



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
VFZ-D-2015-0001

**YENİ BİR TEDAVİ OLARAK *İN VİTRO* VE FAREDE *İN VİVO* METASTATİK MEME KANSERİ MODELLERİNDE
Nav1.5 KANALININ HEDEFLENMESİ**

Doktora Tezi

Mümin Alper ERDOĞAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferda BELGE**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
VFZ-D-2015-0001

**YENİ BİR TEDAVİ OLARAK *İN VİTRO* VE FAREDE *İN VİVO* METASTATİK MEME KANSERİ MODELLERİNDE
Nav1.5 KANALININ HEDEFLENMESİ**

Doktora Tezi

Mümin Alper ERDOĞAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferda BELGE**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Mümin Alper ERDOĞAN tarafından hazırlanan “Yeni Bir Tedavi Olarak *In Vitro* ve Farede *In Vivo* Metastatik Meme Kanseri Modellerinde Nav1.5 Kanalının Hedeflenmesi” başlıklı tez, 27/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Ülker ÇÖTELİOĞLU

İÜ Veteriner Fakültesi

2- Prof. Dr. Ferda BELGE

ADÜ Veteriner Fakültesi

3- Prof. Dr. Muharrem BALKAYA

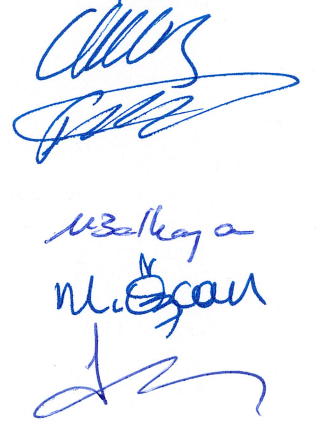
ADÜ Veteriner Fakültesi

4- Prof. Dr. Mukaddes ÖZCAN

İÜ Veteriner Fakültesi

5- Prof. Dr. Funda KIRAL

ADÜ Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Meme hastalıkları, kadınların en çok karşılaştıkları hastalıklardan biri olmakla beraber görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Meme kanseri de bunların arasında en sık görülen kanser tipi olarak başı çekmektedir. Kadınlardaki kanserlerin tümünün %23'ünden ve kanserle ilişkili ölümlerin %14'ünden sorumludur. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinin arkasından ikinci sırada gelmektedir, ancak 40-59 yaş arası kadın ölümlerinin ana nedenidir. Batı ülkelerinde yaşamı boyunca her 8-9 kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır.

Meme kanseri gelişiminde bir çok farklı faktör rol oynayabilmektedir. Bunlar arasında yaş, kilo (obezite), sigara ve alkol kullanımı, uzun süreli menstrüasyon dönemi geçirmiş olmak, oral kontraseptiflerin kullanımı, menapoz sonrası hormon replasman tedavisi alma ve ileri yaş dönemindeki doğumlar yer almaktadır. Meme kanseri olgularının %95'i kendiliğinden meydana gelmesine rağmen, ailesel geçmiş ve genetik yatkınlık da meme kanseri görülme sıklığını etkilemektedir.

Artmış metastazın, uyarılabilir membranların karakteristiği olan akımlar ve membran kanallarının varlığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum öncelikle yüksek derecede metastatik kanser hücre hatları yanı sıra metastatik meme, prostat ve servikal karsinoma biyopsilerinde artmış ekspresyonu tespit edilmiş olan voltaj-kapılı Na^+ kanallarıyla (VGSC) ilgilidir. Bu kanalların aktivitelerinin motiliteyi, endositozu ve invazyonu desteklediği belirlenmiştir. Özellikle $Nav1.5$ kanalının *in vitro* yüksek metastatik potansiyele ve *in vivo* olarak meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Klinik olarak da lenf nodu metastazı görülen hastalarda $Nav1.5$ ekspresyonu artışı ile korelasyon bulunmaktadır. Buna karşın, zayıf metastatik ya da tümorojenik olmayan hücre hatlarının fonksiyonel voltaj-kapılı Na^+ kanalı ekspresyon etmedikleri görülmüştür.

Dünyada ve ülkemizde kanser vakalarının sayısı her geçen gün artmaktadır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra Türkiye'deki toplam ölümlerin ikinci nedenidir. Yapılan tahminler, kanser insidansının önümüzdeki yıllarda da yüksek olacağını göstermektedir. Bunun sonuçları; insan ömründe ve yaşam kalitesindeki azalmanın yanı sıra bu hastalık nedeniyle sağlık sektörünün ve ülkenin karşı karşıya kalacağı ekonomik yükün de artmasıdır. Bu nedenlerle kansere karşı açılan savaşta terapötik amaçla potansiyel

gücü ve popülaritesi artan yeni tedavi girişimlerinin geliştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesi hem dünya hem de ülkemiz için büyük önem arz etmektedir.

