

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ**

Dr. SAİT MURAT DOĞAN

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ
İZMİR 2014

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2010970036

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ**

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Dr. SAİT MURAT DOĞAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. SAFİYE AKTAŞ

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2010970036

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Sait Murat DOĞAN 'MEME
KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ'
konulu Doktora tezini 28.08.2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
BAŞKAN


Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN
ÜYE


Prof. Dr. Nur ÖLGÜN
ÜYE


Prof. Dr. Özgül SAĞOL
ÜYE


Doç. Dr. Aydan Çelebiler
ÜYE

Doç. Dr. Zekiye ALTUN
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Ragıp ORTAÇ
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	i
Tablo Dizini.....	iii
Şekil Dizini.....	iv
Kısaltma Dizini.....	v
Teşekkür.....	vi
Özet.....	1
İngilizce Özet.....	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	5
1.2. Araştırmanın Amacı.....	8
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	8
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Meme Kanseri Heterojen bir Hastalıktır.....	9
2.2. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması.....	9
2.3. Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörler.....	10
2.4. Kanseri Kök Hücre Hipotezi.....	11
2.5. Kanseri Kök Hücresinin Orijini.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Araştırmanın tipi.....	15
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	15
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	15
3.4. Çalışma materyali.....	15
3.4.1. Kullanılan Sarf ve Malzemeler.....	15
3.4.2. Hücre Kültürü.....	16
3.4.3. CD44+CD24- Kök Hücre İzolasyonu.....	17
3.4.4. RNA İzolasyonu.....	18
3.4.5. RT-PCR Array Analizi.....	18
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	20
3.6. Veri toplama Araçları.....	20
3.7. Araştırma Planı.....	20

3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	20
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	21
3.10.	Etik Kurul Onayı	22
4.	BULGULAR	23
5.	TARTIŞMA	28
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7.	KAYNAKLAR	35
8.	EKLER	40
8.1.	Etik kurul onayı	40
8.2.	Özgeçmiş	41

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler.....	11
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. CD44+CD24- Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Manyetik İzolasyonu	17
Şekil 2. Farklı moleküler ve biyolojik özellikteki meme kanseri hücreleri	23
Şekil 3. HTB-133 (T47D) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi	24
Şekil 4. HTB-20 (B474) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi	25
Şekil 5. MCF-7 (HTB-22) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi	26
Şekil 6. MDA-MB-231 meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi	27

1.2. Kısaltma Dizini:

ER :	Östrojen reseptörü
PR:	Progesteron reseptörü
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
MCF-7:	Mişigan kanser vakfı-7
CD :	Diferansiasyon kümesi
RNA:	Ribonükleik asit
cDNA:	Komplemanter deoksiribonükleik asit
CSC:	Kanser kök hücresi
VEGFA:	Vasküler endothelial büyüme faktörü
TFF3:	Trefoil faktör 3
CTNNB1:	Kaderin assosiye protein beta 1
CDKN1A:	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1
JUN:	Jun proto onkogen
SLC39A6:	Çinko transporte eden ZIP6 protein
XBP1:	x-box bağlayıcı protein
RB1:	Retinoblastom 1
MAPK3:	Mitojen aktive protein kinaz 3
ADAM23:	ADAM metalloprotein domain 23
PLAU:	Plazminojen aktive eden ürokinaz
GSTP1:	Glutasyon s transferaz p
BCL2:	B hücreli lenfoma 2
MMP2:	Matriks metalloproteinaz 2
MMP9:	Matriks metalloproteinaz 9
MGMT:	O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
AKT1:	Protein kinaz b
THBS1:	Trombospondin 1
Tp53:	Tümör protein p53
EGFR:	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
PCR:	Polimerize Zincir Reaksiyonu

TEŞEKKÜR

DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Doktora Programı dahilinde tezimin kurgulanması, çalışmaların planlanması, malzemelerin temini, laboratuvar çalışmalarının planlanması ve yürütülmesi, literatür bilgilerinin yorumlanmasında bilimsel ve moral olarak büyük desteğini ve katkısını esirgemeyen tez danışmanım **Sayın Prof. Dr. Safiye Aktaş'a**, eski tez danışmanım **Prof. Dr. Uğur Yılmaz'a**, diğer danışman hocalarım **Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan** ve **Prof. Dr. Özgül Sağol'a** ders döneminde bilimsel yönden gelişmemde katkıları olan tüm **Temel Onkoloji ve Klinik Onkoloji hocalarına**, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan doktora arkadaşlarım **Pınar Erçetin, Hakan Özgür ve Duygu Dursun'a** teşekkür ederim.

Dr. Sait Murat Doğan

İzmir, 2014

MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Dr. Sait Murat Doğan

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Amaç: Meme kanseri kadınlarda tüm dünyada temel halk sağlığı problemlerinden biridir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, kadınlarda görülen en sık kanserdir. Kanser hücrelerinin küçük bir kısmının yeni tümör oluşumuna neden olabildiği ve bu hücrelerin tedaviye dirençli olduğu gösterildikten sonra, kanser kök hücreleri kanser tedavisinde yeni bakış açıları sunmuştur. Bu çalışmada, meme kanserinin gen ekspresyon profili ile onun kök hücrelerini farklı biyolojik özelliklerini esas alarak kıyaslanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Farklı moleküler ve biyolojik özelliklerdeki dört meme kanseri hücre serisi kültüre edildi. (MDA-MB-231: ER-PR-HER2-; MCF-7 (HTB-22): ER+PR+HER2-; BT474 (HTB-20): ER+PR+HER2+; T47D (HTB-133): ER+PR+HER2-). Bu hücreler pozitif kontrollerdi. Kanser kök hücreleri CD44+CD24- özellikleri göz önüne alınarak manyetik izolasyon yöntemiyle ayrıştırıldı. Hücrelerin her iki grubu için RNA izolasyonu ve cDNA dönüşümü yapıldı. Meme kanseri ile ilişkili 84 gen dizilim ekspresyonları RT-PCR ile değerlendirildi. Veri analizleri SABioscience web sayfasında yapıldı.

Bulgular: Kanser kök hücreleri HTB-133 de VEGFA'nın gen ekspresyonu artarken MKI67 ve TFF3 azaldı. HTB-20 kanser kök hücrelerinde CTNBB1, CDKN1A, JUN, TFF3 azaldı. MCF-7 (HTB-22) kök hücrelerinde SLC39A6, TFF3, XBP1, RB1, MAPK3 artarken ADAM23, PLA2, GSTP1, BCL2, MMP2, MMP9, MGMT azaldı. MDA-MB-231 kök hücrelerinde ABCB1 ve SLC39A6 artarken MMP9 and MKI67 azaldı. Meme- kanseri hücreleri ve onların kök hücreleri arasında özellikle anjiogenezis, migrasyon, proliferasyon and DNA onarım genlerinin ekspresyonlarında farklılıklar belirlendi. Meme kanser hücreleri ve onların kök

hücrelerinde AKT1, CTNNB1, THBS1, Tp53 ve XBP1 genlerinde artış olduğu tespit edildi.

Sonuç: Verilerimiz meme kanseri için genel bir kanser kök hücresi bulunmadığını göstermektedir. Farklı genetik özellikte ve fenotipte farklı meme kanser kök hücreleri bulunmaktadır. Çalışmamız “meme kanseri başlatan hücreler ” kavramının ‘’meme kanseri kök hücreleri’’ yerine kullanılmasının daha uygun olacağı düşüncesini desteklemektedir. Nihayi tedavi hedeflerinin, tüm bu genetik farklılıklar göz önüne alınarak planlanması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, kanser kök hücresi, gen ekspresyonu

GENE EXPRESSION CHARACTERISTICS OF BREAST CANCER STEM CELLS

ABSTRACT

Objective: Breast cancer in women is a major public health problem throughout the world. It is the most common cancer among women both in developed and developing countries. Cancer stem cells have gained new insights in cancer treatment after it was shown that only a small proportion of cancer cells retains the ability to form new tumors and these cells show resistance to therapy. In this study we aimed to compare gene expression profile of breast cancer and their stem cells in different biologic characteristics.

Methods: Four breast cancer cell lines in different molecular and biologic characteristics (MDA-MB-231: ER-PR-HER2-; MCF-7 (HTB-22): ER+PR+HER2-; BT474 (HTB-20): ER+PR+HER2+; T47D (HTB-133): ER+PR+HER2-) were cultured. These cell s were positive controls. Magnetic isolation for CD44+CD24- cells were done to separate cancer stem cells. RNA isolation, cDNA conversion were done to both group of cells. Breast cancer related 84 gene array (PAHS-131Z) expressions were evaluated by RT-PCR. Data analysis was done on SABioscience web page.

Results: Gene expression of VEGFA was increased MKI67 and TFF3 was decreased in HTB-133 cancer stem cells. CTNBB1, CDKN1A, JUN, TFF3 were decreased in HTB-20 cancer stem cells. SLC39A6, TFF3, XBP1, RB1, MAPK3 were increased and ADAM23, PLAU, GSTP1, BCL2, MMP2, MMP9, MGMT were decreased in MCF-7 (HTB-22) cancer stem cells. In MDA-MB-231 cancer stem cells ABCB1 and SLC39A6 were increased and MMP9 and MKI67 were decreased. We determined differences in gene expression between breast cancer cells and their stem cells, especially in angiogenesis, migration, proliferation and DNA repair genes. Besides these differences we found increase in AKT1, CTNNB1, THBS1, Tp53and XBP1 genes in all breast cancer cells and their stem cells.

Conclusion: Our data suggest that there is not a common cancer stem cell for

breast cancer. There are different breast cancer stem cells with different genetic characterization and phenotypes, so it is suggested that the usage of “breast cancer initiating cells” term can be more convenient than the term of breast cancer stem cell. The novel therapeutical targets might be planned including these genetic changes.

Key Words: Breast Cancer, Cancer Stem Cell, Gene Expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Meme kanseri kadınlarda tüm dünya genelinde temel bir halk sağlığı problemidir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlardaki en sık kanser nedenidir. Tüm dünyada yeni konan kanser tanılarının onda biri kadınlardaki meme kanseridir. Ayrıca dünya genelinde kadınlardaki kanserden ölüm nedenleri arasında başı çekmektedir. 1,1 milyon üstünde tanı alıp 410.000 üzerinde ölüme neden olmaktadır (1). Her iki cinste akciğer kanseri ilk sıradayken meme kanseri ikinci sırada yer almaktadır.

Meme kanseri klinik davranışı, klinik sonucu ve hastalığın biyolojik doğası gereği heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın kısa ya da uzun seyri ile ilişkili olacak faktörler ve bununla ilintili sistemik tedavisi göz önüne alınarak meme kanseri hastasının tedavisi dikkatlice planlanmalıdır.

