015). Aynı zamanda yüksek bir toplam kalori alımına bağlı olan veya kalori harcamasıyla dengelenmeyen bir yüksek vücut kitlesi, menopoz sonrası meme kanseri için risk faktörüdür. Toplam yağ kadar doymuş hayvansal yağlar da muhtemel riski arttırmaktadır (Glade., 1999). Yüksek et tüketiminin, özellikle kırmızı veya kızartılmış/yanmış etlerin, daha yüksek meme kanseri riski ile ilişkili olduğuna dair belirgin tutarlı kanıtlar vardır. Alkol tüketiminin, meme kanseri riskinde hafif bir artışla ilişkili olduğu göreceli olarak tutarlı bir şekilde bulunmuştur (Smith-Warner ve ark., 1998). Danaei ve ark. (2005), meme kanser ölümlerinin % 21'inin, alkol tüketimi, obezite ve fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Sigara kullanımı ise, özellikle ergenlik döneminde ve öncesinde sigara kullanmaya başlayan kadınlarda meme kanseri gelişimi için orta düzeyde bir risk oluşturur. Ancak, meme kanseri aile öyküsü olan kadınlarda bu riskin daha fazla olduğu vurgulanmıştır (Jones ve ark., 2017).

2.2.5. Genetik Faktörler

Meme kanserleri, ailesel ve sporadik vakalar şeklinde sınıflandırılır. Ailesel vakalar daha çok hastanın diğer kadın akrabalarında görülür ve kalabalık olan ailelerde, ailede bulunan kadınların % 50'sinden fazlasında meme kanseri görülebilir. Sporadik vakalarda ise tersine aile öyküsü olmayan bireylerde görülmektedir (Nathanson ve ark., 2001). Meme kanseri duyarlılığı genellikle sınırlı penetrasyon ile otozomal dominant olarak kalıtılır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 27'si genetik yatkınlıkla ilişkilidir (Peto ve Mack., 2000). Bununla birlikte meme kanserlerinin % 5-10'luk kısmı yüksek penetrans genleri ile otozomal dominant bir modelle kalıtılan ailesel meme kanserlerinin bir alt grubu olan herediter meme kanserlerinden oluşmaktadır (Hall ve ark., 1990; Newman ve ark., 1988). Her ne kadar çeşitli genetik faktörler meme kanseri insidansına katkıda bulunsa da, kalıtsal meme kanseri vakalarının yaklaşık % 40'ı dominant otozomal yöntemle kalıtılan meme kanser yatkınlık geni 1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2)genlerindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Şekil2.2) (Cobain ve ark., 2016).

BRCA1 ve BRCA2 genleri, ailesel meme ve yumurtalık kanseri sendromları 1 ve 2'nin gelişiminden sorumlu en önemli meme kanseri duyarlılık genleridir. Tüm meme kanserlerinin % 3-6'sının gelişimini oluştururlar. Her iki protein de yapısal olarak ilişkisiz olsa da, çift iplik kırıklarının (DDSB) onarımına katkıda bulunan büyük multiprotein komplekslerinin önemli bir bileşenidir (Li ve Greenberg., 2012). Her iki gendeki patojenik mutasyonların sıklığı, dünya genelindeki populasyonlar arasında değişmektedir ve Ashkenazi Yahudi nüfusunda en yüksektir ve genel kadın nüfusunun % 2.5'ini etkilemektedirler (Warner ve ark., 1999). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının taşıyıcıları için 80 yaşına kadar olan kümülatif riskin meme kanseri için sırasıyla % 90 ve % 41'e ulaştığı gösterilmiştir (Offit., 2006).



Şekil 2.2. Herediter meme kanserinin genetik nedenleri (Eccles ve ark., 2013).

Yüksek meme kanseri riski taşıyan diğer yüksek penetran genlerde kalıtsal mutasyonlar çok nadirdir ve genellikle ilişkili genetik sendromların klinik ve histopatolojik özelliklerini yerine getiren vakalarda analiz edilir. Bu uygulama günümüzde yüksek riskli bireylerde yeni nesil sekanslama (NGS) analizlerinin uygulanmasıyla değiştirilmektedir.

Nadir kalıtsal varyantların aksine, bu genlerdeki somatik mutasyonların sporadik meme kanserinde sık sürücü mutasyonlarını temsil ettiği ilginçtir. Meme kanseri, p53 geninde

kalıtsal bir mutasyonun neden olduğu kansere yatkın bir durum olan Li-Fraumeni sendromundan (LFS) etkilenen kadınlarda görülen en yaygın kanser tipidir (Gonzalez ve ark., 2009). LFS bireylerde yaşam boyu meme kanseri gelişimi riski 60 yaşına kadar % 49'a kadar yükselir. LFS hastalarındaki meme tümörleri, ER ve PR pozitifliği veya HER2/Neu pozitifliği ile çoğunlukla duktal karsinomlardır (DCIS) (Masciari ve ark., 2012).

Yaşam boyu meme kanseri gelişme riski yüksek olan BRCA1/BRCA2 genlerindeki mutasyonlar daha az sıklıkta görülür. Bir hücre adezyon molekülünü kodlayan, epitelyal kaderin geni (CDH1) mutasyonları kalıtsal yaygın mide kanserine yatkınlığı olan ailelerin % 30-40'ında tanımlanmıştır. CDH1 mutasyonlarının kadın taşıyıcılarının 75 yaşına kadar kümülatif meme kanseri gelişimi riski % 52'dir (Kaurah et al., 2007). 45 yaşından sonra lobüler meme kanseri, CDH1 mutasyon taşıyıcılarında sık görülen bir meme tümör tipidir (Schrader ve ark., 2011).

Fosfataz ve tensin homolog (PTEN) geni, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfatı hedefleyen bir fosfatazı kodlar. PTEN'de kalıtsal heterozigot mutasyonlar, yaşam boyu meme kanseri riskinde % 25-50 artış gösteren nadir bir çoklu sistem hastalığı olan Cowden sendromu olan bireylerde karakterize edilmiştir (Pilaski ve ark., 2013).

Orta penetrasyona sahip meme kanseri duyarlılığı genlerinden biri de, DNA hasarına yanıt olarak çeşitli protein substratlarını (tümör supressör protein p53 veya BRCA1 dahil) fosforile eden kontrol noktası kinaz 2 proteinini (CHK2) kodlayan, kontrol noktası kinaz 2 tümör supressör genidir (*CHEK2*). Cybulski ve ark. (2004) tekrarlayan *CHEK2* varyantlarının artan meme, kolorektal, prostat veya tiroid kanseri riski de dahil olmak üzere çoklu kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Diğer meme kanseri duyarlılığı genleri epizodik olarak rapor edilmiştir. Çift iplik kırınım tamirinden sorumlu çift iplik kırınımı tamir nükleazı (*MRE11*), çift iplik kırınımı tamir proteini RAD50 (*RAD50*) ve Nijmegen kırık sendromu 1 (*NBN*) genleri, DDSB onarımı ve Ataxia Telangiectasia Mutated/serin treonin kinaz (ATM) aktivasyonu sırasında DNA iplikçiklerinin işlenmesi için gereken heteromerik MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) komplekslerini kodlar. Birçok çalışmada, yüksek riskli meme kanseri hastalarında sadece sınırlı sayıda mutasyon taşıyıcısı tespit edilmiştir (Kleibl ve Kristensen., 2016).

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

Meme kanseri tek bir değişkene bağlı olmayan farklı klinik davranışlar sergileyen heterojen bir hastalık grubudur (Ali ve ark., 2014). Modern onkolojik tedavinin nihai hedefi kişisel tümördür, tümör biyolojisine dayalı hasta prognozunun daha kesin bir şekilde belirlenmesi ve bireysel tümör büyümesinin altında yatan moleküler sapmalara yönelik hedefli tedavi için fırsatın belirlenmesidir. İşlem hacmi yüksek olan moleküler teknikler hasta yönetiminde kişiye yönelik tedavi fırsatı sunmaktadır. Ancak bu tekniklerde standart yöntemlerle kıyaslandığında oldukça maliyetli olması nedeniyle klinik kullanımda sınırlamalara neden olmaktadır. Meme kanserinin başlıca karekterizasyonu hala histolojik alt tip, tümör evresi ve büyüme oranı değerlendirilerek yapılmaktadır. Perou ve ark. (2000) yılında 38 invaziv meme kanserinin bir serisini DNA mikroarray gen ekspresyon analizi yaparak sınıflamışlardır. Bu sınıflandırma ile meme kanserinin moleküler 4 alt tipini tanımlamışlardır. Bu alt tipler; Luminal (Luminal A ve B), İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2 pozitif (HER2 pozitif) ve Bazal Benzeri'dir (Tablo 2.1 ve Şekil 2.3).

Tablo 2.1; Meme Kanseri Alt tiplerinin gösterimi

MemeKanserinin Moleküler alt tipleri	**Hormon Reseptör Durumu**
Luminal A	ER(+), PR(+), HER2(-)
Luminal B	ER(+), PR(+), HER2(+,-)
HER2 (+)	ER(+), HER2 over-eksprese
Bazal Benzeri	ER(-), PR(-), HER2(-)

2.3.1. Luminal A Tip Meme Kanserleri

Luminal kanserler proliferasyonla ilişkili genlerin ekspresyonuna dayanan keyfi olarak iki alt gruba ayrılabilen sürekli bir spektrum oluşturur. Luminal A tip, invaziv meme kanserilerinin % 50'sini oluşturmaktadır. Proliferasyonla ilişkili genlerin düşük ekspresyonu ve ER ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu ile yani ER/PR pozitif, HER2 negatif şeklinde düşük evreli tümörlerdir. Düşük moleküler ağırlığa sahip sitokeratin

ifade eden tubular ve kribriyoform gibi özel tipte kanserleri içermektedir (Prat ve ark., 2013; Weigelt ve ark., 2010).

2.3.2. Luminal B Tip Kanserler

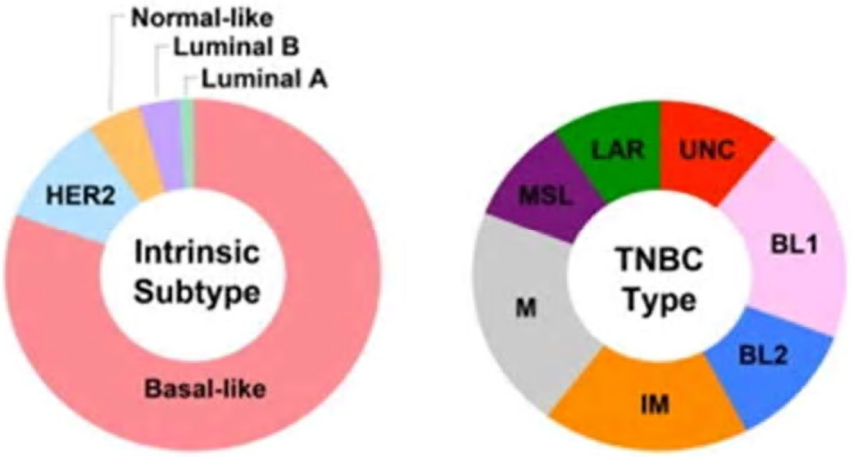
İnvaziv meme kanserlerinin % 20'sini oluşturmaktadır. ER/PR pozitif, HER2 ekspresyonu bakımından ise değişken bir grup oluşturmaktadır. Ki-67 ekspresyon indeksi ve histolojik evresi Lumal A tipi kanserlerden yüksektir. Proliferasyonla ilişkili gen ekspresyonları yüksek, kötü prognoz ile seyreden yüksek evredeki kanserlerdir (Ades ve ark., 2014; Cheang ve ark., 2009; Weigelt ve ark., 2010).

2.3.3. HER-pozitif Meme Kanserleri

Bu tip kanserler, HER2 zengin pozitif ve bazal benzeri/üçlü reseptör negatif şeklinde iki ana gruba ayrılan biyolojik olarak farklı çeşitlilikte oluşumlar sergilemektedir. HER2 zengin pozitif grup 17q12 kromozomu üzerindeki HER2 amplikonu ya da ilgili yolaklarla ilişkili genlerin ve HER2 aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. İnvaziv meme kanseri olgularının % 20-30'unu oluşturmaktadır (Blamey ve ark., 2010). Bu grup içerisindeki tümörin % 80 den fazlası HER2 gen amplifikasyonu ya da aşırı ekspresyonu göstermektedir (Provenzano ve ark., 2018).

2.3.4. Bazal Benzeri/TNBC

Bazal benzeri meme kanserleri, yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler (CK5 ve 14), P-kadherin ve epidermal büyüme faktörü reseptörü dahil bazal/miyoepitelyal hücreler tarafından eksprese edilen genlerin yukarı regülasyonu ile karakterize edilen tipik olarak yüksek dereceli TNBC'dir (Weigelt ve ark., 2010). Bazal benzeri ve TNBC terimleri birbirinin yerine kullanılmıştır; ancak, tüm TNBC'ler bazal tipte değildir (Lehmann ve ark., 2011; Lehmann ve ark., 2016). Gen ekspresyon analizleri kullanılarak her biri kendi içerisinde benzersiz biyoloji sergileyen farklı TNBC alt tipleri tanımlanmıştır. Altı TNBC alt tipi, iki bazal benzeri (BL1 ve BL2), bir immünmodülatör (IM), bir mezenkimal (M), bir mezenkimal kök benzeri (MSL) ve bir lüminal androjen reseptörü (LAR) alt tipini içerir (Şekil 2.3) (Lehmann ve ark., 2011).



Şekil 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve Bazal Benzeri/TNBC alt tipleri (Mayer ve ark., 2014).

2.4. Meme Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Tümör Supressör ve Onkogenler

Meme kanserlerinde bulunan genetik değişimlerin büyük çoğunluğu iki kategoriye ayrılabilir; sağkalımı, büyümeyi ve bölünmeyi uyaran proto-onkogenlerdeki fonksiyon kazanımı mutasyonları, DNA tamirini ve hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonunu destekleyen ve normal olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını engelleyen tümör süprössör genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonlarıdır.

2.4.1. Tümör Supressör Genler

Tümör örneklerinin kullanıldığı geniş genom analizi çalışmaları ile meme kanserinin ilerlemesinde yönlendirici rol oynayan mutasyonları tanımlanmıştır (Stratton ve ark., 2009). Tümörü teşvik eden mutasyonların gelişimi, genomik DNA bütünlüğünü kontrol eden DNA onarım yollarındaki kusurları olan hücrelerde hızlanır. Bu yolların kritik bir anti-kanser bariyerini temsil ettiği öne sürülmüştür (Bartek ve ark., 2007). İlginç bir şekilde, meme kanseri duyarlılığı genlerinin çoğu, DNA onarım işlemlerinde ve esas olarak DDSB'larının onarımının oldukça karmaşık mekanizmalarında yer alan tümör baskılayıcı proteinleri kodlamaktadır.

Bu genler malignant fenotipin kazanılmasında fonksiyon kaybına uğrayan genleri işaret etmektedir. Tümör supressör genler, büyümenin ya da hücre adhezyonu ve proteaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi invaziv ve metastatik potansiyeli etkileyebilen diğer fonksiyonların negatif düzenleyicileridir. Kalıtsal anormallikler meme kanseri vakalarının küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen, bu germline mutasyonlar tümör supressör genlerde meydana gelmektedir. "Çift vuruş" hipotezinde olduğu gibi somatik

mutasyonlarda yine tümör supressör genlerde meydana gelebilmektedir (Knudson., 1971).

P53 geni; Kromozomun 17q bölgesinde yer alır ve farklı bölgelerden fosforillenerek düzenlenen çoklu fonksiyonlara sahip 393 kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır. Proteinin downregülasyonu büyük oranda p53 bağlayıcı protein E3 ubiquitin protein ligaz (Mdm2) proteini üzerinden gerçekleşmektedir. Myc üzerinden p53 tetiklenmektedir. Meme kanser vakalarının yaklaşık % 20 ila 30'unda p53 mutasyonu meydana gelmektedir (Hollstein ve ark., 1991).

BRCA1; Ailesel meme kanserli hastaların bağlantı (linkage) analizlerinde belirlenen bu gen kromozomun 17q21 bölgesinde yer almaktadır (Hall ve ark., 1990). Genel bir populasyonda BRCA1 mutasyon taşıyıcılığı % 0.02 olarak tahmin edilmektedir, ancak Aşkenazi Yahudileri gibi kapalı bir toplumlarda bu oran % 1'e çıkmaktadır (Roa ve ark., 1996). Bu gen mutasyonun meme kanser vakalarında 40 yaş altındaki kadınların % 5'inde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Ford ve ark., 1995). BRCA1 ilişkili kanserler düşük ihtimalle ER pozitif gösterir ve bazal fenotip ekspresyon paternleri ile birlikte myc gen amplifikasyonu sergileme eğilimindedir (Grushko ve ark., 2004).

BRCA2; Kalıtsal meme kanser vakalarının yalnızca küçük bir kısmı için BRCA1 geni sorumlu tutulsa da kromozomun 13q12-q13 kolunda yer alan ikinci bir sorumlu gen daha araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Wooster ve ark., 1994). BRCA2 geni, çoğu özellik bakımından BRCA1 genine benzemektedir ancak yapısal olarak oldukça farklıdır. BRCA2 proteini, DNA tamir proteini Rad51' e bağlanır ve kardeş kromatid proofreadingi için gerekli DNA tamirinde oldukça önemli rolleri vardır. BRCA2 geninde bugüne kadar tanımlanmış 100 benzersiz mutasyon bulunmaktadır ve bunların çoğu olgunlaşmadan kesilmiş proteinlere dönüşen mutasyonlardır. Genel populasyonda BRCA2 heterozigozite insidansı BRCA1 ile benzerdir.

PTEN; Akt proteinin negatif düzenleyicisi olan bir fosfotaz kodlamaktadır. PTEN genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları Akt sinyalinin uzamasına neden olarak sağkalımı arttırmaktadır (Burke ve ark., 1997). Kalıtsal PTEN mutasyonları bu gendeki yaygın olmayan sporadik mutasyonların aksine meme ve yumurtalık kanser riskini artırmaktadır. Ayrıca Cowden sendromunda da kalıtsal PTEN mutasyonları görülmektedir (Mills ve ark., 2001).

2.4.2. Onkogenler

İnsan kanserlerinde çok sayıda onkogen tanımlanmıştır, ancak bunlardan sadece bazıları meme kanserlerinin ilerlemesinde bir aktiviteye sahiptir. Bu onkogenlerin ve onkogen ürünlerinin aşırı ekspresyonu ve amplifikasyonu bu genlerin karsinogeneze katıldığı ana mekanizmadır.

HER2 onkogeni; Reseptör tirozin kinaz 2 (ERBB2) geni, 17. kromozomun q kolunda bulunur ve 185 kDa büyüklüğünde transmembran tirozin kinaz büyüme faktör reseptörünü (RTK) kodlamaktadır (Yarden ve Sliwkowski., 2001). Büyüme faktör reseptör aktivasyonu spesifik ligandların bağlanması ile aktive edildiği gibi otonom olarak yani hücre membranı üzerinde yeteri kadar reseptör olması durumunda reseptör dimerizasyonu ile reseptör otofosforilasyonunu gerçekleşir ve çeşitli yolakların aktivasyonunu sağlayan sinyal kaskadı harekete geçer. Sinyal kaskadının harekete geçirdiği yolaklar arasında proliferasyon, anjiyogenez, hücre motilitesi ve apoptoza direnç gibi hücresel dinamiklerde rol oynayan PI3K/Akt ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolakları yer almaktadır (Oved ve Yarden., 2002). Primer meme kanserlerinde HER2 gen amplifikasyonu, aşırı ekspresyonu ve kanserin daha agresif bir yapıya sahip olmasıyla ilişkilendirilmesinin keşfedilmesi teşhis ve tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlamıştır (Slamon ve ark., 1987b). Benign meme kanserlerinde HER2 gen amplifikasyonu görülme sıklığı oldukça nadirdir ama invaziv meme kanserlerinin % 20-30'unda ya amplifiyedir ya da aşırı ifade edilmektedir (Slamon ve ark., 1987b; van de Vijver ve ark., 1988).

