T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

TRIPLE NEGATİF MEME KANSERİ HASTALARINDA DÜZENLEYİCİ YOLAKTA BULUNAN EZH2/MİR-29B/LOXL4 EKSPRESYON SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Büşra SARUHAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM-2025

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Adı, Soyadı : Büşra SARUHAN	**Sınav tarihi:** 28 / 05 / 2025
Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	
Tez Danışmanı ve Atanma Tarihi: Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN	
Tezin Konusu ve Başlığı : Triple Negatif Meme Kanseri Hastalarında Düzenleyici Yolakta Bulunan *EZH2*/*miR-29b*/*LOXL4* Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi **Belirlenme Tarihi** : 27/12/2023	
Tezin Niteliği : ☒ Tıpta Uzmanlık Tezi ☐ Klinik Çalışmalar ( ) Prospektif ( ) Retrospektif ( ) Kesitsel ☐ Laboratuvar Çalışmaları ( ) Invitro (Cansız) Çalışmaları ( ) Hayvan Çalışmaları	
Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: ☒ Yüz yüze katılım sağlanarak ☐ Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)	

II. KARAR

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak;

☒ Kabulüne

1.Tez Sınavı ☐ Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine)

2.Tez Sınavı ☐ Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 7. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişiğinin kesilmesine)

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

III. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

IV. JÜRİ ÜYELERİ

	Unvanı Adı Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum Bilgisi	İmza
Jüri Başkanı	Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN	Tıbbi Genetik	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR	Tıbbi Genetik	Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Ömer YAKAR	Tıbbi Genetik	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **i**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **iv**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **x**
ÖZET ..... **xii**
ABSTRACT ..... **xiv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Meme Histolojisi ve Anatomisi 4
2.3. Meme Kanseri 7
2.3.1. Epidemiyoloji 7
2.3.2. Meme Kanserinin Etiyopatogenezi 8
2.3.3. Meme kanserinin risk faktörleri 9
2.3.3.1. Yaş 10
2.3.3.2. Hormon Maruziyeti 10
2.3.3.3. Obezite ve Yaşam Tarzı 10
2.3.3.4. Kişisel Öykü, Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler 11
2.3.3.5. Premalign Lezyonlar 12
2.3.4. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması 12
2.3.4.1. İnvaziv Olmayan Meme Karsinomları 12
2.3.4.2. İnvaziv Meme Karsinomları 14
2.3.4.2.1. İnvaziv Meme Karsinomu-Spesifiye Edilemeyen Tip 15
2.3.4.2.2. İnvaziv Lobular Karsinom 15
2.3.4.2.3. Nadir Morfolojik Tipler 15
2.3.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması 16
2.3.5.1. Luminal A tipi 17
2.3.5.2. Luminal B tipi 17
2.3.5.3. HER2 aşırı ekspresyonlu tipi 17
2.3.5.4. Triple negatif tipi 18
2.3.6. Meme Kanseri Tanısı 18

2.3.7. Meme Kanseri Evrelemesi 18
2.3.8. Meme Kanseri Tedavisi 19
2.3.9. Meme Kanseri Genetiği 20
2.3.9.1. Meme Kanseri ile İlişkili Sinyal Yolakları 20
2.3.9.1.1. ER İlişkili Sinyal Yolakları 20
2.3.9.1.2. HER2 İlişkili Sinyal Yolakları 21
2.3.9.1.3. Wnt/β-catenin İlişkili Sinyal Yolağı 22
2.3.9.1.4. Meme kanseri ile İlişkili Diğer Sinyal Yolakları 22
2.3.9.2. Meme Kanseri ile İlişkili Genler 23
2.3.9.3. Meme Kanseri ve Epigenetik 24
2.3.9.4. Çalışmamızda Değerlendirilen mRNA ve miRNA Genleri 26
2.3.9.4.1. *EZH2* geni 27
2.3.9.4.2. *LOXL4* geni 28
2.3.9.4.3. *miR29* ailesi 29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 31
3.1. Çalışma ve Kontrol Grubunun Oluşturulması 31
3.2. Total RNA İzolasyonu 32
3.2.1. Taze Dokudan RNA İzolasyonu 32
3.2.2. FFPE Dokulardan RNA İzolasyonu 33
3.3. cDNA Sentezi (mRNA) 35
3.4. cDNA Sentezi (miRNA) 36
3.5. qPCR Aşaması 37
3.6. Verilerin Analizi 38
4. BULGULAR 39
4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri 39
4.1. Triple Negatif Meme Kanseri Tanılı Hastalardan Alınan Doku Örneklerinde *EZH2*, *LOXL4* ve *miR29b* ekspresyon Analizi Sonuçları 43
4.2. Sağlıklı ve Tümör Doku Gruplarında *EZH2/LOXL4/miR-29b-5p* Ekspresyonları 45
4.2.1. Tümör Grubunun Klinik Parametrelerine Göre *EZH2/LOXL4/miR-29b-5p* Gen İfadelerinin Karşılaştırılması 47
4.2.1.1. Lenf Nodu Metastaz Durumu 47

4.2.1.2. Erken Evre/İleri Evre 48
4.2.2. Korelasyon Analizi 50
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇLAR 61
KAYNAKLAR 63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. İnvaziv meme karsinomlarının sınıflaması 14
Tablo 2. mRNA için cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması 36
Tablo 3. miRNA için cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması 36
Tablo 4. qPCR reaksiyon karışımının hazırlanması 37
Tablo 5. qPCR'ın döngü basamakları 37
Tablo 6. Çalışma grubunun klinik ve histopatolojik verileri..... 40
Tablo 7. Realtime PCR analizleriyle komşu sağlıklı dokulardan elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri 43
Tablo 8. Realtime PCR analizleriyle tümör dokulardan elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri 44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meme anatomisi 5
Şekil 2. Nüklear reseptörün yapısının diyagramatik gösterimi. 6
Şekil 3. Progesteron reseptörünün farklı izoformlarının yapısı. 7
Şekil 4. Pasta grafikleri, 2022'de dünyadaki en yaygın ilk beş kanser türüne ait vaka ve ölüm dağılımını göstermektedir 8
Şekil 5. İnvaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom gelişimi 9
Şekil 6. Meme kanseri yatkınlık alellerinin sıklığı ve risk dağılımı. 12
Şekil 7. Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesi 14
Şekil 8. Sağlıklı ve kontrol gruplarında *EZH2*, *LOXL4* ve *miR-29b-5p* gen ekspresyonlarının karşılaştırması 46
Şekil 9. LN metastazı olan ve olmayan hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması 47
Şekil 9. LN metastazı olan ve olmayan hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması (devamı) 48
Şekil 10. Erken evre ve ileri evre hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması 49
Şekil 11. Tümör grubunda *EZH2* ve *LOXL4*(A), *EZH2* ve miR-29b-5p (B), *miR-29b-5p* ve *LOXL4* (C) arasındaki korelasyon 50

KISALTMALAR DİZİNİ

ACS : Amerikan Kanser Topluluğu; *"American Cancer Society"*
AJCC :*"American Joint Committee on Cancer"*
AKT : AK strain transforming
ATH : Atipik duktal hiperplazi
BL1 : Bazal Benzeri 1
BL2 : Bazal Benzeri 2
BRCA1 : **BR**east **CA**ncer suscetibilty gene 1
BRCA2 : **BR**east **CA**ncer suscetibilty gene 2
CAR-T : Kimerik Antijen Resptörü T Hücresi
CCND1 : Cyclin D1 geni
cDNA : Komplementer DNA
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
CDK6 : Cyclin-Dependent Kinase 6
circRNA : Sirküler RNA ; ''*circular* RNA''
ChIP : Kromatin immunpresipitasyon
Ct : Döngü Eşiği; "*Cycle Threshold*"
DCIS : Duktal karsinoma in situ
DBD : DNA bağlama domaini
dNTP : Deoksiribonükleotid Trifosfat
DNMTs : DNA metiltransferaz
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü; "*World Health Organization*"
E : Östrojen
ECM : Extracellular matrix
EMT : Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ER : Östrojen reseptörü
ERBB2/HER2 : ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 geni
EREs : Estrogen Response Elements
EZH2 : Enhancer of Zesta Homolog 2
FAP : Familyal Adenomatöz Polipozis
FDA : ABD'nin Gıda ve İlaç Dairesi; *"Food and Drug*

	Administration"
FEA	: Flat epithelial atypia
FFPE	: Formaline-fixed parafine-embedded
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor
GLOBOCAN	: "*Global Cancer Observatory*"
GWAS	: Genom boyu dizileme çalışmaları
HNPCC	: Kalıtsal Nonpolipozis Kolorektal Kanser
HRT	: Hormon replasman tedavisinde
IDC	: İnvaziv duktal karsinom
ILC	: İnvaziv lobüler karsinom
JPS	: Juvenil Polipozis Sendromu
KT	: Kemoterapi
LBD	: Ligand bağlama domaini
LAR	: Luminal Androjen Reseptör
LCIS	: Lobuler karsinoma in situ
LN	: Lenf Nodu
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA; ''*long non-coding* RNA''
LS	: Lynch Sendromu
LOX	: Lizil oksidaz
LRP	: Lipoprotein Reseptör Ilişkili Protein
miRNA	: mikroRNA
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MMR	: Yanlış eşleşme onarım; "*Mismatch Repair*"
MRE	: miRNA Tanıma Elemanı; *"miRNA Recognition Element"*
mRNA	: "*messenger* RNA"
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı; *"National Comprehensive Cancer Network"*
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü; "*National Cancer Institute*"
ncRNA	: Kodlamayan RNA; ''*non-coding* RNA''
NTD	: Amino terminali
P	: Progesteron

PARP : Poly-ADP-ribose polymerase
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PD-1 : Programmed Death-1
piRNA : piwi RNA
PIK3 : Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfat 3-Kinaz
PIK3CA : Fosfatidilinozitol 3-Kinaz, Katalitik, Alfa
PJS : Peutz-Jeghers Sendromu
PR : Progesteron reseptörü
PRC2 : Polycomb-repressive complex 2
Pri-miRNA : Primer mikroRNA
PTCH : Patched Homolog-1
PTEN : Fosfataz ve Tensin Homolog
qPCR : Kantitatif Real-Time (gerçek zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS/MAPK : RAS/mitogen-activated protein kinase
RISC : RNA ile indüklenen sessizleştirici kompleks
rRNA : Ribozomal RNA
RT : Radyoterapi
RTK : Reseptör Tirozin Kinaz
SAM : S-adenozil metiyonin
SS : Standart Sapma *"Standard Deviation"*
SEER : Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programı "*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*"
SHH : Sonic-hedgehog
siRNA : *"Small interfering* RNA*"*
snoRNA : Küçük nükleolar RNA
STK11 : Serine/Threonine Protein Kinase 11
TNBC : Triple Negative Breast Cancer
TNM : Tümör/Nod/Metastaz
TP53 : Tümör Proteini p53
tRNA : Transfer RNA
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

UTR	: Untranslated Bölge; *"Untranslated Region"*
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKİ	: Vücut Kilte İndeksi
XPO5	: Eksportin-5

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda bilgi birikimiyle yalnızca akademik gelişimime değil, hayata bakış açıma da katkı sağlayan; her daim sergilediği anlayışlı, yol gösterici ve yüreklendirici tutumuyla bizlere ilham olan, mesleki yaşamım boyunca bana eşlik edecek değerli kazanımlar edinmemi sağlayan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a en içten teşekkürlerimi ve sonsuz minnetimi sunuyorum.

Tez sürecimin her anında bilgi ve deneyimiyle yolumu aydınlatan, desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN'a gönülden teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik bölümünü tercih etmemi sağlayan, birlikte aynı bölümde çalıştığımız kısacık dönemde bilgi birikiminde faydalandığım, sonrasında da ihtiyaç duyduğum her zaman yardımlarını esirgemeyen sevgili dostum Dr. Pelin ERCOŞKUN'a, uzmanlık eğitimim sürecinde birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve yardımları için minnettar olduğum Dr.Momen KANJEE ve Dr. Ziya BULDUK'a ,

Hayatıma girdikleri günden beri apayrı karakterleriyle beni neşelendiren ve her sıkıntımda yanımda olan İslam CENGİZ ve Nurullah MACİT'e, samimiyeti ve yol göstericiliğiyle de bana güç veren; desteğini, emeğini ve abiliğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli Hasbi DİKBAŞ'a, hayatımın son dört yılına eşlik eden, en zor anlarımda yanımda olup varlığıyla güç veren, birlikte güldüğümüz, birlikte ağladığımız, gerçek dostluğun ne demek olduğunu bana ilk kez hissettiren sevgili Dilara AYDEMİR ve Sümeyye ÖZTÜRK'e,

Beni ben yapan, hayatları boyunca kendilerinden çok beni düşünüp en zor anlarında bile fazlasıyla üstüme titreyen, hayatımın sonuna kadar arkamda duracaklarını bildiğim, üstümdeki emeklerinin değer biçilemediği sevgili annem Gülşen OLPAK ve babam Şakir OLPAK'a, varlıklarına şükrettiğim kız kardeşlerim Tuba ERMANCIK ve Çağla ÖZMEN'e, beni en başından beri kendi çocuklarından ayırmayan, sevgileriyle aile olmanın ne demek olduğunu bana her defasında

hissettiren, varlıklarına her zaman minnet ve derin bir sevgi duyduğum çok sevgili kayınvalidem Serap SARUHAN'a ve çok kıymetli kayınpederim Muhittin SARUHAN'a

Desteğiyle ve sevgisiyle beni güçlendiren hayat arkadaşım, sevgili eşim Fatih SARUHAN'a ve son olarak doğduğu ilk andan itibaren varlığıyla hayatımı anlamlandıran, zorluklar karşısında direnme gücümü artıran, bana cesareti öğreten, hayatımın her anına neşe ve renk katan canım oğlum Ömer'ime sonsuz teşekkür ederim…

Dr. Büşra SARUHAN

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinasyon birimi tarafından, **TTU-2024-14464** numarasıyla desteklenmiştir.

ÖZET

Triple Negatif Meme Kanseri Hastalarında Düzenleyici Yolakta Bulunan EZH2/MİR-29B/LOXL4 Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Giriş-Amaç: Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen malignite olup heterojen moleküler yapısı ve değişken klinik seyri nedeniyle hem tanı hem de tedavi süreçlerinde multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Küresel sağlık yükü açısından da öncelikli bir onkolojik hastalık olan meme kanserinin erken tanısı ve hedefli tedavisi her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Kodlamayan RNA'ların kanser oluşumu ve ilerlemesindeki rolünü anlamak, kanserin biyolojisini daha iyi kavramamıza yardımcı olarak gelecekteki tedavi yaklaşımlarına ışık tutabilir. Bu çalışmamızda, Triple negatif meme kanserli hastalardan alınan kanser dokusu ve sağlıklı komşu doku arasında EZH2/LOXL4/miR-29b genlerinin ekspresyon düzeyleri ve etkileşimleri değerlendirilmiştir.

Gereç-Yöntem: Genel cerrahi kliniğine triple negatif meme kanseri tanısı ile başvuran 5 hasta ve tıbbi patoloji bölümünden tümör blokları alınan triple negatif meme kanseri tanılı 25 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada, taze doku ve FFPE doku örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından hedef genlerin ekspresyon düzeyleri kantitatif real-time yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokularında *EZH2* geninin ekspresyon düzeyinin değişmediği, buna karşılık *LOXL4* geninin ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. *miR-29b* düzeyinin ise tümör dokularında anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, *EZH2/LOXL4/miR-29b* genlerini hedefleyen terapötik yaklaşımların potansiyelini ortaya koymakta olup, meme kanseri biyolojisine ilişkin yeni perspektiflerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Sonuç: Bu çalışma, triple negatif meme kanseri gibi moleküler hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu agresif tümör alt tiplerinde, ncRNA'ların düzenleyici rolüne dair yeni kanıtlar sunmaktadır. Elde edilen veriler, *EZH2, LOXL4*

ve *miR-29b* gibi genlerin potansiyel biyobelirteç ve tedavi hedefleri olarak değerlendirilebileceğini göstermekte; böylece hem hastalığın biyolojisine dair daha derin bir anlayış sağlamakta hem de kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *EZH2*, Ekspresyon düzeyi, Triple Negatif Meme Kanseri, *LOXL4*, *miR-29b*

ABSTRACT

Evaluation of *EZH2/miR-29b/LOXL4* Expression Levels in the Regulatory Pathway in Triple Negative Breast Cancer Patients

Introduction–Aim: Breast cancer (BC) is the most common malignancy among women worldwide and requires a multidisciplinary approach in both diagnosis and treatment due to its heterogeneous molecular structure and variable clinical course. As a major global health burden, the early diagnosis and targeted treatment of breast cancer have become increasingly important. Understanding the role of non-coding RNAs in tumor initiation and progression can help us better grasp the underlying biology of cancer and guide future therapeutic strategies. In this study, the expression levels and interactions of the *EZH2/ LOXL4/miR-29b* genes were evaluated in tumor tissues and adjacent healthy tissues obtained from patients with triple-negative breast cancer

Material and Methods: A total of 30 patients diagnosed with triple-negative breast cancer (TNBC) were included in the study, comprising 5 patients from the general surgery clinic and 25 patients whose tumor tissue blocks were retrieved from the pathology archives. Total RNA was isolated from both fresh tissue and FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) samples, followed by quantitative real-time PCR analysis to determine the expression levels of the target genes.

Results: Compared to healthy tissues, the expression level of the EZH2 gene did not change in tumor tissues, whereas the expression level of the LOXL4 gene was found to be significantly increased. In contrast, the level of miR-29b was found to be significantly decreased in tumor tissues.These findings highlight the therapeutic potential of targeting the *EZH2/LOXL4/miR-29b* pathway and contribute to a deeper understanding of breast cancer biology.

Conclusion: This study provides new evidence regarding the regulatory role of ncRNAs in aggressive tumor subtypes such as triple-negative breast cancer, where molecularly targeted treatment options remain limited. The data obtained suggest that

genes such as *EZH2*/*LOXL4*/*miR-29b* may serve as potential biomarkers and therapeutic targets, thereby offering deeper insight into the disease's biology and contributing to the advancement of personalized treatment strategies.

Keywords: *EZH2*, Expression level, Triple-Negative Breast Cancer, *LOXL4*, *miR-29b*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Her 8 kadından biri yaşamları sırasında meme kanseri ile karşı karşıya kalmaktadır [1]. Gelişmiş ülkelerde, meme kanseri insidansı gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir. Bu farklılık ilk gebeliğin ileri yaşta olması, daha az sayıda çocuk sahibi olma ve daha az emzirme süresi, hormon replasman tedavisi, oral kontraseptif kullanımı, alkol tüketimi, obezite ve fiziksel aktivitenin azlığı gibi risk faktörleriyle ilişkili olabilmektedir [2]. Buna karşın gelişmiş ülkelerdeki erken tanı ve etkin tedavi seçeneklerine bağlı olarak, mortalite gelişmekte olan ülkelere oranla daha düşüktür.

Son yıllarda genetik alanındaki gelişmeler, kanserin genetik ve epigenetik değişimlerin sonucunda meydana geldiğini ortaya koymuştur. Hücrenin çoğalması, bölünmesi ve farklılaşmasında rol oynayan genlerden birinde meydana gelen değişiklik kanser gelişimine sebep olmaktadır. Bu genetik değişimlerin bazıları somatik olarak ortaya çıkarken bazıları germline olarak bulunur ve kalıtsal kanserlere sebep olur. Meme kanseri gelişiminde de çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler rol oynamaktadır. [3] Kanser gelişiminde rol oynayan epigenetik mekanizmalar, bir genin dizisini değiştirmeden o genin ekspresyonunu etkileyerek kanser patogenezine katkıda bulunur [4]. Patojenik mekanizmalar, henüz net olarak ortaya konulamamış olsa da bu alanda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Gen ifadesini değiştiren epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon proteinlerinin posttransyonel modifikasyonu ve kodlamayan RNA'ların (ncRNA) etkileşimi olarak sınıflandırılabilir [4]. Kodlama yapmayan RNA'lar hücredeki transktriptomun önemli bir kısmını oluşturur ve birçok hücresel olayda regülatuvar rol oynar [5]. Hücrede herhangi bir proteini kodlamayan bu RNA molekülleri başka genlerin ekspresyonlarını posttranskripsiyonel olarak etkiler [6]. Kodlama yapmayan RNA'lar; uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA), mikroRNA (miRNA), sirküler RNA (circRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lardan oluşmaktadır [6]. Yapılan çalışmalarda kodlamaya yapmayan bu RNA moleküllerinin kanserle ilişkili genleri etkileyerek kanser gelişimine ve prognoza etki edebildiği gösterilmiştir [7]. Epigenetik mekanizmaların kanser oluşumundaki rolünün tanımlanması, kişiye özgü teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

MiRNA'lar, hücrelerde çok çeşitli metabolik olayları regüle eden kodlama yapmayan küçük RNA moleküleridir. 21-22 nükleotid uzunluğunda olan bu tek zincirli RNA molekülleri gen ekspresyonunu postkripsiyonel olarak sekans-spesifik şekilde regüle eder [8]. miRNA'ların birçok hastalıkla direkt ilişkili olduğu hatta kanserlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [9]. Son 20 yıl içinde meme kanseri vakalarında prognoz, metastaz ve tedavi cevabında etkisi olduğu bilinen birçok miRNA bildirilmiştir [10]

miR-29 ailesi kanser başta olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar ve Alzheimeir hastalığı gibi birçok patofizyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır [11]. Bu aile karsinogenezde ve kanser progresyonunda kritik öneme sahip olan DNA metilasyonunu regüle etmektedir [12]. miR-29 ailesi üç farklı mikroRNA'dan oluşmaktadır: miR-29a, miR-29b ve miR2-9c. Bu aileye ait olan miR-29b'nin ekspresyonundaki düzensizlikler kolorektal kanser, osteosarkom ve meme kanserinde belli klinikopatolojik özelliklerle ilişkili olarak bulunmuştur.

Malign ve benign olan tüm meme tümörlerinde miR-29b ekspresyonu gözlenirken, östrojen reseptör (ER) durumu, lenf nodu metastazı, histolojik alt tip, tümör boyutu ve tümör evresine bağlı olarak miR-29b ekspresyonun değişebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [13,14].

Enhancer of Zesta Homolog 2 (EZH2), polycomb-repressive complex 2 (PRC2)'nin kor proteinidir. Histon 3 proteininin 27. Lizin amino asid rezidüsünü metilleyerek çeşitli genleri susturmaktadır. EZH2 proteininin malign transformasyonla ilişkili olduğu hatta kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını kolaylaştırdığı bilinmektedir [15,16]. Ayrıca prostat kanseri ve meme kanserinde çeşitli tümör supressor genleri epigenetik olarak susturduğu bilinen *EZH2* geni bu kanserlerde onkogen olarak gösterilmektedir [17].