Bu nedenlerle çalışmamızda meme kanseri gelişimi ve metastazı üzerinde Nav1.5 kanalının Adult ve Neonatal alt tiplerinin olası rolleri ve etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla siRNA ile gen susturma yöntemi kullanılmıştır. *In vitro* deneyler olarak hücre proliferasyonu testi, koloni oluşturma kapasitesi, invazyon ve migrasyon yeteneği ile ilişkili testler, flow sitometri ile apoptoz ve hücre siklusu analizi, kemoterapötik dirençliliğine olan etkiler, tüm bunlar ile ilişkili protein yollarının değerlendirilmesi için Western blot analizi ve kanal tiplerinin mRNA ekspresyonları için Real-Time ve RT-PCR deneyleri gerçekleştirildi. *In vivo* ksenograft ortotopik meme kanseri modeli ve ksenograft akciğer metastaz modeli gerçekleştirilerek Nav1.5 siRNA tedavilerinin hem meme kanseri tümör büyümesi hem de metastaz kapasitesi üzerine olan etkileri değerlendirildi. Ayrıca tez çalışmamızda *in vivo* sistemik siRNA uygulaması için nanolipozomal ilaç taşıyıcıları kullanılmıştır. Bu da siRNA tedavisinin dolaşımdaki olası dezavantajlarını ve sistemik yan etkilerini minimuma indirerek, ayrıca da pasif olarak tümör dokusuna hedeflenmeyi sağlayarak bu yöntemin ileride klinikte kullanılabilmesine yönelik önemli veriler elde etmemizi sağlamıştır. Böylece kansere karşı savaşta bu yeni tedavi yaklaşımının etkinliğinin ve ayrıntılarının ortaya çıkmasıyla kanserin organizmadaki yayılımını ve iletişimini keserek onu kronik bir hastalık haline dönüştürebilmek, hatta bu geniş ve gelecek vadeden konudaki elde ettiğimiz veriler klinik araştırmalara da ilettilerek yakın gelecekte meme kanserinin tedavisine yönelik çok önemli bir yol kat edebilmek mümkün olacaktır.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ.....	01
1.1. Genel Bilgiler.....	03
1.1.1. Kanser.....	03
1.1.1.1. Kanser kutusu.....	08
1.1.1.2. Genetik değişiklikler	10
1.1.1.3. Epigenetik değişiklikler.....	11
1.1.1.4. Küresel kanser yükü.....	12
1.1.2. Meme Dokusu.....	14
1.1.3. Meme Hastalıkları.....	15
1.1.3.1. Meme kistleri.....	16
1.1.3.2. Granülomatöz mastit.....	16
1.1.3.3. Memebaşı dermatozları.....	17
1.1.3.4. Meme başı akıntısı.....	18
1.1.3.5. Jinekomasti (Erkeklerde meme büyümesi).....	19
1.1.3.6. Neoplastik lezyonlar.....	19
1.1.3.6.1. Fibroadenom.....	19
1.1.3.6.2. Filloides tümör.....	20
1.1.3.6.3. Adenom.....	21
1.1.3.6.4. Papillom.....	21
1.1.4. Meme Kanseri.....	21
1.1.4.1. Meme kanseri epidemiyolojisi.....	21
1.1.4.2. Meme kanseri patolojisi.....	24

1.1.4.2.1. Non-invaziv meme kanseri.....	25
1.1.4.2.2. İnvaziv meme kanseri.....	26
1.1.4.3. Meme kanseri moleküler biyolojisi.....	31
1.1.4.4. Meme kanseri metastazı.....	34
1.1.4.4.1. Primer tümörden hücrelerin ayrılması.....	35
1.1.4.4.2. Proteolitik enzimlerin sekresyonu yoluyla bazal membranın degradasyonu.....	36
1.1.4.4.3. İntravazasyon.....	36
1.1.4.4.4. İkincil bir dokuya adhezyon.....	36
1.1.4.4.5. Anjiyogenez.....	37
1.1.4.4.6. Metastaz supresör genler.....	37
1.1.4.4.7. Metastaz mekanizmaları.....	37
1.1.5. İyon Kanalları ve Kanser.....	40
1.1.6. Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalları.....	42
1.1.6.1. VGSC'lerin doku dağılımı.....	45
1.1.6.2. VGSC ve kanser metastazı.....	46
1.1.6.3. VGSC'lerin düzenlenmesi.....	48
1.1.7. RNA İnterferans (RNAi) Mekanizması.....	52
1.1.7.1. siRNA (Small interfering RNA, Küçük sessizleştirici/interferans RNA).....	53
1.2. Amaç.....	56
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
2.1. Gereç.....	59
2.1.1. Hücre Hatları.....	59
2.1.2. Kimyasallar, Tamponlar ve Solüsyonlar.....	59
2.1.2.1. 10 X PBS (Phosphate buffered saline).....	59
2.1.2.2. 10 X TBS (Tris buffered saline) stok solüsyonu.....	59
2.1.2.3. Yürütme/Transfer tamponu stok solüsyonu.....	59
2.1.2.4. 1 X Yürütme tamponu.....	60
2.1.2.5. 1 X Transfer tamponu.....	60
2.1.2.6. 1 X TBS-Tween-20.....	60
2.1.2.7. Protein lizis tamponu stok solüsyonu.....	60
2.1.2.8. Protein lizis tamponu çalışma solüsyonu.....	60