Siklin D1; Siklin D1'i kodlayan gen kromozomun 11q13 kolunda bulunur ve invaziv meme kanser vakalarının % 40-50'sinde aşırı ifade edilirken % 10-20 sinde amplifiye olduğu bulunmuştur (Steeg ve Zhou., 1998). Siklin D1, siklin bağımlı kinaz partneri ile kompleks oluşturduğunda Retinoblastoma (Rb) tümör süpresör protein fosforillenir ve DNA sentezi için gerekli olan proteinlerin sentezini sağlayan retinoblastoma bağlanma protein (E2F) transkripsiyon faktörünü serbest bırakır. Yüksek siklin D1 protein ekspresyon seviyesinin ER pozitifliği ve proliferatif indeks artışı ile pozitif ilişkili olduğu görülmüştür (Loden ve ark., 2002).

c-myc onkogeni; Kromozomun 8q24 kolunda lokalizedir ve hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptozu içeren transkripsiyonel bir regülator olarak faaliyet gösteren

nüklear fosfoproteindir. Meme kanserlerinin % 15 ila 25'inde aşırı ifade edilir ya da amplifiyedir (Nass ve Dickson., 1997). Ayrıca bazı durumlarda kötü prognozla ve agresif klinik seyir ile ilişkilendirilmiştir (Varley ve ark., 1987). myc'in kemoterapi direnci ve hormon tedavisi cevapsızlığında rolü olduğu düşünülmektedir (Carroll ve ark., 2002).

2.5. Meme Kanserinin Temel Özellikleri

Weinberg ve ark. (2000), kanserin altı temel özelliğini, "çoğalma sinyalinin sürdürülmesi", "büyüme baskılayıcılardan kaçınma", "hücre ölümüne direnme", "replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme", "anjiyogenezin tetiklenmesi" ve "istila ve metastazın aktive edilmesi" olarak bildirmişlerdir. Aynı yazarlar, 2011'de 'enerji metabolizmasının yeniden programlanması' ve 'bağışıklık tahribatından kaçınma' şeklinde ortaya çıkan iki ayırt edici özelliği, tanımladılar ve tüm bu ayırt edici özelliklerin 'genom instabilitesi- mutasyonu' ve ' tümörü teşvik eden inflamasyon ' gibi iki özellik tarafından sağlandığını belirtmişlerdir (Weinberg ve ark., 2011). Bu anlamda meme kanserinin progresyonunda etkili olan temel karakteristikler aşağıda ifade edilmeye çalışılmıştır.

2.5.1. Proliferatif Sinyallerin Sürdürülmesi

ER, PR ve HER2'yi içine alan IHK markırları klasik olarak meme tümör alt tiplemesi için kullanılır (Fulford ve ark., 2006). Bu belirteçleri test eden deneyler, dünya çapında iyi bilinen boyama ve değerlendirme protokolleri ile patoloji laboratuarlarında rutin olarak gerçekleştirilmektedir (Spitale ve ark., 2009). ER, PR ve HER2'nin hücre büyüme sinyallerine aracılık ettiği bilinmektedir. Örneğin, östrojen meme kanseri gelişimini destekler ve karşılık gelen reseptörlerine sahip meme kanseri hücre hatlarının in vitro büyümesini uyarır (Lippman ve ark., 1976).

ER; Östrojen, hedef dokuların büyümesini, farklılaşmasını ve fonksiyonunu kontrol eden ana steroid hormondur ve bu eylemleri sinyal yollarıyla düzenler. Neredeyse tamamen transkripsiyon faktörleri olarak işlev gören ER'lerine, alfa ve beta'ya bağlanarak eylemlerine aracılık eder (Peng ve ark., 2009). Hücre içinde bulunan ER'leri, hem ligand bağımlı hem de ligand bağımsız transkripsiyonel aktivite sergilemektedir. ER'leri çoğunlukla G-protein-eşli reseptörlerdir ve östrojen hormonları, özellikle 17 β-estradiol (E2) ile aktive edilir (Dahlman- Wright ve ark., 2006). Aktive

edilmiş reseptör çekirdeğe yer değiştirir ve farklı genlerin aktivitelerini modüle etmek için DNA'ya bağlanır. E2 veya östrojen, meme bezi gelişiminde önemli rol oynar ve meme kanseri için temel risk faktörlerinden biridir. Deneysel ve klinik kanıtlar ERα alt tipinin meme kanserlerinin çoğunun gelişiminde asıl neden olduğunu göstermektedir (Ali ve Coombes., 2000; Fisher ve ark., 1981). ER'ler, meme kanseri vakalarının % 70'inde aşırı eksprese edilir (Fishman ve ark., 1995). Ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan ERα, hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünde yer alan genleri düzenler. Bu nedenle, ERα sinyalinin düzensizleştirilmiş eylemleri, meme kanseri gelişimi ile ilgili gen ekspresyonunu arttırmak için büyüme faktörü reseptörleri gibi proteinlerle de doğrudan etkileşime girebilir (Levin ve Pietras., 2008). Bu nedenle, östrojenin, tamoksifen gibi meme bezi üzerindeki etkilerini bloke eden ilaçlar veya aromataz inhibitörleri gibi östrojen üretimini bloke eden ilaçlar, hormona duyarlı meme kanseri tedavisinde önemli rol oynarlar. ERα'nın genomik eylemlerine ek olarak, çekirdek dışı sinyaller, post-translasyonel modifikasyonlar ve microRNA'lar da meme kanseri hücrelerinde ERα'nın etkisine zorluklar ekler.

ER, meme kanseri sınıflandırmasında en önemli ve yaygın biyobelirteçtir. İlk olarak 1960'larda tanımlanmış ve 1970'lerin ortalarından beri meme kanseri klinik yönetiminde endokrin yanıt verebilirliğinin birincil göstergesi ve erken rekürrens için prognostik bir faktör olarak kullanılmıştır (Rakha ve ark., 2010). ER, inhibisyonu meme kanseri endokrin tedavisinin temelini oluşturan meme karsinogenezinde önemli roller oynar. ER durumunun, son gen ekspresyon profili çıkarma çalışmaları ile meme kanseri moleküler portrelerinin ana belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (Dai ve ark., 2014; Perou ve ark., 2000; Sorlie ve ark., 2003). ER pozitif tümörler tüm meme kanseri hastalarının % 75'ini oluşturur ve 50 yaşın altında ve üstünde sırasıyla % 65 ve % 80'ini oluşturur (Anderson ve ark., 2002). ER(+) tümörler büyük ölçüde iyi farklılaşmış, daha az agresiftir ve cerrahi sonrası ER negatif olanlardan daha iyi sonuçla ilişkilidir (Dunnwald ve ark., 2007). Hastaların durumlarına göre sınıflandırılmış uzun süreli sağkalımları arasındaki küçük fark göz önüne alındığında, ER tek başına sınırlı prognostik değer sağlamasına rağmen, meme kanserinde tanımlanan en güçlü tek prediktif faktör olarak kabul edilmektedir (Abe ve ark., 2005; Badve ve Nakshatri., 2009; Sorlie ve ark., 2003). Genel olarak, ER(-) tümörlerin endokrin tedavisine yanıt vermesi olası değildir ve ER(+) hastaların yaklaşık % 50'si, anti-östrojen veya aromataz inhibitörlerine yanıt

vermektedir (Clarke ve ark., 1998). ER dışında meme kanseri alt tiplemesinde, risk faktörleri, klinik ve biyolojik davranışları açısından diğer biyobelirteçlerin önemi de unutulmamalıdır (Clarke ve ark., 1998; Dowsett ve ark., 2006).

PR; ER sinyalini aktive eden bir hormon tarafından indüklenmektedir (Horwitz ve ark., 1978; Walker., 2008). PR(+) tümörler bütün meme kanserlerinin % 65-75'ini oluşturmaktadır ve birkaç çalışma bu tür tümörlerin sınıflandırmasında klinik etkilerinden dolayı kullanılmasını desteklemiştir (Colomer ve ark., 2005; Radvin ve ark., 1992; Regan ve ark., 2006). Ancak PR'nin sınıflandırmadaki rolü endokrin tedavi cevabı üzerindeki aşırı ER prediktif rolünü desteklemedeki eksikliklerden dolayı birkaç araştırmacı tarafından hala sorgulanmaktadır (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative., 2005; Olivotto ve ark., 2004). PR(+) tümörler çok nadir ER(-)'dir (Olivotto ve ark., 2004). Tümör tipini belirleme metotlarına bağlı olarak % 0.2 ile 10 arasında bu negatiflik değişmektedir (Allred., 2008; Yu ve ark., 2008). ER(+) tümörlerinde yaklaşık % 40'ı PR(-)'dir (Rakha ve ark., 2007). ER(+)PR(-) tümörler endokrin tedaviye ER(+)PR(+) tümörlerden daha az cevap verirler (Bardou ve ark., 2003; Rakha ve ark., 2007). İki reseptör durumuna göre sınıflandırılan meme kanser alt tipleri, ER(+)PR(+), ER(-)PR(-), ER(+)PR(-), ER(-)PR(+) şeklinde sınıflandırılır. Bu gruplar arasında tedavi cevabı olumlu olan ER(+)PR(+)iken, tümör büyüklüğü, evresi, sağkalımı ve hormon tedavisine verdiği cevap göz önüne alındığında en agresif olan grup ise ER(-)PR(-), olanıdır (Arpino ve ark., 2005; Bardou ve ark., 2003; Dunnwald ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2007). Tek pozitif grubun, çift pozitif ve çift negatif gruplar arasında biyolojik özellikler açısından farklanma gösterdiği bildirilmektedir (Blenkiron ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2007).

HER2: ERBB2 gen amplifikasyonu meme kanserlerinin % 13–15'inde artmaktadır ve bu durum HER2 yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. HER2, epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, hücre dışı bir ligand bağlanma alanı, bir transmembran alanı ve bir katalitik hücre içi tirozin kinaz alanı içerir. HER2 aktivasyonu, ligand bağlanmasından sonra dimerizasyon yoluyla gerçekleşir, ancak HER2 için spesifik ligand tanımlanmamıştır. HER2 sinyali, ras yolu ve PI3K-AKT-MAPK yolu gibi farklı yolaklar vasıtasıyla proliferasyon, hücre sağkalımı, metastaz veyapışmayı aktive eder. HER2'nin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu ile

tanımlanmış HER2(+) kanserlerde HER2 proteinin hedeflenmesi kanıtlanmış etkili bir yoldur (Harbeck ve ark., 2019).

HER2 amplifikasyonunun klinik sonuçları 1987'den beri bilinmektedir (Slamon ve ark., 1987b). Sonraki birçok çalışma, HER2 gen amplifikasyonu veya protein aşırı ekspresyonunun, kötü prognoz ve sistemik kemoterapi tedavisi alan iyi klinik sonuç ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Chia ve ark., 2008; Wolff ve ark., 2007). HER2 proteininin aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu, invaziv duktal meme kanserinin % 13 ila % 20'sinde görülür, bunların yarısından fazlası (yaklaşık % 55) ER(-)PR(-)'dir (Quenel ve ark., 1995; Slamon ve ark., 1987a). HER2(+)'liğinin prognostik değeri, nod-pozitif hastalarda nod-negatif hastalara göre daha yüksektir. HER2 durumunun incelenmesi, ileri tümörlere trastuzumab veya potansiyel HER2(+) erken evre hastalara adjuvan tedavi uygulanmadan önce rutin bir klinik uygulama olarak belirlenmiştir (Piccart- Gebhart ve ark., 2005). HER2 pozitifliğinin, daha yüksek antrasikline bağlı ve taksan içeren rejimlere daha iyi yanıt verdiği belirtilmiştir (Hayes ve ark., 2007). Ayrıca HER2 pozitifliği, endokrin tedavilerine göreceli fakat mutlak olmayan dirençle ilişkilidir (Konecny ve ark., 2003). Bu durum ekspresyon seviyesinde HER2 ve ER/PR arasındaki ters ilişki ile tutarlı bir sonuç vermektedir (Quenel ve ark., 1995) ve bu direncin aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojenik tedaviler için geçerli olmadığı bilinmelidir. Yukarıda belirtilen tedavilere ve stratejilere rağmen HER, HER2 proteinini hedef alan aşılar ve lapatinip gibi ilaçlar ile yeni kanser tedavilerinin önemli hedeflerindendir.

2.5.2. İnvazyon ve Metastazın Aktivasyonu

ER(-)PR(-)HER2(-) tümörleri, tedavilerinin olmaması ve agresif klinik davranışları göz önüne alındığında, meme tümörleri arasında metastatik alt tiplerden biridir. Bu gruptaki hastalar, davranışları, sonuçları ve tedavi cevapları bakımından farklılık gösteren bazal fenotip ve bazal olmayan ER(-)PR(-)HER2(-) tümörleri olmak üzere en az iki farklı moleküler sınıfa ayrılabilir. Bazal tümörleri tanımlamak için, sitokeratinlerin (CK) 5/6, 14, 17, 8/18, EGFR yaygın olarak kabul gördüğü bazal IHK belirteçlerinin sayısı gittikçe artmaktadır (Carey ve ark., 2006; Rakha ve ark., 2009). Bazal alt tipi tanımlamak için bu bazal belirteçlerin çeşitli kombinasyonları kullanılmıştır. Bazal alt tipin en pragmatik ve yaygın olarak kabul edilen tanımı, CK5/6 ve EGFR'nin pozitif ekspresyonu olan ER(-)PR(-)HER2(-) tümörleridir (Carey ve ark., 2006; Chean ve ark.,

2008). Rakha ve ark. (2009), ER(-)PR(-)HER2(-) kanserlerinden bazal tümörlerin karakterize edilmesinde CK5/ 6, CK14, CK17 ve EGFR kullanımını önermişlerdir. Matos ve ark. (2005) da, bazal alt tipi ER(-)PR(-)HER2(-) tümörlerinden immünoprofileme yoluyla ayırt etmede P-kadherin, TP63 ve CK5'in kombine değerlendirilmesini önermişlerdir.

TNBC sınıflandırılmasında bu sınıfın belirteçleri, 'invazyon ve metastaz' ile ilişkilidir. Son çalışmalar sitokeratinler, P-kadherin ve vimentinin tümör oluşumu ve metastazı ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Sitokeratinler, epitelyal dokunun intrasitoplazmik hücre iskeletinde keratin içeren ara filament proteinleridir. Vimentin mezenkimal hücrelerin ana ara filament proteinidir (Pan ve ark., 2010). Sitoiskelet proteinleri (sitokeratinler dahil) ve hücre adhezyon molekülleri (P-kadherin gibi) arasındaki etkileşimi düzenler ve böylece tümör hücrelerinde hücre adhezyonu, migrasyonu, istilası ve hücre sinyal transdüksiyonuna katılır.

Meme kanserlerinin % 10 ila % 25'ini oluşturan bazal tümörler, diğer ER(-)PR(-)HER2(-) meme tümörlerinden daha kötü prognoza sahiptir (Ho-Yen ve ark., 2012; Perou., 2011). Bu iki alt tip farklı moleküler ve biyolojik özelliklere sahiptir ve neoadjuvan kemoterapiye yanıtlarında farklılık gösterir (Fan ve ark., 2006). Bu nedenle, kesin terapötik strateji oluşturma için bazal tümörlerin ER(-)PR(-)HER2(-) alt tipinden doğru tanımlanması gerekir. Birden fazla bazal keratin eksprese eden tümörlerin işlevsiz bir BRCA1 yolağı olma olasılığı daha yüksektir (Turner ve ark., 2007).

Epidermal mezenkimal dönüşüm (EMT), metastaz için gerekli bir süreçtir. EMT belirteçleri esas olarak vimentin (VIM), snail ailesi transkripsiyonel represör 1 (SNAI1), SNAI2, twist ilişkili protein 1 (TWIST1), TWIST2, çinko parmak E-kutusu bağlayıcı homeobox 1 (ZEB1), ZEB2, kadherin 1 (CDH1), klaudin 3 (CLDN3), CLDN4, CLDN7'dir (Palmer ve ark., 2006; West ve ark., 2005). Geleneksel olarak kök hücre markerleri kabul edilen moleküller arasında CD44, CD24, epitelyal hücre adhezyon molekülü (EpCAM), CD10, CD49, CD29, musin 1 (MUC1), hücre yüzey antijeni (THY1) ve aldehid dehidrogenaz (ALDH1A1) yer alır (Creighton ve ark., 2009). Bu belirteçlerden yararlanılarak iki grup meme tümörü, yani klaudin-düşük ve metaplastik meme kanseri (MBC), ER(-)PR(-)HER2(-) tümörlerinden daha iyi ayırt edilebilir. Her iki alt tip de tümör özellikleri, genomik anormallikler, ilaç yanıtı ve klinik sonuç ile ilgili birçok benzerliği paylaşır. EMT belirteçleri için zenginleştirilmiş ve kök hücre

karakteristikleri sergileyen GATA3 ile düzenlenmiş ve hücre-hücre yapışma genlerinin düşük ekspresyonu ile karakterize edilirler (Hennessy ve ark., 2009).

Klaudin-düşük ve MBC'lerin lümen veya bazal tümörlerin öncülünden daha ilkel bir hücreden kaynaklanabileceği ve meme tümörünün başlamasına benzer bir işaret gösteren yeni bir kimyasal-dirençli ER(-)PR(-)HER2(-) hastalığı tanımlayabileceği iddia edilmektedir. Her iki meme tümör alt tipi EMT ve kök hücre belirteçleri açısından anlamlı bir benzerlik gösterse de, MBC meme kanseri, PIK3CA, AKT veya Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogene (KRAS) mutasyonlarını barındırarak klaudin-düşük tümörlerden farklıdır (Hennessy ve ark., 2009).

Klaudin-düşük tümörler, ER(-)PR(-)HER2(-) sıkı bağlantı proteinleri 3, 4 ve 7 genlerinin düşük gen ekspresyonu ve kalsiyum bağımlı CDH1 ile karakterize edilen tümörlerdir. Bu tümörler meme tümörlerinin yaklaşık % 7 ila % 14'ünü oluşturur (Pratt ve ark., 2010). Klaudin-düşük alt tipin moleküler karakterizasyonu, EMT, kök hücre benzeri ve tümör başlatan hücre genomik imzaları, yaygın epitel hücre özelliklerinin eksikliği, lümen ve proliferasyonla ilişkili genlerin düşük ekspresyonu için zenginleştirildiğini ortaya koymaktadır. Klaudin-düşük kanserler kemoterapi duyarlılığı gösterir ve bu tümörleri barındıran hastalarda genel sağkalım kötüdür (Pratt ve ark., 2010).

Birlikte ele alındığında, istila ve metastaz özelliğini temsil eden bazal, EMT veya kök hücre belirteçlerinin üçlü negatif tümörlerde artmasıdaha olasıdır. Bu şekilde ne kadar çok belirteç zenginleştirilirse, tümörler o kadar agresif olur.

2.5.3. Hücresel Ölüme Direnç

Bcl-2 proteini, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneylerde doğrulanan apoptozun baskılayıcısıdır (Haldar ve ark., 1994; Mcdonnell ve ark., 1989). Ekspresyonunun TP53 ekspresyonu ile ters korelasyon gösterdiği ve fonksiyonu TP53 mutasyonu ile değişebilir (Haldar ve ark., 1994). Meme kanserinde hücresel ölüme direnç mekanizmasında ilk çalışmalar Bcl-2 ekspresyonunun düşük dereceli yavaş çoğalan ER(+) meme tümörleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Lipponen ve ark., 1995; Silvestrini ve ark., 1994). Bu tür tümörlerle ilişkili iyileşmenin sağkalımı ER durumu ile korelasyonundan kaynaklanmaktadır (Berardo ve ark., 1998). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, Bcl-2'nin ER, HER2 ve alınan adjuvan tedaviden bağımsız olarak

tüm erken evre meme kanseri tipleri için klinik olarak geçerli ve güçlü bir prognostik belirteç olduğu ileri sürülmektedir (Dawson ve ark., 2010; Hwang ve ark., 2012).