Lizil oksidaz (LOX) ailesi ekstraselüler matriksin iki ana bileşeni olan kollajen ve elastinin yapısında bulunan çapraz bağların oluşumunun katalizlenmesinde rol oynamaktadır. LOX ailesi 5 üyeden oluşmaktadır: LOX, LOX-like 1 (LOXL1), LOXL2, LOXL3 VE LOXL4. Son yıllarda yapılan çalışmalarda LOXL4'ün kanser

progresyonunda rol oynadığı ortaya konmuştur [18]. Mesane ve akciğer kanserinde tümör süpresör olarak fonksiyon gösterirken [19], gastrik kanser ve hepatoselüler karsinomda metastazı ve proliferasyonu kolaylaştırır [20].

Tez çalışmamızdaki amacımız, meme kanseri ve komşu normal doku örnekleri arasında *EZH2/miR-29b/LOXL4* genlerinin ekspresyon seviyelerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmaktır. Literatürde, meme kanseri hücrelerinden oluşturulan hücre kültürlerinde *EZH2/miR-29b/LOXL4* genlerinin ekspresyonları ve aralarındaki ilişkiyi gösteren sadece bir yayın bulunmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız triple negatif meme kanseri hastalarında *EZH2/miR-29b/LOXL4* genlerinin ekspresyonlarının değerlendirildiği ilk çalışma olacaktır. Son yıllarda, kanser patogenezi ile ilişkili olabilecek, prognoz ve tedavi hedefi olma potansiyeli taşıyan kodlamayan RNA'lar popüler bir araştırma konusu olmuştur. Tez çalışmamızda kodlamayan RNA'ların bu potansiyeline dair öncül bir çalışma planladık.

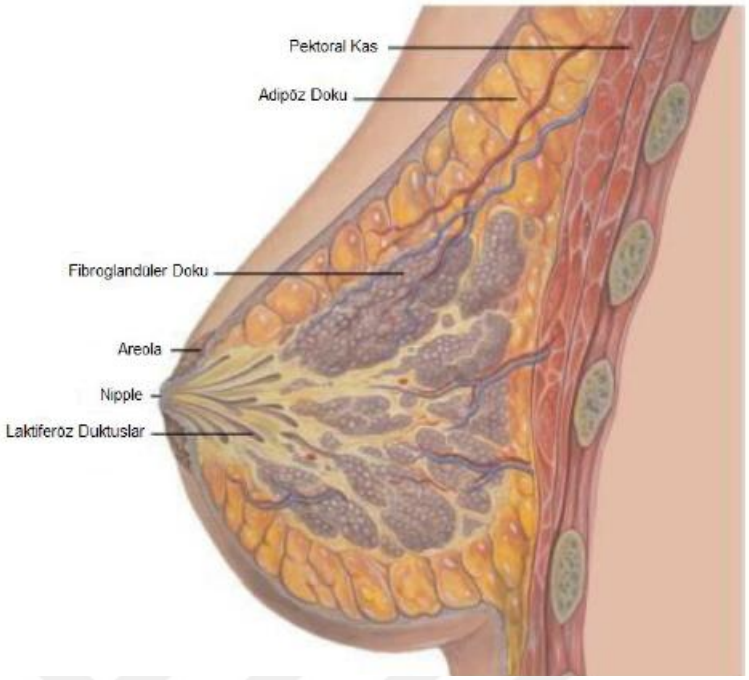
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Histolojisi ve Anatomisi

Deriye bağlı apokrin bir bez olan meme reprodüktif sistemin fonksiyonel bir parçasıdır. Pektoral fasyanın önünde yerleşen meme, cilt ile yüzeyel fasyanın yüzeysel tabakası arasında uzanan Cooper ligamenti ile septalara ayrılmakta ve göğüs ön duvarına asılmaktadır. İnsanlarda meme dokusu; cilt, cilt altı yağ dokusu, apokrin yapıdaki meme bezleri ve bezleri çevreleyen stromadan oluşur (Şekil 1). Apokrin meme bezleri 15-20 adet lobdan oluşur ve bu lobların her biri ayrı bir kanalla meme başına açılır. Loblar, 20-40 lobülüsden meydana gelirken her bir lobülüs 10-100 adet asinüsten oluşur. Asinüsler ve asinüslerin birleşerek açıldığı terminal duktuslar birlikte memenin en küçük fonksiyonel birimi olan "terminal duktal lobüler üniteyi" oluşturur. Bu fonksiyonel ünite gevşek bir bağ dokusu yapısında ve hücreden zengin bir stroma içinde bulunmakta ve çeşitli hormonlarla uyarılmaktadır.

Meme bezleri ve kanallarındaki çift sıralı epitel tabakası iki ayrı hücre tipini içerir. Epitel tabakasının üst kısmını luminal küboidal hücreler oluşturur ve laktiferöz kanalları bu hücre tabakası çevreler. Alt kısmı ise myoepitelyal hücreler oluşturur. Bu iğsi şekilli hücreler düz kas hücresi özelliği gösterir ve laktasyon sırasında sütün ejeksiyonunu sağlar [21].

Memenin arteryel kanlanmasının %60'ı internal mammariyan arterden sağlanırken, %30'u ise posterior interkostal arterler ve aksiller arterin dalları tarafından sağlanmaktadır. Memenin venöz kanı temel olarak arteryel sistemi takip eden venler aracılığıyla drene olur. Memenin lenfatik drenajı ise yüzeyel ve derin grup lenfatik yollar aracılığıyla büyük oranda aksiller lenf nodlarına ve az bir kısmı da internal torasik lenf nodlarına olmaktadır [22].



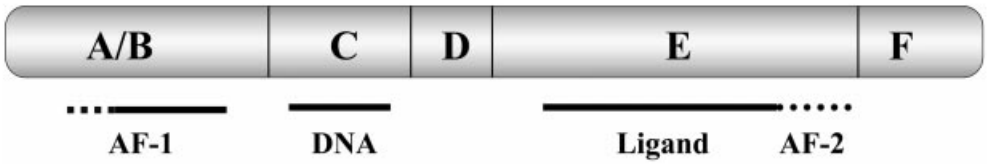
Şekil 1. Meme anatomisi (25)

2.2. Meme Fizyolojisi

Meme gelişimi ve fonksiyonu çok sayıda hormonun etkisindedir. Bu hormonlardan en önemlileri östrojen, progesteron, oksitosin, kortizol ve büyüme hormonudur. Östrojen kız çocuklarında sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumludur. Östrojen hormonunun meme üzerine etkileri: 1) stromal dokunun gelişimi, 2) duktal sistemin gelişimi ve 3) yağ depolanması olarak üç madde halinde toplanabilir. Ayrıca östrojenin meme epiteli, özellikle de duktus epiteli üzerinde mitotik aktiviteyi artırıcı etkisi vardır.

Östrojen hormonu hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak çeşitli sinyal mekanizmalarını tetiklemektedir. Östrojen reseptörü (ER) intranükleer yerleşimli bir reseptördür. ER-α ve ER-β olmak üzere 2 ayrı formu olan [23] östrojen reseptörleri 3 ayrı fonksiyonel domainden oluşmaktadır: NH_2-terminal veya A/B domaini, DNA bağlama bölgesi veya C domaini ve ligand bağlama bölgesi veya D/E/F domaini(Şekil 2). Ligandın reseptöre bağlanması reseptörde konformasyonel değişikliğe neden olur. Reseptör dimerizasyonu, reseptör-DNA etkileşimi ve bir çok transkripsiyon

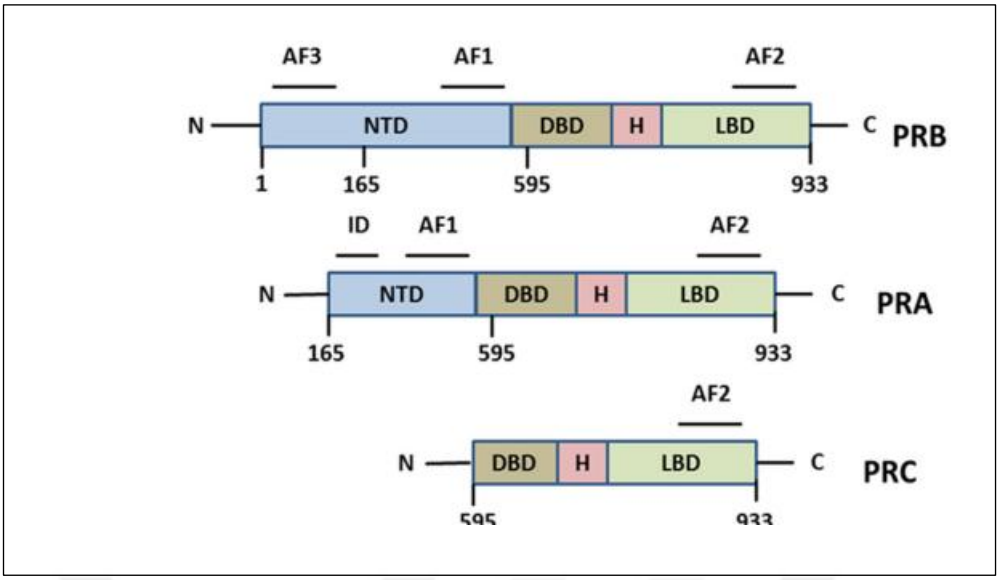
faktörünün toplanması gibi bir seri hücresel olay sonucunda hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan genlerin transkripsiyonunda değişim olur [24].



Şekil 2. Nüklear reseptörün yapısının diyagramatik gösterimi. NH2 terminalindeki A/B alanı, diğer transkripsiyon faktörlerinin etkileştiği AF-1 bölgesini içerir. C/D domaini DNA'ya bağlanan iki çinko parmak yapısı taşır. E/F domaini ligand bağlama bölgesi ve koaktivatör peptidlerle etkileşen AF-2 bölgesinden oluşur (27).

Kadınlarda menstrüel siklus, gebelik ve embriyogenezde rol oynayan progesteron hormonu, östrojen hormonu ile birlikte meme bezi gelişiminde rol oynayan ana enzimlerdendir. Erken puberte döneminde östrojenin etkisiyle gelişen ve uzayan duktuslar sonrasında progesteronun etkisi altında dallanma göstermektedir. Gebelik sırasında yüksek östrojen ve progesteron düzeyleri memede lobül ve alveolların gelişimini uyararak laktasyona hazır hale gelmesini sağlar.

Progesteron reseptörü (PR), östrojen reseptörü gibi intranüklear yerleşimlidir. *PR* geni, 11q22-q23 kromozomal bölgede yer alır ve ayrı promoterlerle transkribe olan üç ayrı izoformu kodlar: PR-A, PR-B ve PR-C [25,26]. PR, C teminalinde yer alan alan ligand bağlama domaini (LBD), globüler yapıdaki santral bölgede DNA bağlama domaini (DBD) ve amino terminalinden (NTD) oluşur. Ayrıca 2 adet transkripsiyonel aktivasyon domaini (AF1 ve AF2) içerir, bu domainler ko-regülatuvar proteinler için bağlanma bölgesi oluşturur. AF1 ve AF3, NTD'de yerleşirken; AF2, LBD'de yerleşir [27](Şekil 3). PR-A reseptörünün NTD bölgesinde 164 amino asit eksiktir ve bu nedenle AF-3 domainini içermez [25]. PR-C izoformunda ise AF1 ve AF3'ün tamamı DBD'nin bir kısmı eksiktir. Diğer izoformların keşfinden sonra bulunan PR-C izoforomu nükleusda belli kofaktörlerle etkileşerek PR-A ve PR-B'nin fonksiyonunu regüle eder [26].Normal meme dokusunda PR-A ve PR-B izoformları hemen hemen aynı oranda eksprese olurken malign meme dokusunda değişen oranlarda eksprese olmaktadır [28].



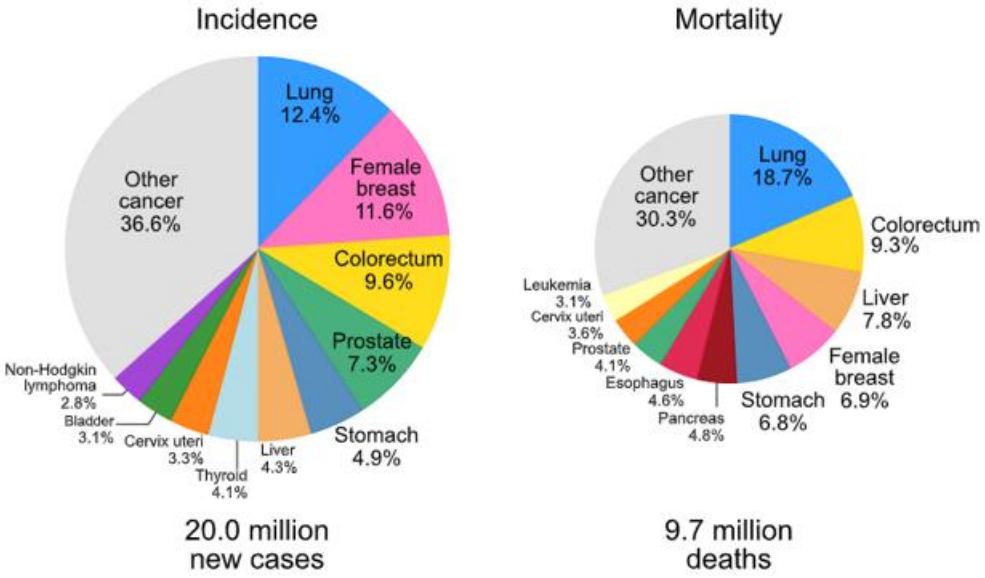
Şekil 3. Progesteron reseptörünün farklı izoformlarının yapısı (29).

İlerleyen yaş ve menopozla birlikte azalan over rezervi, E ve P düzeylerinde azalmaya neden olur. Meme gelişiminde ve farklılaşmasında çok önemli olan bu iki hormonun azalmaya meme bezlerinde atrofi, dejenerasyon ve hyalinizasyon ile sonuçlanır. Kaybedilen meme bezlerinin yerini yağ dokusu alır.

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Epidemiyoloji

2022 GLOBOCAN küresel kanser istatistiklerine göre dünyada 20 milyon yeni kanser vakası ve 9,7 milyon kanser nedenli ölüm meydana gelmiştir. (Şekil 4) Bunların 2,3 milyon (yaklaşık %11,6) kadarını meme kanseri vakaları oluştururken, kanser nedenli ölümlerin 4. sırasında meme kanseri yer almaktadır[29]. Meme kanseri insidansı coğrafi olarak değişkenlik göstermektedir. En yüksek insidans Avustralya, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da gözlenmektedir[29]. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansı gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek olmasına rağmen, mortalite oranı gelişmiş ülkelerde daha düşüktür [30].



Şekil 4. Pasta grafikleri, 2022'de dünyadaki en yaygın ilk beş kanser türüne ait vaka ve ölüm dağılımını göstermektedir (29).

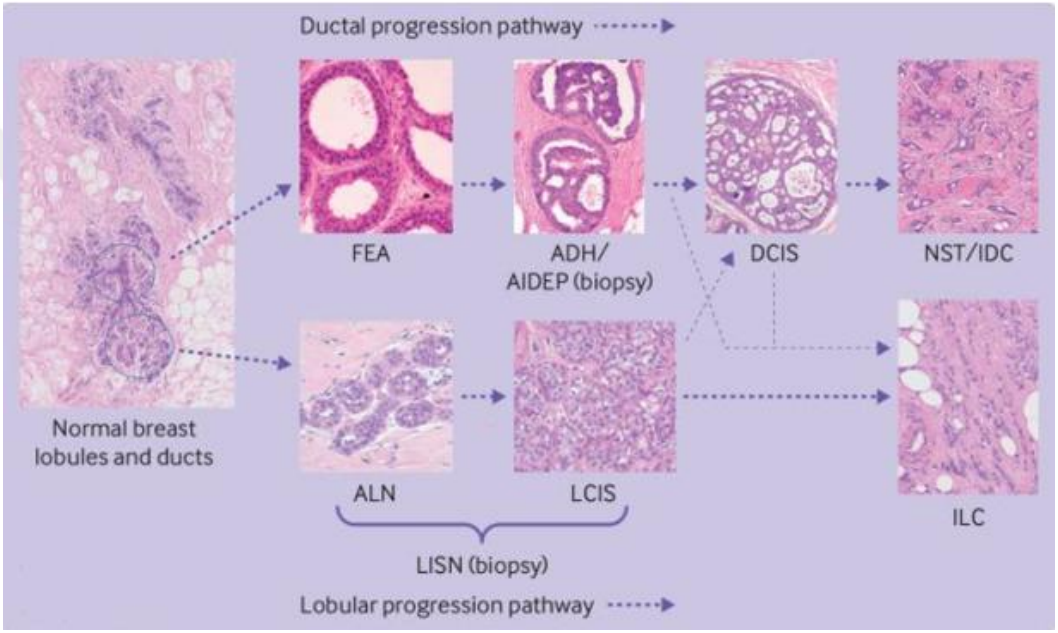
Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kadınlarda en sık görülen malignite, meme kanseridir. Türkiye kanser istatistikleri 2019 verilerine göre ülkemizdeki kanser tanısı alan kadınların %29.3'ünü meme kanseri hastaları oluşturmaktadır. Meme kanseri vakaları incelendiğinde %48,3'ünün lokalize evrede tanı aldığı görülmektedir[31].

2.3.2. Meme Kanserinin Etiyopatogenezi

Meme kanseri terimi, kontrolsüz hücre çoğalması sonucunda büyük çoğunluğu terminal duktal lobüler üniteden gelişen, heterojen ve geniş bir grup malign epitelyal tümörü kapsar. Atipik duktal veya lobüler hiperplazi, duktal veya lobuler karsinoma in situ gibi premalign lezyonlar belli değişimler sonucunda invaziv karsinoma ilerleyebilmektedir [32].

Son zamanlarda yapılan çok sayıda ve geniş çaplı epidemiyolojik ve morfolojik çalışmalar ile meme kanseri ile ilişkili olan daha fazla sayıda moleküler değişiklik tanımlanmakta bu sayede premalign lezyonlardan karsinom gelişimi sürecinde moleküler bağlantılar daha iyi anlaşılabilmektedir. Meme kanserinin başlangıcı, dönüşümü ve ilerlemesine ilişkin çok sayıda model öne sürülmüştür.

Duktal karsinom için öne sürülen modelde düz epitelyal atipi (flat epithelial atypia/FEA) olarak isimlendirilen lezyondan sırasıyla atipik duktal hiperplazi (ATH), duktal karsinoma in situ (DCIS) gibi lezyonların invaziv ve metastatik duktal karsinom (IDC) için öncül lezyonlar olduğu kabul edilmektedir [32]. Lobüler duktal karsinom için yapılan modelde ise atipik lobüler hiperplaziyi takiben lobuler karsinoma in situ (LCIS) ve sonrasında invaziv lobüler karsinom (ILC) geliştiği düşünülmektedir [32,33]. (Şekil 5)



Şekil 5. İnvaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom gelişimi (33)

2.3.3. Meme kanserinin risk faktörleri

Meme kanseri için en önemli risk faktörü kadın cinsiyettir. Kadın cinsiyette, meme kanseri erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha fazla görülür [34]. Ayrıca yaş, ırk, genetik ve epigenetik faktörler önemli risk faktörleri arasındadır. Bunların dışında ise, iyonize radyasyon, hormon maruziyeti, alkol, obezite ve sedanter yaşam gibi çevresel faktörlerin de meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir [35].

2.3.3.1. Yaş

Meme kanseri insidansı ve mortalitesinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir. Tüm dünyada insidans 40 yaşta artmaya başlayarak 60 yaş civarında pik yapar [35]. Meme kanseri ilişkili ölümlerin %99'unun 40 yaş üzerinde, %71'inin ise 60 yaş üzerinde gerçekleştiği rapor edilmiştir [36].

2.3.3.2. Hormon Maruziyeti

Endojen ve eksojen östrojen hormonunun her ikisi de meme kanseri için risk oluşturmaktadır. Overler tarafından üretilen endojen östrojene maruziyet erken menarş yaşı ve geç menopoz yaşı ile artmaktadır [35].

Eksojen östrojenin ana kaynağını oral kontraseptif ilaçlar ve hormon replasman tedavisinde (HRT) verilen hormon ilaçları oluşturmaktadır. Bu ilaçların kullanımının kesilmesinin ardından meme kanseri riskinin de azaldığı gösterilmiştir [36].

2.3.3.3. Obezite ve Yaşam Tarzı

Obezitenin premenopozal ve postmenopozal dönemde meme kanseri riski üzerine olan etkisi farklıdır. Premenopozal dönemde yüksek vücut kitle indeksi (VKI) meme kanseri açısından koruyucu bir faktör olmaktadır. Tam tersi olarak, postmenopozal kadınlarda, obezite meme kanseri gelişme riskini artıran bir faktördür. Yapılan bir çalışmada HRT tedavisi almamış kadınlardan VKI'si 31.1'in üzerinde olanların, VKİ'si 22.6'nın altında olan kadınlara göre meme kanserine yakalanma riski çok daha yüksek bulunmuştur [1]. Bu durum postmenopozal dönemde overler fonksiyonel olmadığı için endojen östrojenin major kaynağının yağ dokusu olması ile açıklanmaktadır [37].

Düzenli fiziksel aktivite yapan, meyve ve sebze tüketimi yeterli düzeyde olan kadınlarda meme kanseri riski, sedanter yaşam tarzına sahip olan ve fast-food ile beslenen kadınlara göre düşük bulunmuştur.