Tümör evrelendirme sistemi TNM, hastaların prognozunu göstermesi, tedavi planlarında yol gösterici olması ve uygulanan tedavi etkilerinin takibine yardımcı olması sebebiyle 1953 yılından beri ortak dil olmuştur (2). Ancak meme kanserinin tedavi anlayışı, son 20 yıl içinde Östrojen Reseptörü (ER) ve İnsan epitel Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2) sinyal yolağını hedefleyen tedavilerle birlikte değişti. Artık tedavi seçiminde, hastalığın doğal seyriyle ilişkili olup sistemik adjuvan tedavinin yokluğunda sağ kalım ile ilişkili olan prognostik faktörler ve tedaviye verilecek yanıt ile ilişkili ölçümler olan öngörüselsel faktörler değerlendirilmektedir. Ancak günümüzde kullanılan kesin prognostik ve prediktif faktörlerin kısıtlılığı nedeniyle hastaların bir bölümü tedaviden yararlanamamaktadır. Mevcut prognostik faktörlere göre sınıflandırıldığında, düşük riskli hastaların bir kısmı nüksedebilir ya da yüksek riskli gruba dahil hastalarda nüks görülmeyebilir. Daha genç kadınlara uygulanan daha agresif tedaviler uzun dönemde sekellere yol açabilir. Diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle daha yaşlı kadınlar agresif tedavinin toksisitelerine daha duyarlı olabilir. Tedavinin ana hedefi yalnızca hastalıksız sağ kalım değil, aynı zamanda toplam yaşam süresi ve yaşam kalitesi de olduğundan toksisiteden kaçınmak için adjuvan sistemik tedaviden yarar görebilecek hastaların seçiminde kullanılabilecek yeni faktörlerin keşfedilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

Kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem potansiyel olarak prognostik ve öngörüşel faktörleri tespit etme gücüne sahiptir. qRT-PCR ve microarray gibi moleküler tekniklerle gerçekleştirilen gen ekspresyon profilleri ile meme kanserinin heterojenitesini açıklama çabaları tümörün moleküler sınıflamasını gündeme soktu ve sporadik meme kanserleri arasında gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı (3). Ancak meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörüşel göstergelerin çok daha büyük hasta gruplarını içeren klinik çalışmalarla birlikte denenmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasına yol açması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

Ayrıca, nod negatif meme kanserinde adjuvan kemoterapi önerilen meme kanseri vakalarının bir bölümünün adjuvan tedavi almadan tedavi olması ve hastaların tedaviye verdikleri yanıtların farklılığı, hastaların nüks risklerine göre tanımlanmasını sağlayacak, tedaviye verilecek yanıtı öngörebilecek moleküler yaklaşımları gündeme getirdi. Microarray ve diğer yüksek işlem hacmine sahip deneylerde çoklu değişkenlerin test edilmesi, prognostik ve prediktif çalışmaların yürütülmesi için hem yöntemsel hem de istatistiksel değişikliklere sebep oldu. FDA (Food and Drug Administration), 2007 yılında yayınlanan taslak kılavuzla tek bir laboratuvar tarafından geliştirilen, tek bir laboratuvarda uygulanan ve klinik laboratuvar hizmetleri olarak sunulmaya başlayan yeni genetik testleri, In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays: Vücut Dışı Çok Değişken Endeksli Tanı Testleri (IVDMVIA) olarak isimlendirerek, bunları düzenleme otoritesine sahip olduğunu açıkladı; böylece yeni testlerin geliştirilmesi ve klinik kullanımının yolunu açmıştır (4).

Bireysel tedavi modalitelerinin giderek ön plana çıktığı bu çağda, genetik temel üzerinde gelişen kanserin sınıflandırmasının moleküler düzeyde yapılmasının önemi kabul görürken, hasta tümör örneklerinin genetik ve epigenetik durumlarının incelenmesi hastalık hakkında tanı, tedavi ve prognoz ile ilişkili detayların bilinmesine yol açacaktır.

Yıllar içinde meme kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen zaman içinde bu hastalığın rölapsı hastalığın tam tedavi olması önünde bir engel olarak durmaktadır. Bu da kanser kök hücreleri olarak bilinen kök benzeri hücrelerin küçük bir kısmının var olduğunun belirtilmiş olmasıdır. Tek gösterilmiş neden de budur (5,6).

Kanserin kök hücre hastalığı olarak bilinmesi yeni bir bakış değildir. Geçtiğimiz yıllarda bilim adamları kök hücre tabanlı hiyerarşik modelleri kullanarak kanser biyolojisini tekrar gözden geçirdiler. Konu hakkındaki temel tartışmalar doku kök hücrelerinin transformasyon için primer hedef olabileceğini göstermektedir. Bunu da şu şekilde özetleyebiliriz: kök hücreler uzun ömürlüdür, yavaşça bölünen hücreler dokularda sebat edip neoplastik transformasyon için birden fazla genetik farklılığa neden olmaktadır bu da kısa ömürlü olanlara göre daha fazla genotoksik sonuçlara neden olur.(7); (ii) moleküler yolaklar kök hücrelerin kendini yenilemesinde kritik rol oynarak bir sıra tümör içinde sıklıkla kısıtlamaları kaldırmaktadır. (8); (iii) normal kök hücreleri ve tümör hücreleri bir seri fenotipik özellik paylaşırlar: görece farklılaşmamış faz, kendini yenileme özelliği ,migrasyon için belirgin yetenek olarak bilinen sitoprotektif mekanizmaların aktivasyonu. Kan, beyin ve meme kanserlerinde tümörün gelişimi ve yayılmasında değişime uğramış kök/progenitor hücrelerin rol oynadığı daha önceleri de kabul gören bir durumdu (9-13). Immün baskın farelerde transplantasyon sonrası kanser hücrelerinin çok az bir kısmında tümör yayılımını tekrardan düzenleme kapasitesi ve kendini yenileme özelliğine sahip “kanseri kök hücreleri“ veya “ tümör başlangıç hücreleri“ nin yeni tümör hücreleri oluştuğu gösterilmiştir. Kaç adet ve hangi tip kanser hücrelerinin elimine edileceğini anlamak kanser tedavisinin temel amacıdır. Bu yüzden sınırlı üreme potansiyeline sahip kanser hücrelerinin eliminasyonu sınırsız üreme özelliğine sahip kök hücre yayılımı düşünüldüğünde klinik rölaps ya da rekürrens ile sonuçlanmaktadır (14). Membranlar üzerindeki yüzey belirleyici proteinleri hücre tiplerini tanımlar. Ayrıca meme kanseri için kök hücreler hücre yüzey marker proteini CD44 sunumu ve adezyon molekülü olarak bilinen düşük düzey CD24 ile tanımlanabilirler. Meme kök hücreleri, mammosferler olarak bilinen nöral kök hücre agregatlarına benzer serumdan yoksun süspansiyon kültürlerinde çoğalma yeteneğiyle kolaylıkla tanımlanabilirler. Meme tümörlerinde xenograftli farelerde olduğu gibi tedavi edilmiş hastalarda neoadjuvant tedavi rejimlerinin kullanılması konvansiyonel kemoterapinin kök hücrelerin kuvvetlenmesine neden olabileceğini göstermiştir (15,16). Kök hücreler üzerine

radasyon etkisi, invitro olarak çalışılmıştır. MCF7 de tek sıra kültürdeki hücrelere nazaran mammosferler olarak izole edilen kök-hücre/progenitörler radyoterapiye daha dirençlidirler, fraksiyone radyoterapi CD44/CD24/low fenotipli meme kök hücrelerin oranını arttırmıştır (17). Bu veriler; kanser kök hücrelerin kabul gören tüm tedavilere direnç gösterdiğini ve tedavi küratif ise bunların dışlanacak güncel hedefler olduğunu tekrardan vurgulamaktadır. İlginç bir şekilde , EGFR/ERBB2 inhibitor lapatinib li ERBB2-pozitif tümörlerin tedavisi meme kanseri kök hücrelerin yüzdesinde küçük bir azalmaya neden olmaktadır (12). Tanı , tedavi ve prognozdeki gelişime ragmen meme kanserinde rekürens ve metastaz gibi durumları açıklamak için bu kök hücrelerin özelliklerinin anlaşılması önemli bir basamaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, farklı moleküler ve biyolojik karakteristikteki meme kanseri hücrelerinin kök hücrelerindeki gen ekspresyon profillerindeki farklılıkları tespit ederek olası yeni moleküler tedavi hedeflerini tespit etmeyi amaçladık.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Farklı moleküler ve biyolojik özellikteki meme kanserleri ve bunlara ait kök hücrelerin gen ekspresyon özellikleri farklılıklar gösterir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Heterojen Bir Hastalıktır

Meme kanserinin tek yönlü bir hastalık olmadığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Daha çok moleküler, histopatolojik ve klinik düzeyde heterojenite gösteren bir hastalıktır. Çeşitlilik, moleküler düzeyde kendini gen ekspresyonunda farklılıklar, genomik sapmalar ve protein ekspresyonunda değişiklikler şeklinde gösterir. Bu çeşitlilik histopatolojik alt tiplerde her zaman paralellik göstermemektedir. Mikroçevre ve mikroçevredeki hücresel ilişkilerdede varyasyonlar görülmekte olup, bu varyasyonlar tümörün kendi içinde angiogenetik ve metastatik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır. Tümörün hücresel kompozisyonu kişinin hastalığının biyolojik ve klinik özelliklerinin en önemli belirleyicisidir. Bu çeşitlilik yüzünden tanı, tedavi ve prognozun belirlenmesinde histopatolojik sınıflama yeterli olmayıp detaylı moleküler sınıflama yapılması ihtiyacı oluşmuştur.

2.2 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

Kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem potansiyel olarak prognostik ve öngörüselle faktörleri tespit etme gücüne sahiptir. qRT-PCR ve microarray gibi moleküler tekniklerle gerçekleştirilen gen ekspresyon profilleri ile meme kanserinin heterojenitesini açıklama çabaları tümörün moleküler sınıflamasını gündeme soktu.

Sporadik meme kanserleri arasında gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı (2):

- 1) Luminal hücre benzeri,
- 2) Bazal hücre benzeri,
- 3) Normal epitel benzeri
- 4) HER2 pozitif grup

Sonraki çalışmalarda luminal hücre benzeri grup içinde luminal A ve B olmak

üzere 2 alt grup daha tanımlandı (18,19), meme kanserinin bu alt moleküler gruplarının ekspresyon farklılıkları doğrulandı (18,20-23).

Luminal hücre benzeri grubunun hepsi ER pozitifdir. Luminal A grubu en fazla ER ekspresyonu gösteren tümörlerdir (19). Luminal B grubu tümörler luminal gruba özgü genleri orta düzeyde eksprese eder ve bazıları HER2 pozitifdir. p53 gen mutasyon sıklığı luminal A grubunda luminal B grubundan daha sıktır (24,25). Luminal hücre benzeri grubun yaklaşık üçte ikisi düşük ya da orta düzey histolojik grade'e sahiptir, endokrin tedaviye duyarlıdır. Bazal hücre benzeri grubun %95'i ER negatifdir ve %91'i yüksek gradedir (26). Bazal hücre benzeri grup aynı zamanda "triple" negatif meme kanser fenotipine sahiptir (ER negatif, PgR negatif ve HER2 negatif). Ancak bazal hücre benzeri grubun heterojen olduğu ve alt grupları içerdiği düşünülmektedir (24,25).

Farklı moleküler alt gruplarda prognoz ve kemoterapi duyarlılığının farklı olduğu gözlemlendi. Luminal hücre benzeri kanserlerin daha uzun sağ kalım oranları, bazal hücre benzeri ve HER2 pozitif tümörlerin ise birden fazla ajanla yapılan neoadjuvan tedaviye daha yüksek oranda patolojik tam yanıt verdikleri gösterildi (19,26).

Meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörüsül göstergelerin çok daha büyük hasta gruplarını içeren klinik çalışmalarla birlikte denenmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasına yol açması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

2.3 Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörler

Prognostik faktörler hastalığın doğal seyriyle ilişkili olup sistemik adjuvan tedavinin yokluğunda sağ kalım ile ilişkili, öngörüsül faktörler ise tedaviye verilecek yanıt ile ilişkili ölçümlerdir. Hormon reseptör durumu ve HER2 ekspresyonu gibi durumlar hem prognostik hem de öngörüsül olabilir (27).

Meme kanseri tedavi karar sürecinde kullanılan prognostik ve prediktif faktörler tablo 1'de özetlendi.

Tablo 1. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler (*araştırma düzeyinde) (27)

Prognostik faktörler	Prognostik ve prediktif faktörler
Lenf nodu durumu	ER ve PgR durumu
Tümör büyüklüğü	HER2 amplifikasyonu
Histolojik grade ve tip	İnvazyon faktörleri*
Lenfatik ve vasküler invazyon	Gen ekspresyon profili
Tanı yaşı	Dolaşımdaki tümör hücreleri
Etnik yapı	P53 mutasyonu
Proliferasyon markırları*	Dolaşımdaki anjiogenik faktörler
Katepsin D*	Topoizomeraz II durumu
Anjiogenez markırları*	BRCA gen mutasyonu
Kemik iliği mikrometastazı*	

Son 20 yıldır meme kanseri tedavi anlayışı ER ve HER2 sinyal yolağını hedefleyen tedavilerle birlikte değişti. Bununla birlikte kesin ve kullanılabilir prognostik ve prediktif faktörlerin kısıtlılığı nedeniyle hastaların bir bölümü tedaviden yararlanamayabilir. Günümüzde kullanılan prognostik faktörlerle düşük riskli hastaların bir kısmı nüksedebilir ya da yüksek riskli gruba dahil hastalarda nüks görülmeyebilir. Daha genç kadınlara uygulanan daha agresif tedaviler uzun dönemde sekellere yol açabilir. Diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle daha yaşlı kadınlar agresif tedavinin toksisitelerine daha duyarlı olabilir. Tedavinin ana hedefi yalnızca hastalıksız sağ kalım değil, aynı zamanda toplam yaşam süresi ve yaşam kalitesi de olduğundan toksisiteden kaçınmak için adjuvan sistemik tedaviden yarar görebilecek hastaların seçiminde kullanılabilecek yeni faktörlerin keşfedilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

2.4 Kanseri Kök Hücre Hipotezi

Kanserin, kök hücre özelliği gösteren dar bir hücre grubundan kaynaklanabileceği görüşü yaklaşık 150 yıl öncesine dayanmaktadır. 1961’de Till JE ve Mc CE, kanserin kökeninin dokuya özgü kök hücreleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. 1967’de ise Pierce GB, kanserin kök hücrelerin olgunlaşmalarının durmasıyla ilgili olduğunu savlamıştır (28).