2.1.2.9. % 10'luk stok SDS çözeltisi.....	60
2.1.2.10. PCR yürütme tamponu (Tris Borat EDTA-TBE 10 X stok).....	60
2.1.2.11. 3X yükleme tamponu.....	60
2.1.2.12. Kullanılan diğer malzemeler, kimyasallar, solüsyonlar ve kitlerin listesi....	61
2.1.3. Primerler.....	63
2.1.4. siRNA Sekansları.....	64
2.2. Yöntem.....	65
2.2.1. Hücre Kültürü.....	65
2.2.1.1 Sterilizasyon.....	65
2.2.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının çoğaltımı ve idamesi.....	65
2.2.1.3. Pasajlama.....	66
2.2.1.4. Hücre stoklama, dondurma ve çözme.....	66
2.2.1.5. Hücrelerin sayımı.....	66
2.2.1.6. Tripan Blue boyama yöntemi.....	67
2.2.2. siRNA Transfeksiyonu.....	68
2.2.2.1. Kültür hücrelerine siRNA'ların dağıtılması.....	68
2.2.3. <i>İn Vitro</i> Deneyle.....	71
2.2.3.1. MTS hücre proliferasyon testi.....	71
2.2.3.2. Klonojenik testi (Klon oluşturabilme yeteneklerinin incelenmesi).....	71
2.2.3.3. İnvazyon testi (Hücrelerin invazyon yeteneklerinin incelenmesi).....	72
2.2.3.4. Migrasyon testi (Hücrelerin migrasyon yeteneklerinin incelenmesi).....	73
2.2.3.5. Yara iyileşmesi testi (Wound-healing assay).....	74
2.2.3.6. Total RNA eldesi.....	74
2.2.3.7. Total RNA miktar tayini.....	75
2.2.3.8. Revers transkripsiyon (cDNA sentezi).....	75
2.2.3.9. Primerlerin hazırlanışı.....	76
2.2.3.10. Real-Time PCR (qRT-PCR).....	76
2.2.3.11. Klasik PCR.....	77
2.2.3.12. Western Blot (WB) yöntemi.....	79
2.2.3.12.1. Protein izolasyonu.....	79
2.2.3.12.2. Protein miktarının ölçümü.....	80

2.2.3.12.3. Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE) yürütülmesi.....	81
2.2.3.12.4. Örneklerin yükleme için hazırlanması.....	81
2.2.3.12.5. Örneklerin jele yüklenmesi ve elektrofrez işlemi.....	81
2.2.3.12.6. Elektrobloiting (Protein örneklerinin nitroselüloz membrana aktarılması)	82
2.2.3.12.7. Bloklama.....	82
2.2.3.12.8. Membran üzerindeki proteinin immunolojik olarak gösterilmesi.....	83
2.2.3.12.9. Membran görüntüleme işlemi.....	83
2.2.3.12.10. Membranın tekrar kullanımı.....	83
2.2.3.13. Flow Sitometri ile hücre ölümünün araştırılması.....	84
2.2.3.14. Flow Sitometri ile hücre siklusunun araştırılması.....	84
2.2.4. <i>İn Vivo</i> Deneyler.....	86
2.2.4.1. Ksenograft akciğer metastaz modeli oluşturulması.....	86
2.2.4.1.1. Biyoluminesans görüntüleme sistemi (BLI)	86
2.2.4.2. Ksenograft ortotopik meme kanseri modeli oluşturulması.....	88
2.2.5. İstatistiksel Analiz.....	89
3. BULGULAR.....	90
3.1. <i>İn Vitro</i> Deney Bulguları.....	90
3.1.1. Hücre Proliferasyonu Üzerine Olan Etkiler.....	90
3.1.1.1. Normal meme epiteli hücre hattı üzerine olan etkiler.....	92
3.1.1.2. Hedef tedavinin ilaç dirençliliği üzerine olan etkileri.....	93
3.1.2. Hücrelerin Koloni Oluşturabilme Yeteneklerine Üzerine Olan Etkiler.....	94
3.1.3. Hücrelerin İnvazyon Yetenekleri Üzerine Olan Etkiler.....	97
3.1.4. Hücrelerin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Olan Etkiler.....	99
3.1.5. PCR İle İlgili Bulgular.....	100
3.1.5.1. Real-Time PCR metoduna ilişkin bulgular.....	100
3.1.5.2. Klasik PCR metoduna ilişkin bulgular.....	102
3.1.6. Western Blot İle İlgili Bulgular.....	104
3.1.7. Yara İyileşmesi Testine İlişkin Bulgular.....	111
3.1.8. Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular.....	111
3.1.9. Hücre Siklusuna İlişkin Bulgular.....	112
3.2. <i>İn Vivo</i> Deney Bulguları.....	113

3.2.1. Ksenograft Akciğer Metastaz Modeli.....	113
3.2.2. Ksenograft Ortotopik Meme Kanseri Modeli.....	115
4. TARTIŞMA.....	120
5. SONUÇ.....	138
ÖZET.....	141
SUMMARY.....	143
KAYNAKLAR.....	145
ÖZGEÇMİŞ.....	194
TEŞEKKÜR.....	195

SİMGELER ve KISALTMALAR

Apaf-1	: Apoptotic Protease Activating Factor 1/Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutated
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma 2
BLI	: Bioluminesans Görüntüleme
BRCA1	: Breast Cancer 1, Early Onset
BRCA2	: Breast Cancer 2, Early Onset
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAM	: İmmünglobülin-Benzeri Adezyon Molekülleri
CAM kinaz II	: Kalsiyum Kalmodulin Kinaz II
Caspase-3	: Apoptosis-Related Cysteine Peptidase 3
Caspase-9	: Apoptosis-Related Cysteine Peptidase 9
CCD	: Charge Coupled Device
CCND1	: Cyclin D1
cdc2	: Cyclin-Dependent Kinase 1
CDK	: Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2a	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A geni
cDNA	: Komplementer DNA
CHEK2	: Checkpoint Kinase 2
Ct	: Cycle Threshold/Eşik Döngü Değeri
CTNNB1	: Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1
DKIS	: Duktal Karsinoma <i>İn Situ</i>
DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMPC	: 1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
DOPC	: 1,2-Dioleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine
DR5	: Death Receptor 5
dsRNA	: Double-strand RNA
ECM	: Ekstraselüler Matriks/Extracellular Matrix
EF2k	: Elongation Factor 2 Kinase
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2 α	: Elongasyon İnisiyasyon Faktör 2 Alfa
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition/Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
Eph	: Ephrin/Efrin Reseptörleri
ER	: Östrojen Reseptörü
ERK1/2	: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