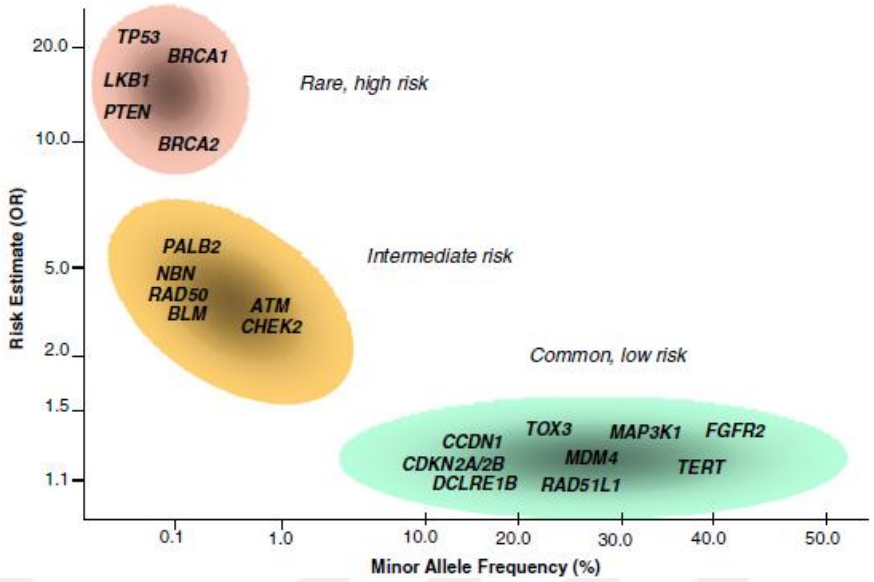
Alkol, meme kanseri riskini artıran bir faktördür. Bazı çalışmalar meme kanseri ile alkol ilişkisinin doz bağımlı olduğunu ortaya koyarken, başka çalışmalar kümülatif bir riskten söz ederek uzun süreli alkol tüketiminin meme kanseri riskini artırdığını göstermiştir [35]. Bu durumun altında yatan muhtemel mekanizmanın alkolün kandaki östrojen düzeyini artırması olduğu düşünülmektedir [38].

2.3.3.4. Kişisel Öykü, Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler

Daha önce meme kanseri tanısı almış kadınlarda, ikinci bir meme kanseri gelişme riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu kadınlarda sekonder meme malignitesi, aynı memede veya diğer memede ortaya çıkabilir [1].

Ailesinde meme kanseri öyküsünün olması, kişinin meme kanseri riskini artıran bir faktördür. Özellikle birinci derece yakınında meme kanseri olan kadınlarda hastalığa yakalanma riski 2 kat artmaktadır [39]. Ayrıca kanser tanısı 50 yaşından önce alınmışsa, bu risk daha fazla yükselmektedir. Risk artışının sebebi, ortak yaşam tarzı veya ortak bir kanser yatkınlık geninin kalıtılması veya da her ikisi olabilmektedir [40].

Meme kanseri, diğer kanserlere kıyasla ailesel geçişin daha sık görüldüğü bir kanser türüdür. Çoğunluğu sporadik olmakla birlikte, meme kanserlerinin %10-15'lik kısmı herediterdir. Herediter meme kanserlerinin yaklaşık %25'inden **BR**east **CA**ncer suscetibilty gene 1 (*BRCA1*) ve **BR**east **CA**ncer suscetibilty gene 2 (*BRCA2)* genleri sorumludur [41]. Sırasıyla 17q21 ve 13q12 lokuslarında yerleşen *BRCA1* ve *BRCA2* genleri DNA'nın çift zincir kırıklarının onarımında rol oynayarak tümör süpressor fonksiyonu göstermektedir [36]. BRCA1 geninde patojenik varyant taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişme riski %55-85 iken bu risk BRCA2 geni için %35-60 olarak bildirilmiştir [42]. Ayrıca son zamanlarda yürütülen genom boyu dizileme çalışmaları (GWAS) sayesinde meme kanseri ile ilişkili olduğu bilinen çok sayıda gen tanımlanmıştır [36,42]. Bu genler yüksek penetranslı, orta penetranslı ve düşük penetranslı genler olarak gruplara ayrılmıştır (Şekil 6) .



Şekil 6. Meme kanseri yatkınlık alellerinin sıklığı ve risk dağılımı (42).

2.3.3.5. Premalign Lezyonlar

Benign karakterdeki meme lezyonları, proliferatif ve non-proliferatif lezyonlar olarak ikiye ayrılır. Non-proliferatif lezyonlar genellikle meme kanseri riskini artırmazken, atipik proliferatif lezyonlar meme kanser riskini 4-5 kat, atipik olmayanlar ise riski 2 kat artırmaktadır [43].

2.3.4. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması

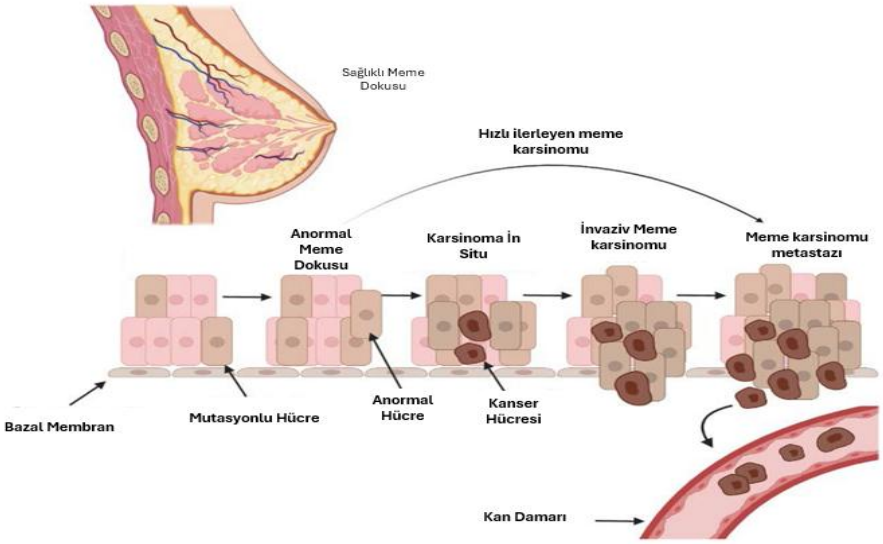
Meme kanseri morfolojik, biyolojik ve klinik çeşitlilik gösteren birçok farklı alt tipten oluşan heterojen bir hastalık grubudur [44]. İnvaziv olmayan ve invaziv olan meme karsinomları şeklinde iki gruba ayrılırlar.

2.3.4.1. İnvaziv Olmayan Meme Karsinomları

İnvaziv olmayan veya in situ kanser terimi orijinlendiği yerde kalan, diğer duktus veya lobüllere yayılmamış ve myoepitel tabakasının altına invaze olmamış tümörler için kullanılmaktadır. Duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in situ (LCIS) tipleri vardır (Şekil 7) [45].

Tüm meme karsinomlarının %20'sini duktal karsinoma in situ (DCIS) tipi oluşturur. Meme kanseri farkındalığı arttıkça mamografide DCIS saptanma oranı da her geçen gün artmaktadır [46]. Mamografide şekli ve sınırları düzensiz mikrokalsifikasyon şeklinde görülen lezyonlardan yapılan biyopsi ile DCIS tanısı konulmaktadır . Yaklaşık yarısı invaziv morfolojiye dönen DCIS, invaziv meme kanseri için öncül lezyon olarak değerlendirilir. Bu yüzden bu lezyonların meme koruyucu cerrahi ile çıkarılması ve sonrasında kemoterapi veya hormonal tedavi uygulanması gerekmektedir [47].

LCIS lezyonları genellikle başka bir sebeple yapılan biyopsilerde alınan dokuların incelenmesi sırasında tesadüfi olarak bulunurlar. Bu yüzden LCIS insidansının net olarak bilinmesi mümkün değildir [48]. Bu lezyon genellikle 49 yaş civarındaki premenopozal kadınlarda saptanır [49]. Hastaların yaklaşık olarak %60-80'inde LCIS multisentrik olarak bulunur [48]. Normal meme dokusu ve birçok meme malignitesinden farklı olarak LCIS ve invaziv lobuler karsinomların immunohistokimyasal yöntemlerle E-cadherin proteinini eksprese etmediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda LCIS tanısı alan kadınlarda ilk 10 yıl içinde invaziv meme karsinomu gelişme riski %7.1 olarak bildirilmiştir [50]. Uzun yıllardır LCIS tanısı olan kadınlarda bilateral mastektomi yapılması tavsiye edilse de bu yaklaşım son zamanlarda yerini daha konservatif yaklaşımlara bırakmaktadır. Buna göre hastaların yakın takibi ve tamoksifen ile kemoprevensiyon yapılması önerilmektedir [49].



Şekil 7. Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesi (45)

2.3.4.2. İnvaziv Meme Karsinomları

İnvaziv meme karsinomları, Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) histopatolojik sınıflamasına göre çok sayıda gruba ayrılmıştır (Tablo 1) [51].

Tablo 1. İnvaziv meme karsinomlarının sınıflaması (45)

Histological types
Invasive carcinoma of no special type
Invasive lobular carcinoma
Tubular carcinoma
Cribiform carcinoma
Carcinoma with medullary features
Metaplastic carcinoma
Carcinoma with apocrine differentiation
Adenoid cystic carcinoma
Mucoepidermoid carcinoma
Polymorphous adenocarcinoma
Mucinous carcinoma and signet ring cell carcinoma
Carcinoma with neuroendocrine features
Invasive papillary carcinoma
Invasive micropapillary carcinoma
Secretory carcinoma
Oncocytic carcinoma
Sebaceous carcinoma
Lipid-rich carcinoma
Glycogen-rich clear cell carcinoma
Acinar cell carcinoma

2.3.4.2.1. İnvaziv Meme Karsinomu-Spesifiye Edilemeyen Tip

‘‘İnvaziv meme karsinomu-spesifiye edilemeyen tip’’ terimi herhangi spesifik bir alt tipin özelliğini taşımayan ve oldukça heterojen olan invaziv meme karsinomu grubunu ifade eder. İnvaziv meme karsinomlarının %70’ini kapsayan bu grup pratikte invaziv duktal karsinom olarak da adlandırılabilmektedir. Bu alt tipte nadiren medüller, tübüler, papiller ve müsinöz patern gözlenebilir [51]. İnvaziv meme karsinomu-spesifiye edilemeyen tip meme karsinomlu hastalarda 10 yıllık sağ kalım oranı %65-78 civarındadır [52].

2.3.4.2.2. İnvaziv Lobular Karsinom

Spesifik tipteki invaziv meme karsinomlarının en yaygın alt tipi olan invaziv lobular karsinoma (ILC), spesifiye edilemeyen invaziv meme karsinomlarına göre farklı morfolojik ve klinik özellikler göstermektedir [53]. İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık %15’ini oluşturan bu karsinom tipi genellikle düşük derece gösterir ve iyi prognoz ile ilişkili olarak bulunmuştur [54]. ILC vakalarının yaklaşık %90 oranda ER-α, %60-70 oranda PR eksprese edilmektedir [55]. Ayrıca %90 vakada E-cadherin proteininin ekspresyonunun kaybolduğu gözlenmiştir [56].

Genellikle postmenopozal dönemdeki kadınlarda ortaya çıkar [57]. İnvaziv lobular karsinomun standart tarama programları ile tespit edilmesi zor olduğundan hastalar genellikle metastatik evrede nodal tutulum ile gelirler [58]. Multifokalite ve bilateral tümör oranı da bu alt tipte yaygındır [59,60].

2.3.4.2.3. Nadir Morfolojik Tipler

İnvaziv meme karsinomunun farklı klinik ve morfolojik özellikler gösteren çok sayıda nadir alt tipi mevcuttur.

Müsinöz karsinom tüm primer meme kanserlerinin yaklaşık olarak %2-3’ünü oluşturmaktadır. Genellikle düşük dereceli tümör olan musinöz karsinomlar yüksek

oranda ER ve PR eksprese ederken, HER2 negatiftir [51]. Hastaların ortalama tanı yaşı 71 olmakla birlikte bu alt tipte düşük lenf nodu tutulumu söz konusudur.

Tübüler karsinom ise invaziv meme kanserlerinin %1-2'lik kısmını oluşturur [61]. Morfolojik olarak çok yoğun tübüler yapılar gözlenen bu tipte diffüz ER ve PR ekspresyonuna eşlik eden 'human epidermal growth factor receptor' (HER2) negatifliği mevcuttur [61]. Hastaların uzun dönem sağkalımları düşük dereceli invaziv duktal karsinomlardan daha iyidir [62].

Kribriform tip ve invaziv papiller karsinom, ER ve PR+, HER2- olan diğer nadir invaziv meme karsinomları arasındadır ve iyi prognoz gösterir [62]. Pleomorfik lobular karsinom, inflamatuvar meme karsinomu, metaplastik meme karsinomu, mikropapiller karsinom ve nöroendokrin karsinom kötü prognozlu olan nadir alt tipler arasındadır [51].

2.3.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması

Meme kanserlerinin gen ekspresyon profillemesi çalışmaları meme kanseri biyolojisini anlamada çok büyük fayda sağlamıştır [63]. Morfolojik sınıflama meme kanserlerinin prognoz tahmininde yetersiz kalırken gen profilleme oldukça iyi prognostik tahminler yapılabilmesini sağlamaktadır [64]. Bu alanda son zamanlarda yapılan çalışmalara göre meme karsinomları dört moleküler tipe ayrılmıştır: Luminal A, Luminal B, HER2-amplifikasyonlu, triple negatif tip. Bu moleküler tipler hastalar için hedefli tedavi seçenekleri açısından yol gösterici olmaktadır.

Meme kanserinde çok önemli bir prognostik faktör olan ER, invaziv meme karsinomlarının %70-75'inde pozitiftir [65]. ER+ hastaların yaklaşık %50'sinde PR pozitifliği görülürken tek başına PR pozitifliği nadir görülür [66]. HER2 ekspresyonu, meme kanserlerinin yaklaşık %15-25'inde pozitiflik gösterir ve tedavi seçimini etkileyen önemli bir belirteçtir [67]. HER2 amplifikasyonu, protoonkojenik sinyal yolaklarının daha fazla çalışmasına neden olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını kolaylaştırır ve bu yüzden kötü prognozla ilşkilidir [68].

2.3.5.1. Luminal A tipi

İnvaziv meme karsinomlarının %40-50'sini oluşturan Luminal A tümörler, ER ve/veya PR pozitifliğine eşlik eden HER2 negatifliği ile karakterizedir. Ayrıca bu tümörlerde hücre prolifreasyon belirteci olan düşük molekül ağırlıklı sitokeratin/Kİ-67'nin düşük ekspresyonu söz konusudur. Bu grubun gen profiline bakıldığında *MAP3KI*, *GATA3*, *PIK3CA*, ve *FOXA1* mutasyonları, yüksek *XBP1* ve *ESR1* ekspresyonu görülmüştür [69]. Klinik olarak düşük dereceli olan bu tümörler, düşük relaps ve yüksek sağ kalım oranı ile en iyi prognozlu tümör grubunu oluşturmaktadır [66]. Hormon reseptörü pozitifliği sayesinde hormonal tedaviye çok iyi yanıt verirlerken kemoterapiden kısıtlı fayda elde edilir [66].

2.3.5.2. Luminal B tipi

Luminal B tümörler invaziv meme karsinomlarının %20-30'unu oluşturur. Bu gruptaki tümörler, luminal A tümörlere kıyasla daha yüksek dereceli ve daha kötü prognozludur. ER pozitifliğine PR negatifliği eşlik edebilir. HER2 ekspresyonu değişmekle birlikte Kİ67 ekspresyonu %20'nin üzerindedir [70]. Gen profilleme çalışmalarında ise *PIK3CA*, *TP53* mutasyonları, *MDM2* ve *Cyclin D1* amplifikasyonu görülebilir [69]. Bu tümörler hormonal tedavi ile birlikte kemoterapiden fayda görürler. Yüksek Kİ-67 skoru, tümörün hızlı büyümesi ile ilişkilidir ve kötü prognoz göstergesidir [71].

2.3.5.3. HER2 aşırı ekspresyonlu tipi

HER2 proteini, *ERBB2* geni tarafından eksprese edilir. Bu gen normal epitel hücrelerinde düşük seviyede eksprese olurken yüksek seviyede ekpresyon invaziv meme karsinomlarının %10-15'inde görülür . HER2 aşırı ifadeli tip olarak adlandırılan bu tümörler yüksek HER2 ekspresyonu, ER/PR negatifliği ile karakterizedir. Bu tümörler, luminal tiplere göre daha hızlı büyümelerine rağmen anti-HER2 tedavileri sayesinde prognozları nispeten iyileştirilmiştir [66]. Ancak yine de bu gruptaki tümörler agresif seyirlidir.

2.3.5.4. Triple negatif tipi

Triple negatif meme kanseri tipi meme kanserlerinin %20'sini oluşturur. Tipik olarak ER, PR ve HER2 negatiftir. Hastalar sıklıkla 40 yaşın altındadır. Yüksek mitotik indekse sahip bu tümörlerde oldukça agresif bir klinik gidişat söz konusudur [66]. Çok büyük bir kısmını invaziv duktal karsinomlar oluştursa da çeşitli histolojik tipler, triple negatif özellikler gösterebilmektedir [72]. *BRCA1* genindeki patojenik varyantlar sonucu gelişen invaziv meme kanserleri tipik olarak triple negatiftir [66]. Son zamanlarda yapılan gen ekspresyon profilleme çalışmaları sayesinde triple negatif meme kanserleri 4 alt tipe ayrılmıştır: bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), mezenkimal ve luminal androjen reseptör (LAR) alt tipi [73]. Bu alt tiplerin prognozları ve tedavi duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Triple negatif gruptaki meme karsinomlarında herhangi bir tedavi hedefi bulunmadığından etkili tek tedavi seçeneği standart kemoterapidir [73].

2.3.6. Meme Kanseri Tanısı

Meme kanseri tanısı, klinik muayene, radyolojik görüntüleme yöntemleri ve biyopsi ile konulmaktadır. Kitlenin palpabl olup olmamasına, hastanın tıbbi geçmişi ve aile öyküsüne göre, hangi biyopsi yönteminin kullanılacağına karar verilir. Kor biyopsi, ince iğne biyopsisi, eksizyonel biyopsi seçenekler arasındadır. Nonpalpabl kitlelerde mamografi veya ultrason gibi görüntüleme yöntemlerinden yararlanılarak tümörden biyopsi alınabilir. Alınan tümör dokusu, histopatolojik olarak incelenir ve ER, PR, HER2 ve Ki-67 durumu belirlenir. Ayrıca genetik analizler ile de çeşitli gen ekpresyon durumlarına bakılabilir. Tedavi hedefinin belirlenebilmesi açısından gen profilleme çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

2.3.7. Meme Kanseri Evrelemesi

Kanserlerde evreleme, genel olarak tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve metastatik hastalık varlığına dayanmaktadır. Evreleme sisteminin amacı, hastanın prognozunu daha doğru bir şekilde tahmin edebilme ve hastaya uygun bir tedavi planı oluşturabilmektir.

Meme kanserinde, primer tümör (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumunun sınıflandırılması ile oluşturulan evreleme sistemi ilk kez American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından 1959 yılında yayınlanmıştır. İlk baskısının yayınlanmasından bu yana, tanı ve tedavideki gelişmelere paralel şekilde evreleme kılavuzu periyodik olarak güncellenmektedir. En son 2017 yılında revize edilmiştir [74]. Bu son revizyonda AJCC evreleme sistemine ER, PR ve HER2 ve multigen testleri gibi biyomarkerlar da dahil edilmiştir. Böylece klasik TNM evrelemesi modifiye edilerek prognostik evreleme yapılmaktadır [75]

2.3.8. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin yönetiminde amaç hastanın yaşam kalitesinin korunarak uzun bir sağ kalım sağlanmasıdır. Bu amaçla en sık başvurulan tedavi yöntemi mastektomidir [76]. Tercih edilecek cerrahi yöntem tipi tümör dokusunun büyüklüğüne, karsinomun morfolojik ve moleküler özelliklerine ve hastanın evresine bağlıdır. Buna göre total mastektomi veya meme koruyucu cerrahi, lenf nodu diseksiyonu tercih edilebilir.

Cerrahi sonrasında rekürrensi önlemek için kontrendikasyon olmayan hastalarda radyoterapi ve kemoterapi, meme kanserinin standart tedavi prokolünde yer almaktadır [77]. Tümörün moleküler özelliklerine göre, hormonal tedavi veya anti-HER2 tedavisi de uygulanabilir. Ayrıca klasik kemoterapi dışında, tümörün gen profiline göre belirlenen hedefe yönelik tedavi de uygulanabilmektedir.

Meme karsinomları, moleküler olarak çok heterojen oldukları için, bazı tiplerde, klasik kemoterapiye cevap yetersiz olmaktadır. Özellikle TNBC gibi hormonal tedavi veya anti-HER2 tedavilerin de uygulanmadığı tiplerde, uygun bir tedavi hedefinin seçilmesi önem kazanmaktadır. Bu hedefe yönelik tedaviler, klasik kemoterapi veya hormonal tedavilerle birlikte kombine veya monoterapi rejimi olarak uygulanabilmektedir [78].

Hedefe yönelik tedavide, tümör hücrelerinin gelişimi, proliferasyonu ve yayılımını sağlayan proteinler hedef alınmaktadır [79]. Bu tedavi seçenekleri arasında;

Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inbitörleri, cycline-dependent kinase 4 ve 6 (CDK4 ve CDK6) inhibitörleri, AK strain transforming (AKT) inhibitörleri ve fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitörleri sayılabilir [80]. Ayrıca HER2+ meme karsinomları ve TNBC'lerde immunoterapinin etkili olabileceği gösterilmiştir[78].

2.3.9. Meme Kanseri Genetiği

Memenin lobular ve duktal epitelinin anormal proliferasyonu ile karakterize olan meme kanseri genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur.

2.3.9.1. Meme Kanseri ile İlişkili Sinyal Yolakları

Normalde hücrelerin proliferasyonu, surveyi, migrasyonu ve birbiriyle kurduğu iletişim, kompleks sinyal yolakları ile kontrol edilmektedir [81]. Bu yolakların regülasyonunda ise çok sayıda protoonkogen, tümör supressor gen ve epigenetik mekanizma rol oynar. Kanser hücrelerinde bu sinyal yolaklarının regülasyonu bozularak hücre proliferasyonu, surveyi ve farklılaşması üzerindeki kontrol kaybedilir. Protoonkogenlerdeki aktive edici mutasyonlar bu sinyal yolaklarının hiperaktivasyonuna, tümör supresör genlerdeki inaktive edici mutasyonlar ise sinyal yolaklarının üzerindeki negatif regülatuvar etkinin kaybedilmesine neden olmaktadır[82].

Meme kanseri gelişiminde; ER ilişkili sinyal yolağı, HER2 ilişkili sinyal yolağı, Wnt/β-catenin ilişkili sinyal yolağı, Notch sinyal yolağı ve Sonic-hedgehog (SHH) sinyal yolağı gibi çok sayıda yolak rol oynamaktadır [81,82].