2.5.4. Genom İnstabilitesi ve Mutasyon

Genom instabilitesi erken tanımlanabilen fenotiplerden biri olarak ortaya çıkmaktadır ve normal histolojik dokularda bile tespit edilebilir. Aslında kalıtsal kanser sendromları, örneğin DNA tamirinde rol oynayan BRCA1/BRCA2 meme ve ovaryum kanser risk genlerinin her ikisi de sıklıkla bu fenotipi içerir. Kalıtsal olsun ya da olmasın kanser hücresinde genom instabilitesi; gen kaybı, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonu ve kromozomal translokasyon gibi genetik değişiklikler sıklıkla oluşma potansiyeline sahiptir. Bu değişimlerin çoğu hücre ölümü ile sonuçlanırken bazıları sağkalım, proliferasyon, invazyon, motilite, ilaç direnci ve diğer malignant karakterleri destekleyen diğer anahtar genlerin aktivasyonunu tetikleyebilmektedir. Buradaki genetik anormallikler karsinogenezin erken evresinde meydana gelir ve meme kanserlerinde heterozigozite kaybı ve gen kopya sayısındaki değişikliklerin hiperplaziden DCIS'e geçişte keskin bir şekilde olduğu görülmektedir (O'Connell ve ark., 1998; Waldman ve ark., 2000). Ayrıca bu genetik değişimlerin etkilediği hücresel yolaklar birbirleriyle fazlasıyla bağlantılıdır. Bu komplekslilik de teşhisin ve tedavinin neden bu kadar yavaş ilerlediğini açıklayabilir.

2.5. 5. İmmüniteden Kaçış

İnterferon tarafından düzenlenen genlerin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen ER(-)PR(-)HER2(-)tümörleri interferon bakımından zengin alt tip olarak yakın zamanda tanımlanmıştır (Hu ve ark., 2006; Teschendorff ve ark., 2007). Bu tümörler meme tümörü vakalarının yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. İnterferonla düzenlenen genlerin farklılaştırdığı tümörler arasında ER(-)PR(-)HER2(-) alt tipteki tümörleri ayıran genler sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1 (STAT1) ve transkripsiyon koaktivatörü (SP110) en önemlileridir. Burada STAT1, interferon ile düzenlenmiş gen ekspresyonuna aracılık eden transkripsiyon faktörüdür (Hu ve ark., 2006). SP110, bu alt tip için prognostik bir değere sahip olduğu bildirilmiştir (Teschendorff ve ark., 2007). İnterferonca zengin meme tümörlerinin nüks ihtimali, bazal tip kanserler (ER(-)(PR-)HER2(+) ile karşılaştırılabilir) ve luminal A tip tümörler arasında bir yerdedir ve

hastalarda daha iyi bir sonucun görüldüğü immün sistemin daha kolay tetiklendiği luminal B tipi tümörleriyle karşılaştırılabilir (Hu ve ark., 2006).

2.5.6. Kanserde Bozulan Enerji Metabolizması

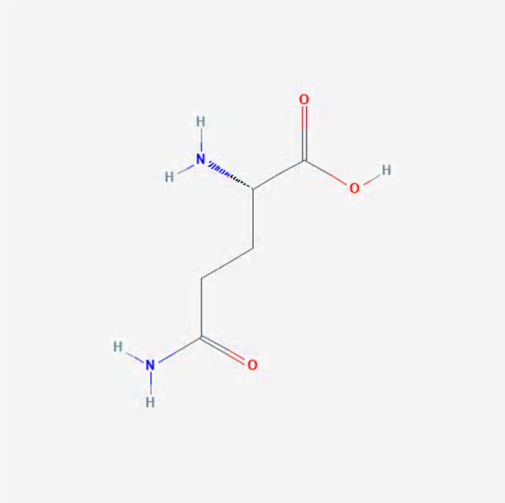
Kanser hücreleri sınırsız bir replikatif kapasiteye sahiptir. Sınırsız çoğalması için ihtiyaç duydukları besin ve enerjiyi sağlamaları gerekir. Kanserin ihtiyaç duyduğu besin ve enerjinin sentezlenmesi ve içinde bulundukları sürekli olarak değişen mikro çevrede hayatta kalabilmeleri için metabolizmalarını yeniden programladıkları artık bilinmektedir. Yeniden programlanan metabolizmanın keşfi 1920'lerde Otto Warburg'un çalışmalarına dayanmaktadır. Warburg, Ehrlic Ascites tümörler ile yaptığı çalışmada hızlı prolifere olan tümör hücrelerinin artan bir glukoz alımı ve glikolitik bir akış sergilediğini belirlemiştir (Warburg., 1956a, 1956b). Alınan glukozun tamamen oksidasyonu için gereken yeterli oksijen varlığında bile Trikarboksilik Asit (TCA) döngüsü üzerinden mitokondriyal oksidasyon yerine glikoliz ile oluşturulan pirüvatın çoğunun laktat'a dönüştürüldüğünü göstermiştir. Bu olayın aerobik şartlar altında gerçekleşmesi nedeniyle "aerobik glikoliz" ya da "warburg etkisi" olarak adlandırılmıştır. Warburg etkisi olarak tanımlanan bu metabolik yolak kanser hücrelerinin temel özellikleri arasında yer almaktadır.

Kanser hücrelerin temel özelliklerinden biri, kontrolsüz hücre çoğalması için gereken yapı taşlarının anormal ihtiyacına cevap olarak metabolizmayı yeniden programlayabilmeleri ve tümörlerin başladığı ve geliştiği sürekli bir değişim gösteren mikro çevreye uyum sağlayabilmeleridir (Hanahan ve Weinberg., 2011; Pavlova ve Thompson., 2016; Vander Heiden ve ark., 2009; Ward ve Thompson., 2012). Çeşitli kanser hücrelerinde yeniden programlamanın en iyi örneği de besin ve enerji kaynağı olarak glutamini kullanıyor olmalarıdır. Normal hücrelerin aksine transforme olmuş proliferatif hücreler glutamini, hızlı bir şekilde bölünüp, çoğalmak ve yaşamını devam ettirmek için kullanmaktadır. Transforme hücrelerde çok yönlü fonksiyonlara sahip olan glutamin, ATP üretimi için katabolik bir substrat iken makromolekül biyosentezi içinde anabolik bir substrattır (De Berardinis ve ark., 2007). Glutamin, *de novo* pürin ve pirimidin sentezinde, heksozamin biyosentezi ve glikolizasyon reaksiyonlarında, diğer amino asitlerin sentezinde, hızlı bir metabolizmadan kaynaklanan oksidatif strese karşı hücrelerin sağkalımını devam ettirmek için gerekli olan glutatyonun sentezinde, bir seri reaksiyon sonrasında α-ketoglutarat'a dönüştürülerek TCA döngüsünü beslemede,

pirüvat'a dönüştürülerek malik enzim üzerinden redoks homeostazisin düzenlenmesinde görev almaktadır.

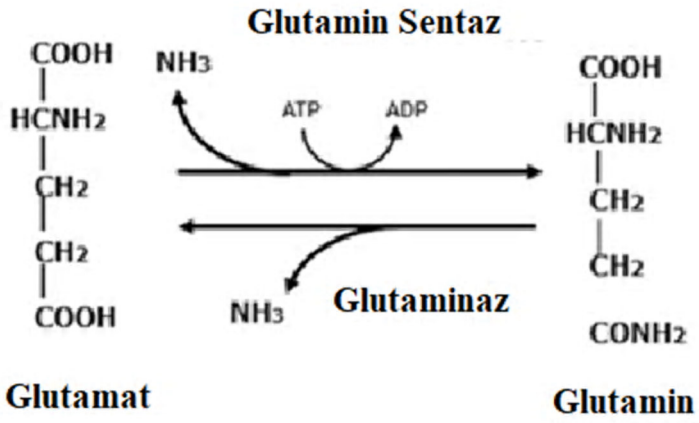
2.6. Normal Hücrelerde Glutamin Kullanımı ve Metabolize Edilmesi

En temel seviyede amino asitler, hücre ve dokularımızda protein sentezi için kullanılan yapısal elemanlardır ve sudan sonra vücudumuzda en fazla bulunan bileşenlerdir. Amino asitler, endojen ya da ekzojen kaynaklı proteinlerden elde edilebilir ve bu yapıların varlığı hücresel canlılığın devamı, sağkalım ve proliferasyon için temel bir önem arz etmektedir. Genetik kodda belirtilen 20 amino asit arasında glutamin, memeli hücrelerinde oynadığı rollerle ve metabolizmadaki misyonuyla en dikkat çeken amino asittir. Glutamin L-α-amino asid formunda (Şekil 2.4) ve 146.15 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Fizyolojik pH değeri ile ilgili olarak, glutamin nötr bir amino asit olarak sınıflandırılırken, normal hücrelerdeki besin ihtiyacı bakımından esansiyel olmayan bir amino asit şeklinde sınıflandırılır. Kan numunelerinden elde edilen plazmada, glutamin konsantrasyonu, kandaki toplam serbest amino asit havuzunun yaklaşık % 20'sine karşılık gelen ~ 500 ila 800 μM/L (açlık durumunda 12 saat sonra kaydedilen değerler) arasında değişim gösteren bir değere sahiptir (Roth., 2008). Karaciğer ve iskelet kası gibi dokularda, glutamin konsantrasyonu, toplam amino asit havuzunun yaklaşık % 40 ila % 60'ını oluşturarakplazma konsantrasyonundan daha yüksek bir değere ulaşmaktadır. Hem plazmada hem de dokularda, glutamin konsantrasyonu, diğer amino asitlerin konsantrasyonlarından 10 ile 100 kat arasında değişen bir fazlalığa ulaşmaktadır. Bu nedenle, glutamin, vücudun en bol bulunan amino asidi olarak kabul edilmektedir (Cruzat ve ark., 2018).



Şekil 2. 4. L-Glutamin moleküler formülü
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamine)

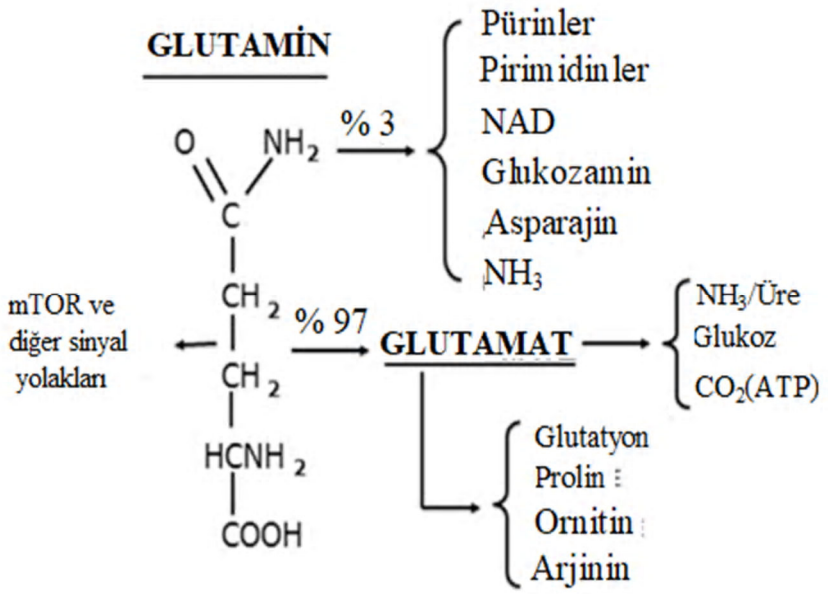
Sağlıklı yetişkin bir insan vücudu, 80 gr'dan fazla serbest glutamin içerir. Bu glutaminin % 98'i yani 20 mM konsantrasyondan fazlası iskelet kas hücrelerinde bulunur (Curthoys ve Watford., 1995). Glutamin, iskelet kası, akciğerler, adipoz doku ve karaciğerde Glutamin Sentaz enzimi tarafından amonyak ve glutamattan sentezlenmektedir (Şekil2.5) (Watford., 2015).



Şekil 2. 5. Glutamin sentaz ve Glutaminaz enzimleri ile Glutamin ve Glutamat arasındaki sentez (Watford., 2015).

Glutamin büyüme ve hücre bölünmesi için bir seri biyosentetik yolağın öncüsüdür (Şekil 2.6). Glutamin Şekil 2.5 ve 2.6 da gösterildiği gibi glutaminaz tarafından hidrolize edilir ve sonuçta hepatik glukoneogenez, üre sentezi ve böbrekte amonyak

oluşumu için substrat görevi görürken aynı zamanda bağışıklık sisteminin hücreleri ve enterositler için solunumda yakıt olarak kullanılır (Curthoys ve Watford., 1995). Glutamin, sıklıkla mTOR'un aktivasyonu ile başlatılan protein sentezi, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi anabolik fonksiyonların uyarılmasında, apoptoz ve protein yıkımı gibi katabolik fonksiyonların inhibe edilmesinde rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür (Curi ve ark., 2007).

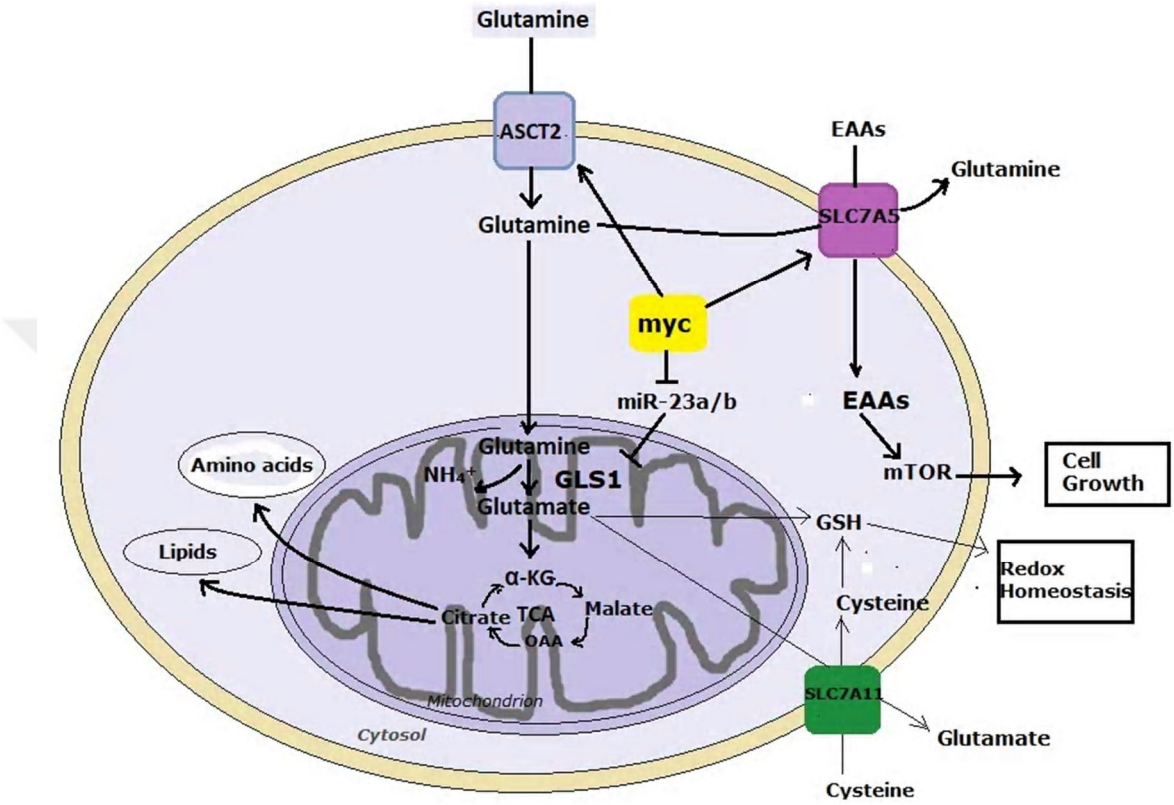


Şekil 2.6. Glutamin ve Glutamat'ın rol aldığı biyosentetik olaylar (Watford., 2015).

2.7. Kanserde Glutamin Metabolizması

Hızlı çoğalan hücre ve dokular için enerji üretiminde ve normal hücre metabolizmasında glutamin önemli bir rol oynamaktadır. Çoğu kanser hücresi de glutamin bağımlıdır ve ekzojen glutamin yokluğunda canlılıklarını devam ettirememektedir (Abu Aboud ve ark., 2017; Niklison-Chirou ve ark., 2017; Petronini ve ark., 1996; Vanhove ve ark., 2019; Yuneva ve ark., 2007). Kanser hücreleri, ihtiyaç duydukları enerjiyi karşılamak ve metabolizmasını desteklemek için alternatif kaynaklara yönelmektedir. Kanser hücrelerininproliferasyonuna aracılık eden transkripsiyon faktörü STAT3'ü aktive etmek için bir sinyal molekülü olmanın dışında glutamin, metabolik rollerinden bağımsız olarak kanser progresyonunu başlatabilmektedir (Cacace ve ark., 2017). Glutamin dolaylı olarak hücre büyümesi ve

proliferasyonunu düzenleyen rapamisin 1'in memeli hedefi (mTORC1) gibi diğer sinyal yolaklarını dolaylı olarak aktive edebilmektedir (Duran ve ark., 2012).



Şekil 2.7. Kanser hücrelerinde Glutamin metabolizması ve myc üzerinden düzenlenmesi. "Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach" çalışmasından uyarlanmıştır (Chen ve Cui., 2015).

Glutamin metabolizmasındaki yeniden programlama, tümörlerde replikasyonu destekleyen enzimlerin ve hücresel taşıyıcıların up-regülasyonu yoluyla alımını ve kullanımı tetikleyip agresif kanser fenotipine neden olabilecek myc gibi onkogenlerin aktive olması ile ya da Rb gibi tümör süpressörlerin kaybı ile kontrol edilmektedir (Chang ve ark., 2015; De Berardinis ve ark., 2008).

Glutamin solüt taşıyıcı ailesine (SLC) ait amino asit taşıyıcıları ile hücre içerisine alınmaktadır (Şekil 2.7). Alanin-serin-sistein taşıyıcı 2 (ASCT2) proteini, Na^+ bağımlı nötral bir amino asit taşıyıcıdır ve *SLC1A5* geni tarafından kodlanmaktadır. Baskın olarak da hücre membranında lokalizedir. ASCT2, hızla büyüyen tümör hücrelerinin glutamin alması için çok önemli olan amino asit substratlarının değiş tokuşuna aracılık

etmektedir (Kekuda ve ark., 1996). Sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında ASCT2, çeşitli tümör dokularında daha fazla ifade edilmektedir (Fuchs ve ark., 2007; Kim ve ark., 2013; Liu ve ark., 2017; Shimizu ve ark., 2014).