ER α	: Östrojen Reseptör- α
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FHF1B/FGF12	: Fibroblast Büyüme Faktörü Homolog Faktörü 1B
FITC	: Fluorescein İsothiocyanate
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GDNF	: Glial Kaynaklı Nörotrofik Faktör
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIN-1	: High in Normal-1
hMLH1	: Human Mutl Homolog 1
hMSH2	: Human Muts Homolog 2
HRP	: Horseradish Peroxidase
HUVEC	: İnsan Umbilikal Endotelyal Hücrelerinin
IARC	: International Agency on Cancer for Research
IFM motif	: Ile-Phe-Met Motifi
IGF-I	: İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü-I
KRAS	: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LKIS	: Lobüler Karsinoma <i>In Situ</i>
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MBA	: Meme Başı Akıntısı
miRNA	: Mikro RNA
MMP	: Matrix Metalloproteinase
MMP-2	: Matrix Metalloproteinase-2
MPH	: Memenin Paget Hastalığı
mRNA	: Messenger RNA
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MYC	: V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	: Sodyum/Potasyum ATPaz
Nav1.5	: Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalı 1.5
Nedd4	: Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated Protein 4
Nedd4-2	: Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated Gene 4-Like
NESO pAb	: nNav1.5'e Karşı Spesifik Bir Antikor
NF- κ B	: Nuclear Factor κ B
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NHE1	: Na ⁺ /H ⁺ Exchanger İsoform 1
Nm23	: Non-metastatik gen 23
nNav1.5	: Neonatal Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalı 1.5
P130Cas	: Crk-Associated Substrate p130Cas
p14ARF	: ARF Tumor Suppressor
p16	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A proteini
p21	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1/CDK-İnteracting Protein 1

p27	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B
p27KIP1	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B
PARP	: Poly ADP Ribose Polymerase
PAZ	: Piwi – Argonaute - Zville bölgesi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
P-ERK	: Phospho-Extracellular Signal-Regulated Kinase
P-FAK	: Phospho-Focal Adhesion Kinase
PI	: Propidyum İyodür
P-IF2 α	: Phospho-Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha/Fosfo-Elongasyon İnisiyasyon Faktör 2 Alfa
PIWI	: P-Element Induced Wimpy Testis
piRNA	: Piwi-interacting RNA
PKA	: Protein Kinase A
PKB/Akt	: Protein kinase B
PKC	: Protein Kinase C
PKC δ	: Protein Kinase C- δ
PMS	: Phenazine Methosulfate
P-NF κ B	: Phospho-Nuclear Factor κ B
P-PI3K	: Phospho-Phosphoinositide 3-Kinase
PS	: Fosfatidilserin
P-SRC	: Phospho-Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog
PTGS	: Post-Transcriptional Gene Silencing
PVDF	: Polyvinylidene Difluoride
RAR β 2	: Retinoik Asit Beta 2
Ras	: Rat Sarcoma Viral Oncogene
RB1	: Retinoblastoma 1
RE-1	: Transcriptional Repressor Element-1
RISC	: RNA Induced Silencing Complex/RNA İndüklü Sessizleştirme Kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA interference
RNaz	: Ribonükleaz
RNaz H	: Ribonükleaz H
RPTP β	: Reseptör benzeri protein fosfataz β
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCLC	: Küçük-Hücreli Akciğer Karsinomu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SGK1	: Serum ve glukokortikoid indüklenebilir kinaz 1
SGK3	: Serum ve glukokortikoid indüklenebilir kinaz 3

Sipal	: Sinyal-İndüklemeli Proliferasyon-İlişkili Gen 1
siRNA	: Small Interfering RNA, Küçük Sessizleştirici/İnterferans RNA
Src	: Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase/Rous Sarcoma Virus
SSS	: Santral Sinir Sistemi
Targetoid Patern	: Bull's-Eye/Öküz Gözü Paterni
TBE	: Tris Borat EDTA
TBS	: Tris Buffered Saline
TGF- α	: Transforming Growth Factor Alpha
Tie	: Tyrosine-Protein Kinase Receptor
TP53/p53	: Tumor Protein P53
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TTX	: Tetrodotoksin
uPA	: Urinary-Type Plasminogen Activator
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VGCC	: Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalı
VGPC	: Voltaj-Kapılı Potasyum Kanalı
VGSC	: Voltage Gated Sodium Channels/Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü/ World Health Organization
YSH	: Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları

ÇİZELGELER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	Doğrulanmış meme kanseri risk faktörleri ve koruyucu faktörler	22
Çizelge 1.2.	Meme kanserinin histolojik sınıflaması	24
Çizelge 1.3.	VGSC α 'nın kromozomal ve doku dağılımı ile TTX duyarlılığı	44
Çizelge 2.1.	siRNA hesaplama yöntemi	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Kanser kutusu	10
Şekil 1.2.	Memenin tanjensiyel ve sagital kesimi	15
Şekil 1.3.	İn situ duktal karsinom	25
Şekil 1.4.	Pleomorfik lobuler karsinoma in situ	26
Şekil 1.5.	İnvaziv duktal karsinoma	27
Şekil 1.6.	İnvaziv lobüler karsinoma solid patern	28
Şekil 1.7.	Medüller karsinoma	29
Şekil 1.8.	Tübüler karsinoma	29
Şekil 1.9.	İnvaziv kribriform karsinoma	30
Şekil 1.10.	Müsinöz karsinoma	31
Şekil 1.11.	Metastaz	35
Şekil 1.12.	Voltaj-kapılı Na kanalı α altünitesi yapısı	43
Şekil 1.13.	Voltaj-kapılı Na kanalı inaktivasyon kapısı	43
Şekil 1.14.	nNav1.5 gen ve proteininde alternatif splicing alanının lokalizasyonu	47
Şekil 1.15.	VGSC α 'nın çeşitli kinazlar aracılığıyla uğradığı fosforilasyon ve glikozilasyon paterni.	49
Şekil 1.16.	RNA İnterferans Mekanizması	55
Şekil 2.1.	Biyoluminesans görüntüleme sistemi (BLI)	88
Şekil 3.1.1.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre profilerasyonu üzerine etkileri	90
Şekil 3.1.2.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücre profilerasyonu üzerine etkileri	91
Şekil 3.1.3.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MCF7 hücre hattında hücre profilerasyonu üzerine etkileri	92