2.3.9.1.1. ER İlişkili Sinyal Yolakları

Nükleer yerleşimli olan ERα ve ERβ reseptörleri, belirli genlerin ekspresyonunu aktive eden veya baskılayan transkripsiyon faktörleri olarak rol oynamaktadır. Farklı genler tarafından kodlanan bu iki molekül, değişen derecelerde benzerlik gösteren ve heterodimer oluşumunu sağlayan fonksiyonel domainlerden

oluşur [83]. ER reseptörlerine ligand bağlanınca, reseptörler homodimer veya heterodimer yapı oluşturarak belli genlerin ekspresyonunu regüle etmek üzere DNA ile etkileşime girer [81]. DNA ile etkileşim, ER bağımlı veya hedef genlerde yer alan östrojen cevap elementlerine (EREs) bağımlı olarak gerçekleştirilebilir. ER moleküllerinde yer alan DBD, ER dimerleri ve hedef genlerin östrojen cevap elementlerinin (EREs) etkileşimini sağlayan bölgedir. ER bağımlı mekanizmada birçok ko-aktivatör ve ko-represör görev alır [84]. Bunlardan en önemlisi, ERα sinyal yolağını inhibe ederek tümörsupresör fonksiyonu gösteren BRCA1 genidir [85].

ERα, meme kanseri patogenezinde oldukça önemli bir rol oynar. Meme kanserlerinin yaklaşık %75'inde, ERα ekspresyonu pozitiftir [86]. Bu reseptörün kanser patogenezindeki rolünü açıklayan birçok mekanizma ortaya konmuştur. Bu mekanizmalardan birine göre ERα, siklin D1 ile etkileşerek kanser hücresinin proliferasyonunu kolaylaştırmaktadır [87].

2.3.9.1.2. HER2 İlişkili Sinyal Yolakları

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörleri (human epidermal growth factor receptors/HERs), normal dokularda ve birçok kanser dokusunda eksprese edilen ve tirozin kinaz reseptör ailesine ait olan reseptör grubudur [88]. Bu reseptörler, ligand bağlama görevi olan ekstraselüler domain, tramsmembranel domain ve enzimatik fonksiyonu olan intraselüler domainden oluşur [89]. Bu aileye ait olan ve meme kanseri patogenezinde oldukça önemli olan HER2 molekülüne ligand bağlanmasından sonra, reseptörde dimerizasyon meydana gelir. Sonrasında reseptörde otofosforilasyonla tirozin rezidüleri fosforillenerek birçok kaskadın aktifleşmesi sağlanır. Aktifleşen bu kaskadlardan en önemlileri RAS/mitogen-activated protein kinase (RAS/MAPK) ve phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 3-kinase (PIK3) sinyal yolaklarıdır [90,91]. Bu yolaklar meme kanseri patogenezinde çok önemli olan yolaklardır [92].

HER2 proteini, birçok meme kanseri alt tipinde yüksek miktarda eksprese olur. Bu proteinin aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve kanserin progresyonunu destekler [93]. HER2 ekspresyonu yüksek olan meme kanserleri, metastaz yapma eğilimindedir [94].

2.3.9.1.3. Wnt/β-catenin İlişkili Sinyal Yolağı

Wnt proteinleri yüksek derecede glikozilasyon işlemine uğrayarak sekrete edilir. Bu proteinler embryonik dokularda gelişimde, olgun dokularda ise homeostazinin sağlanmasında rol oynayan bir protein ailesi grubuna aittir [95]. Salgılanan Wnt proteinlerinin Frizzled ve düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) reseptörlerine bağlanması ile bir kaskad başlar ve B-catenin'in proteozomlarca yıkımı inhibe edilir. Bunun sonucunda stoplazmada biriken B-catenin nükleusa geçer ve Myc ve Cyclin D1 gibi onkogenlerin transkripsiyonunu uyarır [96]. Meme kanserinde Wnt sinyal yolağının, otokrin mekanizma ile sürekli aktif olduğu gösterilmiştir [81].

2.3.9.1.4. Meme kanseri ile İlişkili Diğer Sinyal Yolakları

Normal meme dokusunun gelişiminde ve kanser patogenezinde rol oynayan başka sinyal yolakları da bulunmaktadır. Hücre siklusunun progresyonu, siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından regüle edilir. Meme kanserlerinin %60'ında Cyclin D1 amplifikasyonu görülür [97]. Ayrıca östrojenin mitojenik etkisini, Cyclin D1 üzerinden gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda oral CDK inhibitörü Palbosiklib'in, ER+ hücre hatlarında hücre siklusunun progresyonunu durdurduğu gösterilmiştir [98]. Hücre farklılaşması, ve proliferasyonunda rol oynayan Notch sinyal yolağı, meme kanserinde patogenez, tedavi direnci ve anjiyogenez ile ilişkili bulunmuştur. Meme dokusunun gelişiminde önemli rol oynayan SHH sinyal yolağındaki bozukluklar, *patched homolog-1 (PTCH)* ve *glioma-associated oncogene-2 (GLI2)* gibi genlerin ekspresyonunda artışa sebep olur. Bu genlerdeki ekspresyon artışları ise duktal morfogenezde bozulmaya yol açar [99]. *PI3K/Akt/mTOR* sinyal yolağı, hücre siklusunu regüle eden önemli bir intraselüler sinyal yolağıdır. Bu yolakta tirozin kinaz aktivitesine sahip olan reseptöre, ligand bağlanınca phosphoinositide 3 kinase (PI3K) aktive olur ve bir seri fosforilasyon adımı ile Akt molekülü fosforillenir. Serin/treonin kinaz özelliğine sahip bir tümörsupresör olan *TSC* genini inhibe eder. Bir seri reaksiyonla, mTOR molekülü aktive olur ve hücre proliferasyonu uyarılır. Meme kanserlerinin önemli bir kısmında bu yolağın regülasyonu bozulmuştur [100].

2.3.9.2. Meme Kanseri ile İlişkili Genler

Meme kanserinin yaklaşık %70'i sporadik olarak görülürken %5-10 oranında ailesel bir yığılma söz konusudur. Vakaların %10-15'i ise herediter meme kanseri olarak karşımıza çıkar [101]. Herediter meme kanserlerinden otozomal dominant olarak kalıtılan bazı kanser yatkınlık genleri sorumludur (Şekil.6). Bu genler genel olarak DNA onarım mekanizmalarında, hücre siklusu kontrol noktalarında veya apoptozisde rol oynamaktadırlar. Bu hücresel olaylardaki defektler genomik instabiliteye sebep olarak kanser gelişimine zemin hazırlar [102]. Meme kanseri yatkınlık genlerinden yüksek penetranslı olanlar, meme kanseri riskini 5 kattan fazla artırırken, orta penetranslı genler 2-4 kat, düşük penetranslı genler 1,5-2 kat artırırlar [103].

BRCA1 ve *BRCA2* genleri, DNA onarımında, DNA hasarının kontrol edilmesinde ve genomik stabilitenin sağlanmasında rol oynayan proteinleri kodlayan iki önemli tümör supresör gendir [101]. Bu iki gendeki fonksiyon kaybettirici mutasyonlar genomik instabiliteye ve mutagenezise neden olur. Herediter meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sinden *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar sorumludur [104]. *BRCA1* taşıyıcılarında, yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %55-80 iken, bu risk, *BRCA2* taşıyıcılarında %35-60 civarındadır [42]. *BRCA1* taşıyıcılarında gelişen meme kanserleri genellikle ER- özellik gösterirken, *BRCA2* taşıyıcılarında tümör fenotipi değişken olabilmektedir [42].

Phosphtase and tensin homolog (PTEN) geni, *PI3K/AKT/mTOR* yolağında baskılayıcı olarak fonksiyon gösteren bir tümör supresör gendir [101] . Otozomal dominant olarak kalıtılan Cowden sendromu, *PTEN* genindeki fonksiyon kaybettiren mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Ciltte multipl hamartom, intestinal hamartomatöz polipler, epitelyal tiroid kanseri ve endometriyal karsinom ile karakterize olan bu sendromda meme kanseri gelişme riski çok yüksektir [105].

TP53 genindeki fonksiyon kaybettirici mutasyonlar, meme kanserinin yanısıra birçok kanserde gözlenmektedir [81]. Bu gen, hücre siklusu, DNA onarımı, apoptozis, hücre yaşlanması ve daha birçok hücre içi yolakta düzenleyici rol oynamaktadır. Otozomal dominant olarak kalıtılan Li-Fraumeni sendromu, *TP53* geninde fonksiyon

kaybına yol açan germline mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır [106]. Bu sendromda osteosarkom, lösemi, beyin tümörü ve adrenokortikal tümör riskinde artışın yanısıra 45 yaş altı kadınlarda meme kanseri gelişme riskinde 18 kat artış söz konusudur [107]. Meme kanseri vakalarının %1'inden daha azında germline *TP53* mutasyonu varken, %19-57'sinde somatik *TP53* mutasyonu gözlenir [107].

STK11 veya *LKB1* olarak adlandırılan tümörsupresör gendeki germline mutasyonlar, Peutz-Jeghers sendromuna sebep olmaktadır. Otozomal dominant olarak kalıtılan bu sendromda ince barsakta hamartomatöz polipler, bukkal mukoza ve dudaklarda ise pigmentli maküller gözlenir [108]. *STK11* geninde mutasyon taşıyan kişilerde meme kanseri gelişme riski %32-54 olarak bildirişmiştir [109].

CDH1 geni, hücreler arası adezyonda rol oynayan E-cadherin proteinini kodlamaktadır. Bu gende fonksiyon kaybına neden olan germline mutasyonlar otozomal dominant olarak kalıtılan herediter diffüz gastrik kanser ve invaziv lobuler meme kanseri yatkınlığına sebep olmaktadır [110,111].

Serin/treonin kinazı kodlayan *CHEK2* geni ise, DNA hasarının onarımı ve hasara verilen apoptozis veya hücre siklusu duraklatılması cevabında önemli rol oynamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar meme kanseri başta olmak üzere birçok kanserde karşımıza çıkmaktadır [112].

ATM ve *PALB2* gibi genler, *BRCA1* ve *BRCA2* genleriyle birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımında rol oynamaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar varlığında da meme kanseri riskinde artış söz konusudur.

2.3.9.3. Meme Kanseri ve Epigenetik

Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan genlerin ekspresyonunu değiştiren ve kalıtılabilen değişikliklerdir. Bu modifikasyonlar gelişim, farklılaşma ve karsinogenez süreçlerinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte kişideki epigenetik işaretler, yaş, diyet, stres ve hormon gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Gen dizisindeki değişimlerden farklı olarak, epigenetik

değişimlerin revesibl olması belli hastalıkların tedavisinde epigenetik modifikasyonların tedavi hedefi olarak seçilebilmesini sağlamaktadır [113]. Son yıllarda artan bilgiler ışığında keşfedilen epigenetik mekanizmalar, arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar (ncRNA) bulunmaktadır [113].

DNA metilasyonu, genellikle genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında sitozin rezidülerininde meydana gelmektedir [114]. Metilasyon sırasında DNA metiltransferaz (DNMTs) enzimleri, metil grubunu, S-adenozil metiyonin (SAM) molekülünden sitozinin 5. karbonuna aktarır. Genellikle genlerin susuturulması ile ilişkili olan bu metilasyon işlemi, diferansiasyon, gelişim ve hastalık gibi süreçlerde oldukça önemlidir. Birçok kanser tipinde tümör supresör genlerin hipermetilasyonuna karşılık onkogenlerin hipometilasyonu gibi metilasyon bozukluklarının olduğu gösterilmiştir [115]. Meme kanseri hastalarında yapılan analizlerde *p16*, *ATM* ve *BRCA1* gibi bazı tümör supresor genlerde hipermetilasyon belirlenmiştir [116,117].

Histon proteinlerinin modifikasyonu, kromatinin yapısının değişimine neden olarak genin ifadesini değiştiren bir epigenetik mekanizmadır. Histon modifikasyonları, gen transkripsiyonu, DNA replikasyonu, DNA rekombinasyonu ve DNA onarımı gibi önemli hücresel olayları etkilemektedir [118]. Ayrıca histon modifikasyonlarının kanserin başlangıç ve progresyonunda rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bilinen histon modifikasyonları arasında, asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon bulunmaktadır.

Tüm genom dizileme ve RNA dizileme teknolojilerindeki hızlı gelişmeler ve bioinformatik analizlerinin gerçekleştirilmesi, insan genomuna bakış açısını oldukça değiştirmiştir [81]. Kapsamlı transkriptomik analizler, genomun sadece %2'lik kısmının protein kodlayan genlerden oluştuğunu ortaya koymuştur. Yani insanlarda transkriptomun çok büyük bir kısmı, birçok biyolojik süreçte ve gen ekspresyonunda regülatuvar rol oynayan kodlamayan RNA (ncRNA) moleküllerinden oluşmaktadır [119]. Son yıllarda yapılan çalışmalar kodlamayan RNA'ların kanserin başlangıcı ve progresyonunda çok önemli roller üstlendiklerini ortaya koymuştur.

Kodlamayan RNA'lar yapılarına ve uzunluklarına göre iki kategoriye ayrılır: >200 nükleotidden oluşan uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve <200 nükleotidden oluşan mikroRNA (miRNA), küçük nükleolar RNA (snRNA) ve piwi RNA (piRNA)[120].

Genlerin ekspresyonunu, posttranskripsiyonel olarak regüle eden miRNA'lar 20-24 nükleotid uzunluğundadır. miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' ucundaki transkribe olmayan (3' UTR) kısma bağlanarak mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonunun bozulmasına neden olur [121]. miRNA'lar organ gelişimi, apoptozis, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır [121]. miRNA'ları kodlayan genler, genellikle protein kodlayan genlerin intronlarında veya eksonlarında veya da intergenik alanlarda yerleşirler [122]. İntergenik miRNA'ların ekspresyonu, host genin ekspresyonuna bağlı iken intragenik miRNA'ların kendi transkripsiyonel ünitesi vardır. miRNA geni, RNA polimeraz II tarafından transkribe edildikten sonra uzun primer transkript olan pri-miRNA oluşur [123]. Birkaç kilobaz (kb) uzunluğunda olan pri-miRNA, nükleusta kesilerek 70 kb uzunluğundaki pre-miRNA molekülü oluşturulur. Oluşan bu molekül, eksportin-5 ve Ran-GTP vasıtasıyla nükleustan sitozole aktarılır. Sitozolde RNAse III Dicer enzimi pre-miRNA'yı, 22 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA dupleksine dönüştürür. Çift iplikli miRNA, RNA ile indüklenen sessizleştirici komplekse (RISC) bağlanır. Bu kompleks komplementer ipliği parçalayarak ve miRNA tek iplikli stabil iplik olarak fonksiyonel miRNA haline getirilir [123].

miRNA'ların, meme kanseri progresyonu ve metastazında oldukça önemli oldukları ortaya konmuştur [124]. Prognostik markerların ve tedavi hedefinin bulunmadığı TNBC'de miRNA'ların anormal ekspresyon düzeyinin klinik açıdan anlam taşıdığını gösteren kanıtlar her geçen gün artmaktadır [125].

2.3.9.4. Çalışmamızda Değerlendirilen mRNA ve miRNA Genleri

Meme kanseri moleküler olarak oldukça heterojen bir hastalık grubu olup karsinogenez sürecinde genetik ve epigenetik bozuklukların progresif birikimi söz konusudur. Bu çalışmamızda amacımız tedavi hedefi ve prognostik marker eksikliği

nedeniyle tedavinin zor olduğu TNBC hastalarında gen ekspresyon paterninin değerlendirilerek tedavi hedefi olabilecek genetik değişikliklerin ortaya konmasına katkıda bulunmaktır.

2.3.9.4.1. *EZH2* geni

Polycomb grup (PcG) proteinleri, kromatinin yapısını değiştirerek transkripsiyonu baskılayan önemli epigenetik regülatuvarlardır. Bu proteinler, multiprotein komplekslerini içeren çok sayıda aileden oluşmaktadır. Bu ailelerden en iyi bilinenleri, PRC1 ve PRC2'dir [126]. Bu ailelerdeki proteinler, kromatinlerin yapısını histon proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonları vasıtasıyla değiştirirler. Bilindiği gibi histon proteinlerine çeşitli moleküller eklenerek kromatinin yapısı ile birlikte çeşitli translokasyon faktörlerinin o bölgedeki genlere erişebilirliği değişmektedir [127].

PRC2 ailesine ait proteinler, H3 histon proteininin 27. lizin (Lys) rezidüsüne iki veya üç metil molekülü ekler. Buna bağlı olarak kromatin yapı sıkılaşarak o bölgede bulunan genler susturulur [128]. Histon modifikasyonlarındaki bozulmalar karsinogenezde rol oynamaktadır.

EZH1 ve EZH2 proteinleri PRC2 kompleksinin katalitik alt birimidir. EZH2 proteini, organ gelişimi ve homeostazisi, genlerin baskılanması ve imprinting süreçleri ve de DNA hasarının tamirinde kritik roller oynamaktadır. EZH2 proteini, histonların dışında, başka moleküllerin de (transkripsiyon faktörleri başta olmak üzere) lizin rezidülerinin metilasyonunu sağlar.

EZH2 geni, meme kanserinde çeşitli tümör supresör genleri baskılayarak onkojenik etki göstermektedir. Kanser dokusundaki ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden düzenlenmesi, kanserin progresyonunda önemli bir adımdır. EZH2 proteininin de ECM yeniden düzenlenmesinde rol oynayarak kanser progresyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu sürecin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemel mekanizmalardan birine göre, EZH2 lizil oksidaz ailesi üyelerinin ekspresyonunu etkileyerek ECM'nin yapısında değişikliğe sebep

olmaktadır. Biz de çalışmamızda TNBC dokularındaki EZH2 ve LOXL4 ekspresyon düzeylerine ve bunların birbiri ile ilişkisi olup olmadığına bakmayı amaçlamaktayız.

2.3.9.4.2. *LOXL4* geni

Lizil oksidazlar, bakır bağımlı amin oksidaz fonksiyonu gören ve beş üyeden oluşan bir protein ailesidir : LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 ve LOXL4 [129]. Bu ailedeki proteinlerin karboksil terminali oldukça korunmuş iken amino terminali değişkenlik gösterir. Amino terminalindeki bu farklılıklar, her bir üyenin dokuya özgü işlevler ve dağılım paterni göstermesini sağlamaktadır. Bu protein ailesi ECM'nin en önemli bileşenleri olan kollajen ve elastinin yapısındaki lysin rezidülerinin, oksidatif deaminasyonunu katalizleyerek kovalent çapraz bağların oluşumunu sağlar [130]. Embryonik gelişim ve farklılaşma döneminde önemli rol oynayan LOX protein ailesi, tüm dokularda değişen oranlarda eksprese olmaktadır. Ateroskleroz, skleroderma ve keratoz gibi bağ dokuyu ilgilendiren hastalıklarda LOX proteinlerin ekspresyonunda bozulmalar gözlenmektedir. Son yıllarda ise LOX proteinlerinin kanser invazyonu ve metastazında rol oynadığı ortaya konmuştur [131].

Bu protein ailesi içerisinde yer alan LOXL4, özellikle ECM yeniden şekillenmesi, doku onarımı ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde görev alır. Normal dokularda LOXL4 ekspresyonu sınırlı olmakla birlikte uterus ve serviks gibi organlarda, yüksek oranda eksprese olabilmektedir. Son yıllarda LOXL4'ün çeşitli kanser tiplerinin progresyonu ile ilişkili olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bazı kanser türlerinde onkojenik etki gösteren LOXL4, bazı kanser türlerinde tümör supresör olarak rol oynamaktadır [18]. Son zamanlarda LOXL4, TNBC ile ilişkili olarak dikkati çekmektedir. Yapılan çalışmalar, LOXL4 ekspresyonunun TNBC'de artmış olduğunu ve bu artışın tümör progresyonu, invazyon ve metastazla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle LOXL4, TNBC patogenezinde önemli bir rol oynayan potansiyel bir biyobelirteç ve hedef molekül olarak değerlendirilmektedir.

2.3.9.4.3. *miR29* ailesi

miR-29 ailesi, miR-29a, miR-29b ve miR-29c'den oluşmaktadır. Bu 3 ayrı miRNA 7q32.32 bölgesinden kodlanan pri-miR-29a/b1 ve 1q32. bölgesinden kodlanan pri-miR29b2/c primer transkriptlerinden meydana gelmektedir [121]. Bu miRNA'ların matur formlarının sekansları, birbirine yüksek derecede benzerlik gösterse de hücredeki lokalizasyonları ve fonksiyonları farklılık göstermektedir [132]. miR-29 ailesi üyeleri yaygın bir şekilde eksprese edilir ve birçok kanser tipinde ekspresyonlarında bozulmalar gözlenir. miR-29b, miR-29b1 ve miR-29b2 şeklinde iki ayrı alt gruptan oluşur. Bu iki subtip farklı kromozomal bölgeden kodlanmasında rağmen matur formda çok yüksek oranda benzerlik göstermektedir [132].

Son yıllarda miR-29 ailesi ve özellikle miR-29b'nin fonksiyonu hakkında daha fazla veri elde edilmiştir. Buna göre miR-29b hücredeki DNMT'leri ve DNA metilasyon yolaklarında rol oynayan proteinleri etkileyerek DNA metilasyonunu azaltmaktadır. Özellikle miR-29b aşırı ekspresyonunda, tümör hücrelerindeki DNA metilasyonunda azalma olduğu ortaya konmuştur [132]. Kanser hücrelerinde, tümör supresor genlerin promoterlerindeki metilasyonun ortadan kaldırılması ile antitümöral etki edileceğinden miR-29b tümör supresör miRNA olarak bilinmektedir. Çoğu hematolojik malignitede, miR-29b'nin hücrede bulunan DNMT'lerin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

Ayrıca miR-29b, p53 düzeyini artırarak hücrede apoptozisi indüklemektedir [133]. Kanser metastazında ve progresyonunda tümör mikroçevresinin çok önemli olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada, *GATA3* geninin miR-29b ekspresyonunu artırarak tümör mikroçevresini değiştirdiği ve metastazı baskıladığı ortaya konmuştur [134].

miR-29b'nin tümör supresor fonksiyonunun yanısıra farklı kanser evreleri ve türlerinde onkojenik roller üstlenebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [135]. Bazı meme kanseri vakalarında, metastatik kanser hücrelerinde miR-29b ekspresyonu yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca miR-29b nin aşırı ekspresyonu, ileri tümör evresi,

lenf nodu metastazı ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [14]. miR-29b ‘nin bu zıt fonksiyonlarının moleküler temeli henüz anlaşılamamıştır.