2.8. Glutaminaz ve Kanserdeki rolü

Glutaminaz (GLS), serbest amonyum ve glutamat'ın sitokiometrik miktarını glutamin'in amid grubunun hidroliziyle katalize eden fosfatla aktive olan mitokondri matriks enzimidir. GLS'in, GLS1 ve GLS2 olarak adlandırılan iki izoformu bulunmaktadır. *GLS1* geni, kromozomun 2q32 bölgesinde lokalizedir ve doku spesifik olarak alternatif işlenme ile oluşturulan üç splice varyantı meydana getiren başlangıç mRNA'dan şifrelendiği düşünülmektedir. Sonrasında bu splice varyantları, böbrek tipi glutaminaz (KGA), glutaminaz C (GAC) ve glutaminaz M (GAM) olarak adlandırılan 3 insan glutaminaz izoenzimine dönüştürülmektedir. İnsan *GLS1* geni 82 kb uzunluğunda ve 20 ekzondan oluşmaktadır (Elgadi ve ark., 1996) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=(gls)). İnsan *GLS2* geni, kromozomun 12q13 bölgesinde lokalizedir ve glutaminaz 2 ya da karaciğer tipi glutaminazı şifrelemektedir. Şifrelenen bu protein fonksiyonel olarak böbrek tipi glutaminaza benzemektedir fakat büyüklük olarak daha küçüktür (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(gls2)). Glutaminaz ekspresyonu ve aktivitesi böbrek, karaciğer, beyin, pankreas, kalp kası, iskelet kası, ince bağırsak, plateletler ve fibroblastlarıda içeren çok sayıda dokuda belirlenmiştir. GLS1 ya da KGA'nın baskın olarak böbrek ve beyinde ifade edildiği gösterilmiştir. GAC, pankreas ve kalp kasında baskın olarak ifade edilmektedir fakat böbrek, akciğer ve plasenta da bu gruba dahil edilebilmektedir. GAM ise kalp ve iskelet kasında ifade edilmektedir (Elgadi ve ark., 1999). GLS2'nin doku spesifik ekspresyon dağılımı tam olarak belirlenememiştir. Normal insan hepatositleri GLS2'yi ifade ederken hepatoma hücrelerinin KGA'yi ifade ettikleri belirlenmiştir (Bode ve Souba., 1994). Gastrointestinal sistemde GLS spesifik aktivitesi ince ve kalın bağırsakta yüksektir, mide ve özofagusda ise düşüktür. Bu nedenle hem ince hem de kalın bağırsak, mide ve özafagusun aksine glutamin hidrolizi için yüksek potansiyele sahiptir (James ve ark., 1998). İnterlökin 1 (IL1), interlökin 6 (IL6), tümör nekrozis faktör (TNF)-α ve interferon ɣ insan hücrelerinde enzimin aktivitesini azaltırken, glukokortikoidlerin GLS aktivitesini başlatabildiği gösterilmiştir (Sarantos ve ark., 1994). İnsan solunum epitelyum hücrelerinde GLS aktivitesi

interferon-ɣ ve TNF-α tarafından inhibe edilirken asidik zorluğa cevap olarak artmıştır (Hunt ve ark., 2002). *GLS2* geni, p53 aktivasyonu GLS2 mRNA'larının ekspresyonunu indüklediğinden dolayı p53'ün bir hedefi olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle GLS2 p53'ün bazı etkilerine aracılık ederek tümör supresyonunda p53'ün rolüne katkı yapabilir. GLS2 ekspresyonu hepatosellular karsinomalarda kaybolur ya da azalır ve GLS2'nin aşırı ekspresyonu tümör hücre koloni yapısını azaltır (Hu ve ark., 2010; Suzuki ve ark., 2010). Diğer yandan onkogen myc, GAC ekspresyonunu up-regüle etmektedir ve insan B lenfomasında ve prostat kanser hücrelerinde tümör hücre proliferasyonunu desteklemektedir (Gao ve ark., 2009). Öyle görünüyor ki GLS1 ve GLS2 tümör gelişiminde farklı rollere sahiptir. Tümör süpressör gen p53, GLS2'nin ekspresyonunu indüklerken çeşitli hücrelerde GLS1'i indüklememektedir. Onkogen myc ise tam tersine GLS1'i indükleyip GLS2'yi etkilememektedir (Hu ve ark., 2010).

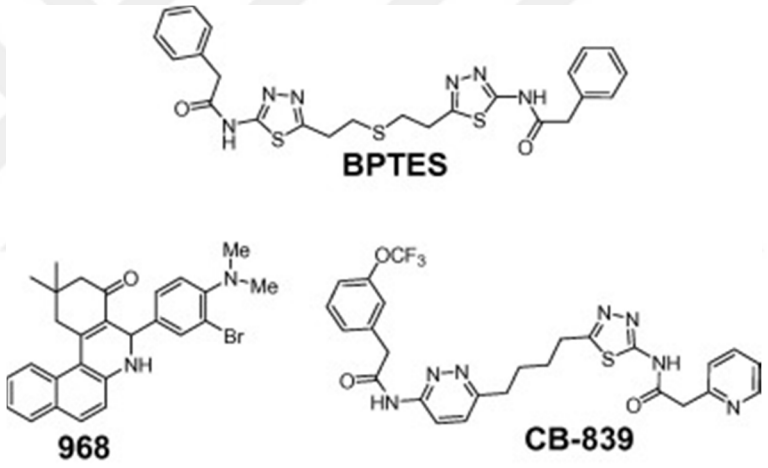
c-myc, glutamin metabolizması ve akışını başlatabildiği gibi glutamin bağımlılığının indüklenmesinde de anahtar bir rol oynamaktadır. GLS1'in her iki splice varyantı GAC ve KGA, c-myc tarafından pozitif olarak düzenlendiği ve c-myc'in indüklediği tümörlerde güçlü bir şekilde ifade edildikleri gösterilmiştir (Csibi ve ark., 2014; Gao ve ark., 2009; van den Heuvel ve ark., 2012). Yüksek GLS1 ekspresyonu ile c-myc'in aşırı ekspresyonunu sergileyen tümörler hücre içerisine yüksek miktarda glutamin girişi ile glutamin bağımlısı olurlar (Wise ve Thompson., 2010).

2.9. Glutaminaz İnhibitörleri

Glutamin ihtiyacı meme kanserinin moleküler alt tiplerinde farklılık gösterir (Gao ve ark., 2009; Kung ve ark., 2011) ve sadece bazıları ekzojen glutamine ihtiyaç duyar ve glutamin bağımlılığı gösterir. Üçlü negatif ve HER2+ meme kanser hücre hatları yüksek oranda glutamin bağımlısıyken luminal tümörler glutamin ihtiyacı pek duymazlar (van Geldermalsen ve ark., 2016). Proliferatif kapasiteleri yüksek olan glutamin bağımlısı bu tiplerde GLS1 baskın bir şekilde upregüledir. Glutamin katabolizmasında ilk basamakta yer alan bu enzim tedavi hedefi olarak bir potansiyel taşımaktadır.

GAC hücresel metabolizma için bir anahtar özelliği taşıdığından dolayı aktivitesi birçok kanser hücre tipinin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle GAC'ı hedefleyen küçük molekül inhibitörleri geliştirmek için pekçok girişimde bulunulmuştur (Gross ve ark., 2014; Shukla ve ark., 2012; Stalnecker ve ark., 2015). Bu girişimlerden

biri Curthoys ve ark. (2007) tarafından Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide **(**BPTES)'in gelişimi ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.7). Bu inhibitör enzimin katalitik bölgesine bağlanan glutamin ile yarışmak yerine enzimin tetramerik bölgesini inaktive ederek stabilize eden allosterik inhibitör özelliği taşımaktadır. BPTES, çeşitli tümör modellerinde kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Le ve ark., 2012; Seltzer ve ark., 2010; van den Heuvel ve ark., 2012). Sonrasında Gross ve ark. (2014) tarafından önceki BPTES analoglarına göre belirgin bir iyileşmeyi temsil eden Teleglanestat (CB-839)'un gelişimini bildirmiştir. CB-839 şimdi hem tek başına hem de ilaç karışımlarının bir parçası olarak bazı farklı endikasyonlar için klinik çalışmada yer almaktadır (https://clinicaltrials.gov/).



Şekil 2.8. GLS1'in varyantı GAC'ın küçük molekül inhibitörleri (McDermott ve ark., 2016).

2.10. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA)

Kodlamayan RNA (ncRNA) terimi, bir proteini kodlamayan RNA için yaygın olarak kullanılır, ancak bu ncRNA'ların bilgi içermediği veya herhangi bir fonksiyona sahip olmadığı anlamına gelmez. Genellikle genetik bilginin çoğunun proteinler tarafından işlendiği varsayılsa da, son kanıtlar, memelilerin ve diğer kompleks organizmaların genomlarının çoğunun aslında ncRNA'lara kopyalandığını, birçoğunun alternatif olarak daha küçük ürünlere dönüştürüldüğünü göstermektedir (Mattick ve Makunin., 2006). ncRNA'lar, genel olarak küçük ncRNA (sncRNA) ve uzun ncRNA (lncRNA) olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Transkripsiyon aktivitesinin büyük bir kısmı lncRNA

tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu RNA molekülleri en az 200 nükleotid uzunluğunda ve genellikle mRNA'ya benzer şekilde bir poli-A kuyruğu ile karakterizedir (Hombach ve Kretz., 2016). lncRNA'nın gen ekspresyonunun epigenetik kontrolü, promotöre özgü gen regülasyonu (Martianov ve ark., 2007; Bond ve ark., 2009), X kromozom inaktivasyonu (Tian ve ark., 2010; Lee ve ark., 2013), damgalama (Lyle ve ark., 2000) gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rolleri bulunmaktadır. sncRNA'lar da birçok farklı hücresel yol ve sistemde gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicileri olarak rol oynamaktadırlar. Son yıllarda çok sayıda sncRNA sınıfı tanımlanmış olup, miRNA'lar, piRNA'lar ve siRNA'lar en ayrıntılı olarak incelenen sınıflarıdır (Hombach ve Kretz., 2016).

2.10.1. Küçük interferans RNA'lar (siRNA)

siRNA'lar, 21-25 nükleotid uzunluğunda çift iplikten oluşmaktadır (Meister ve Tuschl., 2004). RNA interferans (RNAi), RNA aracılı doğal bir gen düzenleme sürecidir (Hannon., 2002). RNAi süreci, uzun çift iplikli RNA'nın Dicer enzimi ile parçalanması ile başlamaktadır. Nükleaz aktivitesine sahip olan Dicer enziminin etkisi ile dsRNA21-23 nükleotid uzunluğunda RNA'lara parçalanır, oluşan yapıya RNA indükleyici baskılama kompleksi (RISC) adı verilen bir multiprotein kompleksi bağlanır ve hedef mRNA parçalanır (Şekil 2.9.1) (Tijsterman M and Plasterk., 2004). RNAi süreci, kanser, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde umut verici biyolojik bir önem arz eder (Devi., 2006; Tan ve ark., 2004).

2.10.2. siRNA Temelli Kanser Tedavileri

siRNA'lar, yüksek spesifisitesi, etkinliği, daha az yan etkisi ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle gen susturulması ve herhangi bir ilaç ile tedavi edilemeyen kanserlerin tedavisi için oldukça umut vericidir. Ancak, birçok başarılı klinik öncesi çalışma olmasına rağmen, klinik kullanım için hedefe spesifik nanotaşıyıcı ile beraber sadece birkaç siRNA onay alabilmiştir (Rosenblum ve ark., 2018). Kanser dahil olmak üzere lokal dağıtım yoluyla farklı hastalıkları hedefleyen çeşitli siRNA ilaç adayları bulunmaktadır (Ozcan ve ark., 2015; Zuckerman ve Davis., 2015) (Tablo 2.2). Marina Biotech firması, kolon kanserinden sorumlu β-katenin genini hedefleyerek ailesel adenomatoz poliposis'e karşı siRNA ilacı CEQ508'in klinik çalışmalarını gerçekleştirmiştir (Trieu ve ark., 2017). Silenseed firması da, 2011 yılında pankreatik

duktal adenokarsinom ve pankreas kanserine karşı, mutasyona uğramış bir KRAS (G12D) onkogenine karşı uzun süreli etki için SIG12D siRNA ilacını tasarlamıştır. SIG12D'nin kemoterapi ile kombinasyon halinde yapılan faz I/II çalışmaları, ilacın pankreas kanseri olan hastalarda iyi tolere edildiğini, güvenli ve güçlü olduğunu ortaya koymuştur. SIG12D siRNA ilacı şu anda faz II klinik çalışma aşamasındadır (Golan ve ark., 2015).

Tablo 2.2. Faz aşamasında olan siRNA temelli ilaçlar (Zuckerman ve Davis, 2015)

siRNA temelli ilaç	Hedefi	Uygulanan Kanserler
CALAA 01	Ribonükleotid redüktazın M2 alt ünitesi	Solid Tümörler (Davis ve ark., 2
The Atu-027	Protein Kinaz N3	Metastatik Pankreatik Cancer (Aleku ve ark., 2008)
ALN-VSP02	Kinezin	Solid Tümörler (Cervantes ve ark., 2011)
TKM-PLK1	Polo-like kinaz	Gastrointestinal, Nöroendokrin Tümörler ve Adrenokortikal karsinoma(Xu ve ark., 2015)
DCR-MYC	c-Myc geni	Solid Tümörler ve Multiple Myeloma (Tolcher ve ark., 2015)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar Erciyes Üniversitesi, Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Genom Laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

3. 1. GEREÇLER

3.1.1.Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar marka bilgileri ile birlikte aşağıda listelenmiştir.

- Laminar Akım Kabini (Clean Air)
- CO_2'li İnkübatör (Sanyo, MCO-19 A/C (UV))
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Counter, Cat. No. 369436)
- Hassas Terazi (Mrc)
- Su Banyosu (Nüve St 30)
- Çalkalayıcı (Heidolph)
- Derin Dondurucu (Uğur, Kod. No. 100703000000)
- Buzdolabı +4 (Siemens, No. KG57NVW20N)
- Invert Mikroskop (Leica)
- Otoklav (Alp, CL-40M)
- Pipet Tabancası (Gilson)
- Mikropipet Seti (Gilson)
- Vorteks (Heidolph)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
- BioRad Western Görüntüleme Cihazı
- Eliza-Reader (Glomax-Multi)
- Muse Cihazı (Milipore)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific)
- L-Glutamin (Capricorn Scientific)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS) (Capricorn Scientific)
- Metanol (Merck)
- Tris (Merck-Milipore)
- Non-Fat Dry Milk (BioRad)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific)
- Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific)
- Hücre Kültür Flaskları 25 cm^2 (Greiner CellStar)
- Hücre Kültür Flaskları 75 cm^2 (Greiner CellStar)
- Steril 6'lı, 96 kuyucuklu Kültür plakaları (Greiner CellStar)
- Serolojik Pipetler 5ml, 10ml, 25ml (Greiner CellStar)
- Membran (BioRad)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- İki farklı GSL1 siRNA (Sigma-Aldrich)
- Kontrol siRNA (Sigma-Aldrich)
- HyPerFect Transfeksiyon Ajanı (Qiagen, 301705)

3.1.3. Kitler

Çalışmada kullanılan kitler marka bilgisi ile birlikte aşağıda listelenmiştir.

- Annexin V Apoptoz Kiti (Milipore MCH100105)
- MTS Reagent Powder (Biovision, 2808-250)
- DC™ Protein Assay Kit (BioRad)
- ReadyPrep Protein Extraction Kit (BioRad)
- Muse cell cycle Reagent (Milipore)
- ECL (BioRad)

3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Buffer

1 ml Cell lizis buffer

10 µl proteaz inhibitör kokteyl

10 µl fosfataz inhibitör kokteyl

4 µl NaF

Yürütme ve Transfer Solüsyonu 1L (10X)

- 30 gr Tris-Base
- 144 gr Glisin

Yürütme Solüsyonu 1L(1X)

- 100 ml 10X Yürütme Solüsyonu
- 890 ml dH2O
- 10 ml % 10 SDS

Transfer Solüsyonu 1L (1X)

- 100 ml 10X Transfer Solüsyonu
- 200 ml Metanol
- 700 ml dH2O

Tris Buffered Saline 1L (TBS) (10X)

- 31.5 gr Tris-HCl
- 80 gr NaCl

TBS-Tween 20 (TBS-T) Çalışma Solüsyonu 1L

- 100 ml 10X TBS Buffer
- 898 ml dH2O
- 2 ml Tween-20

Non- Fat Dry Milk Solüsyonu

- 350 mg non-fat dry milk
- 7 ml TBS-T

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kullanılan Hücre Hattı

MDA-MB-231 üçlü reseptör negatif meme kanser hücre hattı ticari olarak ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alınmıştır.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının tamamı ve kültür işlemleri için gerekli olan malzemelerin hazırlanması steril laminar hava akımlı kabinlerde gerçekleştirildi.

Hücre besiyerinin hazırlanması

DMEM F12 medyum içerisine, 55 °C'de inaktive edilen FBS, L-Glutamin ve Penisilin/Steptomisin ilave edilerek hücrelerin çoğalabileceği uygun besiyeri hazırlandı ve +4 °C'de saklandı ve çalışma yapılacağı zaman ısısı 37 °C'ye ayarlandı.

Hücrelerin Çoğaltılması

Hücre kültür kaplarına ekimi yapılmış olan hücrelerin doluluk oranı inverted mikroskopta düzenli olarak takip edildi. Hücre yoğunluğu % 80'e ulaştığında pasajlama işlemine geçildi. Pasajlama işlemi için; +4 °C'de muhafaza edilen DMEM F12 besiyeri ve % 0.05'lik konsantrasyondaki tripsinin ısısı 37°C'ye ayarlandı. Kültür kaplarındaki besiyeri serolojik pipet ile uzaklaştırılarak kapların tabanında bulunan hücrelerin üzerine 2 ml tripsin ilave edildi ve 3 dakika (dak.) inkübatörde hücrelerin kültür kabının tabanından kalkması için bekletildi. Bu sürenin ardından hücre ve tripsin EDTA'dan oluşan süspansiyonun üzerine tripsinin etkisini yok etmek için 4 ml DMEM F12 besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Hücre süspansiyonu 1500 rpm de 5 dak. santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Süpernatan uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine besiyeri eklenerek hücreler çözüldü ve daha sonra hücreler medyum içeren 75 cm^2'lik hücre kültür kaplarına alındı. Daha sonra hücreler çoğlamaları için 37 °C'lik CO_2'li etüvde inkübe edildi

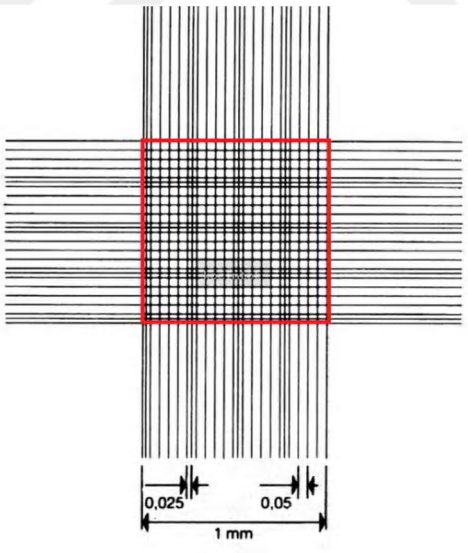
3.2.2. Hücre Sayımı

Yapılan testlerde gruplar arasındaki hücre sayılarını eşitleyerek sağlıklı sonuçlar elde edilmesi için hücreler sayılarak eşit sayıda hücre ile çalışmalar yapıldı. Hücre sayımı Thoma lamı kullanılarak yapıldı. Thoma lamında hücre sayımı prensibi, Şekil 3.1'de gösterilen kırmızı alan ile çevrelenmiş 0.1 mm^3 hacmindeki 16 kareden oluşan büyük kare üzerindeki hücrelerin sayılması ve sayılan toplam hücre sayısının kırmızı ile çevrelenen alan sayısına bölünmesi ilkesine dayanmaktadır. Şekil 3.1'de kırmızı ile gösterilen alanın bir kenarı 1mm, yüksekliği 0.1 mm hacmi ise; 1mm x 1mm x 0.1 mm den 0.1 mm^3 eder.

1 ml ise 1000 mm^3 ettiğinden 0.1 mm^3 hacmi, 1 ml'nin 10.000 de 1'i etmektedir.

Pellet yoğunluğuna göre yapılan dilüsyon oranı da hesaplamaya dahil edildiğinde aşağıdaki formül hücre sayısını belirlemek için kullanıldı.

1 ml deki hücre sayısı = (sayılan hücre sayısı/sayılan işaretli alanların sayısı) x 10^4 x dilüsyon faktörü



Şekil 3.1. Thoma lamı

3.2.3. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu

GLS1'in baskılanması için GLS1'ihedef alan iki farklı siRNA ve negatif kontrol olarak herhangi bir geni baskılamayan kontrol siRNA kullanıldı. siRNA'lar SIGMA ALDRICH firmasından satın alındı. Kontrol (SIC001) ve GLS1 siRNA'lar (SASI-HS01-71581 ve SASI-HS01-71573) son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde nukleaz-free su ile laminar havaakımlı kabinde hazırlandı. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu için transfeksiyon ajanı olarak hiperfekt kullanıldı.