Kanser kök hücresi (KKH) hakkındaki ilk direkt kanıt, 1997’de Dick J. ve arkadaşlarının yayımladıkları makale ile gelmiştir. Dick J. ve grubu, akut myelojenik lösemili (AML) hastaların kanlarından izole ettikleri lösemik hücrelerin küçük bir grubunun (yaklaşık 10 000 hücrede <1 hücrenin), diyabetik olmayan ağır

immünsupresif (NOD/ SCID) farelerde orijinal tümörü oluşturabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu hücre grubunun normal hematopoetik kök hücrelerin fenotipinde olduğunu (CD 34+ /CD 38-) tesbit etmiş ve kanserin normal kök hücrelerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (5,29,30) .

Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar, Dick J. ve arkadaşlarının açtığı yoldan ilerleyerek, bu grubun “lösemik kök hücreleri” izole ettiği ve bu hücrelerin kök hücre özelliklerini test ettiği yöntemleri, solid tümörlere adapte etmişlerdir. Bu bağlamda meme kanseri ve glioblastomlarda yapılan araştırmalar başı çekmiş (2003 ve 2004) ve ardarda kolon kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi birçok solid tümörde “kanser kök hücreleri” gösterilmiştir (13, 31-33).

Normal kök hücre biyolojisi hakkındaki temel bilgiler, farelerde hematopoez üzerinde yapılan araştırmalardan elde edilmiştir. Aynı şekilde hematolojik kanserler de- özellikle kronik miyelojenik lösemi (KML) ve akut miyolejenik lösemi (AML) başta olmak üzere- kanser gelişiminde modern konseptlerin oluşturulmasında önemli model hastalıklar olmuşlardır (34, 35).

AML ve diğer tümörlerde gözlenen “fonksiyonel heterojenite”nin açıklanmasında iki model bulunmaktadır: “Stokastik Model” ve “Kanser Kök Hücre Modeli” (35).

Stokastik modelde; her bir tümör hücresinin, aynı kök hücre gibi davranarak “sınırsız” çoğalma kapasitesine sahip olma olasılığı düşük ancak eşittir. Kanser kök hücre modelinde ise, bir tümörde farklı “kendini yenileme” ve farklılaşma kapasitelerine sahip belirli hücre sınıflarının olduğu ileri sürülmektedir. Sonuçta, ancak küçük tanımlanabilir bir hücre topluluğu tümörü başlatabilecek sürekli kapasiteye sahip olacak ve tümörü oluşturan hücre tiplerinin hiyerarşisini üretebilecektir. Her iki model de bir tümörde sadece sınırlı sayıdaki hücrenin tümörü başlatabileceğini ileri sürse de, dayandıkları biyolojik prensipler çok farklıdır. Stokastik teoriye göre, bir tümör içindeki hücreler görece homojendir ve tümörün oluşmasına ve ilerlemesine yol açan genetik değişiklikler bütün hücrelerde oluşurlar. Sonuçta tümörejenik yolların anlaşılması ve tümörün eradike edilmesini sağlayacak tedaviler, tümördeki hücrelerin hepsini kapsamalıdır. Kök hücre modelindeyse, tümörü başlatan nadir bir hücre popülasyonu biyolojik ve fonksiyonel olarak diğer

hücrelerden farklıdır. Tümördeki hücrelerin büyük çoğunluğuyla karşılaştırıldığında, tümörejenik yollar bu hücrelerde farklı işleyecektir. Dolayısıyla, kanser relapsını efektif olarak önleyebilecek tedavilerin geliştirilebilmesi için araştırmalar KKH'leri üzerinde yoğunlaştırılmalıdır. KKH modeli, in-vivo olarak tümör oluşumunu başlatabilecek kapasiteye sahip olan kök hücrelerin prospektif olarak tümörün geri kalan büyük kısmından izole edilebileceğini ileri sürmektedir; buna karşın stokastik modelde, tümörü başlatma kapasitesi her zaman her hücre fraksiyonunda olacağından böyle bir izolasyon söz konusu değildir (35).

KKH hipotezi, yukarda da bahsedildiği gibi tümör içerisinde bir grup hücrenin normal kök hücre özellikleri gösterdiğini ileri sürmektedir. Bu özellikler şöyle sıralanabilir:

- Kendini yenileme kapasitesi,
- Farklanma yetisi,
- Aktif telomeraz ekspresyonu,
- Anti-apoptotik yolların aktivasyonu,
- Hücre zarı transport aktivitesinin artmış olması,
- Migrasyon ve metastaz yeteneği (1).

Özetleyecek olursak, bu hipoteze göre; tümörler de vücuttaki normal dokular gibi hücrel bir hiyerarşi göstermektedirler. Bu hiyerarşide, KKH'leri limitsiz çoğalma kapasitesi olan tek hücre grubudur. Bu nedenle KKH'leri tümörün büyümesini ve metastaz yapabilmesini sağlarlar. Tümör dokusunun büyük kısmını oluşturan “diferansiye” kanser hücreleriye, yüksek çoğalma kapasitesine sahip olabilirler ancak bu kapasite sınırsız değildir (36, 37).

2.5 Kanser Kök Hücresinin Orijini

Dokulardaki YKH'lerin kendini yenilemesi, kök hücrenin içinde bulunduğu “niş” (mikroçevre) ‘den gelen sinyallerle çok sıkı bir biçimde denetlenmektedir. Normal koşullarda kök hücre bölünmesi asimetriktir; bölünme sonucu kök hücrenin kopyası olan bir hücreyle, farklanma yeteneğine sahip olan ve dokudaki hücre

türlerine dönüşecek olan bir hücre oluşur. Kök hücrenin simetrik bölünmesindeyse, iki tane kök hücre özelliğine sahip hücre ortaya çıkar (28). Literatürdeki ağırlıklı görüşe göre KKH'nin kökeni, dokulardaki normal kök hücrelerdir (34, 38, 39).

KKH'lerinin izolasyonunda kullanılan tanımlanmış pek çok belirteç normal kök hücre belirteçleridir. Kök hücre belirteci konusundaki en önemli sorun, bu belirteçlerin kök hücre/ progenitor hücreler için hiç de spesifik olmamasıdır. Tam tersine bu antijenlerin birçoğu çeşitli mezenkimal hücrelerde eksprese edilmektedir. Örneğin, en çok kullanılan belirteçlerden bir tanesi olan CD 44 sadece hematopoetik ve hematopoetik olmayan kök hücrelerde değil, monosit, lenfosit, granülosit, epitel hücresi ve melanositleri içeren birçok olgun hücrede de eksprese olmaktadır. Yine CD34 sadece hematopoetik kök hücrelerde değil daha olgun progenitor hücreler ve endotelial hücrelerde eksprese edilmektedir (40).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Laboratuvarlarında 2012–2014 yılları arasında yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma ticari hücre hatları MCF-7 (HTB-22), HTB-133 (T47D), MDA- MB-231 (HTB-26) , HTB-20 (BT-474) ile yapılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

3.4.1. Kullanılan Sarf ve Malzemeler

Ticari Hücre Hatları

- MCF-7 (HTB-22)
- HTB-133 (T47D)
- MDA- MB-231 (HTB-26)
- HTB-20 (BT-474)

Malzemeler:

- Plastik hücre kültürü kapları.
- DMEM: Ham's F12 (1:1) kültür ortamı
- Fetal bovine serum
- Hücre kazıyıcı

- Tripsin/EDTA
- PBS
- L-Glutamin
- Penisilin/Streptomycin
- RNA izolasyon kiti
- cDNA sentez kiti
- İnsan kökenli meme kanseri RT-PCR Array kiti (PAHS-131Z)
- CD44+CD24- meme kanseri kök hücre izolasyonu kiti

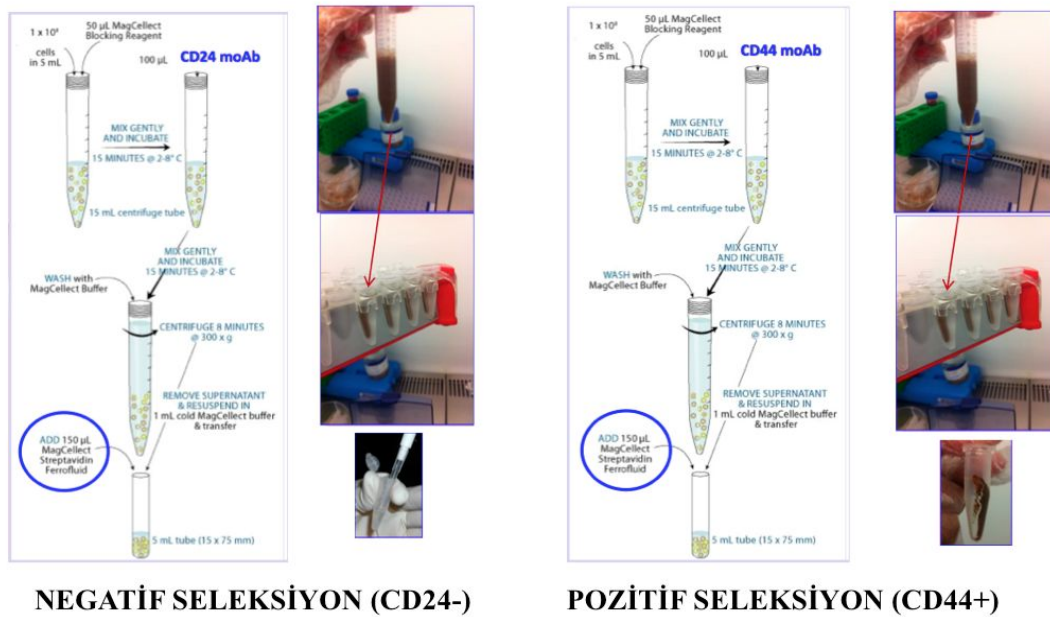
3.4.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada dört tip meme kanseri hücre hattı kullanılarak kültüre edildi. Bu çalışmada kullanılacak hücre hatlarından HTB-133 (T47D) insan kökenli duktal epitel meme tümöründen elde edilmiş metastatik orijine sahip bir hücre hattıdır. Bu hücreler mutant p53 proteinini eksprese etmelerine ek olarak normal kültür koşullarında progesteron ve östrojen reseptörleri açısından pozitifler ve ERBB2 amplifikasyonu yoktur. Östrojen desteği ile tümörojenik fare deneylerinde de kullanılabilir özelliktedir. Bir diğer hücre hattı olarak MDA- MB-231 (HTB-26) kullanılacaktır. Bu hücreler insan kökenli olup invaziv duktal meme karsinomu özelliğinde ve metastatik orijine sahiptir. Ayrıca ER ve PR açısından negatiftirler, ERBB2 amplifikasyonu yoktur ve mutant p53 proteini eksprese ederler. Tümörojenik fare deneylerinde de kullanılabilir özelliktedir. Üçüncü kullanılacak hücre hattı BT-474 (HTB-20) ise, insan kökenli duktal epitel meme tümöründen elde edilmiş primer orijine sahip bir hücre hattıdır. Ayrıca ER ve PR açısından pozitifler, ERBB2 amplifikasyonu vardır ve mutant p53 proteini eksprese ederler. Tümörojenik fare deneylerinde de kullanılabilir özelliktedir. MCF-7 (HTB-22) insan kökenli metastatik adenokarsinomu özelliğinde olup ER+, PR+ olup ERBB amplifikasyonu vardır. Yukarıda tanımlanan bu hücrelerin tümü adherent özelliktedirler.