TNBC hastalarından alınan kanser dokuları, kanser hücre hatları ve sağlıklı doku kontrolleri kullanılarak yapılan 2017 tarihli bir çalışmada miR-29b1 ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. İlk olarak kanser dokusu ve kanser hücre hatlarının her ikisindeki miR-29b düzeyi sağlıklı kontrollere göre düşük çıkmıştır. Ayrıca kanser hücre hatlarının incelenmesi sırasında, miR-29b düzeyi yüksek olan hücrelerde proliferasyon hızı ve hücrelerin migrasyon yeteneği daha düşük bulunmuştur. Bu kanser hücre hatlarına ve sağlıklı dokulara paklitaksel uygulanmış ve hücrelerin proliferasyon oranları karşılaştırılmıştır. İlaca verilen yanıt ile mi-R29b düzeyleri arasında doğrusal bi ilişki bulunmuştur [136].

Biz de çalışmamızda, TNBC hastalarında miR29b’nin düzeyinin kanser dokusunda normal dokuya göre değişimini ve bu değişimin incelediğimiz diğer iki gendeki farklanmalarla olan ilişkisini inceleyerek TNBC’nin moleküler patogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçlamaktayız. Çünkü moleküler yolakların tam olarak anlaşılamadığı TNBC vakalarında çok daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınarak yürütülmüştür (sayı: B.30.2.ATA.0.01.00/60, karar no ve tarihi: 73; 21.02.2024).

3.1. Çalışma ve Kontrol Grubunun Oluşturulması

Çalışmamıza, 20-70 yaş aralığında TNBC tanısı almış 30 hastanın dahil edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Şubat 2024 ile Nisan 2025 tarihleri arasında, Genel Cerrahi kliniğine başvurmuş ve TNBC tanısı kesinleşmiş hastalardan cerrahi müdahale sırasında 5 kanser doku örneği toplanmıştır. Ayrıca sağlıklı kontrol doku olarak, aynı hastalara ait, operasyon esnasında patolog tarafından tümör negatif olarak tanımlanmış komşu normal doku örneği de alınmıştır. Alınan dokular, hemen Eppendorf tüpüne alınarak RNA izolasyonu yapılana kadar -80'de saklanmıştır. Ayrıca Genel cerrahi kliniğinden alınan doku sayısının yetersiz olması nedeniyle Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arsivi'nden 2023-2025 yıllarına ait parafin bloklardan 25 TNBC tanılı doku örneği de çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri, öz-geçmiş bilgileri ve tıbbi kayıtları hastanemiz sisteminden alınmıştır. Bu sırada verilerin gizliliği açısından azami hassasiyet gösterilmiştir.

Çalışmaya Alınma Kriterleri:

1. TNBC tanısı almış olması.
2. Bu çalışmaya katılmayı kabul etmesi ve onam formunu imzalamış olması.
3. Herhangi başka bir kronik hastalığının olmaması.

Dışlanma Kriterleri:

1. 20-70 yaş aralığının dışında olmak
2. ER/PR ve HER+'liği

Dahil edilme kriterleri dikkate alınarak seçilen hastaların dokularından elde edilen total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldıktan sonra kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle analiz gerçekleştirildi. Bu analizde *miR-29b1-5p, EZH2 ve LOXL4* genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. Ekspresyon analizinin doğru yapılabilmesi için normalizasyon amacıyla çeşitli kontrol genleri kullanıldı; mRNA için *GAPDH*, miRNA için ise *U6* genleri kontrol geni olarak kullanılmıştır.

3.2. Total RNA İzolasyonu

3.2.1. Taze Dokudan RNA İzolasyonu

Genel cerrahi kliniğinden alınan tümör ve sağlıklı doku örnekleri, Qiagen TissueLyser LT kullanılarak üretici tavsiyelerine göre Lysis Buffer içinde boncuk kullanarak homojenize edildi. Bunun ardından total RNA izolasyonu, QuickExTotal RNA Extraction Kit'i (NucleoGene, İstanbul, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Bu kit, spin kolon ve özel lizis tamponu ile doku örneklerinden elde edilen RNA'ların bozulmadan izole edilmesini sağlar. İzolasyon işleminin ardından, total RNA yüksek verimlilik ve saflıkta elde edildi. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonunu ve saflığı MaestroNano Micro-Volume spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü, İzole edilmiş standardize RNA'lar -80°C'de saklandı.

Total RNA izolasyonu için kullanılan QuickEx Total RNA Extraction Kit'in protokolü aşağıdaki basamaklar şeklindedir;

1. Örnek ile lizis tamponunun tam olarak karışmasından sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra katı partiküllerin kolonu tıkamaması için 14,000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüje edildi. Oluşan süpernatant dikkatlice alınıp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ve buradan sonra süpernatant ile devam edildi.
2. Lizis tamponun içinde parçalanmış olan örneğe eşit miktarda etanol (%95-100) eklendi ve 1 dakika süreyle vortekslenerek iyice karıştırıldı.
3. Karışım bir *Collection* tüpündeki *Spin* kolona aktarıldı ve 11,000 rpm'de

30 saniye boyunca santrifüjlendi. *Collection* tüpü boşaltılarak *Spin* kolonu *Collection* tüpüne geri yerleştirildi.

4. RNaz içermeyen bir tüpe 5 µl DNaz l (6 U/L) ve 45 µl DNaz l buffer eklendi ve karıştırıldı. Karışım kolon matriksine yavaşça eklendi. On beş dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. *Spin* kolona 400 µl Wash l buffer eklendi ve 11,000 rpm'da 30 saniye boyunca santrifüj yapıldı. *Collection* tüpü boşaltıldı ve *Spin* kolonu *Collection* tüpüne tekrar yerleştirildi.
6. Tekrar *Spin* kolona 400 µl Wash l buffer eklendi ve 11,000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi. *Collection* tüpü boşaltıldı ve *Spin* kolonu *Collection* tüpüne tekrar yerleştirildi.
7. *Spin* kolona 700 µl Wash ll buffer eklenip 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. *Collection* tüpü atıldı ve *Spin* kolonu nükleaz içermeyen yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
8. RNA'yı elde etmek için 100 µl Elüsyon buffer'i doğrudan *Spin* kolonunun merkezine eklenip 11,000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. RNA'yı yüksek konsantrasyonda elde etmek için Elüsyon buffer 100 µl kadar kullanıldı.

3.2.2. FFPE Dokulardan RNA İzolasyonu

FFPE doku örneği blokları, Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji bölümünden alındı. Histopatolojik tanı, tümör alt tipi ve grade'i deneyimli bir danışman patolog tarafından doğrulanmıştır. Kanser dokusuna ait patolojik bilgiler ve hastalara ait klinik bilgiler hastanemiz veri tabanından elde edilmiştir. Triple negatif meme kanseri (TNBC) hastalarına ait komşu sağlıklı meme dokusu örnekleri, karşılaştırmalı analizlerde normal kontrol olarak kullanılmıştır.

FFPE dokularından RNA izolasyonu için, EcoSpin FFPE Total RNA Kit kullanılmıştır. Total RNA, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak izole edilmiştir. Kullanılan izolasyon protokolü aşağıda sunulmuştur:

1. 10 mikron kalınlığında yaklaşık 5 kesit ependorflara alındı. Fazla parafin uzaklaştırıldı.

2. Her tüpe 1 mL ksilen eklendi, 50 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından vortekslendi.
3. Tüpler maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildikten sonra ksilen fazı dikkatlice uzaklaştırıldı.
4. Örneğe 1 mL %96–100 etanol eklenir ve vortekslendi.
5. Tüpler maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
6. 4 ve 5. adımlar tekrar edildi.
7. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için peletler oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika kurutuldu.
8. Her bir tüpe 100 µL EcoSpin Pre-Lysis Buffer eklenir ve vortekslenerek ya da pipetle karıştırılarak çözülmesi sağlandı.
9. Ardından 100 µL EcoSpin FFPE Lysis Buffer eklenip karıştırıldı. Üzerine 20 µL EcoSpin Proteinase K ilave edilip karıştırıldı ve 55 °C'de 15 dakika inkübasyona alındı.
10. Karışım 80 °C'de, sık sık vortekslenerek, 15 dakika inkübe edildi.
11. Tüpler maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Süpernatantla devam edildi.
12. Örneğe 400 µL EcoSpin Binding Buffer eklenerek iyice karıştırıldı.
13. Üzerine 600 µL %96–100 etanol eklenerek 10 saniye vortekslendi.
14. EcoSpin kolonu bir toplama tüpüne yerleştirildi ve karışım kolona aktarıldı. Mikrosantrifüjde oda sıcaklığında maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi. Gerekli durumlarda bu adım lizat hacmine göre tekrarlandı.
15. RNaz içermeyen bir tüpte, 5 µL DNaz I (6 U/µL) ile 45 µL DNaz I buffer karıştırıldı ve elde edilen karışım kolon matriksine yavaşça bırakıldı. Ardından, oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
16. Kolonun altındaki birikim (flow) atıldı. Ardından, kolona 400 µL EcoSpin Wash Buffer 1 eklendi. Mikrosantrifüjde oda sıcaklığında maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi.
17. Birikim tekrar atıldı. Kolona 500 µL EcoSpin Wash Buffer 2 ilave edildi ve aynı şekilde 30 saniye santrifüj edildi.
18. Birikim uzaklaştırıldıktan sonra, kolon üzerine 200 µL EcoSpin Wash

Buffer 2 eklendi ve bu kez kalan yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması amacıyla maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.

19. EcoSpin Kolonu, yeni ve RNaz içermeyen 1.5 mL mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.
20. Kolon membranının ortasına 50–100 µL EcoSpin Elution Buffer damlatıldı ve kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
21. Kolon, mikrosantrifüjde oda sıcaklığında maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi.
22. Kolon atıldı. Saf RNA elde edilmiş oldu.

3.3. cDNA Sentezi (mRNA)

İzole edilen total RNA'dan mRNA cDNA'sı elde etmek için cDNA Synthesis Kit'i (5X) (NucleoGene, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Bu kit, konsantre master mix, tampon, deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP)'ler, $MgCl_2$, primerler, RNaz inhibitör proteini, qScript ters transkriptaz ve stabilizatörleri içermektedir. qScript, MMLV ters transkriptazın bir RNaz H(+) türevidir ve güvenilir cDNA sentezi için optimize edilmiştir. Protokol izlenerek aşağıdaki aşamalar sırasıyla yapıldı;

1. Kullanılacak malzemeler buz üzerine yerleştirilerek oda ısısına gelene kadar çözdürüldü. Ardından içeriğin tüpün dibinde toplanması için kısa bir süre vortekslenerek santrifüjlendi.
2. Reaktiflerin karışımı buz üzerinde hazırlandı (Tablo 2). Karışım, PCR mikro-tüplerine dağıtıldı ve her tüpe RNA örneği eklendikten sonra vortekslendi ve sonrasında santrifüjlendi.
3. Hazırlanmış karışımlar sırasıyla 25°C'de 5 dakika, 50°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika ve son olarak 4°C'de PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazında inkübe edildi.
4. cDNA sentezi tamamlandıktan sonra, PCR amplifikasyonu için volümün 1/5-1/10 kadarı (2-4 µL) kullanıldı. Ardından Real-time qPCR protokolü ile devam edildi.

Tablo 2. mRNA için cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5X)	4 µl
RNA	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

3.4. cDNA Sentezi (miRNA)

İzole edilen total RNA'dan miRNA cDNA'sı elde etmek için microRNA cDNA Synthesis Kit'i (NucleoGene, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Bu kit, Poli(A) Polimeraz, dNTP'ler, rekombinant RNaz inhibitör proteini, qScript ters transkriptaz, stabilizatörler, 2x Reaksiyon Karışımı ve microRNA Enzim Karışımı içermektedir ve miRNA'dan cDNA sentezlemek için hepsi bir arada, kullanıma hazır bir üründür. Kalıp RNA'ya başlangıçta bir poli(A) kuyruğu ekleyip ardından bir adaptör primeri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirmektedir. Üretici firmanın protokolü izlenerek aşağıdaki aşamalar yapıldı;

1. Kalıp RNA'yı ve tüm reaktifler buz üzerinde çözdürülüp vortekslenerek karıştırıldı. Ardından tüplerdeki sıvıyı toplamak amacıyla kısa bir santrifüj yapıldı.
2. Reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı (Tablo 3). İçeriğin karışması için pipetlenerek kısa bir santrifüj yapıldı.
3. Hazırlanan karışımlar sırasıyla 37°C'de 30 dakika, 50°C'de 30 dakika, 95°C'de 5 dakika ve de 4°C'de PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazında inkübe edildi. Sonrasında Real-time qPCR protokolü ile devam edildi.

Tablo 3. miRNA için cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
2x Reaksiyon Karışımı	10 µl
mikroRNA Enzim Karışımı	1 µl
RNA	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

3.5. qPCR Aşaması

1. Elde edilen cDNA'nın PCR amplifikasyonu için üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde qPCR reaksiyonu aşağıdaki Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlandı.
2. Pipetleme ve mikrosantrifüjle reaksiyonların iyice karışması sağlandı.
3. Örnekler Qiagen Rotor-Gene Q qPCR cihazına aktarıldı ve 72'lik platform kullanılarak Tablo 5'teki protokole göre çalıştırıldı.

Tablo 4. qPCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
qPCR Sybr Green Master Karışımı	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA (2-5 kat seyreltilmiş)	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

miR-29b1-5p, EZH2 ve LOXL4'e özgü primerler ve referans genler (mRNA için *GAPDH*, miRNA için *U6*), NucleoGene firması tarafından GENE EXPRESSION ASSAY (NucleoGene, İstanbul, Türkiye) kullanılarak tasarlanmıştır.

Tablo 5. qPCR'ın döngü basamakları

Sıcaklık	**Süre**	**Siklus Sayısı**
95°C	15 dakika	1
95°C	15 saniye	40
60°C	30 saniye	
72°C	45 saniye	

Real-time qPCR işleminin ardından, her bir örnekten elde dilen floresan ışıma miktarını gösteren Ct (Döngü Eşiği; Cycle threshold) değeri hesaplandı. Ct değerleri, veri analizinde kullanılmak amacıyla kaydedildi.

3.6. Verilerin Analizi

miRNA (*miR-29b1-5p*) ve mRNA (*EZH2 ve LOXL4*) ekspresyon düzeylerini qPCR'de ölçmek amacıyla üretici firmanın talimatlarına uyularak 30 kanserli doku ve 30 eşleşen komşu sağlıklı dokuda olmak üzere toplam 180 reaksiyon gerçekleştirildi. qPCR verilerinin rölatif kantifikasyon yöntemiyle normalize edilebilmesi için *GAPDH* (mRNA için) ve *U6* (miRNA için) kontrol genleri kullanıldı.

qPCR işlemi sırasında amplifikasyon oldukça elde edilen floresans ışıma, Real-Time qPCR cihazı tarafından kaydedildi ve her örnekten elde edilen Ct değeri cihaz tarafından otomatik olarak kaydedildi. Rotor-Gene Yazılım programında, tümör ve normal doku grubu olarak kabul edilen 30 çift örneğin Ct değerleri ve Ct eğri grafikleri analiz edilerek kaydedildi.

Elde edilen veriler kullanılarak, mRNA ve miRNA ekspresyon değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle hesaplandı. Ct değeri, genin ekspresyon düzeyinin bir göstergesidir. Dokudaki hedef genin ve kontrol geninin Ct değerleri arasındaki fark (ΔCt = hedef genin Ct değeri - kontrol geninin Ct değeri) hesaplanarak ΔCt değeri bulunur. ΔΔCt (Delta Delta Ct) metodu olarak da bilinen Livak yöntemi, qPCR verilerinin analizinde bir genin iki farklı durum (sağlıklı ve kanserli doku) arasındaki rölatif ekspresyonlarını karşılaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, ΔΔCt hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ΔΔCt = örneğin ΔCt değeri -kontrollerin ortalama ΔCt değeri) formülüyle 2 grup arasındaki kat değişimi (fold change) elde edilir [137].

Çalışmada elde edilen demografik ve klinik verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 26.0 yazılımı kullanılmıştır. RNA ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon farklarının istatistiksel karşılaştırılmasında parametrik olmayan Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Ayrıca, hastalar lenf nodu metastazı ve erken evre-ileri evre durumuna göre alt gruplara ayrılmış; bu gruplar arası karşılaştırmalarda yine Mann-Whitney U testi tercih edilmiştir. $p<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. MiRNA ve mRNA ekspresyonları arasındaki ilişkileri değerlendirmek amacıyla Spearman Rho korelasyon katsayısı ile korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir; bu analizlerde de $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Bu çalışmaya, 35 ila 69 yaş aralığında değişen yaşlara sahip, toplam 30 meme kanseri hastası dahil edilmiştir. Olguların yaş ortalaması 47 olarak hesaplanmıştır. Katılımcıların 26'sı tanı anında herhangi bir tedavi almamış ve primer cerrahi uygulanmış hastalardan oluşurken; geri kalan 4 hasta ise neoadjuvan kemoterapi sonrası opere edilmiştir.

Hastaların soygeçmişi değerlendirildiğinde, 12 (%40)'sinde birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarda kanser öyküsü bulunduğu belirlendi. Bu hastalardan 5'inin birinci derece akrabalarında meme kanseri mevcuttu. Öte yandan, 9 hastada herhangi bir dereceden akrabada kanser öyküsü saptanmadı.

Çalışmaya dahil edilen olguların 25'i (%83,3) invaziv duktal karsinom, 3'ü (%10) invaziv meme karsinomu–spesifiye edilemeyen tip, 2'si ise (%6,6) invaziv lobüler karsinom olarak sınıflandırılmıştır. Tümör lokalizasyonu değerlendirildiğinde, lezyonların 15'i (%50) sol memede, 15'i ise (%50) sağ memede saptanmıştır.

Hastaların evrelemesi, AJCC tarafından tanımlanan TNM sistemi esas alınarak yapıldı. 30 hastanın 11'i (%36,67) evre 1, 15'i(%50) evre 2, 1'i(%3,33) evre 3 ve 3 hasta evre 4 (%10) idi. Hastaların 11'inde (%36,7) lenf nodu metastazı varken 4'ünde (%10) uzak metastaz mevcuttu.

Tablo 6'da hastaların demografik ve klinopatolojik bilgileri özetlenmiştir.

Tablo 6. Çalışma grubunun klinik ve histopatolojik verileri

No.	Yaş	Cinsiyet	Aile Öyküsü	Tümör Lokalizasyonu	Patolojik Tanı	Klinik Evre	Grade	Neoadjuvan Tedavi
1	35	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Lobüler Karsinom	$T_2N_1M_0$	3	-
2	35	K	Yok	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
3	52	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Karsinom	$T_2N_0M_0$	2	-
4	37	K	Teyzede meme Ca	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
5	63	K	Yok	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	3	-
6	46	K	Annede meme ca	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
7	39	K	Anne ve kızkardeş	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_1M_0$	3	-
8	46	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
9	35	K	Annede endometrium	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
10	36	K	Annede meme Ca	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-

Tablo 6. (Devamı)

No.	Yaş	Cinsiyet	Aile Öyküsü	Tümör Lokalizasyonu	Patolojik Tanı	Klinik Evre	Grade	Neoadjuvan Tedavi
11	41	K	Bilinmiyor	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_1M_0$	3	-
12	45	K	2.derece akrabada meme Ca	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	2	-
13	49	K	Bilinmiyor	Sağ Meme	İnvaziv Karsinom	$T_2N_1M_0$	3	-
14	37	K	Yok	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
15	66	K	Bilinmiyor	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_1M_0$	3	-
16	44	K	Annede endometriu	Sağ Meme	İnvaziv Lobüler Karsinom	$T_2N_2M_1$	3	+
17	44	K	2.derece akrabada	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	2	-
18	57	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_2M_1$	3	+
19	65	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_1M_1$	3	-
20	57	K	Annede meme Ca	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_1M_0$	2	-

Tablo 6. (Devamı)

No.	Yaş	Cinsiyet	Aile Öyküsü	Tümör Lokalizasyonu	Patolojik Tanı	Klinik Evre	Grade	Neoadjuvan Tedavi
21	62	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	3	-
22	50	K	Yok	Sağ Meme	İnvaziv Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
23	37	K	Bilinmiyor	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	2	-
24	54	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	2	-
25	40	K	Yok	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	3	-
26	67	K	Kardeş meme Ca	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_1M_0$	3	-
27	52	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_3N_1M_0$	3	+
28	47	K	Anne ve kızkardeş meme	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	2	-
29	69	K	Yok	Sol Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_1N_0M_0$	3	-
30	38	K	Kız kardeşte meme Ca	Sağ Meme	İnvaziv Duktal Karsinom	$T_2N_0M_0$	2	-

4.1. Triple Negatif Meme Kanseri Tanılı Hastalardan Alınan Doku Örneklerinde *EZH2*, *LOXL4* ve *miR29b* ekspresyon Analizi Sonuçları

Triple negatif meme kanseri tanılı hastalardan elde edilen tümör dokusu ve sağlıklı doku örneklerinin her birinde EZH2, LOXL4 ve miR29b genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Bu genlerden EZH2 ve LOXL4 genlerinin ekspresyonunun normalizasyonu için GAPDH kontrol geni ve miR29b geninin eskpresyonunun normalizasyonu için U6 kontrol geni kullanıldı.

Realtime PCR analizleri sonucunda komşu sağlıklı doku ve tümör dokularında incelenen EZH2, LOXL4 ve miR29b genlerinin RNA ekspresyonlarına ait Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri sırasıyla Tablo 7 ve 8'de sunulmuştur.