Şekil 3.1.4.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MCF10A hücre hattında hücre profilerasyonu üzerine etkileri	93
Şekil 3.1.5.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında Paklitaksel ile kombinasyonunun hücre profilerasyonu üzerine etkileri	94
Şekil 3.1.6.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri	95
Şekil 3.1.7.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri	96
Şekil 3.1.8.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MCF7 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri	97
Şekil 3.1.9.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri	98
Şekil 3.1.10.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri	99
Şekil 3.1.11.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin migrasyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri	100
Şekil 3.1.12.	MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Adult Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	101
Şekil 3.1.13.	MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	102
Şekil 3.1.14.	MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	103
Şekil 3.1.15.	MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Integrin β 1 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	103
Şekil 3.1.16.	MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Cyclin D1 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	104
Şekil 3.1.17.	Meme kanseri hücre hatlarında Adult Nav1.5 kanalının protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve spesifik Nav1.5 siRNA'sının MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hattında Adult Nav1.5 protein ekspresyon düzeyi üzerine etkileri	105

Şekil 3.1.18.	MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri	106
Şekil 3.1.19.	MDA-MB-468 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri	107
Şekil 3.1.20.	MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri gelişimi, hücre proliferasyonu, büyüme ve translasyon ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri	108
Şekil 3.1.21.	MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının hücre siklusu ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri	109
Şekil 3.1.22.	MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının apoptoz ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri	110
Şekil 3.1.23.	MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) ve invazyon/migrasyon/metastaz ilişkili (MMP-2) protein düzeyleri üzerine etkileri	110
Şekil 3.1.24.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre ölümü üzerine olan etkileri	111
Şekil 3.1.25.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre ölümü üzerine olan etkileri	112
Şekil 3.1.26.	Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre siklusu üzerine olan etkileri	113
Şekil 3.2.1.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft akciğer metastaz modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının akciğer metastazı üzerine olan etkilerine ait 1.hafta görüntüleme verileri	114
Şekil 3.2.2.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft akciğer metastaz modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının akciğer metastazı üzerine olan etkilerine ait son hafta görüntüleme verileri	115

Şekil 3.2.3.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör hacmi üzerine olan etkileri	116
Şekil 3.2.4.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör ağırlığı üzerine olan etkileri	116
Şekil 3.2.5.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının fare ağırlığı üzerine olan etkileri	117
Şekil 3.2.6.	MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör hacmi üzerine olan etkileri	118
Şekil 3.2.7.	MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör ağırlığı üzerine olan etkileri	118
Şekil 3.2.8.	MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının fare ağırlığı üzerine olan etkileri	119

1.GİRİŞ

Meme hastalıkları, kadınların en çok karşılaştıkları hastalıklardan biri olmakla beraber görülme sıklığı da giderek artmakta ve Meme kanseri de bunların arasında en sık görülen kanser tipi olarak başı çekmektedir. Kadınlardaki kanserlerin tümünün %23'ünden ve kanserle ilişkili ölümlerin %14'ünden sorumludur (Parkin ve ark 2002). Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinin arkasından ikinci sırada gelmektedir, ancak 40-59 yaş arası kadın ölümlerinin ana nedenidir. Batı ülkelerinde yaşamı boyunca her 8-9 kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır (Aydıntuğ 2004).

Meme, kadınlarda süt üretimine yönelik farklılaşmış bir tubuloalveolar ter bezidir. Günümüz verilerine göre memede kanser (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epitelisi, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçerek sonunda meme kanseri gelişmektedir. Bu gelişim yıllarca sürebilmektedir. İlk olarak süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçiş yaparlar. Bu evrede tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaştıklarında metastaz yapma yeteneğine de ulaşarak diğer organ ve dokulara yayılım gösterirler. Meme kanseri tedavi edilmezse, biyolojik karakterine göre uzak organ metastazları yapar ve sonunda ölüme neden olur. Ölümlerin büyük kısmı da organ metastazlarından kaynaklanmaktadır. Kemik metastazları ile daha uzun süreler yaşanabildiği halde, beyin, karaciğer ve akciğer metastazları meydana geldikten sonra sağ kalma süresi ayları geçmemektedir (Aydıntuğ 2004).

Meme kanseri gelişiminde birçok farklı faktör rol oynayabilmektedir. Bunlar arasında yaş, kilo (obezite), sigara ve alkol kullanımı, uzun süreli menstrüasyon dönemi geçirmiş olmak, oral kontraseptiflerin kullanımı, menapoz sonrası hormon replasman tedavisi ve ileri yaş dönemindeki doğumlar yer almaktadır (American Cancer Society 2011, Tyczynski ve ark 2002). Meme kanseri olgularının %95'i kendiliğinden meydana gelmesine rağmen, ailesel geçmiş ve genetik yatkınlık da meme kanseri görülme sıklığını etkilemektedir (King ve ark 2003).