3.2.4.Western Blot Analizi

25 cm^2'lik hücre kültür flasklarına 4 ml medya içerisinde 350.000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kültür otamına son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde siRNA'lar ilave edildi ve transfeksiyon için hücreler 72 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücrelerin bulunduğu ortamdaki medya uzaklaştırıldı ve üzerine 2ml tripsin ilave edilip, 3 dak. etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flaskın tabanından kalkması sağlandı. Sonrasında ortama tripsin miktarının 2 katı kadar medya eklendi vehücre süspansiyonu falkon tüpealındı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatan kısmı atılarak pellet üzerine1 ml PBS eklenip süspanse edildi. Ependorf tüpe alınan süspansiyon 5000 rpm de 3 dak. santrifüj edildi. Pellet miktarına bağlı olarak üzerine lizis buffer ilave edilen hücreler, buz üzerine alınarak 10 dak. inkübe edildi. Ardından hücreler seri bir şekilde 30 sn vortekslenerek 15 dak. yine buz üzerinde inkübe edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Vorteks basamakları sonrasında hücreler 13000 rpm'de 20 dak. santrifüj edilip, protein miktar tayini için süpernetan kısımları ayrı bir ependorf tüpe alındı.

Süpernatanlardan 2 µl alınarak üzerlerine 12 µl dH_2O eklenerek dilüsyon sağlandı. 96 kuyulu plakanın dilüsyonu yapılan süpernatanlardan 5 µl eklendi. Her süpernatan için iki kuyuya yükleme yapıldı. Standart protein konsantrasyonunu belirlemek için BSA ile standart konsantrasyonlar kullanıldı. Protein standart konsantrasyonları, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 mg/ml olan standartlardan kuyulara 5 µl eklendi ve her standart ikili çalışıldı. Süpernatanların ve standartların üzerine Reagent A ve Reagent S den oluşan bir karışımdan 20 µl ilave edildi. Sonrasında Reagent B'den 175 µl her kuyuya eklenerek kuyulardaki son hacmin 200 µl olması sağlandı. 96'lı plaka 3 dak. oda şartlarında

çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı ve sonrasında Eliza-Reader da 750 nm de ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrası protein standartlarının değerleri kullanılarak bir standart eğri elde edildi. Süpernatanların ortalamaları hesaplandı ve western blot analizinde jele yüklenecek protein miktarları belirlendi.

Protein miktar tayini yapıldıktan sonra 40 µg içeren protein örneği jele yüklenerek yürütme tamponu içeren ortamda 50 mA akım altında 2 saat boyunca proteinler jelde yürütüldü. Daha sonra proteinler, +4 °C'de buz aküleri ile desteklenen transfer solüsyonu içerisinde 24 mA akımda bütün gece bekletilip jelden polivinilidin membran (PVDF) membrana aktarıldı. Transfer işleminin tamamlanmasından sonra PVDF membran süt tozu solüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklandıve sonrasında membran 3 kez 5'er dak. periyotlarla çalkalayıcı üzerinde TBS-T solüsyonunda yıkandı. Daha sonra hedeflediğimiz proteinlerin ekspresyonunu belirlemek için GLS1 (Proteintech, 12855-1- AP), kaspaz-3 (Proteintech,19677-1-AP), aktif kaspaz-3, aktif kaspaz-7, aktif kaspaz-9, integrin-β1 (Proteintech, 12594-1-AP) ve p21 (Santa Cruze, sc-397) primer antikor muamelesi yapıldı ve bütün gece membran +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde antikorla inkübe edildi. Sürenin sonunda tekrar TBS-T ile 3'er kez yıkanıp oda sıcaklığında 1 saat horseradish peroksidaz konjuge rabbit sekonder antikor muamelesi yapıldı. Sonrasında yıkamalar yapıldı ve hedef protein ekspresyonlarını belirlemek için standart Enhanced chemiluminescence (ECL) metodu kullanılarak membran BioRad kemolümünesan cihazı kullanılarak görüntüleme yapıldı. Yükleme kontrolü olarak β-aktin (Proteintech, 60008-1-lg) kullanıldı. ImageJ programı kullanılarak hedef proteinlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

3.2.5. Proliferasyon Analizi

Hücrelerin proliferasyon/canlılık oranını belirlemek için MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) analizi yapıldı. MDA-MB-231 hücreleri 96 kuyulu plakaya her kuyuda 1500 hücre olacak şekilde medya içerisinde ekimi yapıldı. Hücreler 37 °C'de % 5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde ortama siRNA'lar ilave edildi ve hücreleri 72 ssat siRNA'larla transfekte olması sağlandı. 72 saatlik transfeksiyonun ardından, kültür sonlandırıldı ve MTS/PMS (phenazine methosulfate) solüsyonundan (1000:50) her kuyucuğa 20 µl eklenerek yaklaşık 30 dak. etüv de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede 450 nm'de ölçüm yapıldı.

3.2.6. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay)

GLS1 siRNA ile transfeksiyon sonrası, siRNA'nın hücrelerin koloni oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek için koloni oluşturma (klonojenite) analizi yapıldı. MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyulu plakalara 2 ml medya içerisine 1000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler kültürün 48. saatinde siRNA'lar ile transfekte edildi ve 12-14 gün 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler ve transfeksiyon yapılmayan hücreler invert mikroskopta takip edildi ve bu hücreler kabın % 90'ınını doldurduğu zaman kültür sonlandırıldı. Kuyulardan medyalar uzaklaştırılıp hücreler metanolle hazırlanan % 10'luk kristal viyole ile boyandı.

3.2.7. Yara iyileşme Testi (Wound Healing Scratch Assay)

Hücreler 6 kuyulu plakaya her kuyuya 2 ml medya içerisinde 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24 saat sonra siRNA'lar ile transfekte edilerek 72 saat boyunca 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. Kültürün 96. saatinde 20 µl'lik pipet ucu kullanılarak kuyularda yara oluşturuldu. Oluşturulan yara alanları 0., 24. ve 48. saatlerde mikroskopta görüntülendi. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler takip edildi ve yaranın kapanması ile birlikte kültür sonlandırıldı. İnvert mikroskopta görüntüler alındı ve görüntülenen yara alanları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü.

3.2.8. Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi için hücreler, 25 cm^2'lik flasklara 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kültürün 24. saatinde siRNA transfeksiyonu yapıldı ve 96. saatin sonunda hücreler toplandı. Muse annexin V kit prosedürüne göre işlem basamakları takip edildi. 100 µl medya içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde hücreler süspanse edildi ve üzerine 100 µl Muse annexin V kitinden eklendi. Hücrelerin bulunduğu ependorf tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 20 dak. oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve ardından Muse cihazında ölçüm yapıldı.

3.2.9. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi için hücreler, 25 cm^2'lik flasklara 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kültürün 24. saatinde siRNA transfeksiyonu yapıldı ve kültürün 96. saatinin sonunda hücreler toplandı. Daha sonraki tüm aşamalar Muse cell cycle kit içeriğine

uygun olarak yapıldı. 1 ml medya içerisinde 1.000.000 hücre olacak şekilde hücreler süspanse edildi ve 300 g de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 1 ml DPBS eklenip tekrar santrifüj edildi. Pellet üzerine 1 ml % 70 etil alkol eklenerek -20 ^{0}C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler 300 g de 5 dak. santrifüj edildi ve pellet üzerine 200 µl Muse cell cycle reagent eklenip 30 dak. inkübasyona bırakıldı. Ardından Muse cihazında ölçüm yapıldı.

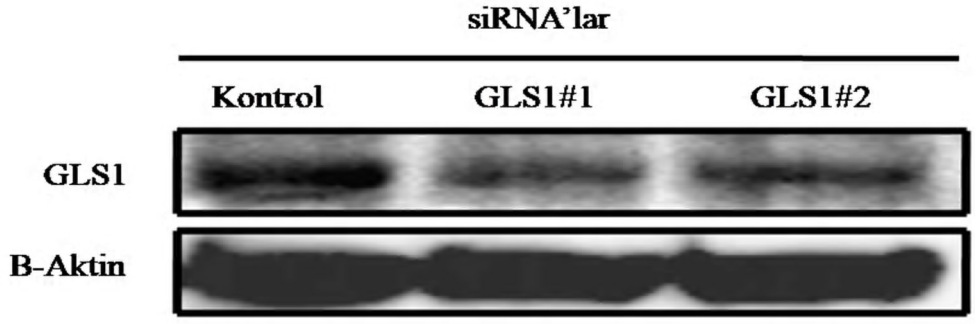
3.2.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistik analizleri GraphPad Prisim 6 programları kullanılarak Student t testi ile değerlendirildi. Her çalışma en az 3 kez tekrar edildi. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

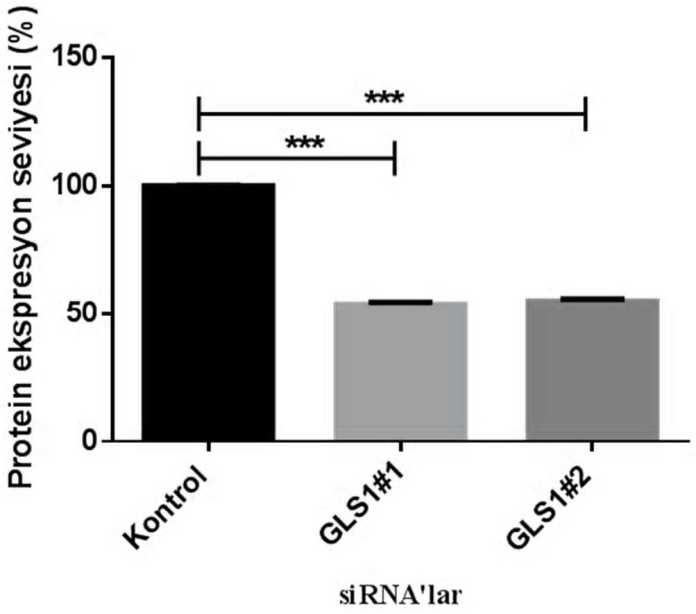
4. BULGULAR

4.1. siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun GLS1 protein düzeyine etkisinin belirlenmesi

İki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, GLS1 siRNA'larının GLS1 genini hedef alıp almadığını belirlemek için GLS1 geninin ürünü olan GLS1 protein ekspresyonu western blot analizi ile incelendi. Şekil 4.1.1'de görüldüğü gibi iki farklı GLS1 siRNA ileve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, GLS1'in ekspresyon oranı gösterildi. GLS1 siRNA'ları ile transfekte edilen hücrelerle kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler karşılaştırıldığında, GLS1 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde GLS1 protein ekspresyonunun önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 4.1.2) ($p<0.001$). Bu sonuçlarımıza göre, seçtiğimiz iki farklı GLS1 siRNA'ların GLS1 genini hedeflediğinden emin olundu ve ilerleyen deneylerimizde bu siRNA'ların kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.1.1. siRNA'larla transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki GLS1 protein ifadelerinin western blot analizi ile belirlenmesi.



Şekil 4.1.2. GLS1 ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1 protein ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (***p<0.001).

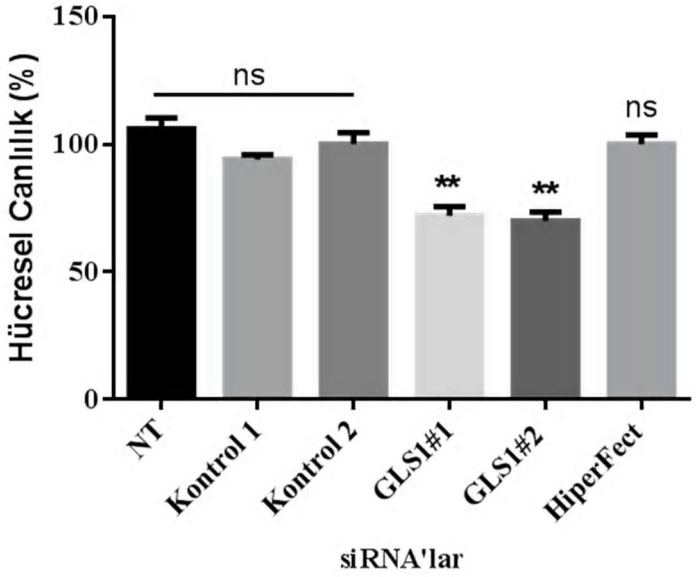
4.2. GLS1'in GLS1-siRNA aracılı inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu azaltmaktadır

GLS1#1, GLS1#2 olmak üzere iki farklı GLS1 siRNA ve iki farklı kontrol siRNA'nın MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri MTS analizi ile araştırıldı. Bu analiz için hücrelerin bir kısmı iki farklı GLS1 siRNA ve bir kısmı kontrol siRNA ile transfekte edildi. Bir kısım hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı (NT). Bir kısım hücreler ise transfeksiyon ajanı olan Hyperfect ile muamale edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri tamamlanınca, hücreler MTS/PMS solusyonu ile muamele edildi ve 3-4 saat sonra 450 nm'de Eliza-Reader'da hücre canlılık oranı analiz edildi (Şekil 4.2.1). Şekil 4.2.2'de görülen analiz sonuçlarına göre, kontrol siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelere göre, iki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hücre proliferasyon/büyüme oranının önemli oranda baskılandığı bulundu ($p<0.01$). Kontrol siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerle herhangi bir transfeksiyonun yapılmadığı hücreler arasında çoğalma oranı açısından bir fark olmadığı bulundu ($p>0.05$). Herhangi bir transfeksiyon ya da uygulamanın yapılmadığı hücrelerle hypefect ile muamele edilen hücrelerin çoğalma oranları arasında da bir fark olmadığı bulundu ($p>0.05$). Bu sonuç transfeksiyon ajanı olarak kullandığımız hyperfect'in hücreler üzerinde toksik bir

etkisinin olmadığını göstermektedir. GLS1'i hedef alan iki farklı siRNA ile GLS1'in baskılanmasının, MDA-MB-231 hücre proliferasyonunu önemli derecede azalttığı bulundu ($p<0.01$). Bu bulgumuz, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu için GLS1'in gerekli olduğunu gösterdi.

Blank	NT	Kont1	Kont2	GLS1#1	GLS1#2	HiPerFect	
1	2	3	4	5	6	7	8
0.464	0.474	0.473	0.497	0.484	0.478	0.469	0.490
0.510	0.857	0.726	0.800	0.741	0.733	0.815	0.814
0.517	0.807	0.786	0.786	0.689	0.704	0.744	0.782
0.497	0.806	0.771	0.771	0.755	0.671	0.718	0.790
0.490	0.748	0.768	0.761	0.749	0.723	0.765	0.762
0.486	0.776	0.730	0.730	0.700	0.701	0.747	0.814
0.482	0.747	0.747	0.736	0.705	0.750	0.761	0.801
0.466	0.499	0.502	0.531	0.501	0.478	0.506	0.467

Şekil 4.2.1. siRNA'ların canlılık üzerine etkilerini gösteren Eliza-Reader sonuçları

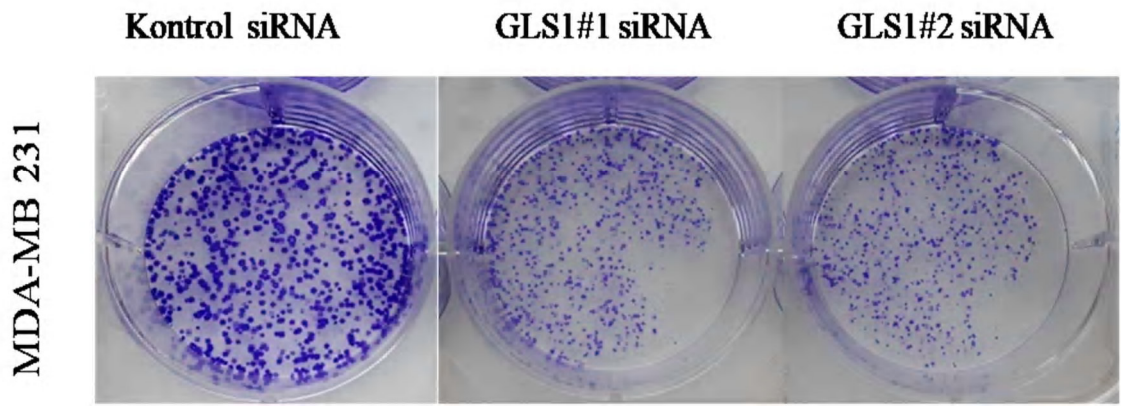


Şekil 4.2.2. MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranları (**$p<0.01$) (NT: hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler, ns: non significant)

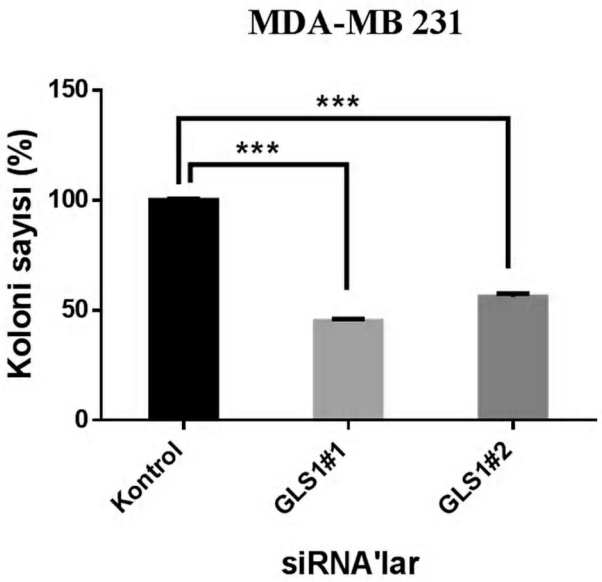
4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1-siRNA aracılı GLS1'in inhibisyonu hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini azaltmaktadır

GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'larının, MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma üzerine olan etkilerini analiz etmek için klonojenite testi yapıldı. Bu test, kanser hücrelerinin neoplastik eğilimini ölçmektedir. Normal hücreler kontak inhibisyon ile büyüyüp çoğalırken kanser hücreleri ise koloniler oluşturarak çoğalmaktadır.

Kontrol, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin oluşturdukları koloniler Şekil 4.3.1'de verildi. Yapılan analiz sonucunda kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin oluşturduğu koloni formasyonu ile kıyaslandığında GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumlarının önemli oranda azaldığı bulundu ($p<0.001$; Şekil 4.3.2). Bu verimiz, GLS1 ekspresyonunun MDA-MB-231 hücrelerindeki koloni oluşumu üzerine önemli bir etkisinin olduğunu gösterdi.