Bu hücre hatları 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin ilaveli 10% fetal bovin serum içeren DMEM:Ham's F12 ortamlarında kültüre edildi. Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek 37°C de % 5 CO₂ 'lik etüvde inkübe edildi. Uygun miktarda RNA izole edilebilecek hücre popülasyonuna ulaşana dek kültür süreci devam ettirildi.

3.4.3. CD44+CD24- Kök Hücre İzolasyonu

Kültüre edilen hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Daha sonra tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilerek hücrelerin kalkması sağlandı. 1:1 oranda ortamlar eklenip hücreler falkon tüpler içinde santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler manyetik ayırma tamponu ile resüspanse edildikten CD24 monoklonal antikoru ile inkübe edildi. Manyetik işaretleme için CD24+ olan hücelere bağlanacak ferritin solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra tüpler manyetik alana yerleştirildi ve magnete tutunmayan CD24- hüceleri içeren süpernatant toplandı. Bu hücelere CD44 monoklonal antikoru ile inkübe edildi. Manyetik işaretleme için CD44+ olan hücelere bağlanacak ferritin solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra tüpler manyetik alana yerleştirildi ve magnete tutunan manyetik işaretli CD44+ hücelere toplandı. Böylece CD44+CD24- meme kanseri kök hüceleri izole edilmiş oldu.



Şekil 1. CD44+CD24- Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Manyetik İzolasyonu

3.4.4. RNA İzolasyonu

İzole edilen CD44+CD24- kök hücreler ve kök hücre olmayan meme kanseri hücreleri uygun seyreltme işlemleri ardından TOMA lamı ile sayıldı. Buna göre 1×10^6 hücre başına yaklaşık 15 µg RNA eldesi için uygulanacak prosedür şu şekilde gerçekleştirildi. Hücreler 200 µl PBS içinde resüspanse edildi. 400 µl liziz ve bağlanma tamponu eklenip 15 sn vortekslendi. Yüksek saflıkta filtreli tüp koleksiyon tüpüne takıldı. Örnek üstteki filtreli tüpe aktarıldı. 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Filtreli tüp koleksiyon tüpünden çıkarıldı. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. Örnek başına 90 µl DNAaz inkübasyon tamponu reaksiyon tüpüne eklendi. 10 µl DNAaz I eklenip karıştırıldı. Bu karışım filtreli tüpe ilave edilecek ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtreli tübe 500 µl yıkama tamponu I eklenip 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. Filtreli tübe 500 µl yıkama tamponu II eklenip ve 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. 200 µl yıkama tamponu II filtreli tüpe eklenip 2 dk max. hızda santrifüjlendi (13000 g). Daha sonra koleksiyon tüpü atıldı ve filtreli tüp yeni bir steril 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldı. RNA elüsyonu için 50-100 µl elüsyon tamponu filtreli tüpe eklendi. 1 dk 8000 g de santrifüjlendi. Elde edilmek istenen RNA artık alttaki 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpünde bulundu. Bu RNA ya hemen RT-PCR çalışmasında kullanıldı ya da daha sonra çalışmak için -80 °C 'de saklandı.

3.4.5. RT-PCR Array Analizi

Elde edilen RNA 'lar cDNA 'ya çevrildi. cDNA 'lar uygun PCR karışımlarına DNA kontaminasyonundan özenle kaçınılarak eklendi. Real-time PCR analizi yapılacak olan array insan kökenli meme kanseri için hazırlanmış kittir. Yapılacak data analizinde şu genlerin ekspresyonları hakkında bilgi edinildi.

Tümör Klasifikasyon Belirteçleri: Luminal A-C: ESR1 (ERa), FOXA1, GATA3, KRT8, KRT18, SLC39A6, TFF3, XBP1. HER2-benzeri: ERBB2 (HER2), GRB7. Basal-benzeri / üçlü negatif: BIRC5, EGFR, KRT5, NOTCH1. Metastasis to Lung: ID1, MMP2 (Gelatinase A), PTGS2 (COX2).

Sinyal Yolakları ile ilgili olarak: Steroid Reseptor-Aracılı: AR, BRCA1, CCNE1, CTNNB1, ESR1 (ER α), ESR2 (ER β), IGF1, KRT19, PGR, RB1. Hedgehog: BCL2, CCND1, GLI1, SNAI2. Glukokortikoid: IGFBP3, NME1 (NM23A), NR3C1 (GRL). Klasik WNT: APC, CCND1, CTNNB1, SFRP1. PI3K/AKT: AKT1, ERBB2 (HER2), IGF1, IGF1R, PTEN. NOTCH: BIRC5, NOTCH1. MAPK: MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), MAPK8 (JNK1), TP73.

Epitelden Mezenkimale dönüşüm ile ilgili olarak: CTNNB1, NOTCH1, SRC, TGFB1, TWIST1.

Anjiyogenez ile ilgili olarak: CDH13, CTNNB1, EGF, ERBB2 (HER2), ID1, IL6, JUN, NOTCH1, PLA1 (uPA), PTEN, SERPINE1 (PAI-1), SLIT2, THBS1, VEGFA.

Adhezyon ile ilgili olarak: ADAM23, APC, BCL2, CDH1 (E-Cadherin), CDH13, CDKN2A (p16INK4), CSF1 (MCSF), CTNNB1, EGFR, ERBB2 (HER2), PTEN, TGFB1, THBS1.

Proteoliz ile ilgili olarak: ADAM23, CST6, CTSD, MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), PLA1 (uPA), PYCARD (ASC).

Apoptoz ile ilişkili olarak: AKT1, APC, BAD, BCL2, CDH1 (E-CADHERIN), CDH1 (E-CADHERIN)3, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CDKN2A (p16INK4), GSTP1, IGF1, IL6, JUN, MUC1, NME1 (NM23A), RARB, SFN (14-3-3s), SFRP1, TP53, TP73, TWIST1.

Hücre Döngüsü ile ilişkili olarak: APC, BCL2, CCNA1, CCND1, CCND2, CCNE1, CDK2, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CDKN1C (p57KIP2), CDKN2A (p16INK4), JUN, MKI67, MYC, PTEN, RASSF1, RB1, SFN (14-3-3s), TP53.

DNA Hasarı ile ilgili olarak: APC, ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), MAPK1 (ERK2), MGMT (AGT), MLH1, SFN (14-3-3s), TP53, TP73.

Ksenobiyotik değişim ile ilgili olarak: ABCB1 (MDR-1), ABCG2 (BCRP).

Transkripsiyon Faktörleri: AR, CTNNB1, ESR1 (ER α), ESR2 (ER β), FOXA1, GATA3, HIC1, JUN, MYC, NOTCH1, NR3C1 (GRL), PGR, PRDM2 (RIZ1), RARB, RB1, TP53, TP73, XBP1.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

İncelenen meme kanseri hücre hatları ve bu hücrelere ait kök hücrelerdeki ekprese olan genler araştırmanın değişkenlerini oluşturmaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

Real-time PCR ile gen ekspresyonları meme kanseri ve kanser hücrelerine ait kök hücrelerinde saptandı.

3.7. Araştırma Planı

- | | |
|-----------------|---|
| 1. üç ay | Deneylein Planlanması Malzemelerin Temini |
| 2. üç ay | Hücre Kültürü Çalışmaları |
| 3. üç ay | Hücre Kültürü Çalışmaları |
| 4. üç ay | RNA İzolasyonu
cDNA çevrimi |
| 5. üç ay | RT-PCR
Array Çalışmaları |
| 6. üç ay | Laboratuvar Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz |
| 7. üç ay | Literatür Bilgilerinin Güncellenmesi
Proje Sonuç Raporunun Yazılması |
| 8. üç ay | Yayın Haline Getirme |

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Kontrol nöroblastom hücrelerinin ekspresyonuna göre her koşulun ekspresyonunun artışı ya da azalışı kat değişimleri (FOLD CHANGE) hesaplandı. Bu analizler SA Bioscience'ın data analysis expression sayfasında yapıldı. Bu sitenin

kullanımı ücretsizdir. Heat map ve clustergramlar ile gen ekspresyon analizleri desteklendi. T test tabanlı p değeri bu sitede değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Maddi nedenler nedeni ile yalnızca dört kanser hücre hattının çalışılması, ayrıştırılan kök hücre sayısının kısıtlı olması ve kök hücrelerin ayrıştırıldıktan sonra kök hücre özelliklerinin yeniden değerlendirilmemesi bu araştırmanın başlıca kısıtlılıklarıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

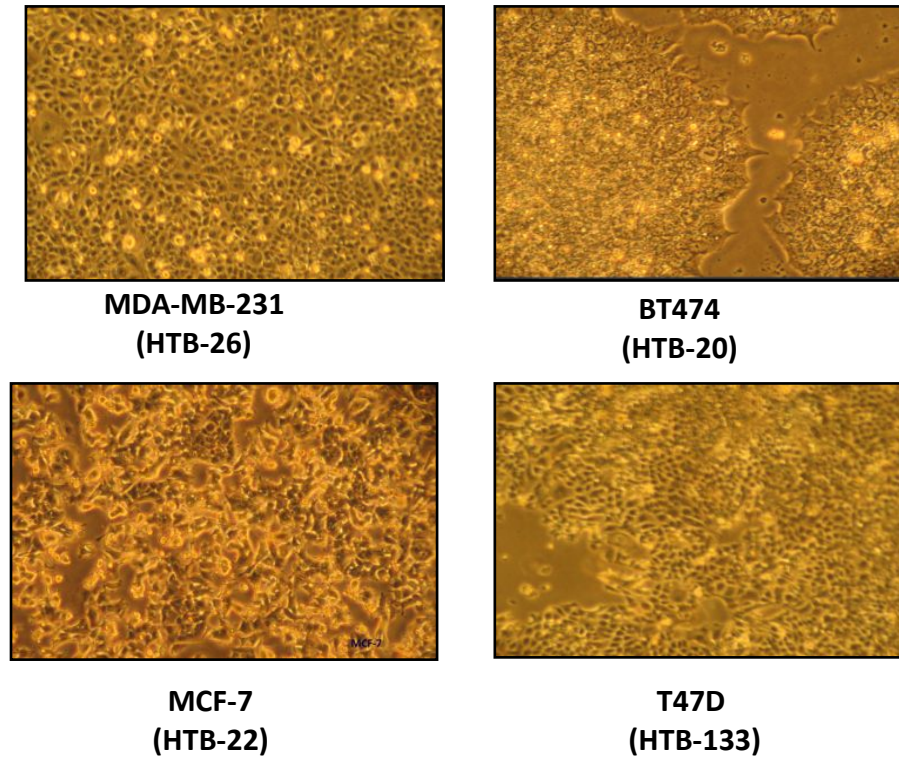
Etik kurul onay tarihi: 26.05.2011

Etik kurul onay numarası: 2011/17-07

(Etik kurul onayı Ek-1’de sunulmuştur.)

4. BULGULAR

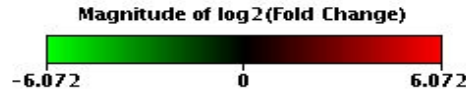
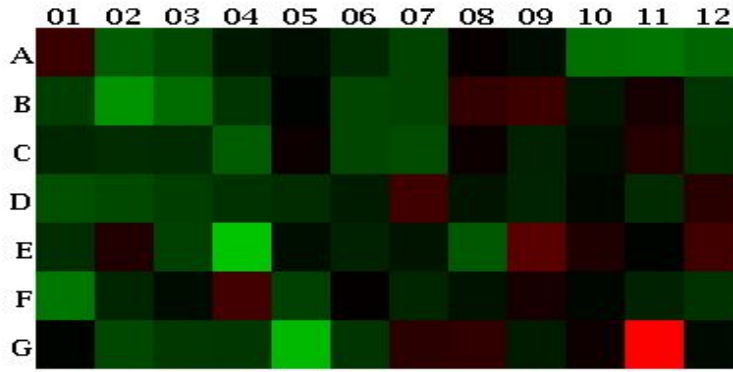
PAHS-131Z kodlu meme kanseri karsinogenezi ilişki 84 geninfarklı moleküler ve biyolojik özellikteki dört meme kanseri kök hücreleri ile kendi normal kontrol hücrelerindeki gen ekspresyonları ile kıyaslanması yapıldığında belirgin artış ve azalmalar saptandı. SaBiosciences 'ın ücretsiz analiz imkanı sağlayan data ekspresyon analizi sayfasında heatmap ve clustergram analizler gerçekleştirildi



Şekil 2. Farklı moleküler ve biyolojik özellikteki meme kanseri hücreleri

ER+, PR+, HER2 amplifikasyonu var olan invaziv duktal karsinom özellikteki insan kökenli **HTB-133 (T47D)** kök hücrelerinde anjiyogenez ilişki VEGFA gen ekspresyonu artarken, epitelial hücrelerin mobilitesinde etkili TFF3 gen ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır.