Plazma membran iyon kanalları tüm yaşayan hücrelerin temel yapısal elemanları içindedir ve hücre proliferasyonu için gereklidir. Son on yılda iyon kanallarının tümör gelişiminde ve kanserin büyümesinde hayati derecede öneme sahip olduğu açıkça ortaya çıkmıştır. Normal bir hücrenin kansere dönüşümü sırasında iyon kanallarının ekspresyonunu etkileyebilen ya da iyon kanal aktivitesinde bir değişime neden olabilen bir

seri genetik değişimler meydana gelir. İyon kanalları kanser hücresinde proliferasyon, apoptozis, migrasyon, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir (Prevarskaya ve ark 2010).

Artmış metastazın, uyarılabilir membranların karakteristiği olan akımlar ve membran kanallarının varlığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum öncelikle yüksek derecede metastatik kanser hücre hatları yanı sıra metastatik meme, prostat ve servikal karsinoma biyopsilerinde artmış ekspresyonu tespit edilmiş olan voltaj-kapılı Na⁺ kanallarıyla (VGSC) ilgilidir (Diaz ve ark 2007). Bu kanalların aktivitelerinin motiliteyi, endositozu ve invazyonu desteklediği belirlenmiştir. Özellikle Nav1.5 kanalının *in vitro* yüksek metastatik potansiyele ve *in vivo* olarak meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Klinik olarak da lenf nodu metastazı ile Nav1.5 ekspresyonu artışı arasında korelasyon bulunmaktadır. Buna karşın zayıf metastatik ya da tümorojenik olmayan hücre hatlarının fonksiyonel voltaj-kapılı Na⁺ kanalı eksprese etmedikleri görülmüştür (Fraser ve ark 2005).

Dünyada ve ülkemizde kanser vakalarının sayısı her geçen gün artmaktadır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra Türkiye'deki toplam ölümlerin ikinci nedenidir. Yapılan tahminler, kanser insidansının önümüzdeki yıllarda da yüksek olacağını göstermektedir. Bunun sonuçları; insan ömründe ve yaşam kalitesindeki azalmanın yanı sıra bu hastalık nedeniyle sağlık sektörünün ve ülkenin yüz yüze kalacağı ekonomik yükün de artmasıdır. Bu nedenlerle kansere karşı açılan savaşta terapötik amaçla potansiyel gücü ve popülaritesi artan yeni tedavi girişimlerin geliştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesi hem dünya hem de ülkemiz için büyük önem arz etmektedir.

Bu nedenlerle çalışmada meme kanseri gelişimi ve metastazı üzerinde Nav1.5 kanalının Adult ve Neonatal alt tiplerinin olası rolleri ve etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla siRNA ile gen susturma yöntemi kullanılmıştır. *In vitro* deneyler olarak hücre proliferasyonu testi, koloni oluşturma kapasitesi, invazyon ve migrasyon yeteneği ile ilişkili testler, flow sitometri ile apoptoz ve hücre siklusu analizi, kemoterapötik dirençliliğine olan etkiler, tüm bunlar ile ilişkili protein yollar değerlendirilmiştir. *In vivo* olarak da ksenograft ortotopik meme kanseri modeli ve ksenograft akciğer metastaz modeli gerçekleştirilerek Nav1.5 siRNA tedavilerinin hem meme kanseri tümör büyümesi hem de metastaz kapasitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca tez çalışmamızda *in vivo* sistemik siRNA uygulaması için nanolipozomal ilaç taşıyıcılar kullanılmıştır. Bu da siRNA

tedavisinin dolaşımdaki olası dezavantajlarını ve sistemik yan etkilerini minimuma indirerek, ayrıca da pasif olarak tümör dokusuna hedeflenmeyi sağlayarak bu yöntemin ileride klinikte kullanılabilmesine yönelik önemli veriler elde edebilmemizi sağlamıştır. Böylece kansere karşı savaşta bu yeni tedavi yaklaşımının etkinliğinin ve ayrıntılarının ortaya çıkarılmasıyla kanserin organizmadaki yayılımını ve iletişimini keserek onu kronik bir hastalık haline dönüştürebilmek ve yakın gelecekte meme kanserinin tedavisine yönelik çok önemli bir yol kat edebilmek mümkün olabilecektir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Kanser

Kanser basit olarak kontrolsüz hücre büyümesi ve bu normal dışı hücrelerin yayılımı şeklinde tanımlanabilir. Diğer bir deyişle, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur. Malign hücre transformasyonunu genellikle 2 farklı grup neden tetikler. Bunlardan biri; sigara kullanımı, beslenme, yaşam şekli, kimyasallar, infeksiyonlar, kirlilik ya da radyasyon gibi ekstrinsik faktörler, diğeri ise; kalıtsal faktörler, silici mutasyonlar, immün sistem kapasitesi, hormonlar gibi intrinsik faktörlerdir. Bu sebeple, bir bireyin yaşam siklusu içinde sigara kullanımını ve düşük karbonhidratlı beslenme gibi eksternal faktörleri elemine etmek ya da düzenli egzersiz yapmak kanser gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynayabilmektedir. Fakat kanser çok basamaklı ve birçok faktör tarafından etkilenebilen bir hastalıktır ve bu faktörlerden biri hastalığın gelişmesinde yeterli olabilir (Garcia ve ark 2007).

Kanser; belirtileri, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan, karmaşık bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve son olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik olabilir. Bununla birlikte, sonunda büyüyerek,

fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda semptom ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır (Merlo ve ark 2006).