Tablo 7. Realtime PCR analizleriyle komşu sağlıklı dokulardan elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Hasta no	EZH2 Ct	LOXL4 Ct	GAPDH Ct	EZH2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	LOXL4 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	miR-29b Ct	U6 Ct	miR-29b $2^{-\Delta\Delta Ct}$
S1	23,48	24,30	16,57	0,04	0,03	24,31	20,70	1,69
S2	25,69	21,64	20,47	0,13	2,94	23,63	22,2	0,15
S3	21,50	22,09	17,81	0,37	0,34	23,54	26,00	2,21
S4	24,42	24,68	26,83	25,05	29,38	22,25	24,30	1,77
S5	21,36	18,14	17,98	0,45	5,93	23,77	26,10	2,06
S6	23,48	25,60	21,29	1,03	0,33	25,64	24,90	0,25
S7	23,14	20,50	21,63	1,66	14,49	24,36	27,30	3,17
S8	23,97	24,12	19,07	0,96	0,20	24,87	26,90	1,12
S9	23,25	23,67	20,07	0,97	2,12	24,89	23,30	0,13
S10	21,65	24,30	19,13	0,82	0,18	21,51	24,70	1,97
S11	22,58	28,48	21,22	1,84	1,27	23,65	26,40	2,70
S12	21,49	24,59	19,39	1,10	0,18	21,65	25,50	5,79
S13	22,87	22,32	20,22	0,75	1,54	20,36	24,60	7,80
S14	22,77	27,32	21,19	1,84	0,09	20,40	25,90	18,30
S15	23,61	23,15	18,32	0,12	0,23	18,56	23,30	10,96
S16	24,50	29,58	21,12	0,45	2,19	19,49	23,70	1,28
S17	24,98	22,70	21,99	0,59	2,31	26,54	25,40	0,19
S18	25,64	25,45	23,06	1,13	1,22	23,85	27,10	4,07
S19	26,33	26,12	23,86	1,84	1,16	26,35	20,20	0,02

Tablo 7. (Devamı)

S20	21,43	21,27	22,54	10,18	1,96	22,54	21,70	0,23
S21	23,95	23,88	23,47	3,38	4,98	23,33	20,20	0,05
S22	23,66	28,56	24,64	9,30	0,44	18,58	22,20	5,01
S23	22,09	22,42	19,84	0,99	1,11	23,54	26,50	3,13
S24	23,51	25,63	27,75	1,89	1,17	24,89	24,90	0,42
S25	24,33	29,14	17,44	1,14	0,15	22,48	26,10	1,89
S26	23,00	23,21	22,09	2,51	3,05	22,99	22,50	0,29
S27	25,98	24,12	28,12	1,10	1,65	25,78	28,8	3,37
S28	23,41	21,64	18,99	0,22	1,05	26,74	23,20	0,03
S29	25,13	30,96	23,65	1,13	1,26	24,55	25,70	0,89
S30	23,51	21,83	19,85	0,37	1,68	22,41	23,60	0,98

Tablo 8. Realtime PCR analizleriyle tümör dokulardan elde edilen Ct ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Örnek no	EZH2 Ct	LOXL4 Ct	GAPDH Ct	EZH2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	LOXL4 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	miR-29b Ct	U6 Ct	miR-29b $2^{-\Delta\Delta Ct}$
T1	26,11	25,39	15,85	0,004	3,65	14,66	24,60	0,35
T2	20,36	17,31	16,46	0,316	3,67	13,58	27,90	0,73
T3	25,96	23,75	18,13	0,021	2,69	19,89	25,00	0,13
T4	23,55	22,75	19,66	0,318	4,51	18,56	25,40	0,40
T5	27,41	26,25	25,44	1,203	3,78	16,57	25,60	0,18
T6	28,65	24,58	23,51	0,134	3,15	17,44	19,60	1,81
T7	20,54	23,66	22,15	0,746	2,32	16,99	20,4	0,36
T8	21,55	20,15	25,85	0,466	2,12	19,54	22,2	2,59
T9	20,85	21,48	24,9	0,395	1,43	18,66	18,70	0,41
T10	20,65	24,67	23,4	1,154	2,75	30,31	17,60	0,06
T11	20,14	22,15	22,18	19,387	6,76	18,58	21,50	3,24
T12	20,56	19,35	20,49	4,491	14,59	17,45	23,50	0,25
T13	20,36	19,17	26,51	2,690	1,62	16,99	17,50	0,61
T14	20,11	22,58	21,56	2,396	3,26	18,22	19,80	1,27
T15	23,41	21,54	25,64	1,178	7,89	19,85	17,90	0,11
T16	25,88	20,31	25,03	2,615	1,07	23,66	20,50	0,05
T17	25,74	23,66	24,16	1,577	1,58	21,55	16,60	0,01
T18	23,54	18,75	21,18	0,918	1,22	17,69	21,40	5,48

Tablo 8. (Devamı)

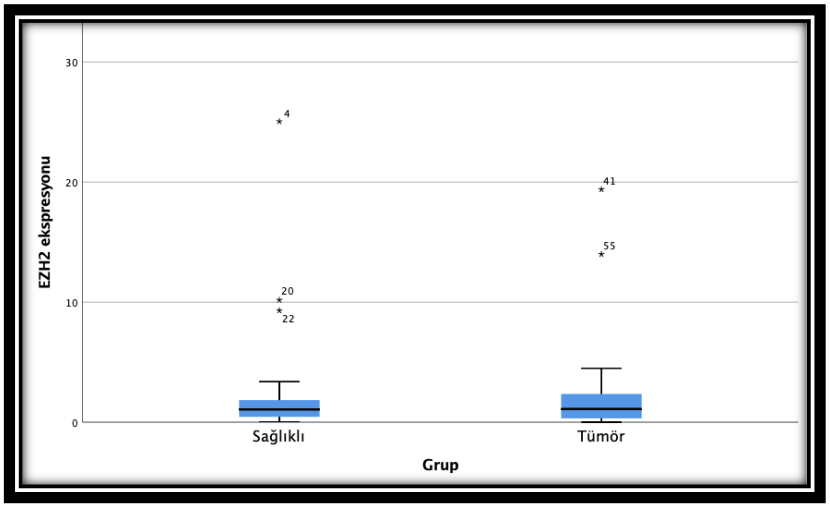
T19	26,37	19,65	17,72	0,012	5,48	18,49	19,40	0,80
T20	23,99	20,68	20,41	0,394	5,49	15,36	19,50	7,54
T21	19,48	21,45	26,51	0,652	1,36	19,22	18,60	0,27
T22	22,55	23,66	24,85	1,154	1,98	15,26	20,50	0,14
T23	22,14	22,41	25,92	1,320	1,46	21,30	20,80	0,28
T24	23,41	27,56	28,67	0,155	2,51	15,66	17,40	1,35
T25	24,00	23,35	25,57	13,997	6,54	14,46	22,70	0,11
T26	22,51	25,4	21,52	2,373	8,63	16,77	19,90	3,57
T27	29,88	18,55	19,85	0,036	1,20	20,21	17,70	0,07
T28	26,74	24,13	24,57	1,048	4,85	22,10	20,60	0,14
T29	24,59	23,74	23,49	2,199	9,87	19,87	19,90	0,42
T30	23,15	21,95	22,15	2,357	7,61	18,54	17,50	0,20

İlgili RNA'ların çalışılan dokulardaki ekspresyon düzeyleri, referans gen kullanılarak normalize edildi ve bu doğrultuda ΔCt değerleri hesaplandı. Sonrasında sağlıklı doku ve tümör dokusundan elde edilen ΔCt değerleri arasındaki fark hesaplanarak ΔΔCt değerleri elde edildi . Bu farkın logaritması alınarak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) tümör dokusu ve komşu sağlıklı meme dokusunda ilgili genin ekspresyon düzeyleri arasındaki kat değişimi (fold change) hesaplandı (Livak Yöntemi).

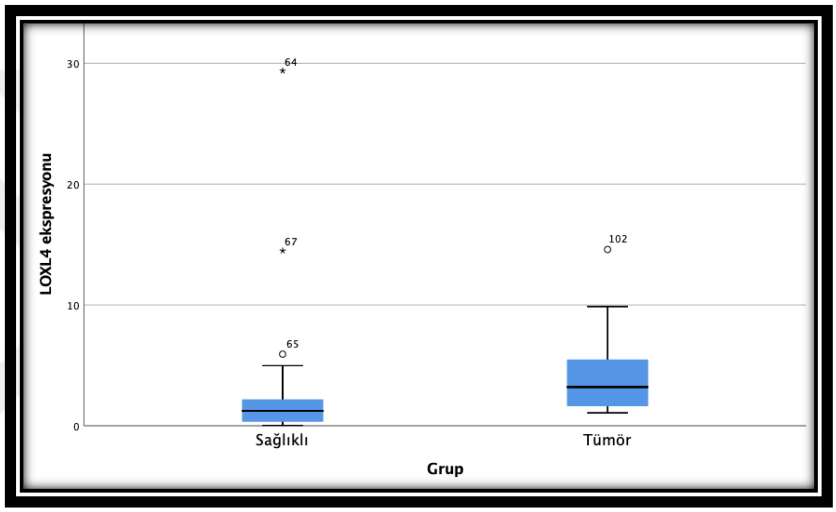
4.2. Sağlıklı ve Tümör Doku Gruplarında *EZH2/LOXL4/miR-29b-5p* Ekspresyonları

EZH2 ve *LOXL4* genlerinin ekspresyon analizinde referans gen olarak *GAPDH*, *miR-29b-5p* için ise *U6* geni kullanılmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, *EZH2* geninin ekspresyonunun sağlıklı ve tümör dokularında benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık *LOXL4* gen ekspresyonu tümör dokularında sağlıklı dokulara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,014). *miR-29b-5p* ekspresyonu değerlendirildiğinde ise tümör dokularında bu miRNA'nın daha düşük düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir ve bu ekspresyon azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,048) (Şekil 8).

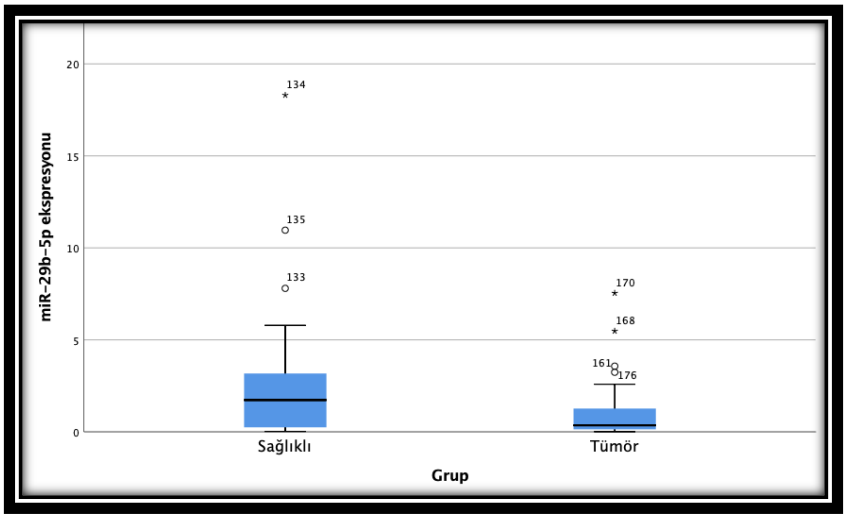
A



B



C

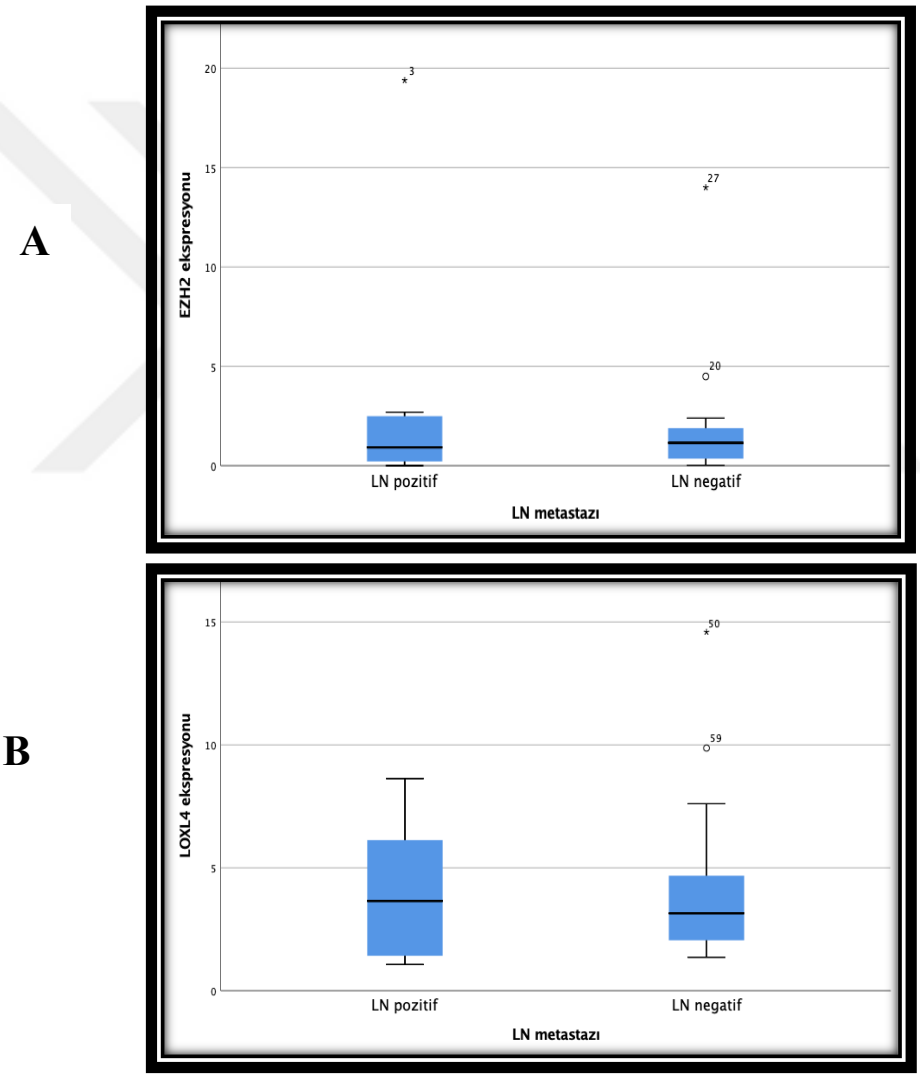


Şekil 8. Sağlıklı ve kontrol gruplarında *EZH2*, *LOXL4* ve *miR-29b-5p* gen ekspresyonlarının karşılaştırması

4.2.1. Tümör Grubunun Klinik Parametrelerine Göre *EZH2/LOXL4/miR-29b-5p* Gen İfadelerinin Karşılaştırılması

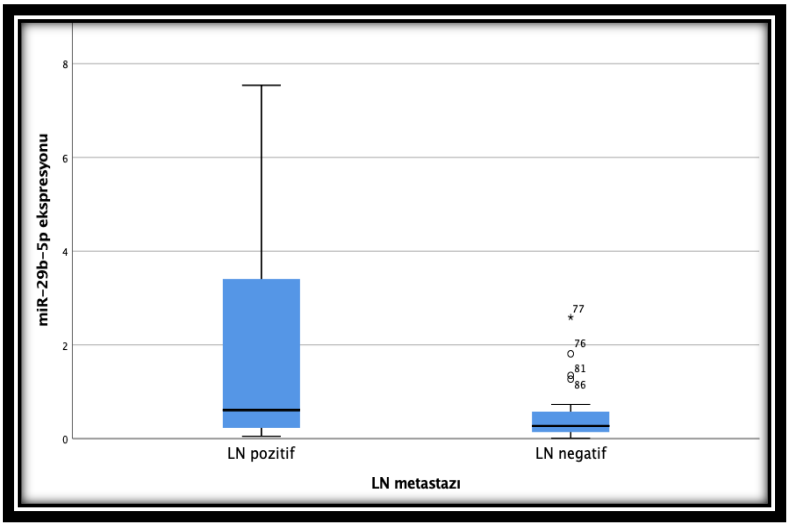
4.2.1.1. Lenf Nodu Metastaz Durumu

Çalışmamızdaki LN+ ve LN- hastalarda *EZH2/LOXL4/miR-29b-5p* gen ifadeleri değerlendirildiğinde bu 3 genin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (3 gen için p>0,05) (Şekil 9).



Şekil 9. LN metastazı olan ve olmayan hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

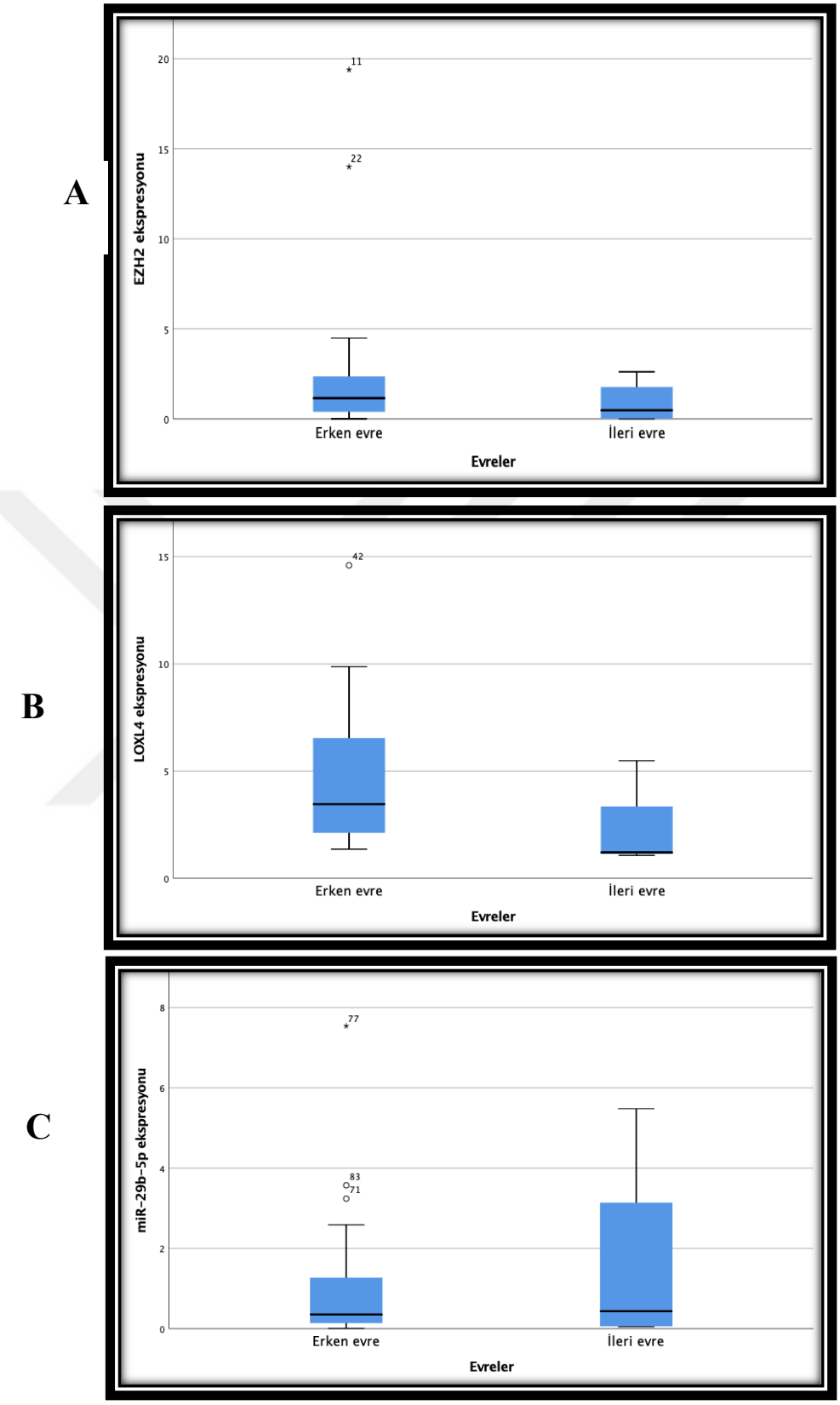
C



Şekil 9. LN metastazı olan ve olmayan hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması (devamı)

4.2.1.2. Erken Evre/İleri Evre

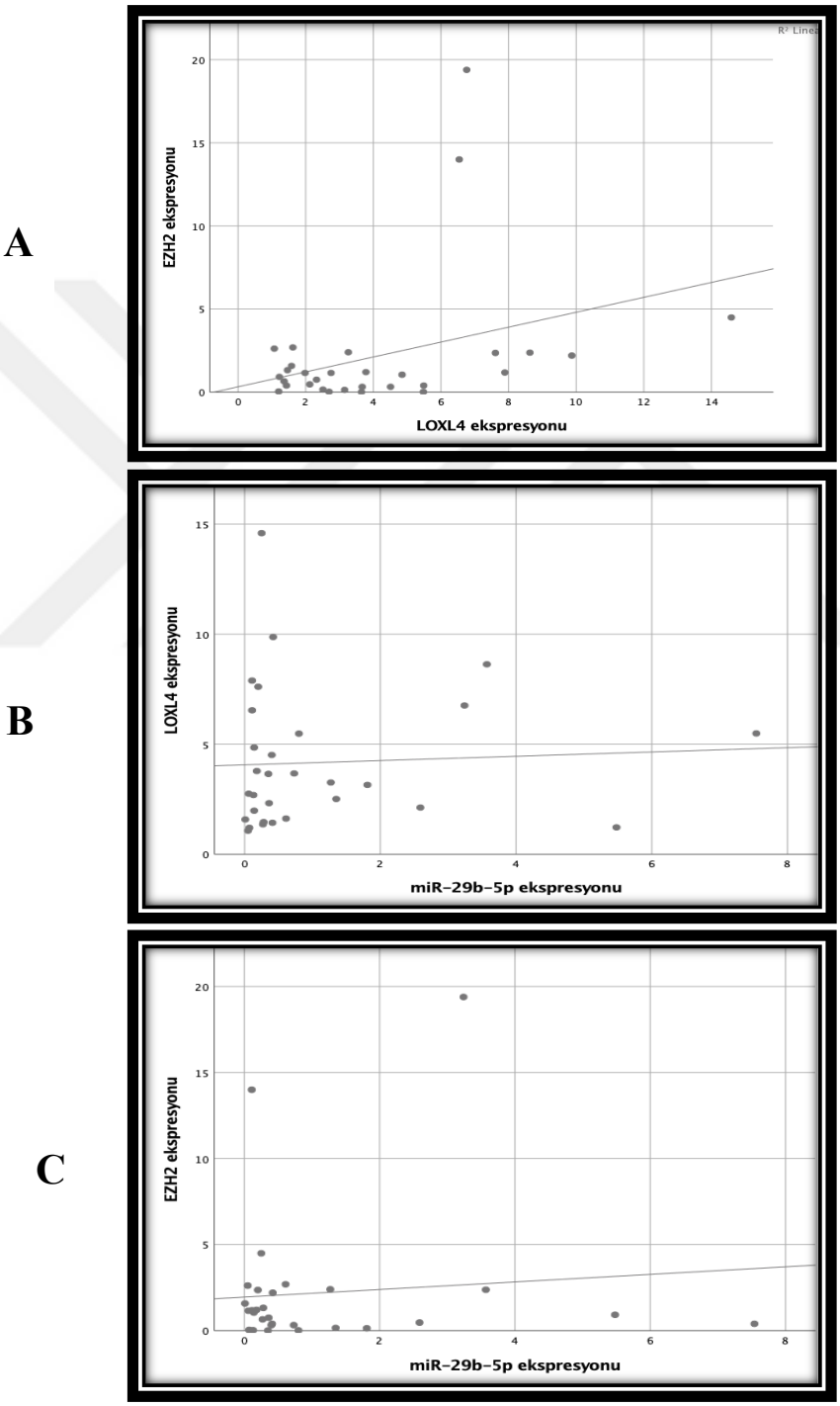
Erken evre (Evre 0,1,2) ve ileri evre (Evre 3-4) meme kanserli kadınlarda *EZH2* ve *miR-29b-5p* RNA ifadeleri değerlendirildiğinde istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Buna karşılık *LOXL4* ekspresyonu ileri evre TNBC hastalarında anlamlı düzeyde düşük bulundu (p= 0.038) (Şekil 10).