Şekil 4.3.1. GLS1 enziminin susturulması ile koloni oluşturma potansiyellerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

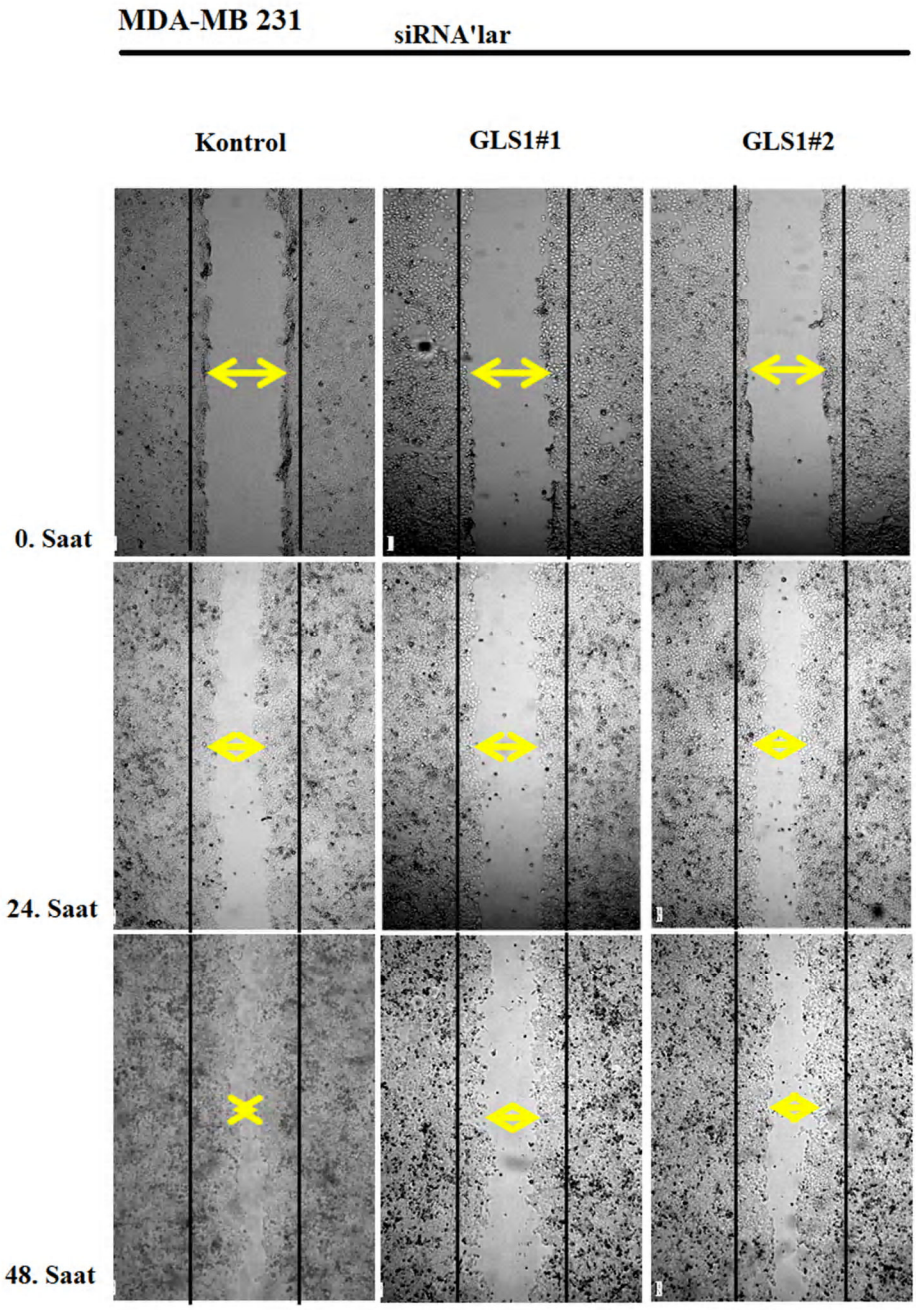


Şekil 4.3.2. GLS1 siRNA uygulaması MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelini azaltır (***p<0.001).

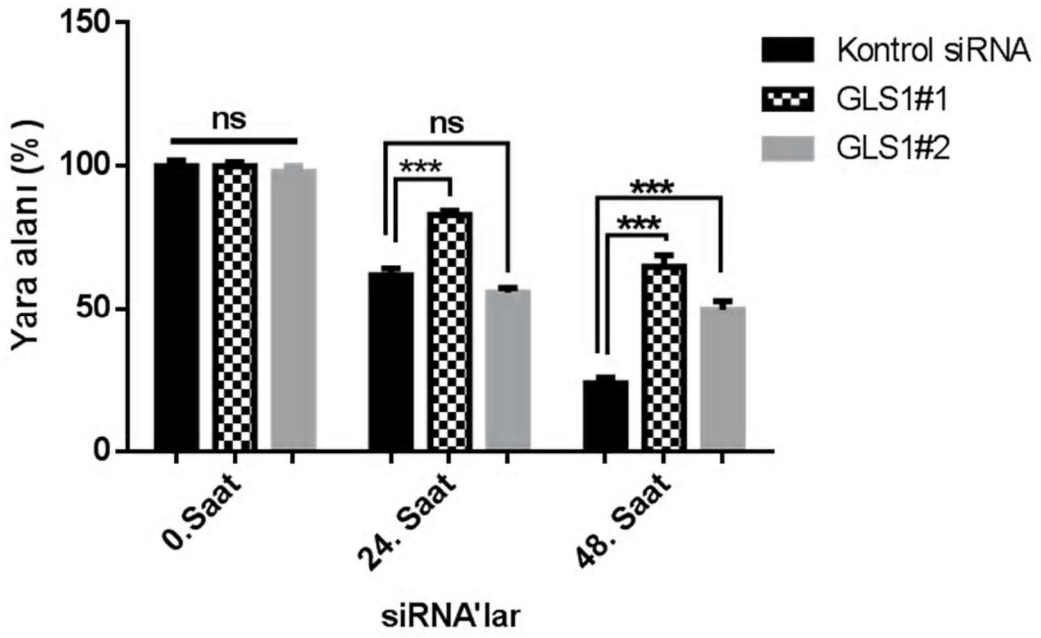
4.4. GLS1-siRNA aracılı GLS1'in inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu azaltmaktadır

MDA-MB-231 hücrelerinde, GLS1'in kanserin ilerleyen basamaklarında görülen hücre göçü (migrasyon) üzerine etkisi yara iyileşme testi ile değerlendirildi. MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına ekilerek, kontrol, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra kuyularda yara oluşturuldu ve 0., 24. ve 48. saatlerde kuyular görüntülendi. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, 0. saatte oluşturulan yaralarda hücrelerin göç etmesi ile birlikte kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde 24. saatte yaranın kapanmaya başladığı, 48. saatte yaranın tamamen kapandığı, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen hücrelerde ise yaranın hala kapanmadığı görüldü (Şekil 4.4.1). Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, 24. saatte, kontrol ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen hücrelerde yara kapanma alanları arasında bir fark olmadığı, ancak kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki yara kapanma alanının, GLS1#1 siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre daha fazla olduğu bulundu ($p<0.001$). 48. saatte, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yara alanının neredeyse tamamen kapandığı, ancak GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen hücrelerde oluşturulan yara alanının kapanmadığı

bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4.4.2). Migrasyon sonuçları değerlendirildiğinde, GLS1'in kanserin ileri basamaklarında görülen hücrelerin migrasyonuna katkıda bulunarak meme kanserlerinin agresifleşmesinde de rol aldığı düşünülebilir.

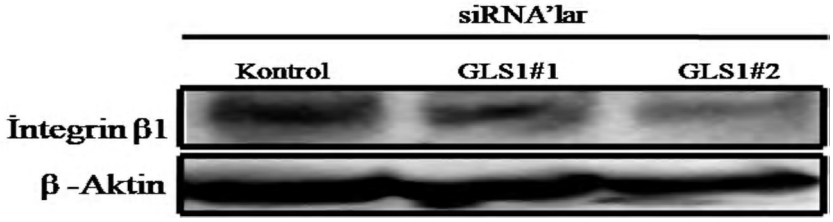


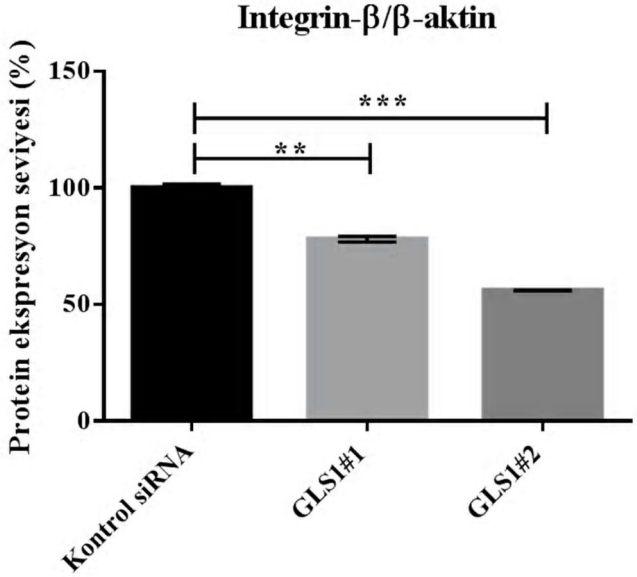
Şekil 4.4.1. GLS1 susturulmasının MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu üzerine etkileri. Yara iyileşmesi analizi ile hücre göçü ölçüldü. Belirtilen siRNA'lar ile transfekte edilmiş ve hücre doluluğu tamamlanmış kültür kabının merkezinde yara oluşturuldu. Işık mikroskobu ile 0., 24. ve 48. saatlerde görüntülendi.



Şekil 4.4.2. GLS1'in siRNA aracılı inhibisyonu, MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunu azaltır (***p<0.001) (ns; non significant).

İntegrin-β1, kanser hücrelerinin göçünü ve invazivliğini arttıran ekstra sellüler matriksin (ECM)'nin düzenlenmesinde rol alan anahtar bir proteindir (Lamouille ve ark., 2014). Bu yüzden çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde, GLS1'in, hücre invazyonunun ve mobilitesinin anahtar medyatörü olarak kabul edilen integrin-β1'in ekspresyonunu etkileyip etkilemediği araştırıldı. Western blot analizi sonuçlarına göre, kontrol siRNA ile kıyaslandığında GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde integrin-β1 protein ekspresyonunun önemli derecede azaldığı bulundu (sırasıyla; p<0.01, p<0.001) (Şekil 4.3.3). Bu sonuç, GLS1 ekspresyonunun baskılanması sonrası hücre göçü ve invazyonun anahtar medyatörü olarak integrin-β1 ekspresyonunun baskılandığını böylece hücrelerin mobilitesinin azaldığını gösterdi.

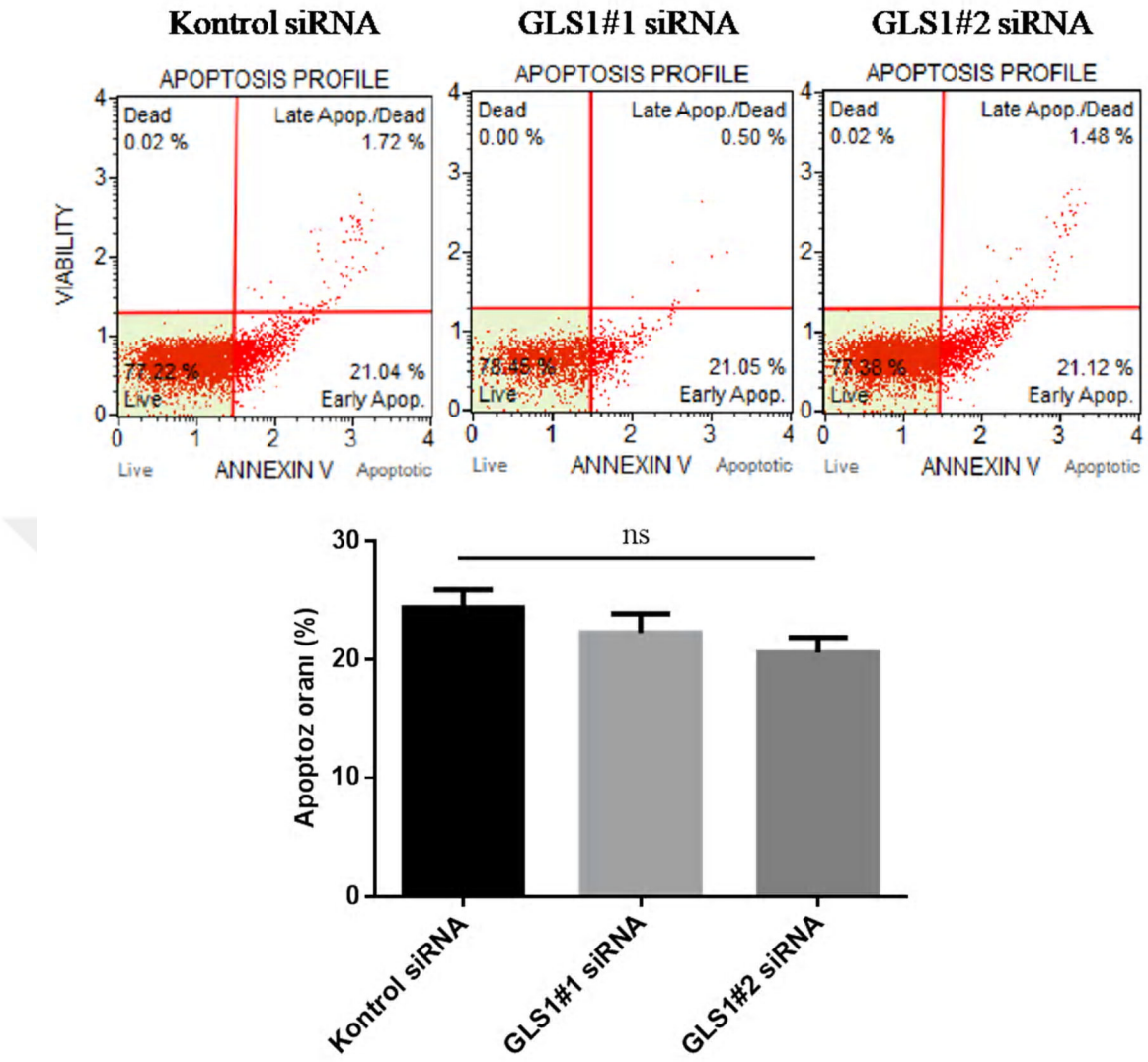




Şekil 4.4.3. GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde integrin β1 ekspresyon seviyesi (**p<0.01, ***p<0.001)

4.5. GLS1'in siRNA aracılı inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz oranını etkilemez

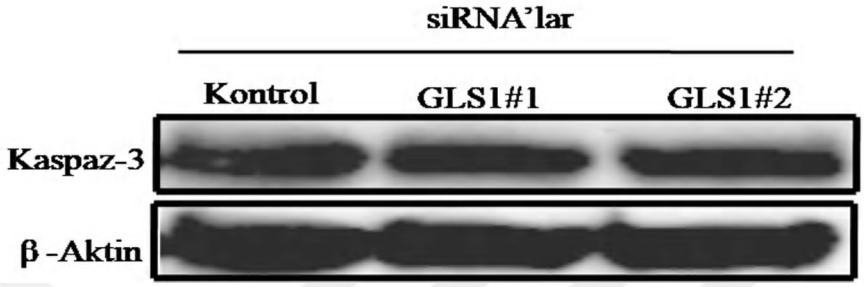
GLS1'in GLS1-siRNA aracılı inhibisyonunun apoptozu tetikleyip tetiklemeyeceğini belirlemek için MDA-MB-231 hücrelerinde iki farklı GLS1 siRNA aracılığı ile GLS1 inhibe edildi ve apoptotik hücre ölümü annexin V boyama ile değerlendirildi (Şekil 4.5.1). Analiz sonuçlarımıza göre, kontrol, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücreleri arasında apoptoz oranı açısından bir fark olmadığı bulundu (kontrol ile kıyaslandığında GLS1#1 p=0.39, GLS1#2 p= 0.12) (Şekil 4.5.1). Bu analiz sonucu ile MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1 inhibisyonuna bağlı olarak azaldığı düşünülen enerji kaynağının yetersizliğinden dolayı, hücrelerde enerji gerektiren bir ölüm tipi olan apoptozun gerçekleşemediği düşünüldü.



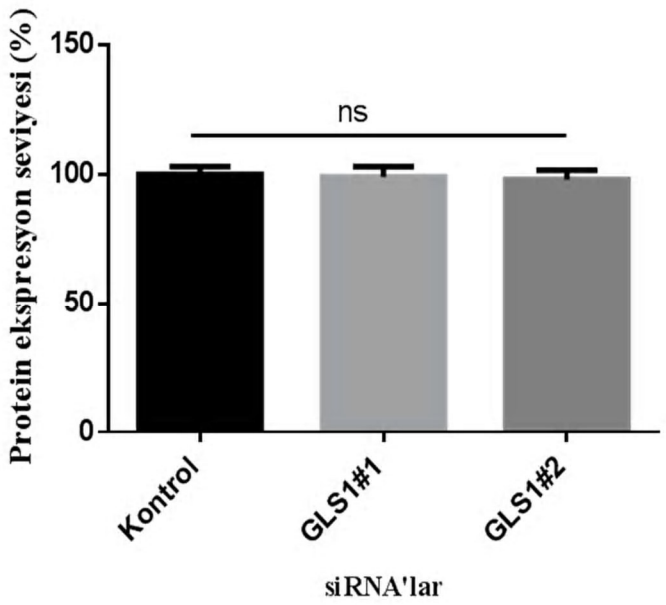
Şekil 4.5.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'in baskılanması, MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ile hücre ölümünü etkilememektedir (ns; non significant).

Bu sonuçlarımızı desteklemek için iki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, apoptozda rol oynayan aktif-kaspaz-3 ve total kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları araştırıldı. Analiz sonuçlarımıza göre; kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle GLS1 siRNA'larla transfekte edilen hücreler arasında, total kaspaz-3 proteinin ekspresyon seviyesi açısından herhangi bir değişiklik bulunamadı (kontrol siRNA ile kıyaslandığında GLS1#1 p=0.85, GLS1#2 P=0.69) (Şekil 4.5.3). Apoptoz uyarıldığı zaman kaspaz-3 proteolitik kesime uğrayarak aktifleşir. İki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun uyarılmadığı ve dolayısıyla kaspaz-3 proteolitik kesime uğramadığı için western blot analizi ile aktif kaspaz-3 görüntülenemedi. Sonuç olarak apoptoz ile ilgili elde ettiğimiz veriler, siRNA aracılı GLS1 inhibisyonun MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu indüklemediğini

ortaya koydu. Ayrıca sonuçlarımız, glutamin enerji metabolizmasının siRNA aracılı inhibe edildiği hücrelerde, hücrelerin enerji gerektiren apoptoz yolağını kullanmadıklarını farklı bir yolak aracılığıyla çoğalmalarını durdurduklarına işaret etmektedir.



Şekil 4.5.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'i baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde total kaspaz-3 protein ekspresyonu.

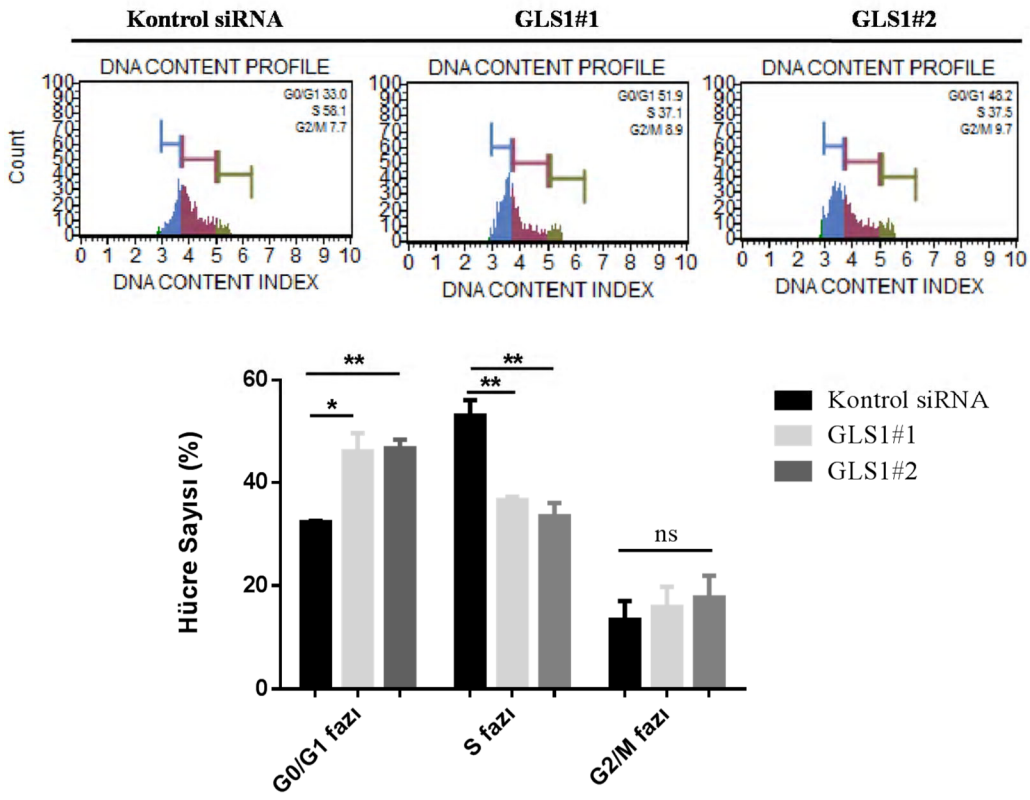


Şekil 4.5.2. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'i baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde, apoptotik proteinlerden olan total kaspaz-3'ün protein seviyesini değiştirmez (ns; non significant).