Kanserin hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. İnsan DNA'sının 23000 kadar gen içerdiği düşünülmektedir. Bu genlerin birkaç bin (3000–5000) kadarı kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde (çok az ya da çok fazla) üretimine, anormal bir protein üretimine (işlev kazanmış ya da kaybetmiş) ya da bir proteinin hiç olmamasına sebep olabilir. Örneğin, KRAS olarak adlandırılan bir gende meydana gelen bir mutasyon, hücre zarının hemen içinde bulunan küçük bir proteinin hücre büyümesinin sinyalini artıran bir protein halini almasına neden olur. Bu protein normalde hücre yüzeyindeki büyüme faktörlerinin reseptörleri ile hücre çekirdeğine hücre bölünmesini başlatmak için büyüme sinyalleri gönderen moleküler sistemler arasında bir ara sinyal maddesi olarak çalışır. KRAS geni mutasyon geçirdiğinde, buna karşılık gelen protein “açık” pozisyonuna kilitlenmiş bir şalter gibi davranarak, sürekli bir hücre bölünmesi sinyali verir. KRAS mutasyonları kolorektal kanserler (vakaların %30-40'ında) ve akciğer adenokarsinomaları (vakaların %20-30'unda) gibi birçok kanserde yaygındır. Bu şekilde etkinleşmiş bir gen, “onkogen” olarak adlandırılır çünkü hücre çoğalmasını hızlandırır. Tersine, bazı genler ise etkin olmadıklarında kanser gelişimine katkıda bulunurlar. Örneğin, TP53 geninde durum budur. Bu gen yanlış hücre bölünmesini engellemek için doğal olarak bir “acil fren” olarak hareket eder. Bu gendeki bir mutasyon proteini bozar ve protein de gerektiğinde hücrelerin çoğalmasını durduramaz. TP53 mutasyonları hemen hemen her kanser çeşidinde vardır. İşlevini kaybetmesi nedeniyle kanser gelişimine katkıda bulunan böyle bir gen, tümör baskılayıcı olarak adlandırılır çünkü normal koşullarda etkin ürünleri kanser gelişimini baskılayan bir fren olarak çalışırlar (Olivier ve ark 2009).

Çoğu kanser sadece tek bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) doğar. Bu hücre kanserli olmak için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmelidir. Bu süreç “asi” hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açar. Eğer organizma bu klonu tolere ederse ve rahatsız edilmeden kalırsa, çoğalmaya devam edebilir ve bu süreç içinde içerdiği hücreler gittikçe artan sayıda modifikasyon biriktirir. Böylesi bozulmuş bir süreçte, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz olan hücrelerin yerini

alacaktır. Tümörler bu şekilde malign hale gelirler. Bu aynı zamanda kanserin tedavisinin bu denli zor olmasının da nedenidir. Hastalara kanser hücrelerini etkin olarak öldüren bir ilaç verildiğinde, hayatta kalan az sayıdaki hücre, kendilerini ilaca karşı dirençli kılan değişiklikler geçirmiş olanlardır. Geride kalan bu ufak hücre grubu kanserin başlangıçtaki biçiminden daha kötü bir biçime dönmesi için yeterli olabilir (Nowell 1976).

Bir kanser hücresi birçok açıdan hücrenin normal hayatını yöneten yasa ve kurallardan kaçarak bağımsız bir sağkalım avantajı elde eden serseri bir hücredir. Kanser hücreleri bunu yaparken organizmanın savunma sistemlerine uyum sağlayarak ve bunlarla savaşıyor, saldırgan işgalci bir davranış benimserler. Kanser hücreleri vücutta dolaşabilme yeteneğini kazanır ve tercihen konuksever organ ortamlarına yerleşerek metastaz yaparlar. Metastatik kanser hücreleri yeni koşullara uyum sağlamakta mükemmelleştikleri için sitotoksik ilaçlar ya da radyasyon tedavileri gibi öldürme çabalarına karşı koyarlar. Çoğu kanserin erken, kanser hücrelerinin uyum yeteneğinin henüz sınırlı olduğu ve tedavinin etkilerini geçiştiremeyecek bir aşamada tedavi edilmelerinin daha kolay olmasının nedeni budur (Hanahan ve Weinberg 2000).

Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda tam bir kanserli hücrenin gelişmesi için gereken minimum basamak sayısı belirlenmiştir. Bunun için üç temel kuralın ihlal edilmesi gerekir. Birincisi, hücrelerin ancak doğru sinyali aldıklarında bölünmeleridir. Bu kuralı ihlal etmek için, hücre, bir hormon ya da büyüme faktörü ile uyarıldığında normal olarak aktif hale geçen devreleri açarak hücre bölünmesini kalıcı olarak aktif hale getirmelidir. İkinci kural, hücrelerin DNA replikasyonu için stresli ya da olumsuz koşullarla karşılaştığında, genlerin hasar görebileceği koşullarda DNA replikasyonunu başlatmak yerine, kendi kendini imha etme programlarını aktif hale getirmeleridir. Bu kendini imha programlarından kaçınmak için, hücrelerin normalde anormal ya da aşırı hücre bölünmesini engelleyen güvenlik frenlerinden kurtulması gerekir. Bu frenler iki ana gen tarafından kontrol edilmektedir: RB1 (aynı zamanda Retinoblastoma geni olarak da bilinir) ve TP53 (normalde ortamda anormallik olduğunda hücrelerin bölünmesini önleyen bir stres sensörü olan p53 proteinini üreten gen). Bu iki fren mutasyon sonucu ortadan kalktıklarında, hücreler sadece bölünmekle kalmaz, aynı zamanda programlanmış hücre ölümünden de kaçınmış olurlar ve böylelikle bir tümör kitlesinin oluşumuna izin verilmiş olur. Üç numaralı kural, normal hücrelerin sadece sınırlı, belli sayıda bölünmeleri kuralıdır. Başka bir deyişle, hücrelerin DNA'larını önceden tanımlanmış, belirli bir sayının ötesinde kopyalamalarını engelleyen bir "bölünme sayaçları" vardır. Normal hücreler, her