HTB-133 normal vs kök hücre
Visualization of log₂(Fold Change)

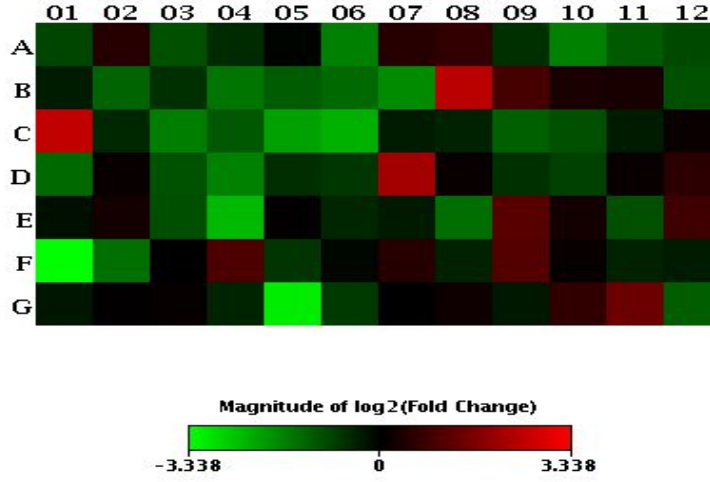


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1	ABCG2	ADAM23	AKT1	APC	AR	ATM	BAD	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2
	2.59	-4.62	-3.29	-1.46	-1.26	-1.93	-2.99	1.14	-1.21	-6.27	-6.81	-5.34
B	CCNA1	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CDH13	CDK2	CDKN1A	CDKN1C	CDKN2A	CSF1	CST6
	-2.75	-11.70	-5.89	-2.38	-1.08	-3.22	-2.96	2.25	2.70	-1.46	1.46	-2.36
C	CTNNA1	CTSD	EGF	EGFR	ERBB2	ESR1	ESR2	FOXA1	GATA3	GLI1	GRB7	GSTP1
	-1.86	-2.04	-2.03	-4.53	1.20	-3.20	-3.45	1.23	-1.75	-1.27	1.86	-2.22
D	HIC1	ID1	IGF1	IGF1R	IGFBP3	IL6	JUN	KRT18	KRT19	KRT5	KRT8	MAPK1
	-3.75	-3.41	-2.82	-2.25	-2.10	-1.59	2.83	-1.41	-1.84	-1.16	-2.00	1.91
E	MAPK3	MAPK8	MGMT	MKI67	MLH1	MMP2	MMP9	MUC1	MYC	NME1	NOTCH1	NR3C1
	-2.16	1.68	-2.86	-26.50	-1.25	-1.75	-1.37	-4.28	4.38	1.66	-1.06	2.91
F	PGR	PLAU	PRDM2	PTEN	PTGS2	PYCARD	RARB	RASSF1	RB1	SERPINE1	SFN	SFRP1
	-7.25	-1.85	-1.20	2.99	-2.84	1.06	-1.88	-1.33	1.49	-1.12	-1.78	-2.28
G	SLC39A6	SLIT2	SNAI2	SRC	TFF3	TGFB1	THBS1	TP53	TP73	TP73	TP73	TP73
	-1.09	-3.34	-2.55	-2.46	-21.68	-2.33	1.99	2.19	-1.57	1.27	67.28	-1.17

Şekil 3. HTB-133 (T47D) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi

ER+, PR+, HER2 amplifikasyonu var olan invaziv duktal karsinom özellikteki insan kökenli **HTB-20 (B474)** kök hücrelerinde epiteliyalden mezenkimale dönüşümde etkili CTNBB1, DNA hasarı ve apoptoz ilişkili CDKN1A ve transkripsiyon faktörü JUN genleri belirgin artarken; nükleer steroid hormon reseptörü PGR, TFF3, hücre proliferasyonu ilişkili MKI67 ve nükleer steroid hormon reseptörü ESR1 genleri azalmıştır.

HTB-20 normal vs kök hücre
Visualization of log2(Fold Change)

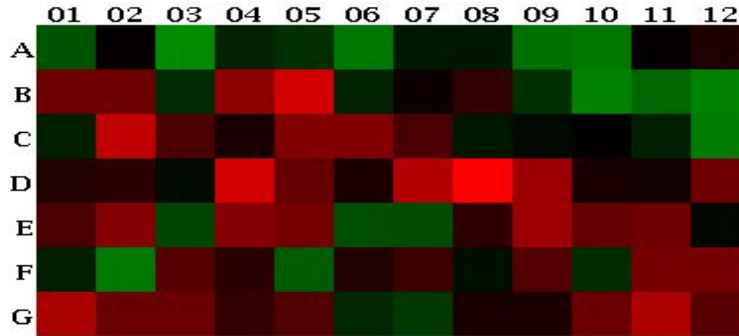


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1	ABCG2	ADAM23	AKT1	APC	AR	ATM	BAD	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2
	-1.89 A	1.41 OKAY	-2.08 A	-1.47 OKAY	-1.03 OKAY	-3.22 OKAY	1.41 OKAY	1.57 OKAY	-1.56 OKAY	-3.24 A	-2.26 OKAY	-1.96 OKAY
B	CCNA1	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CDH13	CDK2	CDKN1A	CDKN1C	CDKN2A	CSF1	CST6
	-1.30 A	-2.49 OKAY	-1.56 A	-2.90 OKAY	-2.31 OKAY	-2.62 OKAY	-3.58 OKAY	5.51 OKAY	1.88 OKAY	1.27 OKAY	1.23 OKAY	-2.07 B
C	CTNNB1	CTSD	EGF	EGFR	ERBB2	ESR1	ESR2	FOXA1	GATA3	GLI1	GRB7	GSTP1
	5.95 OKAY	-1.43 OKAY	-3.11 OKAY	-2.22 OKAY	-4.34 OKAY	-5.06 OKAY	-1.28 OKAY	-1.37 OKAY	-2.41 OKAY	-2.08 OKAY	-1.30 OKAY	1.09 OKAY
D	HIC1	ID1	IGF1	IGF1R	IGFBP3	IL6	JUN	KRT18	KRT19	KRT5	KRT8	MAPK1
	-2.64 OKAY	1.08 OKAY	-2.11 OKAY	-3.24 OKAY	-1.52 OKAY	-1.62 A	4.48 OKAY	1.08 OKAY	-1.55 OKAY	-1.78 OKAY	1.07 OKAY	1.49 OKAY
E	MAPK3	MAPK8	MGMT	MKI67	MLH1	MMP2	MMP9	MUC1	MYC	NME1	NOTCH1	NR3C1
	-1.16 OKAY	1.20 OKAY	-2.03 OKAY	-5.38 OKAY	1.02 OKAY	-1.42 OKAY	-1.26 OKAY	-2.69 OKAY	2.24 OKAY	1.21 OKAY	-2.08 OKAY	1.76 OKAY
F	PGR	PLAU	PRDM2	PTEN	PTGS2	PYCARD	RARB	RASSF1	RB1	SERPINE1	SFN	SFRP1
	-10.11 OKAY	-2.77 OKAY	-1.01 OKAY	2.00 OKAY	-1.59 OKAY	-1.05 OKAY	1.41 OKAY	-1.35 OKAY	2.15 OKAY	1.08 OKAY	-1.37 OKAY	-1.29 OKAY
G	SLC39A6	SLIT2	SNAI2	SRC	TFF3	TGFB1	THBS1	TP53	TP73	TWIST1	VEGFA	XBP1
	-1.21 OKAY	1.02 OKAY	1.05 OKAY	-1.38 OKAY	-8.68 OKAY	-1.70 OKAY	-1.01 OKAY	1.13 OKAY	-1.25 OKAY	1.54 OKAY	2.68 OKAY	-2.36 OKAY

Şekil 4. HTB-20 (B474) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi

ER+, PR+ ve HER2 amplifikasyonu olmayan metastatik adenokarsinom özellikteki insan kökenli **MCF-7 (HTB-22)** meme kanseri kök hücrelerinde taşıyıcı protein ailesinden SLC39A6, TFF3, transkripsiyon faktörü XBP1, RB1, MAPK3 artarken; hücre-matriks ilişkisinde etkili ADAM23, migrasyon ve proliferasyon ilişkili PLAU, antioksidan enzim kodlayan GSTP1, steroid hormon reseptörü AR, anti-apoptotik BCL2, invazyon ve metastaz ilişkili MMP2, MMP9 ve DNA hasarı tamirinde görevli MGMT gen ekspresyonları belirgin azalmıştır.

MCF-7 normal vs MCF-7 kök hücre
Visualization of log₂(Fold Change)

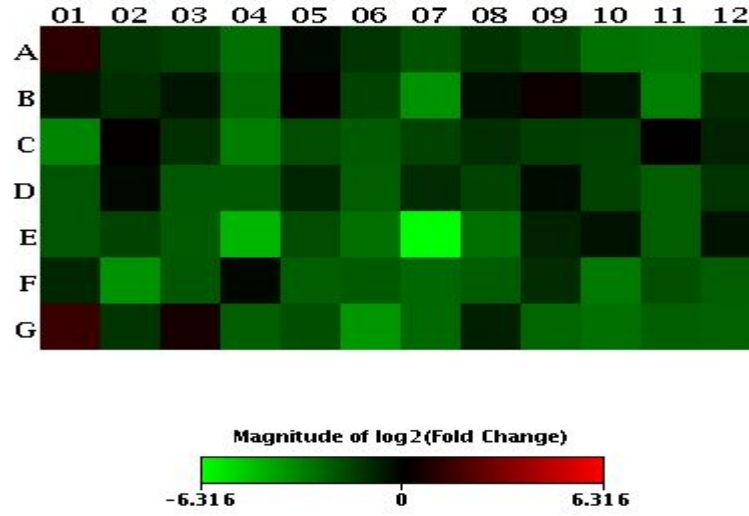


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 -12.61 A	ABCG2 1.13 A	ADAM23 -66.53 OKAY	AKT1 -2.84 OKAY	APC -4.19 OKAY	AR -35.90 OKAY	ATM -2.04 OKAY	BAD -2.09 OKAY	BCL2 -28.76 OKAY	BIRC5 -36.91 OKAY	BRCA1 1.14 OKAY	BRCA2 2.39 OKAY
	CCNA1 26.61 A	CCND1 27.55 A	CCND2 -3.45 A	CCNE1 76.85 A	CDH1 569.68 A	CDH13 -2.88 OKAY	CDK2 1.53 OKAY	CDKN1A 4.45 OKAY	CDKN1C -4.16 OKAY	CDKN2A -49.38 A	CSF1 -21.65 A	CST6 -47.70 A
	CTNNA1 -2.52 OKAY	CTSD 334.07 A	EGF 9.95 A	EGFR 2.18 A	ERBB2 51.41 A	ESR1 53.22 A	ESR2 8.78 A	FOXA1 -2.09 OKAY	GATA3 -1.30 OKAY	GLI1 1.09 OKAY	GRB7 -2.42 OKAY	GSTP1 -41.53 OKAY
D	HIC1 2.74 A	ID1 3.74 OKAY	IGF1 -1.38 OKAY	IGF1R 610.56 A	IGFBP3 20.59 A	IL6 2.26 B	JUN 231.36 A	KRT18 2039.50 A	KRT19 110.20 A	KRT5 2.02 OKAY	KRT8 1.76 OKAY	MAPK1 26.06 A
	MAPK3 9.03 OKAY	MAPK8 54.72 A	MGMT -7.92 OKAY	MKI67 55.10 A	MLH1 33.68 A	MMP2 -11.05 OKAY	MMP9 -9.75 OKAY	MUC1 3.90 OKAY	MYC 113.30 A	NME1 21.62 OKAY	NOTCH1 29.12 A	NR3C1 -1.17 OKAY
	PGR -2.40 OKAY	PLAU -37.95 OKAY	PRDM2 12.76 A	PTEN 3.49 OKAY	PTGS2 -15.31 OKAY	PYCARD 2.74 OKAY	RARB 5.95 A	RASSF1 -1.64 OKAY	RB1 11.35 OKAY	SERPINE1 -3.67 OKAY	SFN 33.92 A	SFRP1 33.68 A
G	SLC39A6 160.23 OKAY	SLIT2 23.98 A	SNAI2 23.33 A	SRC 4.39 A	TFF3 11.75 OKAY	TGFB1 -3.22 OKAY	THBS1 -5.56 OKAY	TP53 2.19 OKAY	TP73 2.23 OKAY	TWIST1 25.71 A	VEGFA 177.79 A	XBP1 14.06 OKAY

Şekil 5. MCF-7 (HTB-22) meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi

ER-, PR- ve HER2 amplifikasyonu olmayan metastatik adenokarsinom özellikteki insan kökenli **MDA-MB-231** kök hücrelerinde MMP9 ve MKI67 genlerinde belirgin azalırken ABCB1 ve SLC39A6 gen ekspresyonlarında artmıştır.