Şekil 10. Erken evre ve ileri evre hastalarda *EZH2* (A), *LOXL4* (B) ve *miR-29b-5p* (C) gen ifadelerinin karşılaştırılması

4.2.2. Korelasyon Analizi

Tümör grubunda *EZH2* ve *LOXL4* arasında, *EZH2* ve *miR-29b-5p* arasında, *LOXL4* ve *miR-29b-5p* arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 11).



Şekil 11. Tümör grubunda *EZH2* ve *LOXL4*(A), *EZH2* ve miR-29b-5p (B), *miR-29b-5p* ve *LOXL4* (C) arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kansere bağlı mortalite oranlarında üst sıralarda yer almakta ve yüksek ölüm oranları ile artan tedavi maliyetleri nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunu oluşturmaktadır. Türkiye'de kadınlarda tanı konulan kanser vakalarının yaklaşık %25'ini oluşturduğu bildirilen meme kanseri, hem yüksek insidansı hem de büyük ölçüde önlenebilir yapısı nedeniyle dikkat çekmektedir. Gelişen moleküler biyoloji ve genetik teknolojiler sayesinde meme kanserinin altında yatan genetik ve epigenetik mekanizmaların aydınlatılması, hastalığın erken tanısı, tarama stratejileri ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, epigenetik düzenlemeler ile kodlayıcı olmayan RNA ailesinin biyolojik süreçlerdeki düzenleyici rollerine odaklanmaktadır. Özellikle lncRNA ve mikroRNA'lara ait regülasyon bozukluklarının pek çok hastalığın patogenezinde etkili olduğu gösterilmiştir [7,8]. Bu moleküllerin kanserin oluşumu ve ilerlemesindeki rollerinin aydınlatılması, non-invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesinden, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin oluşturulmasına kadar geniş bir klinik uygulama alanı sunmaktadır.

Tez çalışmamızda, daha önce meme kanseri hücre hatları ve ksenograft modellerinde ilişkileri ortaya konmuş olan EZH2/miR-29b/LOXL4 genlerinin, triple negatif meme kanserli (TNBC) hastalardan elde edilen tümör dokularında moleküler düzeyde değerlendirdik ve bu moleküler bulguların klinikopatolojik verilerle ilişkilendirdik. Bildiğimiz kadarıyla literatürde hasta dokuları üzerinde yapılmış böyle bir çalışma yoktur.

EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), gen ekspresyonunun epigenetik düzeyde düzenlenmesinde kilit rol oynayan bir histon metiltransferaz olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalar, EZH2'nin birçok non-histon proteini metilleyerek hücre sinyal iletimi, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücresel farklılaşma süreçlerinde doğrudan görev aldığını ortaya koymuştur. Ayrıca, bazı tümör tiplerinde EZH2'nin, PRC2 kompleksinden bağımsız şekilde transkripsiyon faktörleriyle fiziksel

etkileşime girerek gen ekspresyonunu aktive edebildiği literatürde belirtilmektedir. Bu çok yönlü işlevler, EZH2'nin özellikle kanser biyolojisinde epigenetik ve posttranslasyonel düzeyde geniş etkilere sahip potansiyel bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir [141].

EZH2'nin farklı işlevleri, onu birçok solid tümör ve hematolojik kanserde önemli bir rol oynayan epigenetik bir düzenleyici haline getirmiştir. EZH2 ekspresyonunun; meme, prostat, akciğer, karaciğer, over ve melanom gibi solid tümörlerde, ayrıca diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL) ve akut miyeloid lösemi (AML) gibi hematolojik kanserlerde arttığı ve bu artışın kötü klinik seyirle ilişkili olduğu gösterilmiştir [142]. Meme kanserinde EZH2, özellikle agresif alt tiplerde tümör progresyonu ve tedavi direncinde etkili bir düzenleyici olarak öne çıkmaktadır.

Çalışmamızda *EZH2* geninin ekspresyon düzeyleri, tümör ve sağlıklı doku örneklerinde karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *EZH2*'nin meme kanseri hastalarında yüksek düzeyde eksprese edildiği ve bu durumun hastalık progresyonuyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *EZH2*'nin yüksek düzeyde eksprese edilmesinin; histolojik grade artışı, ER ve PR negatifliği ve artmış p53 ekspresyonu ile anlamlı bir ilişki gösterdiği bulunmuştur. *EZH2*'nin ER ve PR negatifliği ile korelasyon göstermesi de, bu genin TNBC'ye özgü tümör davranışında önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir [143]. Bunu yanısıra *EZH2* geninin genellikle artmış ekspresyonunun; tümör progresyonu, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Kleer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada normal meme dokusu, hiperproliferatif lezyonlar, karsinoma in situ, invaziv karsinom ve metastatik karsinomlu hastaların dokularında *EZH2* ekspresyonu değerlendirilmiş; *EZH2* ekspresyonunun normal meme epitelinde düşük olduğu, ancak preinvaziv lezyonlardan başlayarak invaziv karsinomlara kadar giderek arttığı raporlanmıştır. Ayrıca lezyonun agresifliği ve EZH2 düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir [144]. Öte yandan, Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, EZH2 ekspresyonunun tümörlerde evreye bağlı olarak değişebileceği ve bazı erken evre vakalarda düşük düzeyde olabileceği ifade edilmiştir [145].

Bizim çalışmamızda da gözlenen normale yakın ekspresyon, örnek sayısının sınırlı olması, tümör dokularının evreleri veya moleküler alt tip özellikleri gibi faktörlerle açıklanabilir. Hastalarımızın büyük çoğunluğunu (%86) evre 1 ve 2'deki olguların oluşturması, *EZH2* ekspresyon düzeylerinin anlamlı ölçüde yüksek olmamasını açıklayan önemli bir faktör olabilir. Bu bulgu, *EZH2*'nin TNBC biyolojisinde bağlama bağlı olarak farklı roller üstlenebileceğini ve bu genin biyobelirteç ya da tedavi hedefi olarak değerlendirilmesinde klinik özelliklerin dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Julie C. Nienstedt ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 667 baş-boyun skuamöz hücreli karsinom örneğinin immünohistokimyasal analizi sonucunda, *EZH2'nin* aşırı ekspresyonunun, anlamlı düzeyde lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [146]. Hongxiang Yu ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise 20 primer meme tümörü ve 9 lenf nodu metastazı örneğinden izole edilen tümör hücrelerinde gen ekspresyonu analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, *EZH2'nin* lenf nodu metastazlarında primer tümörlere kıyasla anlamlı düzeyde fazla eksprese olduğu gösterilmiştir [147].

Yapılan meta-analiz değerlendirmelerine göre TNBC hastalarında, *EZH2* ekspresyonu ile lenf nodu durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda da TNBC hastalarında lenf nodu pozitif ve negatif gruplar karşılaştırıldığında *EZH2* ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamış olup, bu bulgu literatürde *EZH2* ile lenf nodu metastazı arasında tutarlı bir ilişki bulunmadığını bildiren çalışmalarla uyumludur.

EZH2 ekspresyonu erken evre (Evre 0,1,2) ve ileri evre (Evre 3,4) hastalarda karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi. Varambally ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışma, prostat kanserinde *EZH2'nin* yüksek ekspresyonunun, metastatik potansiyelin artışıyla ilişkilendirildiği, özellikle epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinin indüklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir [148]. Epitelyal over kanserlerinde ise *EZH2*'nin *TIMP2*(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2) gibi metastazı baskılayan tümör supresör genleri epigenetik olarak susturarak matriks metalloproteinazların (MMP) aktivitesini artırdığı ve böylece tümör invazyonunu ve

metastazını kolaylaştırdığı gösterilmiştir [149]. Ren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, *EZH2*'nin *RKIP* (Raf Kinase Inhibitor Protein) geninin promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonunu baskıladığı ve bu mekanizma üzerinden meme ve prostat kanserlerinde metastazı kolaylaştırdığı gösterilmiştir [150]. Moore ve arkadaşlarının yaptığı kapsamlı bir çalışmada, TNBC hücre hatlarında *EZH2*'nin baskılanmasının, p38 MAPK yolunun aktivitesini düşürerek hücre hareketliliğini ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada fare modellerinde, EZH2 baskılanmış hücrelerle oluşturulan tümörlerin akciğere metastaz oluşturma kapasitesi anlamlı şekilde azalmış olduğu ve 16 hastadan elde edilen primer ve metastatik meme kanseri dokularında yapılan incelemelerde, tüm metastazlarda *EZH2*'nin artmış olduğu saptanmıştır [151]. Bu bulgular, *EZH2*'nin meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde metastazı destekleyen önemli bir moleküler belirteç olduğunu göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda, özellikle metastatik evredeki hasta sayısının oldukça sınırlı olması nedeniyle, *EZH2* ekspresyon düzeyi ile metastaz arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ortaya koymak mümkün olmamıştır.

miR-29b, meme kanseri biyolojisinde çift yönlü etkiler sergileyen önemli bir mikroRNA'dır. Özellikle miR-29b-3p ve miR-29b-5p izoformlarının, farklı moleküler alt tiplerde birbirinden farklı işlevler üstlendiği gösterilmiştir. miR-29b-5p'nin, triple negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinde proliferasyonu, hücre göçünü ve kök hücre benzeri özellikleri baskıladığı belirlenmiş; bu da onu TNBC'ye yönelik terapötik yaklaşımlar açısından umut verici bir hedef haline getirmiştir. Öte yandan, bazı bulgular miR-29b-3p'nin metastatik potansiyeli artırabileceğini ve onkojenik etkilere sahip olabileceğini öne sürmektedir. Bu veriler, miR-29b'nin meme kanserindeki etkilerinin tümör alt tipi, hücre hattı ve ekspresyon düzeyine bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır [121].

EZH2/miR-29b/*LOXL4* genleri arasındaki düzenleyici ilişkide yer alan miR-29b-5p'nin, kanser tanısı, prognozu ve tedavisinde umut vadeden ve etkili bir biyobelirteç olarak öne çıkması nedeniyle, bu molekül çalışmamızda değerlendirilen önemli parametrelerden biri olarak ele alınmıştır. Çalışmamızda, miR-29b-5p ifadesi sağlıklı doku grubuna kıyasla tümör doku grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ekspresyon göstermiştir($p=0,048$). Son yıllarda yapılan çalışmalar,

bizim çalışmamızla uyumlu olarak miR-29b ekspresyonunun TNBC olgularında sıklıkla baskılandığını göstermektedir [11,121].

Amirian ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışmada miR-29 ailesi (miR-29a, miR-29b, miR-29c) üyelerinin meme kanserindeki rollerine odaklanılmıştır. Buna göre miR-29b'nin, meme kanseri hücre biyolojisinde çok yönlü işlevlere sahip olduğu; tümör tipinden bağımsız olarak hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik rol oynayabileceği öne sürülmüştür [152]. Özellikle *EZH2*/*miR-29b*-5p/*LOXL4*, *GATA3*/*miR-29b* ve *TIMP3/STAT1/FOXO1* aksları aracılığıyla tümör baskılayıcı etkiler üstlendiği gösterilmiştir [11]. Bununla birlikte, bazı çalışmalar *PTEN* gibi tümör supresör genlerin baskılanması yoluyla invazyon ve metastazı artırdığı yönünde bulgular sunmaktadır. Bu çelişkili bulgular, *miR-29b-5p*'nin etkilerinin tümör alt tipi, genetik ortam ve mikroçevre koşullarına göre değiştiğini düşündürmektedir [152].

miR-29b-5p, meme kanseri patogenezinde özellikle TNBC alt tipinde tümör baskılayıcı işlevleriyle dikkat çeken bir mikroRNA'dır. Yapılan çalışmalarda *miR-29b-5p'*nin TNBC hücrelerinde ekspresyon düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir [121]. Bu düşük ekspresyon, hastaların genel sağkalımında azalma ve nüks riskinde artış ile ilişkili bulunmuştur [152]. Buna göre *miR-29b-5p'nin*, TNBC'nin agresif fenotipinin baskılanmasında potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir.

miR-29b-5p ekspresyonu lenf nodu metastazı bulunan ve bulunmayan hastalarda değerlendirildiğinde bu gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Inoue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kolorektal kanserli 245 hastada, miR-29b düzeyinin düşük olması, lenf nodu metastazı ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur ($p = 0.004$) [153]. Yang ve ark. ise, oral skuamöz hücreli karsinom hastalarında miR-29b düzeyinin artışıyla birlikte lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki saptamıştır. Sonuçlar, miR-29b'nin bu kanser türünde kolorektal kanserin tersine, progresyonu destekleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [154]. Yapılan bu çalışmalar, miR-29b'nin tümör biyolojisinde kanser türüne özgü farklı işlevler üstlenebileceğini ortaya koymaktadır. Literatürde TNBC'de *miR-29b-5p* ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasındaki ilişkiyi inceleyen bulunmamaktadır. Bu

nedenle, miR-29b'nin lenf nodu metastazındaki etkisini daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda LN durumu ile *miR-29b-5p* arasında anlamlı bir bulunmamasının sınırlı hasta sayısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Erken evre ve ileri evre(metastatik) hasta gruplarında *miR-29b-5p* düzeyi karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon farkı bulunmamıştır. Literatüre bakıldığında, Grassilli ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı çalışmada, TNBC hücrelerinde *miR-29b-5p'*nin metastazla ilişkisi araştırılmıştır. MDA-MB-231 hücreleri ve ksenograft modelleri kullanılarak yapılan deneylerde, Vav1 (Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1) proteininin *miR-29b-5p*'yi artırarak AKT2 (AKT Serine/Threonine Kinase 2) düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu durum, hücrelerin invazyon yeteneğini azaltmış ve farelerde akciğer metastazını önlemiştir. Sonuçlar, *miR-29b-5p*'nin *AKT2*'yi baskılayarak TNBC'de metastazı azaltmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir [155]. Çalışmamızdaki ileri evre grubunu oluşturan hasta sayısının azlığı ve bu hastaların neoadjuvan kemoterapi almış olmaları, *miR-29b-5p* düzeyleri ile evre arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasında etkili olmuş olabilir.

EZH2/miR-29b-5p/LOXL4 genleri arasındaki düzenleyici yolaktaki son gen olan *LOXL4*'ün gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, tümör doku grubunda sağlıklı doku grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış ekspresyon gösterdiği saptanmıştır(p=0,014). *LOXL4*, genel karsinogenez sürecinde tümör progresyonu, metastaz ve prognoz üzerinde çift yönlü etkilere sahip karmaşık bir regülatör olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda *LOXL4* ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde farklılık gösterdiği bildirilmektedir. Bu çerçevede; mide, over, özofagus, baş-boyun, kolorektal kanser ve TNBC gibi birçok solid tümörde artmış düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir [156–158]. Buna karşın, mesane, akciğer kanseri ve bazı hepatoselüler karsinom örneklerinde *LOXL4* ekspresyonunun azaldığı, hatta epigenetik mekanizmalarla baskılandığı raporlanmıştır [19,159]. Bu bulgular, *LOXL4'*ün kanser türüne özgü olarak farklı şekillerde düzenlendiğini ve işlevinin tümörün moleküler özelliklerine göre değişebileceğini düşündürmektedir.

LOXL4 (Lysyl Oxidase-Like 4), kollajen ve elastin liflerinin çapraz bağlanmasında görev alan LOX protein ailesinin bir üyesidir ve doku yapısının stabilitesini sağlamada önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar LOXL4'ün yalnızca yapısal işlevlerle sınırlı kalmayıp, birçok kanser türünde tümör biyolojisini doğrudan etkileyen bir faktör olarak işlev gördüğünü ortaya koymuştur. LOXL4 ekspresyonunun başta meme, karaciğer ve baş-boyun kanserleri olmak üzere çeşitli malignitelerde arttığı; bu artışın hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez süreçlerini desteklediği bildirilmiştir. Ayrıca, LOXL4'ün tümör mikroçevresini yeniden şekillendirme kapasitesi sayesinde bağışıklık sisteminin baskılanmasına katkıda bulunduğu ve bu yolla immün yanıttan kaçışa zemin hazırlayabildiği de gösterilmiştir [160]. Tüm bu etkileri göz önünde bulundurulduğunda, LOXL4 sadece bir matriks düzenleyici değil, aynı zamanda tümör progresyonuna çok yönlü katkı sağlayan önemli bir molekül olarak değerlendirilmektedir.

TNBC'de, *LOXL4'ün* ekspresyon düzeyinin arttığı çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Komalasari ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, *LOXL4* geninin TNBC hücre hatlarında yüksek düzeyde eksprese edildiği ve bu artışın hücre proliferasyonu ile invazyon kapasitesini belirgin biçimde artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, *LOXL4* geninin delesyonu ya da bu gendeki fonksiyon kaybettirici mutasyonların sonucunda, tümör hücrelerinde proliferasyon ve invazyon yeteneğinin önemli derecede azaldığı raporlanmıştır [161]. Bu sonuçlar, *LOXL4*'ün TNBC patogenezinde, tümör progresyonunu destekleyen işlevsel bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Lenf nodu durumuna göre *LOXL4* ekspresyonu düzeyi incelendiğinde LN pozitif ve negatif olan hasta grupları arasında anlamlı düzeyde bir farklılık görülmemiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, mide kanseri hastalarında *LOXL4* ekspresyonunun anlamlı şekilde artmış olduğu ve bu artışın lenf nodu metastazı ve ileri TNM evresi ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır [162]. TNBC'nin erken evrelerinde *LOXL4* geni daha yüksek ekspresyon gösterirken, hastalık ilerledikçe ekspresyonunun belirgin şekilde baskılandığı ve bu baskılanmanın lenf nodu tutulumu ve yüksek tümör hacmi gibi ileri evre özelliklerle paralellik gösterdiği bildirilmiştir [163]. Çalışmamızda LOXL4 düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmamış olması,

hastalarımızın büyük bir kısmında lenf nodu metastazının bulunmamasıyla açıklanabilir.

Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *LOXL4* geninin baskılanmasının TNBC hücrelerinde tümör büyümesini ve akciğer metastazını artırdığı gösterilmiştir. Bu durum, kollajen I ve IV birikimiyle ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, düşük *LOXL4* ekspresyonunun TNBC hastalarında kötü sağkalım ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir [163]. Yapılan başka bir çalışmada, LOXL4 düzeyinin TNBC ve akciğer kanserinde azalması durumu; mide, özefagus ve karaciğer kanserinde artması durumu, metastazla ilişkilendirilmiştir [160]. Çalışmamızda hastalık evresine göre yapılan karşılaştırmada, literatürde bildirilenin aksine, ileri evre TNBC'li hastalarda *LOXL4* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir(p=0,038). Bu bulgunun, hasta sayısının sınırlı olması, ileri evre grubundaki hastaların neoadjuvan kemoterapi almış olması ve tedaviye bağlı olarak gen ekspresyon profillerinde oluşabilecek değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Son olarak hücre hatları ve hayvan modellerinde ortaya konan *EZH2*/*miR-29b-5p* /*LOXL4* genleri arasındaki korelasyonun TNBC tanılı hastalarda da gösterilmesi amacıyla bu üç genin tümör dokusundaki ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki ayrı ayrı ele alınmıştır. Ancak yapılan değerlendirme sonucunda, üç gen arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Bu durum, genler arasındaki düzenleyici ilişkinin karmaşıklığını, hücre dışı etkenlerin olası rolünü ve çalışmamızdaki sınırlı örneklem büyüklüğünü yansıtıyor olabilir.

Wang ve arkadaşlarının 2020 yılında gerçekleştirdiği çalışmalarda, EZH2'nin triple negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinde miR-29b ve miR-30d'nin promotör bölgelerine bağlanarak bu mikroRNA'ların transkripsiyonunu epigenetik mekanizmalarla baskıladığı gösterilmiştir. Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) analizleri, EZH2'nin bu bölgelerde H3K27me3 düzeyini artırarak transkripsiyonel susturmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. miR-29b ve miR-30d ise LOXL4 geninin 3'UTR bölgesine bağlanarak bu genin ekspresyonunu negatif yönde düzenlemektedir. Böylece, EZH2 artışıyla birlikte miR-29b/30d düzeylerinin

azalması, LOXL4 ekspresyonunun artmasına yol açmakta ve bu durum hücre proliferasyonu, migrasyonu ve metastatik kapasitenin artmasıyla ilişkilendirilmektedir. Çalışmada kullanılan luciferaz rapor analizleri, qRT-PCR, Western blot ve in vivo modeller ile bu aksın moleküler düzeyde doğrulandığı gösterilmiştir. Ayrıca, EZH2 inhibisyonu veya miR-29b/30d'nin overekspresyonu, LOXL4 düzeyini düşürerek tümör büyümesini ve akciğer metastazını anlamlı düzeyde engellemiştir. Bununla birlikte, LOXL4'ün tümörle ilişkili makrofaj infiltrasyonunu artırarak immün mikroçevrede immünsüpresif bir ortam oluşturduğu gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, EZH2/miR-29b/LOXL4 aksının yalnızca tümör hücre davranışlarını değil, aynı zamanda immün mikroçevre etkileşimlerini de düzenleyerek TNBC'nin agresif fenotipine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu mekanizmaların büyük ölçüde deneysel hücre hatları ve hayvan modelleri kullanılarak gösterilmiş olması, insan tümör dokularında gen ekspresyonlarının daha karmaşık düzenleyiciler tarafından kontrol edilebileceğini düşündürmektedir.[18].