4.6. Hücre Döngüsü Analizi

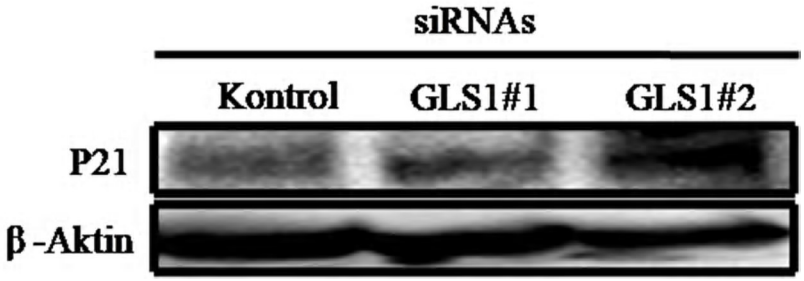
MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1'in siRNA aracılı inhibisyonu ile meydana gelen proliferasyondaki azalmanın hangi mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya çıkartmak için

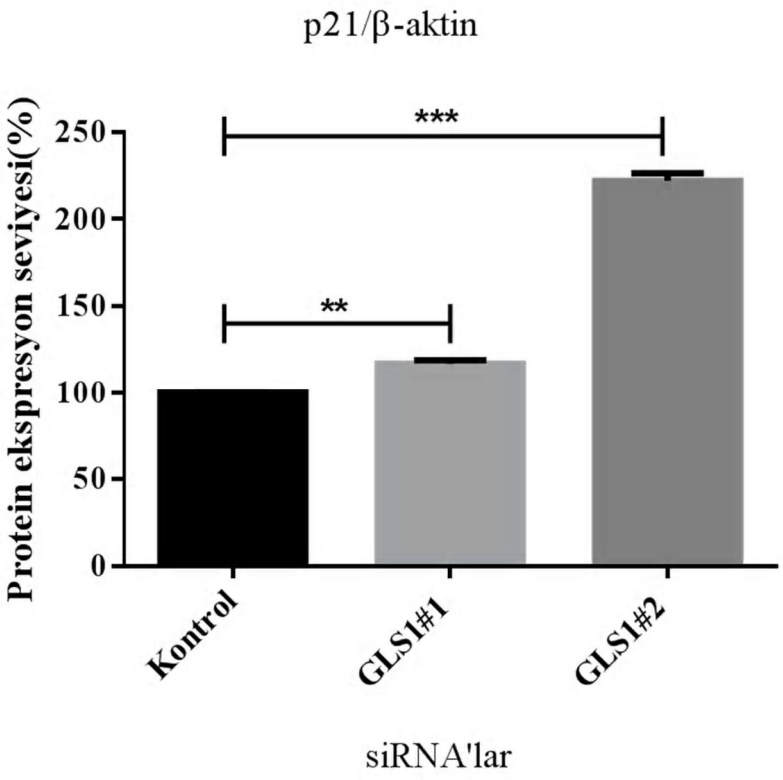
hücrelerin enerji metabolizmasının kesintiye uğratılmasıyla birliktehücre döngüsünün herhangi bir basamağında bölünmelerini durdurabilecekleri düşünüldü. Bu yüzden GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hücre döngüsü analizi yapıldı. Hücre döngüsü fazları, PI boyama ile kantitatif olarak Muse cell analyzer cihazında analiz edildi. Kontrol, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'ları ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü evrelerini gösteren histogram Şekil 4.6.1'de görülmektedir. Kontrol siRNA ile kıyaslandığında, GLS1#1 ve GLS1#2 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerin önemli bir kısmının G0/G1 fazında olduğu bulundu (sırasıyla, p=0.017 ve p= 0.001) (Şekil 4.6.1). S fazında ise durumun tam tersi olduğu kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerin GLS1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerden daha fazla olduğu bulundu (sırasıyla, p=0.006 ve p=0.008) (Şekil 4.6.1). G2/M fazında ise kontrol ve GLS1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücreler arasında bir fark olmadığı bulundu (p>0.05). Sonuçlarımıza göre, GLS1#1 ve GLS1#2 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde hücre proliferasyonundaki azalmanın GLS1'in inhibisyonu sonucu ortaya çıkan enerji kaynağındaki azalmaya bağlı olarak bölünmelerini durdurarak G0/G1 fazında beklemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.



Şekil 4.6.1. İki farklı GLS1 siRNA ile GLS1'in baskılanmasının, MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü evreleri üzerine etkisi (*P<0.05, **P<0.01).

p21, hücre döngüsünün G1 fazında görev alan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörüdür. p21, siklin-CDK2, CDK1 ve CDK4/6 komplekslerine bağlanarak siklin-CDK aktivitesini inhibe eder ve hücrelerin hücre döngüsünün G1 evresinde bekletilmesini sağlar. Bu yüzden GLS1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerin G0/G1 evresinde beklemesinin p21 ekspresyonundaki değişiklikten kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak için, GLS1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde p21 proteinin ekspresyon seviyesi araştırıldı. Western blot analiz sonuçlarımıza göre, iki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde kontrol siRNA iletransfekte edilen hücrelere göre p21 ekspresyonunun önemli oranda arttığı bulundu ($p<0.01$, $p<0.001$) (Şekil 4.6.2). Sonuç olarak, GLS1 siRNA'ları ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G0/G1 evresinde beklemesinin p21 seviyesindeki artıştan kaynaklandığı gösterildi.





Şekil 4.6.2. İki farklı GLS1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde p21 ekspresyonu (**p<0.01, ***p<0.001).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan tez çalışmasında, üçlü reseptör negatif MDA-MB-231 agresif meme kanser hücrelerinde glutamin katabolizmasının ilk basamağında yer alan GLS1 enziminin siRNA aracılı inhibisyonu sonrası bu hücrelerin proliferasyon, apoptoz, migrasyon, koloni oluşturma özellikleri araştırılmıştır.

Meme kanserleri klinik, histolojik ve moleküler genetik olarak heterojen karakterdedir. Kim ve ark.(2013), meme kanserlerindeki bu heterojenitenin glutamin metabolizmasında bir farklılık meydana getirip getirmediğini belirlemek için glutamin metabolizması ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını araştırmışlardır. Bunun için 702 meme kanserli hastanın stroma ve tümör örneği, glutamin ilişkili proteinler GLS1, GDH ve ASCT-2 için hem doku mikroarray'i hem de immünohistokimyasal boyama yapılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, glutamin metabolizması ilişkili protein ekspresyonlarının, meme kanserinin moleküler alt tiplerine göre farklılık gösterdiği, en yüksek glutamin metabolik aktivitesinin üçlü negatif ve HER2 (+) tip meme kanserlerinde olduğu bulunmuştur (Kim ve ark., 2013). Bu sonuçlara göre, meme kanserinin agresif alt tiplerinde glutamin metabolizması tarafından desteklenmesi ile glutaminin ve ilişkili olduğu proteinlerin, meme kanserinin agresifliğine katkı yaptığı düşünülebilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, baş ve boyun (HCCC-9810, RBE ve QBC939), kolorektal (THC8307, HCT116 ve HT29), yumurtalık (HEY, SKOV3 ve IGROV-1) ve hepatoselluler karsinom (HCCLM3 ve SMMC-7721) gibi bazı kanser hücre hatlarında ve Xenograft tümör modellerinde glutaminolizisin ya da GLS1 aktivitesinin inhibe edilmesinin tümör hücre çoğalmasını, invazyon ve migrasyonu, kök hücre özelliklerini azalttığı ve beraberinde apoptozu da indüklediği gösterilmiştir (Hensley ve ark., 2013; Huang ve ark., 2014; Jacque ve ark., 2015; Katt ve Cerione., 2014; Matre ve ark., 2016;

Szeliga ve ark., 2014; Wang ve ark., 2016; Qiu ve ark., 2019; Yang ve ark., 2019; Yuan ve ark., 2015). Matre ve ark. (2016) da, bazı akut myeloid lösemi (AML) alt tiplerinde, glutaminaz inhibitörü CB-839'un farklılaşmayı ve apoptozu indüklediğini ayrıca hücresel büyümeyi baskıladığını bulmuşlardır. Benzer olarak Gross ve ark. (2014), TNBC hücre hatlarında glutaminaz inhibitörü CB-839 ile yaptıkları çalışmada, glutamin kullanan enzim ve taşıyıcılar üzerinde çoklu sitotoksik etkileri olan bu inhibitörün MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir. Ancak bu verilerin tersine, MDA-MB-231 hücrelerinde GLS1'in shRNA aracılı inhibisyonunun apoptozu indüklemediği de gösterilmiştir (Lampha ve ark.,2017). Lampha ve ark. (2017)'nın bulguları ile uyumlu olarak, bizim sonuçlarımız da MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun apoptoz ölüm yolağını indüklemediğini göstermiştir. Apoptoz ile ölüm, DNA parçalanması gibi nükleer değişimlerden mitokondrideki bcl-2/bax değişimine kadar her aşamada intrasellüler ATP'ye ihtiyaç duyan bir mekanizmadır. siRNA aracılı GLS1 inhibisyonu gerçekleştirdiğimiz glutamin bağımlı MDA-MB-231 hücrelerinde önemli bir enerji yolunun kesilmesi bu hücrelerde ATP gerektiren apoptoz gibi bir mekanizmanın durmasına yol açabilir.

Literatürde glutamin sınırlamasının hücresel büyümeyi baskıladığı, hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu ve mTOR gibi önemli bir yolakta bozulmalar meydana getirdiği belirtilmiştir (Yuan ve ark., 2015; Ye ve ark., 2016). Ayrıca, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) de GLS inhibitörü 968'in G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (Han ve ark., 2017). Benzer şekilde, hücre döngüsü analiz sonuçlarımız ile GLS1 siRNA'larla transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde hücrenin G0/G1 fazında beklediği ilk defa gösterildi. Hücre döngüsü analizi ile elde ettiğimiz sonuçları doğrulamak için hücre döngüsünde p21 protein ekspresyonu analizi yapılmış ve GLS1 ekspresyonunun baskılandığı hücrelerde p21 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz veriler, MDA- MB-231 hücreleri için önemli olan glutamin metabolizmasının baskılanmış olmasının, hücrenin enerji kaynağını keserek hücrelerin G0/G1 fazında bekletilmesine ve dolayısyla hücre proliferasyonunun baskılanmasına yol açtığına işaret etmektedir.

NSCLC, yumurtalık, pankreatik, kolorektal, ve intrahepatik kolanjiyokarsinoma gibi farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda, GLS1'in koloni oluşumu (Li ve ark., 2019; Lu ve ark., 2017; Masamha ve ark., 2018; Yeh ve ark., 2017), migrasyon ve invazyona

katkı yaptığı gösterilmiştir. Pankreatik karsinoma hücre hattında GLS'ye karşı uygulanan thiazolidine-2,4-dione küçük molekül inhibitörünün kanser hücrelerinin klonojenitesini azalttığı gösterilmiştir (Yeh ve ark., 2017). Yumurtalık kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada da siRNA aracılı GLS1 inhibisyonu yapılmış, hem koloni oluşturma potansiyeline hem de yara iyileşme analizi ile migrasyon kapasitesine bakılmış ve her iki kanserojenik özellikte de anlamlı derecede azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Lu ve ark., 2017). NSCLC hücrelerinde de GLS1 inhibitörü 968 bileşiğinin muamelesi sonrası migrasyonun inhibe edildiği belirtilmiştir (Han ve ark., 2007). Diğer kanser hücrelerinde bulunan sonuçlarla uyumlu olarak bizde ilk kez MDA-MB-231 agresif meme kanser hücrelerinde siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve migrasyonu önemli oranda baskıladığını gösterdik.

Fu ve ark. (2015), meme kanseri ile ilgili yaptıkları çalışmalarında Taxol'e dirençli meme kanseri hücrelerinin GLS1 ekspresyonunu upregüle ettiğini ve siRNA kullanılarak GLS1'in susturulmasının ise bu hücreleri yeniden Taxol'e hassas hale getirdiğini belirlemişlerdir. TNBC hücre hatları ile yaptıkları çalışmalarında Lampha ve ark. (2017), shRNA aracılı GLS1 inhibisyonuna ilave doksisiklin uygulamasında MDA-MB-231 hücrelerinde sinerjik etki sonucu apoptozun indüklendiğini ve beraberinde mTOR inhibisyonu gerçekleştiğini göstermişlerdir. Chen ve ark. (2016) da üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde kemoterapotik ajanlardan olan etoposit ve sisplatin'in glutamin metabolizmasının inhibisyonu ile birlikte nasıl bir etki oluşturacağını belirlemeye çalışmışlardır. HCC1937 ve BT-549 meme kanseri hücre hatlarını kullanarak GLS1 inhibitörü BPTES ya da glutaminsiz medya ile etoposit ve sisplatinin birlikte kullanımlarının, hücre proliferasyonunu ve apoptozu nasıl etkilediğini incelemişlerdir. HCC1937 hücrelerinde BPTES ya da glutamin eksikliği ile birlikte etoposit ve sisplatin'in hücre proliferasyonunu azalttığı, apoptozu ise arttırdığı belirlenirken; BT-549 hücrelerinde etoposidin sadece en yüksek konsantrasyonda apoptozu uyarırken sisplatinin ise en düşük konsantrasyonda bile uyardığı belirlenmiştir. Böylece kombine yaklaşımlarla glutamin metabolizmasının inhibe edilerek kanser tedavisi yapılabileceği önerilmiştir (Chen ve ark., 2016).

Sonuç olarak, bulgularımız üçlü reseptör negatif MDA-MB-231 agresif meme kanser hücrelerinde siRNA aracılı GLS1 inhibisyonunun, bu hücrelerin proliferasyon, apoptoz,

migrasyon, koloni oluşturma gibi kanserojenik özelliklerini baskıladığını açıkça göstermiştir. Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi glutamin bağımlı agresif meme kanserleri için de bu enerji yolağının antisens uygulamalarla veya küçük molekül inhibitörleri ile hedef alınmasının, önemli bir tedavi stratejisiolarak değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abe O, Abe R, Enomoto K, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet, 2005; 365(9472): 1687-1717.

Abu Aboud O, Habib SL, Trott J, et al. Glutamine Addiction in Kidney Cancer Suppresses Oxidative Stress and Can Be Exploited for Real-Time Imaging. Cancer Res, 2017; 77(23): 6746-6758.

Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. J Clin Oncol, 2014; 32(25): 2794-2803.

Aleku M, Schulz P, Keil O, et al. Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. Cancer Res, 2008;68(23):9788-98.

Ali HR, Rueda OM, Chin SF, et al. Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples. Genome Biol, 2014; 15(8): 431.

Ali S, Coombes RC. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000; 5(3): 271-281.

Allred DC. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. Oncologist, 2008;13(11): 1134-1136.

Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. Breast Cancer Res Treat, 2002; 76(1): 27-36.

Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? J Natl Cancer Inst, 2014; 106(8): 21-25.

Arpino G, Weiss H, Lee AV, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J Natl Cancer Inst, 2005; 97(17): 1254-1261.

Badve S, Nakshatri H. Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. J Clin Pathol, 2009; 62(1): 6-12.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. J Clin Oncol, 2003; 21(10): 1973-1979.

Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. Oncogene, 2007; 26(56): 7773-7779.

Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, Terry MB. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? J Glob Oncol, 2018; 4: 1-16.

Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, et al. bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. Cancer, 1998; 82(7): 1296-1302.

Berkey CS, Frazier AL, Gardner JD, Colditz GA. Adolescence and breast carcinoma risk. Cancer, 1999; 85(11): 2400-2409.

Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002; 7(1): 3-15.

Blamey RW, Hornmark-Stenstam B, BallG, et al. ONCOPOOL - a European database for 16,944 cases of breast cancer. Eur J Cancer, 2010; 46(1): 56-71.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. Genome Biol, 2007; 8(10): R214.

Bode BP, Souba WW. Modulation of cellular proliferation alters glutamine transport and metabolism in human hepatoma cells. Ann Surg, 1994; 220(4): 411-422.

Bond AM, VanGompel MJW, Sametsky EA, et al. Balanced gene regulation by an embryonic brain ncRNA is critical for adult hippocampal GABA circuitry. Nat Neurosci, 2009; 12:1020–7.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018; 68(6): 394-424.

Burke W, Daly M, Garber J, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. JAMA, 1997; 277(12): 997-1003.

Cacace A, Sboarina M, Vazeille T, Sonveaux P. Glutamine activates STAT3 to control cancer cell proliferation independently of glutamine metabolism. Oncogene, 2017; 36(15): 2074-2084.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, wt al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. JAMA, 2006; 295(21): 2492-2502.

Carroll JS, Swarbrick A, Musgrove EA, Sutherland RL. Mechanisms of growth arrest by c-myc antisense oligonucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens. Cancer Res, 2002; 62(11): 3126-3131.

Cervantes A, Alsina M, Tabernero J, et al.Phase I dose-escalation study of ALN-VSP02, a novel RNAi therapeutic for solid tumors with liver involvement. J. Clin. Oncol, 2011; 29:3025

Chang CF, Diers AR, Hogg N. Cancer cell metabolism and the modulating effects of nitric oxide. Free Radic Biol Med, 2015; 79: 324-336.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst, 2009; 101(10): 736-750.

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res, 2008; 14(5): 1368-1376.

Chen L, Cui H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. Int J Mol Sci, 2015; 16(9): 22830-22855.

Chen L, Cui H, Fang J, et al. Glutamine deprivation plus BPTES alters etoposide- and cisplatin-induced apoptosis in triple negative breast cancer cells. Oncotarget, 2016; 7(34): 54691-54701.

Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression As a Prognostic Factor in a Large Tissue Microarray Series of Node-Negative Breast Cancers. Journal of Clinical Oncology, 2008; 26(35): 5697-5704.

Clarke M, Collins R, Davies C, et al, Grp EBCTC. Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomised trials. Lancet, 1998; 351(9114); 1451-1467.

Cobain EF, Milliron KJ, Merajver SD. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. Semin Oncol, 2016; 43(5): 528-535.

Colomer R, Beltran M, Dorcas J, et al. It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer. J Clin Oncol, 2005; 23(16): 3868-3869.

Creighton CJ, Li XX, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009; 106(33): 13820-13825.

Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. Nutrients, 2018; 10(11).

Csibi A, Fendt SM, Li C, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. Cell, 2013; 153(4): 840-854.

Csibi A, Lee G, Yoon SO, et al. The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. Curr Biol, 2014; 24(19): 2274-2280.

Curi R, Newsholme P, Procopio J, et al. Glutamine, gene expression, and cell function. Front Biosci, 2007;12: 344-357.

Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. Annu Rev Nutr, 1995; 15: 133-159.

Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. Am J Hum Genet, 2004; 75(6): 1131-1135.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacological Reviews, 2006; 58(4): 773-781.

Dai XF, Chen A, Bai ZH. Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. Sci Rep, 2014; 4.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet, 2005; 366:1784–1793.

Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. Jnci-Journal of the National Cancer Institute, 2001;93(20): 1557-1562.

Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. Br J Cancer, 2010; 103(5): 668-675.

DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. Oncogene, 2010; 29(3): 313-324.

DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for

protein and nucleotide synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2007; 104(49): 19345-19350.

Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. Curr Opin Genet Dev, 2008; 18(1): 54-61.

Desmedt C, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ. Development and validation of gene expression profile signatures in early-stage breast cancer. Cancer Invest, 2009; 27(1): 1-10.

Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. Cancer Gene Ther, 2006; 13:819–829

Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. Annals of Oncology, 2006; 17(5): 818-826.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Res, 2007; 9(1): R6.

Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, et al. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. Mol Cell, 2012; 47(3): 349-358.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet, 2005; 365(9472): 1687-1717.

Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. Breast Cancer Res, 2013; 15(5): R92.

Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. Physiol Genomics,1999; 1(2): 51-62.

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. N Engl J Med, 2006; 355(6): 560-569.

Feigelson HS, Henderson BE. Estrogens and breast cancer. Carcinogenesis,1996; 17(11): 2279-2284.

Fisher ER, Osborne CK, McGuire WL, et al. Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. Breast Cancer Res Treat, 1981; 1(1): 37-41.

Fishman J, Osborne MP, Telang NT. The role of estrogen in mammary carcinogenesis. Ann N Y Acad Sci, 1995; 768: 91-100.

Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. Am J Hum Genet, 1995; 57(6): 1457-1462.

Fu A, Yu Z, Song Y, Zhang E. Silencing of glutaminase 1 resensitizes Taxol-resistant breast cancer cells to Taxol. Mol Med Rep, 2015; 11(6): 4727-4733.

Fuchs BC, Finger RE, Onan MC, Bode BP. ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2007; 293(1): C55-63.

Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. Histopathology, 2006; 49(1): 22-34.

Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. Nature, 2009; 458(7239): 762-765.

Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition, 1999; 15(6): 523-526.

Golan T, Khvalevsky EZ, Hubert A, et al. RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients. Oncotarget, 2015; 6(27):24560-70.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. J Clin Oncol, 2007; 27(8): 1250-1256.

Gross MI, Demo SD, Dennison JB, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. Mol Cancer Ther, 2014; 13(4): 890-901.

Grushko TA, Dignam JJ, Das S, et al. MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. Clin Cancer Res, 2004; 10(2): 499-507.

Guo L, Zhou B, Liu Z, et al. Blockage of glutaminolysis enhances the sensitivity of ovarian cancer cells to PI3K/mTOR inhibition involvement of STAT3 signaling. Tumour Biol, 2016; 37(8): 11007-11015.

Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Cruce CM. Down-Regulation of Bcl-2 by P53 in Breast-Cancer Cells. Cancer Res, 1994; 54(8): 2095-2097.

Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science, 1990; 250(4988): 1684-1689.

Han T, Guo M, Zhang T, et al. A novel glutaminase inhibitor-968 inhibits the migration and proliferation of non-small cell lung cancer cells by targeting EGFR/ERK signaling pathway. Oncotarget, 2017; 8(17): 28063-28073.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell, 2000; 100(1): 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011; 144(5): 646-674.

Hannon GJ. RNA interference. Nature, 2002; 418:244–251.

Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J et al. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers, 2019; 5(1): 66.

Harvie M, Howell A, Evans DG. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015; e66-73.

Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. N. Engl. J.Med, 2007; 357(15): 1496-1506.

Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, et al. Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. Cancer Res, 2009; 69(10): 4116-4124.

Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. J Clin Invest, 2013; 123(9): 3678-3684.

Ho-Yen C, Green A, Ellis I, Kermorgant S, Jones LJ. C-Met Expression Correlates with Molecular Sub-type and Outcome in Invasive Breast Cancer. J Pathol, 2012; 228: S16-S16.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science, 1991; 253(5015): 49-53.

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

Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. Endocrinology, 1978; 103(5): 1742-1751.

Hu W, Zhang C, Wu R, et al. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. Proc Natl Acad Sci USA,2010; 107(16): 7455-7460.

Hu ZY, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics, 2006; 7. 15-21.

Huang F, Zhang Q, Ma H, Lv Q, Zhang T. Expression of glutaminase is upregulated in colorectal cancer and of clinical significance. International journal of clinical and experimental pathology. 2014, 7(3):1093-100.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. Maturitas, 2001; 38(1): 103-113.

Hunt JF, Erwin E, Palmer L, et al. Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. Am J Respir Crit Care Med, 2002; 165(1): 101-107.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=gls. Erişim Tarihi:15.01.2020

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(gls2). Erişim Tarihi:15.01.2020

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamine. Erişim Tarihi: 15.08.2020

Hwang KT, Woo JW, Shin HC, et al. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. Int J Cancer, 2012; 131(7): E1109-E1119.

Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. Blood, 2015;126(11):1346-56.

James LA, Lunn PG, Middleton S, Elia M. Distribution of glutaminase and glutamine synthetase activities in the human gastrointestinal tract. Clin Sci (Lond), 1998; 94(3): 313-319.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011; 61(2): 69-90.

Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. Breast Cancer Res, 2017;19(1):118.

Katt WP, Cerione RA. Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. Drug Discov Today, 2014; 19(4): 450-457.

Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. JAMA, 2007; 297(21): 2360-2372.

Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, et al, Ganapathy V. Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. J Biol Chem, 1996; 271(31): 18657-18661.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. Epidemiol Rev, 1993;15(1): 36-47.

Kim S, Kim DH, Jung WH, Koo JS. Expression of glutamine metabolism-related proteins according to molecular subtype of breast cancer. Endocr Relat Cancer, 2013; 20(3): 339-348.

Kleibl Z, Kristensen VN. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. Breast, 2016;28: 136-144.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1971; 68(4): 820-823.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al. Quantitative association between, HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst, 2003; 95(2):142-153.

Kung HN, Marks JR, Chi JT. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. PLoS Genet, 2011; 7(8): e1002229.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014; 15(3): 178-196.

Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. Cell Metab, 2012; 15(1): 110-121.

Lee JS, Kang JH, Lee SH, et al. Glutaminase 1 inhibition reduces thymidine synthesis in NSCLC. Biochem Biophys Res Commun, 2016; 477(3): 374-382.

Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. Cell, 2013;152:1308–23

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest, 2011;121(7): 2750-2767.

Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLoS One, 2016; 11(6): e0157368.

Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2008; 108(3): 351-361.

Li ML, Greenberg RA. Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. Trends Biochem Sci, 2012; 37(10): 418-424.

Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res, 1976;36(12): 4602-4609.

Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, et al. Apoptosis Suppressing Protein Bcl-2 Is Expressed in Well-Differentiated Breast Carcinomas with Favorable Prognosis. Journal of Pathology, 1995; 177(1): 49-55.

Liu P, Ge M, Hu J, et al.functional mammalian target of rapamycin complex 1 signaling is indispensable for c-Myc-driven hepatocarcinogenesis. Hepatology, 2017; 66(1): 167-181.

Loden M, Stighall M, Nielsen NH, et al. The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorogenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. Oncogene, 2002; 21(30): 4680-4690.

Losurdo A, Rota S, Gullo G, et al. Controversies in clinicopathological characteristics and treatment strategies of male breast cancer: A review of the literature. Crit Rev Oncol Hematol, 2017; 113: 283-291.

Lu WQ, Hu YY, Lin XP, Fan W. Knockdown of PKM2 and GLS1 expression can significantly reverse oxaliplatin-resistance in colorectal cancer cells. Oncotarget, 2017;8(27): 44171-44185.

Lyle R, Watanabe D, te Vruchte D, et al. The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. Nat Genet, 2000; 25:19–21

Majeed W, Aslam B, Javed I, et al. Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. Asian Pac J Cancer Prev, 2014; 15(8): 3353-3358.

Martianov I, Ramadass A, Barros AS, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. Nature, 2007; 445(7128):666-70.

Masciari S, Dillon DA, Rath M, et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. Breast Cancer Res Treat, 2012;133(3): 1125-1130.

Mattick JS, Makunin IV. Non-Coding RNA. Hum Mol Genet, 2006; 15(1): 17-29.

Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. Virchows Arch, 2005; 447(4): 688-694.

Matre P, Velez J, Jacamo R, et al. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. Oncotarget, 2016; 7(48): 79722-79735.

Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer-deciphering the heterogeneity. Clin Cancer Res, 2014; 20(4): 782-790.

McDermott LA, Iyer P, Vernetti L, et al. Design and evaluation of novel glutaminase inhibitors. Bioorg Med Chem, 2016; 24(8): 1819-1839.

Mcdonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. Bcl-2-Immunoglobulin Transgenic Mice Demonstrate Extended B-Cell Survival and Follicular Lymphoproliferation. Cell,1989; 57(1): 79-88.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ, 2000; 321(7261): 624-628.

Meister G, Tuschl T. Mechanism of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, 2004; 431:343–349.

Mills GB, Lu Y, Fang X, etal. The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. Semin Oncol, 2001; 28(5 Suppl 16): 125-141.

Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. Breast Cancer Res Treat, 1997; 44(1): 1-22.

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med, 2001; 7(5): 552-556.

Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med, 2012; 156(9): 635-648.

Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988; 85(9): 3044-3048.

Niklison-Chirou MV, Erngren I, Engskog M, et al.TAp73 is a marker of glutamine addiction in medulloblastoma. Genes Dev, 2017; 31(17): 1738-1753.

O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, et al. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. J Natl Cancer Inst, 1998; 90(9): 697-703.

Offit K. BRCA mutation frequency and penetrance: new data, old debate. J Natl Cancer Inst, 2006; 98(23): 1675-1677.

Olivotto IA, Truong PT, Speers CH, et al.. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. J Clin Oncol, 2004; 22(9): 1769-1770.

Oved S, Yarden Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. Nature, 2002; 416(6877): 133-136.

Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. Adv Drug Deliv Rev, 2015; 87:108-19.

Palmer C, Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. BMC Genomics, 2006; 7: 115.

Pan Y, Han J, Zhang Y, Li XJ. [Role of vimentin in tumor metastasis and drug research]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2010; 41(6): 413-416.

Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab, 2016; 23(1): 27-47.

Peng J, Sengupta S, Jordan VC. Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators as Treatments and Preventives of Breast Cancer. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009; 9(5): 481-499.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. Oncologist, 2011; 16 Suppl 1: 61-70.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2000; 406(6797): 747-752.

Peto J, Mack TM. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. Nat Genet, 2000; 26(4): 411-414.

Petronini PG, Urbani S, Alfieri R, Borghetti AF,Guidotti GG. Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. J Cell Physiol, 1996; 169(1): 175-185.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al.Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N. Engl J. Med, 2005; 353(16): 1659-1672.

Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. J Natl Cancer Inst, 2013; 105(21): 1607-1616.

Prat A, Cheang MC, Martin M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol, 2013; 31(2): 203-209.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res, 2010; 12(5):255-260.

Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clin, 2018; 13(3): 325-338.

Qie S, Chu C, Li W, Wang C, Sang N. ErbB2 activation upregulates glutaminase 1 expression which promotes breast cancer cell proliferation. J Cell Biochem, 2014; 115(3): 498-509.

Qiu Q, Li M, Yang L, et al. Targeting glutaminase1 and synergizing with clinical drugs achieved more promising antitumor activity on multiple myeloma. Oncotarget, 2019;10(57):5993-6005.

Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, et al. The Prognostic Value of C-Erbb2 in Primary Breast Carcinomas - a Study on 942 Cases. Breast Cancer Res Treat, 1995; 35(3): 283-291.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. J Clin Oncol, 2007; 25(30): 4772-4778.

Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, et al.Triple-Negative Breast Cancer: Distinguishing between Basal and Nonbasal Subtypes. Clin Cancer Res,2009; 15(7): 2302-2310.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2010; 120(2): 293-308.

Ravdin PM, Green S, Dorr TM,et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol, 1992; 10(8): 1284-1291.

Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, et al. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. J Natl Cancer Inst, 2006; 98(21), 1571-1581.

Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat Genet,1996; 14(2):185-187.

Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. Nat Commun, 2018; 19(1):1410.

Roth E. Nonnutritive effects of glutamine. J Nutr, 2008; 138(10): 2025S-2031S.

Sarantos P, Abouhamze Z, Copeland EM, Souba WW. Glucocorticoids regulate glutaminase gene expression in human intestinal epithelial cells. J Surg Res, 1994; 57(1): 227-231.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. J Natl Cancer Inst, 2001; 93(20): 1563-1568.

Schrader KA, Masciari S, Boyd N, et al.Germline mutations in CDH1 are infrequent in women with early-onset or familial lobular breast cancers. J Med Genet, 2011; 48(1): 64-68.

Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. Cancer Res, 2010;70(22): 8981-8987.

Sen S, Aygın D. Meme Kanserinin Etiyolojisinde ÇevreselKarsinojenlerin Rolü. Sakarya Tıp Dergisi, 2014; 4(3): 109 - 114.

Shimizu K, Kaira K, Tomizawa Y, et al. ASC amino-acid transporter 2 (ASCT2) as a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. Br J Cancer,2014; 110(8): 2030-2039.

Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, et al. synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. J Med Chem, 2012; 55(23):10551-10563.

Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, et al. The Bcl-2 Protein - a Prognostic Indicator Strongly Related to P53 Protein in Lymph Node-Negative Breast-Cancer Patients. J Natl Cancer Inst, 1994;86(7): 499-504.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG,et al. Human-Breast Cancer-Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the Her-2 Neu Oncogene. Science, 1987a; 235(4785): 177-182.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, 1987b;235(4785): 177-182.

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. JAMA, 1998;279(7): 535-540.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA, 2003;100(14): 8418-8423.

Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med, 2009;360(8): 790-800.

Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. Ann Oncol, 2009; 20(4): 628-635.

Stalnecker CA, Ulrich SM, LiY, Ramachandran S, et al. Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. Proc Natl Acad Sci U S A,2015; 112(2): 394-399.

Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 1998; 52(1-3): 17-28.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. Nature, 2009; 458(7239): 719-724.

Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA, 2010; 107(16): 7461-7466.

Szeliga M, Bogacinska-Karas M, Rozycka A, et al. Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. Tumour Biol, 2014; 35(3):1855-1862.

Tan FL, Yin JQ. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. Cell Res, 2004; 14:460–466.

Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome Biol, 2007;8(8).

Tian D, Sun S, Lee J. The long noncoding RNA, jpx, is a molecular switch for x chromosome inactivation. Cell, 2010;143:390–403

Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. Cell, 2004; 117:1–3.

Trieu V, HwangL, NgK, D'Cruz O, QaziS, FongA. Fırst-ın-Human Phase I Study of Bacterıal Rna Interference Therapeutıc Ceq508 in Patıents Wıth Famılıal Adenomatous Polyposıs (FAP). Annals of Oncology, 2017; 28 (suppl_5): v158-v208.

Titus-Ernstoff L, Longnecker MP, Newcomb PA, et al. Menstrual factors in relation to breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998;7(9), 783-789.

Tokunaga M, Land CE, Yamamoto T, et al. Incidence of Female Breast-Cancer among Atomic-Bomb Survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980. Radiat Res, 1987; 112(2): 243-272.

Tolcher AW, Papadopoulos KP, Patnaik A, et al.Phase I dose-escalation study of ALN-VSP02, a novel RNAi therapeutic for solid tumors with liver involvement. J Clin Oncol, 2015;33:11006

Toriola AT, Colditz GA. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. Breast Cancer Res Treat, 2013; 138(3): 665-673.

Turner NC, Reis JS, Russell AM, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. Oncogene, 2007; 26(14): 2126-2132.

Vallejos CS, Gomez HL, Cruz WR, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. Clin Breast Cancer, 2010; 10(4), 294-300.

van de Vijver MJ, Peterse JL, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. N Engl J Med, 1988; 319(19): 1239-1245.

van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. Cancer Biol Ther, 2012; 13(12): 1185-1194.

van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, et al.ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. Oncogene, 2016;35(24): 3201-3208.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science, 2009; 324(5930): 1029-1033.

Vanhove K, Derveaux E, Graulus GJ, et al. Glutamine Addiction and Therapeutic Strategies in Lung Cancer. Int J Mol Sci, 2019; 20 (2):253-260.

Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA. Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. Oncogene, 1987; 1(4): 423-430.

Verma R, Bowen RL, Slater SE, Mihaimeed F, Jones JL. Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. Br Med Bull, 2012; 103(1): 129-145.

Waldman FM, DeVries S, Chew KL, et al. Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. J Natl Cancer Inst, 2000; 92(4): 313-320.

Walker RA. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. J Clin Pathol, 2008; 61(6): 689-696.

Wang D, Meng G, Zheng M, et al. The Glutaminase-1 Inhibitor 968 Enhances Dihydroartemisinin-Mediated Antitumor Efficacy in Hepatocellular Carcinoma Cells. PloS one, 2016;11(11):e0166423.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. Science, 1956a; 124(3215): 269-270.

Warburg O. On the origin of cancer cells. Science, 1956b; 123(3191): 309-314.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. J Gen Physiol, 1927; 8(6): 519-530.

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. Cancer Cell, 2012; 21(3): 297-308.

Warner E, Foulkes W, Goodwin P, et al.Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. J Natl Cancer Inst, 1999;91(14): 1241-1247.

Watford M. Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? Anim Nutr, 2015; 1(3): 119-122.

Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. J Pathol, 2010; 220(2): 263-280.

West RB, Nuyten DS, Subramanian S, et al.Determination of stromal signatures in breast carcinoma. PLoS Biol, 2005; 3(6): e187.

Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov, 2009; 8(2):129-38.

Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends Biochem Sci, 2010; 35(8): 427-433.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al.American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol, 2007; 25(1), 118-145.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science, 1994; 265(5181): 2088-2090.

Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. Trends Mol Med, 2015; 21(4):223-32

Yang J, Guo Y, Seo W, et al. Targeting cellular metabolism to reduce head and neck cancer growth. Scientific reports, 2019;9(1):4995.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol,2001; 2(2): 127-137.

Ye X, Zhou Q, Matsumoto Y, et al. Inhibition of Glutaminolysis Inhibits Cell Growth via Down-regulating Mtorc1 Signaling in Lung Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res, 2016; 36(11): 6021-6029.

Yeh TK, Kuo CC, Lee YZ, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Thiazolidine-2,4-dione Derivatives as a Novel Class of Glutaminase Inhibitors. J Med Chem, 2017;60(13): 5599-5612.

Yu KD, Di GH, Wu J, et al. Breast cancer patients with estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive tumors: being younger and getting less benefit from adjuvant tamoxifen treatment. J Cancer Res Clin Oncol, 2008; 134(12): 1347-1354.

Yuan L, Sheng X, Clark LH, et al. Glutaminase inhibitor compound 968 inhibits cell proliferation and sensitizes paclitaxel in ovarian cancer. Am J Transl Res, 2016; 8(10): 4265-4277.

Yuan L, Sheng X, Willson AK, et al. Glutamine promotes ovarian cancer cell proliferation through the mTOR/S6 pathway. Endocr Relat Cancer, 2015;22(4): 577-591.

Yuneva M, ZamboniN, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. J Cell Biol, 2007;178(1): 93-105.

Zuckerman JE, Davis ME. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. Nat Rev Drug Discov, 2015;14(12):843-56.

siRNA ARACILI GLUTAMİNAZ (GLS1) İNHİBİSYONUNUN MEME KANSER HÜCRELERİNİN KANSEROJENİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%1	%1	%1	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	www.jcancer.org İnternet Kaynağı	<%1
2	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	aip.scitation.org İnternet Kaynağı	<%1
5	www.sabcs.org İnternet Kaynağı	<%1
6	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	Ferhat İÇME, Zeynep KEKEÇ, Ahmet SEBE, Gülşah SEYDAOĞLU, Ayça AÇIKALIN, Akkan AVCI. "A Comparison of Effectiveness of Sodium Bicarbonate in Patients Intoxicated by	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Sakine AKAR

Uyruğu : Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri : 17.04.1989 / MALATYA

Medeni Durumu : Evli

e-mail : ylmzsakine@gmail.com

Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Fatih Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Tam Burslu)	2012
Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2015

YABANCI DİL

İngilizce

İŞ DENEYİMLERİ

2015	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji	Araştırma Görevlisi
2016	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji	Araştırma Görevlisi