MDA-MB-231 normal vs kök hücre
Visualization of log₂(Fold Change)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 2.13 A	ABCG2 -2.52 A	ADAM23 -2.96 B	AKT1 -6.76 OKAY	APC -1.17 A	AR -2.46 B	ATM -4.19 OKAY	BAD -2.32 OKAY	BCL2 -3.31 OKAY	BIRC5 -7.19 B	BRCA1 -7.98 OKAY	BRCA2 -5.30 OKAY
	CCNA1 -1.39 OKAY	CCND1 -2.20 OKAY	CCND2 -1.46 OKAY	CCNE1 -5.84 OKAY	CDH1 1.10 A	CDH13 -3.07 B	CDK2 -12.61 OKAY	CDKN1A -1.31 OKAY	CDKN1C 1.28 OKAY	CDKN2A -1.36 B	CSF1 -8.91 OKAY	CST6 -2.14 B
C	CTNNB1 -10.10 OKAY	CTSD 1.08 OKAY	EGF -2.29 OKAY	EGFR -8.79 OKAY	ERBB2 -3.65 OKAY	ESR1 -4.74 A	ESR2 -3.09 A	FOXA1 -2.23 A	GATA3 -2.90 A	GLI1 -3.04 A	GRB7 1.05 A	GSTP1 -1.77 OKAY
	HIC1 -4.37 OKAY	ID1 -1.14 OKAY	IGF1 -4.49 A	IGF1R -4.52 OKAY	IGFBP3 -1.90 OKAY	IL6 -4.98 OKAY	JUN -2.08 OKAY	KRT18 -3.07 OKAY	KRT19 -1.23 OKAY	KRT5 -3.07 A	KRT8 -5.08 OKAY	MAPK1 -2.47 OKAY
E	MAPK3 -4.30 OKAY	MAPK8 -3.09 OKAY	MGMT -4.65 OKAY	MKI67 -23.52 OKAY	MLH1 -3.75 OKAY	MMP2 -6.80 OKAY	MMP9 -79.67 OKAY	MUC1 -6.85 OKAY	MYC -1.81 OKAY	NME1 -1.34 OKAY	NOTCH1 -5.05 OKAY	NR3C1 -1.34 OKAY
	PGR -2.01 OKAY	PLAU -12.87 OKAY	PRDM2 -4.49 OKAY	PTEN -1.15 OKAY	PTGS2 -5.16 OKAY	PYCARD -4.65 OKAY	RARB -5.92 OKAY	RASSF1 -4.88 OKAY	RB1 -2.09 OKAY	SERPINE1 -8.26 OKAY	SFN -3.93 OKAY	SFRP1 -5.08 OKAY
G	SLC39A6 2.68 OKAY	SLIT2 -2.44 OKAY	SNAI2 1.45 OKAY	SRC -5.16 OKAY	TFF3 -3.85 OKAY	TGFB1 -13.60 OKAY	THBS1 -6.09 OKAY	TP53 -1.74 OKAY	TP73 -5.76 OKAY	TWIST1 -6.76 OKAY	VEGFA -5.16 OKAY	XBP1 -5.41 OKAY

Şekil 6. MDA-MB-231 meme kanseri normal ve kök hücrelerinin gen ekspresyon farklılıklarının heat map analizi

RT-PCR analizlerinde moleküler ve biyolojik olarak farklı olduğu bilinen dört farklı meme kanser hattı hücreleri ve bu hücre hatlarına ait kanser kök hücrelerinde 5 genin fazla oranda ekprese edildiği tespit edilmiştir. Bu genler sinyal transdüksiyonu ve apoptoz ilişkili AKT1 geni; angienez, epitelyal-mezenkimal dönüşüm ve steroid aracılı sinyal ileti ilişkili CTNNB1 geni; adezyon ve angienezde rol oynayan THBS1 geni, DNA hasarı ve apoptoz ilişkili Tp53 ve transkripsiyon faktörü XBP1 genleridir.

5. TARTIŞMA

Tümör örneklerinin analizinde genomik teknolojinin kullanılması, klinik kararı ve prognozu iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Meme kanserinden ölüm oranını azaltmak için meme kanseri başlangıcı ve progresyonunun moleküler yapısını anlayarak bu bilgi ile moleküler temelli hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda çok önem kazanmıştır . Meme kanseri tek bir hastalık olmayıp biyolojik olarak farklı hastalıkların topluluğudur. Meme kanserine bağlı denetimsiz hücre çoğalması genellikle genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikleri sergiler. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastada tümörün özelliklerinin bilinmesi ve buna uygun tedavi yönteminin belirlenmesi önemlidir. İnsan kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem prognostik/prediktif olma potansiyeline sahiptir. Tanı , tedavi ve prognozda bütün bu gelişime rağmen, meme kanserinde rekürrens ve metastaz gibi durumları açıklamak için aynı zamanda meme kanseri kök hücrelerin özelliklerinin de anlaşılması gerekmektedir.

Meme kanseri kök hücreleriyle ilgili ilk kanıt oluşturan çalışma meme kanseri konusunda önemli çalışmaları bulunan iki grubun (Clarke MF ve Dontu G) birlikte 2003 yılında yayınladıkları çalışmadır. (13) Bu çalışmada, tumor hücreleri primer meme tümörü bulunan hastaların taze tumor dokularından ve metastatic meme kanseri bulunan 7 hastanın torasentez yapılarak plöral efüzyon sıvılarından izole edilmiştir. Tümör hücrelerinden oluşan hücre süspansiyonları elde edildikten sonra belli özelliklerdeki tümör hücreleri FACS (fluorescence-activated cell sorting) kullanılarak seçilmiştir. Adezyon molekülleri CD44 ve CD24, meme-over kanser spesifik markırı B38.1 ve ESA (epithelial specific antigen) FACS markırları olarak kullanılmıştır.hemen hemen tüm CD44+ kök hücrelerin aynı zamanda B38.1+ olduğu anlaşıncı B38.1 kullanımından vazgeçilerek B38.1 çalışma dışı bırakılmıştır. Daha sonra izole edilen tümör hücreleri NOD/SCID farelerde meme dokusu epiteli temizlenmiş yağ yastıkçıklarına transfer edilmiştir (xenotransplantation). Transfer çalışmasında fareye ne kadar sayıda CD44+CD24+ hücre transfer edilirse edilsin herhangi bir tumor oluşumunun olmadığı görülmüştür. Bununla beraber CD44+CD24- ve CD44+CD24-ESA+ hücrelerin transfer edildiği bütün primer tumor hücrelerinin farede tumor oluşturduğu tespit edilmiştir. Immune kompromize

farelerde CD44+CD24- hücrelerin diğer hücelere göre 10 ila 50 kat daha fazla tumor oluşturma kapasitesinin olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca 2×10^5 CD44+CD24- ve CD44+CD24+ hücre farelere transfer edilmiş ve bu fare grubu 6 ay izlenmiştir. CD44+CD24- hücrelerin transfer edildiği fare grubunda tumor oluşumu görülürken CD44+CD24+ hücrelerin transfer edildiği farelerde tumor oluşumuna rastlanılmamıştır. Sonuç olarak farelere transfer edildiğinde CD44+CD24- fenotipindeki tümörojenik hücrelerin sadece tümörojenik hücreler oluşturmadığı aynı zamanda tümörojenik olmayan CD44+CD24+ hücreleri de oluşturduğu belirtilmiştir. Bütün bu bulgular ışığında CD44+CD24- fenotipindeki tümörojenik hücrelerin kendini yenileme ve differansiasyon özelliklerinin olduğu vurgulanmıştır. Benzer olarak bizim çalışmamızda da kullanılan dört farklı meme kanser hücre hattında hücre hattına spesifik tümörojenik karakterde CD44+CD24- fenotipinde hücrelerin olduğu tespit edilmiş ayrıca meme kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında o gruba ait meme kanseri kök hücrelerinde karsinogenezle ilgili belirli genlerin ekspresyonunda anlamlı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.

Meme kanserinin moleküler sınıflamasına göre farklı özellikteki tumor hücrelerinin köken aldığı düşünülen kök hücre özelliği taşıyan hücrelerle ilgili yapılan başka bir çalışmada ER+ meme kanseri hücrelerinin kök hücre özelliği taşıyan hücrelerinde de ER+ olarak bulunmuş (41). Meme dokusunu oluşturan hücrelerin başlangıçta ER- hücrelerden differansiasyona başladığı terminal dönemde oluşan ER+ hücrelerin BRCA1 etkisiyle bu forma dönüştüğü gösterilmiştir (42). Bizim çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarının 3'ü ER+ ekspresyon gösterirken birinde ER ekspresyonu bulunmamaktaydı. Gerek kanser hücre hatlarında gerekse bu hücre hatlarının kök hücrelerindeki gen ekspresyonlarına bakıldığında her grupta farklı genlerde değişimler izlenmiştir. Bu değişiklikler ER, PR ve HER2 ekspresyonları tamamen aynı olan HTB 22 ve HTB 133 hücre hatlarında da görülmüştür. Örneğin HTB 22 hücrelerinin kök hücrelerinde TFF3 ekspresyonu artarken HTB 133 hattındaki incelemede bu ekspresyonun azaldığı görülmüştür. Daha önce bahsedilen çalışmayla birlikte değerlendirildiğinde ER,PR ve HER ekspresyonu aynı olan tümörlerin içlerinde farklı genetik özelliğe sahip kök hücre benzeri hüclereri barındırdıkları söylenebilir.

Hücre siklüsunda regulator görevi gören siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1 (CDKI1) insanlarda 6 kromozomda bulunan CDKN1A geni tarafından kodlanmaktadır (43-46). Metastatic fare meme kanserleriyle ilgili yapılan çalışmalarda CDKI1'in hem primer tümörde hem de metastazda arttığı tespit edilmiştir (47,48). İnsan primer tumor kaynaklı HTB 20 kanser hücre hattından ayrılan kök hücre benzeri hücrelerde bu genin ekspresyonunun kanser hücrelerine oranla anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Tümü metastatic tumor katynaklı diğer üç meme kanseri hücre hattında bu genin ekspresyonu kök hücre benzeri hücrelerde kanser hücreleriyle benzerlik göstermektedir.

Vasküler endothelial büyüme faktörü A VEGFA geni tarafından kodlanmakta olan bir proteindir. Anjiogenez ve hücre migrasyonunu uyarırken apoptozu inhibe etmektedir. Birçok metastatic kanserde vegfa blokörü olan bevsizumab halen kullanılmaktadır (49). Metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılması önerilirken 2011 yılında amerikada bu uygunluk önerisinden vazgeçilmiştir. Bunun sebebi metastatic meme kanserinde sağ kalım üzerine etkinliğinin net olarak gösterilememesi olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda metastatic meme ca kökenli HTB 133 hücre hattının kök hücre benzeri hücrelerinde, aynı hattın tüör hücrelerine oranla VEGFA ekspresyonunun anlamlı arttığı görülmüştür. Metastatik ortamda bulunan meme kanseri kök hücre benzeri hücrelerdeki bu ekspresyon artışının VEGFA'nın tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Metastatik orijinli MDA-MB 231 ve HTB 133 hücre hatlarında kanser hücreleri ve kanser kök hücre benzeri hücrelerde VEGFA da ekspresyon değişikliği görülmemiştir.