EZH2/miR-29b-5p/LOXL4 eksenine ilişkin mevcut çalışmaların büyük çoğunluğu in vitro hücre kültürü sistemleri ve in vivo hayvan modelleri ile sınırlı kalmış; buna karşın insan triple negatif meme kanseri (TNBC) dokularından elde edilen örneklerle bu moleküler yolak bileşenlerinin birlikte değerlendirildiği kapsamlı bir analiz sunulmamıştır. Bu bağlamda, çalışmamız, bildiğimiz kadarıyla *EZH2*, *miR-29b-5p* ve *LOXL4* gen ekspresyonlarının insan TNBC örneklerinde ilk kez entegre biçimde incelendiği özgün bir çalışmadır. Ayrıca, söz konusu genlerin ekspresyon düzeylerinin hastalık evresi ve lenf nodu metastazı durumu gibi klinik değişkenlerle ilişkisel düzlemde analiz edilmesi, bu yolak bileşenlerinin TNBC'nin biyolojik seyri üzerindeki etkilerini daha iyi kavramamıza olanak sağlamayı amaçlamaktadır. Elde edilen bulgular, *EZH2*/*miR-29b-5p/LOXL4* gen ilişkisinin yalnızca tümör hücre dinamiklerini değil, aynı zamanda tümör mikroçevresi ile ilişkili immünolojik süreçleri de etkileyebileceğini düşündürmekte olup, bu eksenin hedeflenmesi dirençli TNBC olgularında yenilikçi ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir terapötik potansiyel barındırmaktadır. Bu çalışma kapsamında ulaşılan sonuçlar, bu moleküler yolakların tümör biyolojisindeki rolünü daha iyi

kavrayabilmek için, daha geniş örneklem grupları ve çok yönlü yöntemlerle yürütülecek ileri düzey araştırmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

6. SONUÇLAR

EZH2/miR-29B-5p/LOXL4 aksının, TNBC tanısı alan hastalarda klinik bulgularla ilişkisinin incelendiği çalışmamızın sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir.

1. TNBC tanılı hastalarda EZH2 ekspresyonu, sağlıklı kontrol dokularıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu durum, çalışmamıza dahil edilen TNBC örneklerinde EZH2 ekspresyon düzeylerinde bireyler arası değişkenliğin yüksek olması ve örneklem büyüklüğünün sınırlı kalmasıyla ilişkili olabilir.
2. LN metastazı durumuna göre yapılan karşılaştırmada EZH2 ekspresyonunda anlamlı farklılık belirlenmedi.
3. Evre durumuna göre yapılan incelemede EZH2 ve miR-29b-5p ekspresyonu düzeylerinde anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu sonuç, ileri evre hasta sayısının düşük olması ve bazı ileri evre olguların neoadjuvan kemoterapi almış olmasının gen ekspresyonunu etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir.
4. TNBC tanılı tümör gruplarında LOXL4 düzeyi anlamlı düzeyde yüksek bulundu(p=0,014). Bu bulgu, çalışmamızdaki TNBC örneklerinde LOXL4 geninin tümör oluşumuna potansiyel katkısını desteklemekte ve LOXL4'ün TNBC'de tümörogenez ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.
5. LN pozitif ve negatif gruplar arasında LOXL4 ve miR-29b-5p ekspresyonu açısından farklılık gözlenmedi.
6. İleri evre TNBC hastalarında LOXL4 düzeyi erken evre hastalara göre daha yüksek olarak saptandı(p= 0.038). Bu bulgu, LOXL4'ün hastalık progresyonuyla ilişkili olabileceğini ve ileri evrelerde artan tümör agresifliğini yansıtıyor olabileceğini düşündürmektedir.
7. TNBC tanılı hastalarda miR-29b-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi(p=0,048). *Bu sonuç, miR-29b-5p'in TNBC'de tümör baskılayıcı bir rol oynadığını ve düşük düzeylerinin tümör gelişimiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir.*

8. Tümör grubunda *EZH2* ve *LOXL4* arasında, *EZH2* ve *miR-29b-5p* arasında, *LOXL4* ve *miR-29b-5p* arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Bu durum, bizi daha fazla sayıda örneklem içeren geniş kapsamlı klinik çalışmalara ve bu genler arasındaki etkileşimi moleküler düzeyde ortaya koyabilecek fonksiyonel çalışmalara yönlendirmektedir..

Bulgularımıza göre; TNBC'de *LOXL4*'ün ekspresyonunun artması ve ileri evre hastalarda, erken evreye göre daha fazla artış olması, *LOXL4*'ün tanısal bir biyobelirteç adayı olabileceğini düşündürmektedir. TNBC tanılı hastalarda *miR-29b-5p* ekspresyon düzeylerinde gözlenen düşüş gelecekteki çalışmalarla birlikte hem tanısal hem de prognostik biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır. Ayrıca, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında terapötik bir hedef olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışma kapsamında ulaşılan sonuçlar, bu moleküler yolakların tümör biyolojisindeki rolünü daha iyi kavrayabilmek için, daha geniş örneklem grupları ve çok yönlü yöntemlerle yürütülecek ileri düzey araştırmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Obeagu, E. I. & Obeagu, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)* **103**, e36905 (2024).
2. Understanding Breast Cancer: A Comprehensive Review of Epidemiology, Risk Factors, and Treatment Strategies. https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=138715.
3. Walker-Smith, T. L. & Peck, J. Genetic and Genomic Advances in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Nurs. Womens Health* **23**, 518–525 (2019).
4. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159 (2008).
5. Zhou, H., Hao, X., Zhang, P. & He, S. Noncoding RNA mutations in cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **14**, e1812 (2023).
6. Mi, Y. *et al.* The Association Between Three Genetic Variants in MicroRNAs (Rs11614913, Rs2910164, Rs3746444) and Prostate Cancer Risk. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **48**, 149–157 (2018).
7. Goodall, G. J. & Wickramasinghe, V. O. RNA in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 22–36 (2021).
8. Pasquinelli, A. E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–282 (2012).
9. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004 (2004).
10. Stückrath, I. *et al.* Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget* **6**, 13387–13401 (2015).
11. Kwon, J. J., Factora, T. D., Dey, S. & Kota, J. A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol. Ther. Oncolytics* **12**, 173–194 (2019).
12. Wang, C., Gao, C., Zhuang, J.-L., Ding, C. & Wang, Y. A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **138**, 2127–2136 (2012).
13. Papachristopoulou, G., Papadopoulos, E. I., Nonni, A., Rassidakis, G. Z. & Scorilas, A. Expression Analysis of miR-29b in Malignant and Benign Breast Tumors: A Promising Prognostic Biomarker for Invasive Ductal Carcinoma With a Possible Histotype-Related Expression Status. *Clin. Breast Cancer* **18**, 305-312.e3 (2018).
14. Wang, C., Bian, Z., Wei, D. & Zhang, J. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **352**, 197–207 (2011).
15. Li, X. *et al.* Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **175**, 1246–1254 (2009).

16. Li, Z. *et al.* The degradation of EZH2 mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer. *Cell Death Differ.* **24**, 59–71 (2017).
17. Crea, F. *et al.* EZH2 inhibition: targeting the crossroad of tumor invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 753–761 (2012).
18. Yin, H. *et al.* EZH2-mediated Epigenetic Silencing of miR-29/miR-30 targets LOXL4 and contributes to Tumorigenesis, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. *Theranostics* **10**, 8494–8512 (2020).
19. Wu, G. *et al.* LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res.* **67**, 4123–4129 (2007).
20. Li, R. *et al.* Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol. Cancer* **18**, 18 (2019).
21. Aranda-Gutierrez, A. & Diaz-Perez, H. M. Histology, Mammary Glands. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
22. Bazira, P. J., Ellis, H. & Mahadevan, V. Anatomy and physiology of the breast. *Surg. Oxf.* **40**, 79–83 (2022).
23. Li, X. *et al.* Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7681–7694 (2004).
24. Nilsson, S. *et al.* Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev.* **81**, 1535–1565 (2001).
25. Li, Z., Wei, H., Li, S., Wu, P. & Mao, X. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **16**, 305–314 (2022).
26. Azeez, J. M. *et al.* New insights into the functions of progesterone receptor (PR) isoforms and progesterone signaling. *Am. J. Cancer Res.* **11**, 5214–5232 (2021).
27. Grimm, S. L., Hartig, S. M. & Edwards, D. P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J. Mol. Biol.* **428**, 3831–3849 (2016).
28. Mote, P. A., Bartow, S., Tran, N. & Clarke, C. L. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **72**, 163–172 (2002).
29. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **74**, 229–263 (2024).
30. Arnold, M. *et al.* Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast Edinb. Scotl.* **66**, 15–23 (2022).
31. Kanser İstatistikleri. https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri.
32. Wellings, S. R., Jensen, H. M. & Marcum, R. G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 231–273 (1975).

33. Freeman, K. *et al.* Atypia detected during breast screening and subsequent development of cancer: observational analysis of the Sloane atypia prospective cohort in England. *BMJ* **384**, e077039 (2024).

34. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).

35. Winters, S., Martin, C., Murphy, D. & Shokar, N. K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **151**, 1–32 (2017).

36. Sun, Y.-S. *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 1387–1397 (2017).

37. Kunyahamu, M. S., Daud, A. & Jusoh, N. Obesity among Health-Care Workers: Which Occupations Are at Higher Risk of Being Obese? *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **18**, 4381 (2021).

38. Siu, A. L. & U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann. Intern. Med.* **164**, 279–296 (2016).

39. Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res. Treat.* **165**, 193–200 (2017).

40. Maio, F. *et al.* Breast Cancer Screening during COVID-19 Emergency: Patients and Department Management in a Local Experience. *J. Pers. Med.* **11**, 380 (2021).

41. Paluch-Shimon, S. *et al.* Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, v103–v110 (2016).

42. Bogdanova, N., Helbig, S. & Dörk, T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **11**, 12 (2013).

43. Page, D. L., Salhany, K. E., Jensen, R. A. & Dupont, W. D. Subsequent breast carcinoma risk after biopsy with atypia in a breast papilloma. *Cancer* **78**, 258–266 (1996).

44. Rakha, E. A., Tse, G. M. & Quinn, C. M. An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology* **82**, 5–16 (2023).

45. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. & Khan, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol. Res.* **50**, 33 (2017).

46. Hophan, S. L. *et al.* Ductal Carcinoma In Situ of Breast: From Molecular Etiology to Therapeutic Management. *Endocrinology* **163**, bqac027 (2022).

47. Barrio, A. V. & Van Zee, K. J. Controversies in the Treatment of Ductal Carcinoma in Situ. *Annu. Rev. Med.* **68**, 197–211 (2017).

48. Wen, H. Y. & Brogi, E. Lobular Carcinoma In Situ. *Surg. Pathol. Clin.* **11**, 123–145 (2018).

49. Haagensen, C. D., Lane, N., Lattes, R. & Bodian, C. Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast. *Cancer* **42**, 737–769 (1978).

50. Chuba, P. J. *et al.* Bilateral risk for subsequent breast cancer after lobular carcinoma-in-situ: analysis of surveillance, epidemiology, and end results data. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 5534–5541 (2005).

51. Universidade do Estado do Pará *et al.* Histopathological and immunohistochemical parameters of breast cancer cases analyzed in a reference laboratory. *Mastology* **30**, e20190029 (2020).

52. Li, C. I. Risk of mortality by histologic type of breast cancer in the United States. *Horm. Cancer* **1**, 156–165 (2010).

53. McCart Reed, A. E., Kutasovic, J. R., Lakhani, S. R. & Simpson, P. T. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res. BCR* **17**, 12 (2015).

54. Ferlicot, S. *et al.* Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **40**, 336–341 (2004).

55. Rakha, E. A. *et al.* Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **44**, 73–83 (2008).

56. Vos, C. B. *et al.* E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* **76**, 1131–1133 (1997).

57. Rakha, E. A. *et al.* The biological and clinical characteristics of breast carcinoma with mixed ductal and lobular morphology. *Breast Cancer Res. Treat.* **114**, 243–250 (2009).

58. Rakha, E. A. & Ellis, I. O. Lobular breast carcinoma and its variants. *Semin. Diagn. Pathol.* **27**, 49–61 (2010).

59. Rakha, E. A. *et al.* Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: is it a prognostically significant pathological subtype independent of histological grade? *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **26**, 496–501 (2013).

60. Iorfida, M. *et al.* Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 713–723 (2012).

61. Limaiem, F. & Mlika, M. Tubular Breast Carcinoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).

62. Jenkins, S., Kachur, M. E., Rechache, K., Wells, J. M. & Lipkowitz, S. Rare Breast Cancer Subtypes. *Curr. Oncol. Rep.* **23**, 54 (2021).

63. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast Edinb. Scotl.* **24 Suppl 2**, S26-35 (2015).

64. Smolarz, B., Nowak, A. Z. & Romanowicz, H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers* **14**, 2569 (2022).

65. Zhang, M. H., Man, H. T., Zhao, X. D., Dong, N. & Ma, S. L. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed. Rep.* **2**, 41–52 (2014).

66. Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O. & Ramírez-Valdespino, C. A. Subtypes of Breast Cancer. in *Breast Cancer* (ed. Mayrovitz, H. N.) (Exon Publications, Brisbane (AU), 2022).

67. Vaz-Luis, I., Winer, E. P. & Lin, N. U. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **24**, 283–291 (2013).

68. Krishnamurti, U., Hammers, J. L., Atem, F. D., Storto, P. D. & Silverman, J. F. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 1044–1048 (2009).

69. Fragomeni, S. M., Sciallis, A. & Jeruss, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **27**, 95–120 (2018).

70. Tsang, J. Y. S. & Tse, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **27**, 27–35 (2020).

71. Inic, Z. *et al.* Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin. Med. Insights Oncol.* **8**, 107–111 (2014).

72. Provenzano, E., Ulaner, G. A. & Chin, S.-F. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* **13**, 325–338 (2018).

73. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS One* **11**, e0157368 (2016).

74. Giuliano, A. E., Edge, S. B. & Hortobagyi, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 1783–1785 (2018).

75. Sawaki, M., Shien, T. & Iwata, H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn. J. Clin. Oncol.* **49**, 228–231 (2019).

76. Houssami, N., Turner, R. M. & Morrow, M. Meta-analysis of pre-operative magnetic resonance imaging (MRI) and surgical treatment for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **165**, 273–283 (2017).

77. Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C. & Morrow, M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* **13**, 339–354 (2018).

78. Liu, Y. *et al.* Advances in immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer* **22**, 145 (2023).

79. Baudino, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **12**, 3–20 (2015).

80. El-Tanani, M. *et al.* Cellular and molecular basis of therapeutic approaches to breast cancer. *Cell. Signal.* **101**, 110492 (2023).

81. Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5**, 77–106 (2018).

82. Sever, R. & Brugge, J. S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a006098 (2015).

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

84. Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**, 227–251 (2000).

85. Fan, S. *et al.* Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* **20**, 77–87 (2001).

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

87. Zwijsen, R. M. *et al.* CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**, 405–415 (1997).

88. Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0010 (2005).

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

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

91. Mayer, I. A. & Arteaga, C. L. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu. Rev. Med.* **67**, 11–28 (2016).

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

93. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).

94. Schwartz, R. S. & Erban, J. K. Timing of Metastasis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2486–2488 (2017).

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

96. Yang, K. *et al.* The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **96**, 116–136 (2016).

97. Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* Downregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 might correlate with poor disease-free and overall survival in inflammatory breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **7**, 326–330 (2006).

98. Finn, R. S. *et al.* PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res. BCR* **11**, R77 (2009).

99. García-Zaragoza, E. *et al.* Intraepithelial paracrine Hedgehog signaling induces the expansion of ciliated cells that express diverse progenitor cell markers in the basal epithelium of the mouse mammary gland. *Dev. Biol.* **372**, 28–44 (2012).

100. Paplomata, E. & O'Regan, R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **6**, 154–166 (2014).

101. Joshi, H. & Press, M. F. 22 - Molecular Oncology of Breast Cancer. in *The Breast (Fifth Edition)* (eds. Bland, K. I., Copeland, E. M., Klimberg, V. S. & Gradishar, W. J.) 282-307.e5 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2.

102. Nielsen, F. C., van Overeem Hansen, T. & Sørensen, C. S. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 599–612 (2016).

103. Tung, N. *et al.* Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, 1460–1468 (2016).

104. Couch, F. J., Nathanson, K. L. & Offit, K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science* **343**, 1466–1470 (2014).

105. Yehia, L. & Eng, C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993).

106. Garber, J. E. *et al.* Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* **51**, 6094–6097 (1991).

107. de Jong, M. M. *et al.* Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* **39**, 225–242 (2002).

108. Giardiello, F. M. *et al.* Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1511–1514 (1987).

109. Zyla, R. E., Hahn, E. & Hodgson, A. Gene of the month: STK11. *J. Clin. Pathol.* **74**, 681–685 (2021).

110. Corso, G., Intra, M., Trentin, C., Veronesi, P. & Galimberti, V. CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. *Fam. Cancer* **15**, 215–219 (2016).

111. Hansford, S. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol.* **1**, 23–32 (2015).

112. Apostolou, P. & Papasotiriou, I. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer Dove Med. Press* **9**, 331–335 (2017).

113. Sarvari, P., Sarvari, P., Ramírez-Díaz, I., Mahjoubi, F. & Rubio, K. Advances of Epigenetic Biomarkers and Epigenome Editing for Early Diagnosis in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 9521 (2022).

114. Rodríguez-Paredes, M. & Esteller, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* **17**, 330–339 (2011).

115. Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O. M. & Chan, W.-Y. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **87**, 335–350 (2009).

116. Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y. & Noguchi, S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Res. Treat.* **129**, 69–77 (2011).

117. Brennan, K. *et al.* Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* **72**, 2304–2313 (2012).

118. Stillman, B. Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression. *Cell* **175**, 6–9 (2018).

119. Iyer, M. K. *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet.* **47**, 199–208 (2015).

120. Lo, P.-K. *et al.* Noncoding RNAs in breast cancer. *Brief. Funct. Genomics* **15**, 200–221 (2016).

121. Grassilli, S., Bertagnolo, V. & Brugnoli, F. Mir-29b in Breast Cancer: A Promising Target for Therapeutic Approaches. *Diagn. Basel Switz.* **12**, 2139 (2022).

122. Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. & Croce, C. M. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 1–9 (2015).

123. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).

124. Loh, H.-Y. *et al.* The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4940 (2019).

125. Piasecka, D., Braun, M., Kordek, R., Sadej, R. & Romanska, H. MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **144**, 1401–1411 (2018).

126. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343–349 (2011).

127. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395 (2011).

128. Cao, R. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039–1043 (2002).

129. Molnar, J. *et al.* Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1647**, 220–224 (2003).

130. Kim, Y.-M., Kim, E.-C. & Kim, Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 145–149 (2011).

131. Wang, W., Wang, X., Yao, F. & Huang, C. Lysyl Oxidase Family Proteins: Prospective Therapeutic Targets in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12270 (2022).

132. Yan, B. *et al.* The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *OncoTargets Ther.* **8**, 539–548 (2015).

133. Park, S.-Y., Lee, J. H., Ha, M., Nam, J.-W. & Kim, V. N. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 23–29 (2009).

134. Chou, J. *et al.* GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat. Cell Biol.* **15**, 201–213 (2013).

135. Chen, C.-Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1768–1771 (2005).

136. Drago-Ferrante, R. *et al.* Suppressive role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation. *Oncotarget* **8**, 28939–28958 (2017).

137. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).

138. Tse, J. C. & Kalluri, R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* **101**, 816–829 (2007).

139. Mathe, A., Scott, R. J. & Avery-Kiejda, K. A. MiRNAs and Other Epigenetic Changes as Biomarkers in Triple Negative Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 28347–28376 (2015).

140. Xu, J., Wu, K.-J., Jia, Q.-J. & Ding, X.-F. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **21**, 673–689 (2020).

141. Wang, J. & Wang, G. G. No Easy Way Out for EZH2: Its Pleiotropic, Noncanonical Effects on Gene Regulation and Cellular Function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9501 (2020).

142. Liu, Y. & Yang, Q. The roles of EZH2 in cancer and its inhibitors. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **40**, 167 (2023).

143. Jiang, T. *et al.* Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 4584–4597 (2016).

144. Kleer, C. G. *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11606–11611 (2003).

145. Lu, C. *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* **18**, 185–197 (2010).

146. Nienstedt, J. C. *et al.* EZH2 overexpression in head and neck cancer is related to lymph node metastasis. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **47**, 240–245 (2018).

147. Yu, H. *et al.* PRC2/EED-EZH2 complex is up-regulated in breast cancer lymph node metastasis compared to primary tumor and correlates with tumor proliferation in situ. *PloS One* **7**, e51239 (2012).

148. Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624–629 (2002).

149. Yi, X. *et al.* EZH2-mediated epigenetic silencing of TIMP2 promotes ovarian cancer migration and invasion. *Sci. Rep.* **7**, 3568 (2017).

150. Ren, G. *et al.* Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 3091–3104 (2012).

151. Moore, H. M. *et al.* EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **138**, 741–752 (2013).

152. Amirian, M., Jafari-Nozad, A. M., Darroudi, M., Farkhondeh, T. & Samarghandian, S. Overview of the miR-29 family members' function in breast cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* **230**, 123280 (2023).

153. Inoue, A. *et al.* MicroRNA-29b is a Novel Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **22 Suppl 3**, S1410-1418 (2015).

154. Yang, C.-N. *et al.* MicroRNA-29b regulates migration in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Oral Oncol.* **51**, 170–177 (2015).

155. Grassilli, S. *et al.* Vav1 Selectively Down-Regulates Akt2 through miR-29b in Certain Breast Tumors with Triple Negative Phenotype. *J. Pers. Med.* **12**, 993 (2022).

156. Hirabayashi, D. *et al.* LOXL1 and LOXL4 are novel target genes of the Zn2+-bound form of ZEB1 and play a crucial role in the acceleration of invasive events in triple-negative breast cancer cells. *Front. Oncol.* **13**, 1142886 (2023).

157. Liu, R. *et al.* The dual role of LOXL4 in the pathogenesis and development of human malignant tumors: a narrative review. *Transl. Cancer Res.* **13**, 2026–2042 (2024).

158. Li, R. *et al.* Lysyl oxidase-like 4 (LOXL4) promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via FAK/Src pathway. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 269–281 (2015).

159. Tian, M. *et al.* LOXL4 is downregulated in hepatocellular carcinoma with a favorable prognosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 3892–3900 (2015).

160. Wang, J. *et al.* The possibilities of LOXL4 as a prognostic marker for carcinomas. *Amino Acids* **55**, 1519–1529 (2023).

161. Komalasari, N. L. G. Y. *et al.* Lysyl oxidase-like 4 exerts an atypical role in breast cancer progression that is dependent on the enzymatic activity that targets the cell-surface annexin A2. *Front. Oncol.* **13**, 1142907 (2023).

162. Li, R. *et al.* Lysyl oxidase-like 4 (LOXL4) promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via FAK/Src pathway. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 269–281 (2015).

163. Choi, S. K., Kim, H. S., Jin, T. & Moon, W. K. LOXL4 knockdown enhances tumor growth and lung metastasis through collagen-dependent extracellular matrix changes in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **8**, 11977–11989 (2017).