Beta-katenin hücre-hücre adezyonu ve gen transkripsiyonunun regülasyonu koordinasyonunda görev alan bir proteindir. CTNNB1 geni tarafından kodlanmaktadır (50,51). Mutasyon ve fazla ekspresyonunun hepatoselüler karsinom, kolorektal karsinom, malign meme tümörleri, over ve endometrium kanserleri ile ilişkilendirilmiştir (52). Ayrıca WNT sinyal yolağında görev alan beta-kateninin belli hücre gruplarında artmış ekspresyonu, o hücrelerdeki pluripotent özelliğin sağlanmasında etkili olduğu bildirilmiştir (53). Bizim çalışmamızda da primer tumor orijinli HTB 20 hücre hattında kök hücre benzeri hücrelerde CTNNB1 ekspresyonun artış göstermesi daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Metastatik

orijinli diğ er üç hücre hattında CTNNB1 ekspresyonunda anlamlı değ iş iklik bulunmamıştır.

Daha önce HTB 22 hücrelerinde yapılan bir çalış mada, artan c-JUN ekspresyonunun kanser hücrelerinde selüler motilite ve invazyon yeteneğini arttırarak tümörün daha agresif seyretmesine yol açtığı gösterilmiştir. Aynı çalış mada C-Jun fazla ekspresyonunun östrojen ve tamoksifen tedavisine direnç geliş iminde etkin olduğu bildirilmiş ve meme kanser hücrelerinin östrojen bağı msız hale geldiğı bildirilmiştir (54). Yine başka bir çalış mada Jun ekspresyon artış ının metastazla ilgili olduğu, karaciğ er metastazı yapan meme kanserlerinde bu ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (55). Ayrıca Jun ekspresyonunun meme kanseri kök hücrelerini yöneterek kanserin invaziv formda ilerlemesini sağ ladiğı başka bir çalış mada bildirilmiştir (56). Bu sonuçlarla karşı laştırıldığında HTB 20 kanser hücresi hattundan ayrılan kök hücre benzeri hücrelerde JUN ekspresyonunun arttığı nı saptadığımız bizim çalış mamızda literatürle benzer bulgular saptanmıştır.

Daha önce triple negative meme kanserlerinde ekspresyonunun arttığı bildirilen XBP1 HIF1 alfa ile birlikte etki ederek kanserin metabolizma ve anjiogenezinde etkin rol aldığı Kötü prognoz göstergesi olarak bildirilen bu ekspresyon artış ının tümörleri agresif ve tedaviye direnç li hale getirdiğı gösterilmiştir (57). Bizim çalış mamızda HTB 22 meme kanseri hücre hattının kök hücre benzeri hücrelerinde bu genin ekspresyonunda anlamlı artış tespit edilmiştir. Ayrıca çalış ılan tüm kanser hücreleri ve kök hücre benzeri hücrelerde bu genin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu literatürle benzerlik göstermektedir. Agresif ve tedaviye direnç li tümörlerde XBP1 ekspresyonunun incelenmesinin tedavi hedefi tespitinde etkili olabileceğı düşünülebilir.

Hücre proliferasyonu, differansiasyonu ve hücre siklusu progresyonunda görev alan ekstraselüler sinyal regülasyon kinazları ailesinden MAPK3 ekspresyonunun (58) HTB 22 hücre hattı kök hücre benzeri hücrelerde arttığı tespit edilmiştir. Henüz differansiasyonunu tamamlamamış kök hücre benzeri hücrelerde bu ekspresyonun kanser hücresine göre daha fazla olması, bu gen ürününün görevi göz önünde bulundurulduğ unda beklenen bir sonuç olduğunu düşünölmektedir.

Meme kanserli hastaların tümör hücreleri metilasyon profillerinin incelendiği bir çalışmada ADAM 23 geninin control grubuna göre daha az ekprese olduğu ve bu özelliğin tümörün metastaz yeteneğini arttırdığı tespit edilmiştir (59). Yine başka bir çalışmada ER+ meme kanserinde artmış GSTP1 metilasyonunun tümörün daha agresif seyretmesine neden olduğu ancak tümör davranışıyla ekspresyon seviyesinin ilişkili olmadığı bildirilmiştir (60). Bizim çalışmamızda metastatic orijinli HTB 22 tümör hücre hattından elde edilen kök hücre benzeri hücrelerde bu iki genin aynı hattın kanser hücrelerine göre daha az ekprese olduğu görülmüştür.

Normal dokuda üreme, yara iyileşmesi ve anjiogenz gibi fizyolojik olaylarda ekstraselüler matriksin degradasyonu görevini üstlenen MMP2 ve MMP9 gen ürünleri kanser invazyon ve metastazında önemli etkiye sahiptirler. Örneğin metastatic meme kanserinde ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (61). Yine bazı insan kanserlerinde invazyon ve metastaz ilişkileri tespit edilmiş, tümörün agresif seyrinden sorumlu tutulmuşlardır (62). Bizim çalışmamızda Adam 23 ve GSTP1 örneğinde olduğu gibi metastatik orijinli HTB 22 tümör hücre hattından elde edilen kök hücre benzeri hücrelerde bu iki genin aynı hattın kanser hücrelerine göre daha az ekprese olduğu görülmüştür. Bu bulgu literatürle çelişir gibi görülmüşse, metastaz yapmış bir tümörün barındırdığı kök hücre benzeri hücrelerin de, differansiasyona uğramış hücreler olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

AKT1 normal meme dokusunun gelişiminde önemli bir oynarken meme kanseri inisiasynu ve progresyonunda da önemli bir role sahiptir. İnsan kanserlerinde ekspresyonu en sık artan genlerden biridir. Bu yüzden de kanser gelişiminin anlaşılması ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde AKT1 rolünün iyi anlaşılması gerektiği düşünülmektedir. Hücre siklusu artan AKT1 aktivasyonu ile G1 ve G2 fazındaki kontrol noktalarını atlayarak kontrolsüz çoğalma yönünde ilerlemektedir (63). Bu da kanser oluşumunda önemli bir etkidir. Bu bilgilerle uyumlu olarak çalışmaya dahil ettiğimiz farklı özellikteki tüm kanser hücre serilerinde ve bunlara ait kök hücre benzeri hücrelerde AKT1 gen ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur.

Anjiogenezin inhisyonu ve tümör büyümesinin engellenmesi lehine çalışan THBS1 gen ürünlerinin azalması kolorektal, pancreas, serviks, oral skuamoz hücre kanserlerinde kötü prognoz belirteci olarak gösterilmiştir. Meme ve prostat kanserinde yeterli bulgu olmamasına rağmen meme kanserinde artmış seviyesinin

artan VEGF nedeniyle koruyucu etki yapmadığı bildirilmiştir (64). Bizim çalışmamızda tüm kanser hücre hatları ve bu hatlara ait kök hücre benzeri hücrelerdeki artan THBS1 ekspresyonu literatürle uyumlu değildir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bizim çalışmamızda meme karsinogenezinde rol alan bazı genlerin ekspresyonlarında normal kanser hücre hattına göre kanser kök hücrelerinde anlamlı artma ve azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin özellikle hücre-hücre ilişkisi, anjiogenez, tümör migrasyonu ve proliferasyonu ve DNA hasar onarımı ilişkili genlerde olduğu görülmüştür. Kanser hücreleri ve kanser kök hücre benzeri hücrelerdeki gen ekspresyonlarında tespit edilen bu farklılıkların yanında AKT1, CTNNB1, THBS1, TP53 ve XBP1 gen ekspresyonlarının hem kanser hücrelerinde hem de kanser kök hücre benzeri hücrelerde artmış olduğu görüldü. Nihayi tedavi hedeflerinin, tüm bu genetik farklılıklar göz önüne alınarak planlanması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca farklı genetik yapı ve fenotipteki kanser hücre hatları ve bu hücre hatlarından elde edilen kök hücre benzeri hücrelerdeki gen ekspresyonlarının farklılıklar göstermesi asimetrik olarak çoğaldığı bilinen kanser kök hücrelerinin literatürde bildirilen kök hücre yüzey belirleyicileri CD44 ve CD24'e bakılarak ayrıştırılamayacağı görüşünü ortaya koymaktadır. Bu nedenle meme kanseri kök hücresi yerine ‘‘meme kanseri başlatan hücre’’ kavramının kullanılmasını önermekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2004) GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No. 5 Version 2.0. IARC Press, Lyon.
2. Denoix PF. Nomenclature classification des cancers [in French]. Bull Inst Nat Hyg (Paris) 1952; 7:743–748
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406:747-752
4. Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories and FDA Staff - In Vitro Diagnostic Multivariate Index Analysis, URL: www.fda.gov. Erişim tarihi 23.12.2008
5. Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. Cell Mol Life Sci. 2007; 64 (24):3248-60.
6. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. Cancer Res. 2006; 66 (4):1883-90.
7. Dario Ponti, Nadia Zaffaroni, Chiara Capelli, Maria Grazia Daidone Breast cancer stem cells: An overview European Journal of Cancer 42 (2006) 1219–1224.
8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414:105–11.
9. Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3:730–7.
10. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cells in human brain tumors. Cancer Res 2003;63:5821–8.
11. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumor-initiating cells. Nature 2004;432:396–401.
12. Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res 2004;64:7011–21.
13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:3983–8.
14. Emmanuelle Charafe-Jauffret, Christophe Ginestier and Daniel Birnbaum. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on BMC Cancer 2009, 9:202

15. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al.: Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100:672-679.
16. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al.: let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007, 131:1109-1123.
17. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F: The response of CD24(-/ low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1777-1785.
18. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor sub types in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418– 8423
19. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869–10874
20. Pusztai L, Ayers M, Stec J et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive 164 tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2406–2415
21. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10393–10398
22. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:560 –569
23. Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96
24. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367–5374
25. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R65
26. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5678 –5685
27. R.E. Mansel et al. (eds.), *Metastasis of Breast Cancer*, Netherlands: Springer 2008 279–305

28. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006; 66 (4):1883-90.
29. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324 (5935):1670-3.
30. Farnie G, Clarke RB. Breast stem cells and cancer. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006;(5):141-53.
31. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer –initiating cells. *Nature* 2007;445 (7123):111-15.
32. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE. et al. Identification of bronchoalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121 (6) : 823-35.
33. Xin L, Lawson DA, Witte ON. The sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *PNAS* 2005;102(19):6942-47.
34. Germano I, Swiss V, Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology* 2010;58(6): 903-10.
35. Dick JE, Wang JCY. Cancer stem cells: Lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology* 2005;15 (9):492-501.
36. Dontu G. Breast cancer stem cell markers- the rocky road to clinical applications. *Breast Cancer Research* 2008;10 (5):1-2.
37. Ruddon RW. *Cancer Biology*. Fourth edition. New York, Oxford University Pres, 2007;139.
38. Clarke RB. Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif.* 2005;38:375-86.
39. Chandler JM, Lagasse E. Cancerous stem cells: deviant stem cells with cancer-causing misbehavior. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1(2):13.
40. Schlenburg A, Brämswig K, Hermann H. Neoplastic stem cells: current concepts and clinical perspectives. *Rev Oncol Hematol.* 2010;76(2):79-98.
41. Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, Lindeman GJ, Vis- 170. vader JE: The emerging picture of the mouse mammary stem cell. *Stem Cell Rev* 2007, 3:114-123
42. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, Dontu G, Wicha MS: BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 1680-1685.
43. "Entrez Gene: CDKN1A cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)".

44. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (November 1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases". *Cell* 75 (4): 805–16. doi:10.1016/0092-8674(93)90499-G. PMID 8242751.
45. Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (November 1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression". *Cell* 75 (4): 817–25. doi:10.1016/0092-8674(93)90500-P. PMID 8242752.
46. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366(6456):701-4.
47. Klopffleisch R, Gruber AD (August 2009). "Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands". *Res. Vet. Sci.* 87 (1): 91–6. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.010. PMID 19185891.
48. Klopffleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD. (2010). "Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease". *Veterinary Pathology* 228 (1): 91–96. doi:10.1177/0300985810390826. PMID 21149845.
49. "FDA Commissioner announces Avastin decision Drug not to be safe and effective in breast cancer patients" (Press release). November 18, 2011.
50. Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG (September 1994). "Localization of the human CTNNB1 gene to 3p21: a region implicated in tumor development". *Genomics* 23 (1): 272–4. doi:10.1006/geno.1994.1493. PMID 7829088.
51. MacDonald BT, Tamai K, He X (July 2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Developmental Cell* 17 (1): 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016. PMC 2861485. PMID 19619488.
52. "beta-catenin signaling and cancer.". *BioEssays* 21 (12): 1021–30. Dec 1999. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:11021::AID-BIES63.0.CO;2-P. PMID 10580987.
53. Sokol SY (October 2011). "Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling". *Development* 138 (20): 4341–50. doi:10.1242/dev.066209. PMC 3177306. PMID 21903672.
54. Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P, Brown PH, Birrer MJ (October 1999). "cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype". *Oncogene* 18 (44): 6063–70. doi:10.1038/sj.onc.1202989. PMID 10557095.
55. Zhang Y, Pu X, Shi M, Chen L, Song Y, Qian L, Yuan G, Zhang H, Yu M, Hu M, Shen B, Guo N (2007). "Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model". *BMC Cancer* 7: 145. doi:10.1186/1471-2407-7-145. PMC 1959235. PMID 17672916.

56. Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N, Lisanti MP, Pestell RG (March 2010). "c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion". *J. Biol. Chem.* 285 (11): 8218–26. doi:10.1074/jbc.M110.100792. PMC 2832973. PMID 20053993.
57. Xi Chen, Dimitrios Iliopoulos ,Qing Zhang, Qianzi Tang, Matthew B. Greenblatt. "XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1a pathway". doi:10.1038/nature13119
58. Pettiford, S M; Herbst R (February 2000). "The MAP-kinase ERK2 is a specific substrate of the protein tyrosine phosphatase HePTP". *Oncogene (ENGLAND)* 19 (7): 858–69. doi:10.1038/sj.onc.1203408. ISSN 0950-9232. PMID 10702794.
59. Zmetakova I, Danihel L, Smolkova B, Mego M, Kajabova V, Krivulcik T, Rusnak I, Rychly B, Danis D, Repiska V, Blasko P. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma.* 2013;60(6):635-46. doi: 10.4149/neo_2013_082.
60. Miyake T1, Nakayama T, Kagara N, Yamamoto N, Nakamura Y, Otani Y, Uji K, Naoi Y, Shimoda M, Maruyama N, Shimomura A, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. Association of GSTP1 methylation with aggressive phenotype in ER-positive breast cancer. *Anticancer Res.* 2013 Dec;33(12):5617-23.
61. Morini M, Mottotese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, Albini A (2000). "The $\alpha 3\beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (mmp-9) activity". *International Journal of Cancer* 87 (3): 336–42. doi:10.1002/1097-0215(20000801)87:3<336::aid-ijc5>3.3.co;2-v. PMID 10897037.
62. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M (2012). "The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer". *Folia Histochem. Cytobiol.* 50 (1): 12–9. doi:10.2478/18691. PMID 22532131.
63. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR (March 1999). "Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (5): 2110–5.
64. Chen H, Herndon ME, Lawler J The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):597-614.

ÖZGEÇMİŞ
Araştırma Görevlisi
(Dr.) SAİT
MURAT DOĞAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	1315021734
Doğum Yılı:	1973
Vizajına Adresi:	52/52 sok no:13/6Katay 350350 İzmir/Türkiye
Telefon:	
e-posta:	saitmuratdogan@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Dercece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Hacettepe Üniversitesi	TIP FAKÜLTESİ (İNGİLİZCE)	TIP FAKÜLTESİ	Lisans	1997

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birimi	Görev Türü	Görev Dönemi
İZMİR TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ	Türkiye	İzmir	genel cerrahi	Teknik Personel	1997-
İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Türkiye	İzmir	genel cerrahi	İdari Personel	2003-2014

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınları Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tatmin Olunan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/otay/üyelik vb.)			

YAYINLARI

SCI, SSCI, ABCT indekslerine girilen çalışmada yayınlanmış makaleler

Sert, İsmail; Yavuzcu, Önder; Tugmen, Cem; Koca, Oğuz Deniz; Kiline, Selçuk; Dogan, Salt M.; Bal, Alişip; Kebabci, Eyup; Alparslan, Cüneyt; Karaca, Cezmi; Aksu, Nejat, A retrospektive analysis of long-term graft survival in 61 pediatric renal transplant recipients: A single-center experience, 2013, ANNALS OF TRANSPLANTATION
Yapıcı, Enver; Erkan, Nazif; Bayal, Umit; Yılmaz, Cengiz; Dogan, Murat, Metastatic tumours to the thyroid gland: report of 3 cases and brief review of the literature, 2011, RADIOLOGY AND ONCOLOGY
Sert, I.; Colak, H.; Tugmen, C.; Dogan, S. M.; Karaca, C., Anemia in Living Donor Kidney Transplantation, 2013, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Alparslan, Cüneyt; Dogan, Salt Murat; Koca, Engin; Elnes, Cengizhan; Kiline, Selçuk; Arslan, Nil; Kebabci, Eyup; Karaca, Cezmi; Yavuzcu, Önder; Aksu, Nejat, DO PRE-TRANSPLANT STABLE SYSTOLIC CARDIAC FUNCTION PLAY A ROLE ON SHORT-TERM SYSTOLIC CARDIAC FUNCTION AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION IN CHILDREN?, 2013, NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION
Ayru, T. K.; Soyöz, M.; Kartalınas, Y.; Dogan, S. M.; Ozyilmaz, B.; Tugmen, C.; Pirim, I., Comparison of Complement-dependent Cytotoxic and Flow-cytometry Crossmatch Results Before Cadaveric Kidney Transplantation, 2013, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Sert, İsmail; Dogan, Salt Murat; Tugmen, Cem; Kebabci, Eyup; Kayar, Ragıp; Karaca, Cezmi, THE EFFECT OF COLD ISCHEMIA TIME ON THE DELAYED GRAFT FUNCTION AND ACUTE REJECTION IN KIDNEY TRANSPLANTATION, 2011, TRANSPLANT INTERNATIONAL
Dogan, Salt Murat; Sert, İsmail; Tugmen, Cem; Kebabci, Eyup; Karaca, Cezmi, THE EFFECT OF ANTI CD-25 AB INDUCTION TREATMENT ON GRAFT FUNCTION IN THE ADOLESCENT KIDNEY TRANSPLANTATION FROM LIVE DONORS, 2011, TRANSPLANT INTERNATIONAL
Uslu, Adem; Postacı, Hakan; Yetiş, Halil; Selek, Elif; Nart, Ahmet; Corumlu, Buris; Zengel, Baki; Aykas, Ahmet; Dogan, Salt Murat, Longitudinal Surveillance of Mid- and Distal Rectum Cancer in a Subset of Patients with Specific Histology, 2011, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Nart, A.; Uslu, A.; Buzkaya, G.; Aykas, A.; Dogan, M.; Kartan, B., A Predict Algorithm for Hypertiproteinemia in Renal Transplant Recipients, 2009, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Uslu, A.; Toz, H.; Sen, S.; Alkan, F. T.; Nart, A.; Aykas, A.; Dogan, M.; Postacı, H.; Sahin, T.; Simsek, C., Late Conversion From Calcineurin Inhibitor-Based to Sirolimus-Based Immunosuppression Due to Chronic Toxicity: A Prospective Study With Protocol Biopsy Amendment, 2009, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Nart, Ahmet; Uslu, Adem; Aykas, Ahmet; Yuezbasoglu, Fatih; Dogan, Murat; Demirtas, Ozgecan; Simsek, Cenk, Total thyroidectomy for the treatment of recurrent Graves' disease with ophthalmopathy, 2008, ASIAN JOURNAL OF SURGERY
Uslu, Adem; Nart, Ahmet; Tasli, Funda Alkan; Postacı, Hakan; Aykas, Ahmet; Dogan, Murat; Sahin, Tamer, Sirolimus-based triple immunosuppression with antithymocyte globulin induction in expanded criteria donor kidney transplantation, 2008, NEPHROLOGY
Buzkaya, G.; Nart, A.; Uslu, A.; Corumlu, T.; Aykas, A.; Dogan, M.; Karaca, B., Impact of calcineurin inhibitors on bone metabolism in primary kidney transplant patients, 2008, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS

<https://arbis.tobitak.gov.tr/pages/bilgiisari/user/ozgecmisForm1.jsp?mode=print&run...> 02.07.2014

Uslu, A.; Nart, A.; Çoban, T.; Aykır, A.; Yüzbaşıoğlu, M. P.; Hidir, K.; Dogan, M.; Kalkan, K., Predictors of mortality and morbidity in acute obstructive jaundice: Implication of preventive measures, 2007, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Uslu, A.; Kızıls, C.; Nart, A.; Ağar, H.; Aykır, A.; Çakır, A.; Dogan, M. Adjuvant chemotherapy in a relapsing population of patients with gastric cancer undergoing surgery, 2004, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Uslu, A.; Nart, A.; Çoker, E.; Koca, S.; Aykır, A.; Kahya, M.; Yüzbaşıoğlu, M. P.; Dogan, M. Two-day induction with thymoglobulin in kidney transplantation: Risks and benefits, 2004, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Koc, D.; Nart, A.; Dogan, M.; Yıldırım, Y.; Özbakkaloğlu, M.; Uslu, A. Impact of subtotal parathyroidectomy and in situ preservation of the remnant on the metabolic and cardiac manifestations of secondary hyperparathyroidism, 2002, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Gurlek, A.; Kacar, S.; Varlıoğlu, C.; Tili, S.; Turan, V.; Dogan, M.; Döner, H.; Sahin, S., Exchange Donor Transplantation: Ethical Option for Living Renal Transplantation, 2011, TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
Alparslan, Caner; Yavaşcan, Onder; Can, Ender; Kose, Engin; Elmaz, Cengizhan; Saritas, Serdar; Tugmen, Cem; Dogan, Murat Sait; Karaca, Cezmi; Akso, Nejat, The Importance of Ambulatory Blood Pressure Monitoring in Children after Renal Transplantation, 2013, PEDIATRIC NEPHROLOGY
Akso, Nejat; Yavaşcan, Onder; Alparslan, Caner; Kose, Engin; Tugmen, Cem; Kiliç, Selçuk; Dogan, Murat Sait; Kebeci, Eyup; Olmez, Mustafa; Karaca, Cezmi, Do Pre-Transplant Stable Systolic Cardiac Functions Play A Role On Short-Term Systolic Cardiac Functions After Kidney Transplantation in Children?, 2013, PEDIATRIC NEPHROLOGY
Dogan, Murat; Tugmen, Cem; Kebeci, Eyup; Karaca, Cezmi; Ozurk, Safak; Olmez, Mustafa; Karaca, Cezmi; Bademkiran, Ender; Gorgun, Mehmet; Aydin, Cengiz, Effective Weight Control and Normalization of Metabolic Parameters after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: A Single Center Experience, 2013, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Alparslan, Caner; Bol, Alkan; Kose, Engin; Yavaşcan, Onder; Akso, Nejat; Gencer, İsmail; Tugmen, Cem; Dogan, Murat Sait; Kebeci, Eyup; Karaca, Cezmi, Graft Survival in Pediatric Renal Transplantation: A 15-year experience in a single center, 2012, PEDIATRIC NEPHROLOGY
Alparslan, Caner; Yavaşcan, Onder; Akso, Nejat; Dogan, Murat Sait; Tugmen, Cem; Kebeci, Eyup; Karaca, Cezmi, En-bloc pediatric kidney transplantation together with a partial bladder segment: a case report, 2012, PEDIATRIC NEPHROLOGY
Dogan, Murat; Tugmen, Cem; Kebeci, Eyup; Yıldırım, Umut; Karaca, Cezmi; Alparslan, Caner; Yavaşcan, Onder; Akso, Nejat, En-bloc pediatric kidney transplantation together with a partial bladder segment: a case report, 2011, PEDIATRIC NEPHROLOGY
Alparslan, Caner; Yavaşcan, Onder; Dogan, Murat Sait; Tugmen, Cem; Karaca, Cezmi; Ayvazoglu, Ali; Uzman, Ibrahim; Akso, Nejat, Kidney transplantation in a child with bladder dysfunction who underwent prior bladder augmentation: A case report, 2013, PEDIATRIC NEPHROLOGY

Diger dergilerde yayımlanan makaleler

Hakemli konferans/simpozyumların bildir kitaplarında yer alan yayınlar

Diger yayımlar

Düzenleme Tarihi 02/07/2014

<https://rbls.nabita.gov.tr/pages/bilgi/iruf/uzozgecmisForm1.jspx?mode=print&uz...> 02.07.2014