kromozomun ucunda yeralan ve telomer adı verilen özel bir yapı nedeniyle sınırlı sayıda DNA replikasyonu yapabilir ve bölünebilirler. Telomer, her hücre bölünmesinde kopup giden, küçük DNA dizilimi tekrarlarından oluşur. Tüm tekrarlar bittiğinde, hücre daha fazla bölünemez ve yaşlı bir hücre olur. Kanseri hücrede, telomeraz adlı bir enzimin aktivasyonu kromozomların ucuna yeni tekrarlar eklenebilmesini sağlar ve böylelikle hücre programlanmış olan sınırlı sayının ötesinde de bölünebilir. Bu süreç, bir çeşit “sonsuz gençlik” durumuna eşdeğerdir. Bu üç işlevsel değişikliğin gerçekleştirilmesi hücrenin kanserli hale gelmesi için yeterlidir. Ancak, moleküler düzeyde, bu basit bir işlem değildir. Bu değişikliklerin her biri ayrı ayrı ele alındıklarında, normal hücre işlevini altüst edebilir ve hücrenin anormal hücreleri yok eden bir çeşit “hücre intiharı” olan apoptozis adı verilen bir süreçle imha edilmesine yol açabilirler. Dolayısıyla, kanserleşecek bir hücrenin asıl sorunu, bu değişikliklerin hepsini eşgüdümlü bir şekilde çalıştırabilmektir. Hem genetik zayıflığın hem de çevresel değişikliklerin büyük bir rol oynadıkları nokta burasıdır. Genetik zayıflık bazı kişilerin normal hücrelerine hızlı değişiklikleri daha çok yapabilme yeteneği verir, böylelikle değişikliklerin tek bir hücrede aynı anda gerçekleşebilmesi olasılığı artmış olur. Çevresel değişiklikler, anormal hücrelerin olumsuz koşullarda normal hücrelerden daha uygun görünerek sağ kalımlarına izin verecek doğal bir seçim olarak hareket edebilir. Kanserin, hem genetik hem de çevresel değişikliklerin böylesi önemli rol oynadıkları bir hastalık olmasının nedeni budur. Moleküler bir bakış açısından bu roller birbirlerinden ayrılamaz (Hanahan ve Weinberg 2000).

19.yy'nin orta ve geç dönemlerindeki bir çok buluş, dokuların ve kompleks organizmaların fertilize olmuş bir yumurta hücresinden nasıl geliştiği konusunu anlamamıza katkıda bulundu. Bunlardan en temel olanı, dokuların hücreler ve hücre ürünlerinden kompoze olduğu, tüm hücrelerin de öncül hücrelerin bölünmesi ile geliştiği şeklindeydi. Bu durumda yumurta hücresi tüm hücre hatlarının ana kaynağı demektir. Bu yüzden temelde her bir hücre kendi orjinine ait bazı ipuçları taşımaktadır. Tümör preparatlarının histopatolojik incelemelerine göre, tümör hücrelerinin kaynağının geriye doğru takip edilebilmesi ve malign oluşumun kökeninin tanımlanabilmesi mümkündür. Dahası patolojik ve biyokimyasal yöntemler tümörlerin klinik davranışlarının ve seyri için detaylı incelenebilmesini sağlamaktadır. Tümörler büyümelerinin agresiflik derecesine göre iki büyük sınıfa ayrılırlar. Komşu dokulara invaze olmadan lokal olarak büyüyenler (benign) ve çevre dokuya invaze olabilen ve metastazlar oluşturanlar (malign) (Garcia ve ark 2007).

Bu malfonksiyona uğramış hücreler tümörlerin organizasyonunu yitirmiş doku mimarisinin başlama noktasını oluştururlar. Tümörler orjinlerine göre dört farklı şekilde sınıflandırılırlar; epitelyal, mezenşimal, hematopoetik ve nöroektodermal. Teorik olarak vücuttaki tüm hücre tipleri kanser oluşturabilir, fakat en yaygın insan kanserleri epitelyal kökenli karsinomalardır. Bu grup karsinoma iki kategoriye ayrılmaktadır; biri epitel dokudan köken alan skuamoz hücre karsinomu, diğeri ise sekretuar epitelten köken alan adenokarsinomalardır. Epitel kökenli olmayan malign tümörler mezenşimal hücrelerden köken alan sarkomlar, dolaşım ve immun sistemdeki hücrelerden köken alan hematopoetik kanserler ve sinir sisteminin komponentlerinden orjin alan nöroektodermal tümörleri içermektedirler. Ancak anaplastik olarak adlandırılan bazı tümörler bu sınıflandırma şekline uymamaktadır (Garcia ve ark 2007).

Kanserin modern zamanlara has bir hastalık olduğu düşünülebilirle birlikte bu imajın aldatici olduğu da bir gerçektir. Öncelikle kanser ve kalp hastalıkları ilerleyen yaşlarda rastlanan başlıca hastalıklar ve ölüm nedenleri arasında olup, insanların kronik hastalıkların sık rastlandığı yetmiş, seksen, hatta doksanlı yıllarını yaşamaları geçtiğimiz yüzyılın sonlarında rastlanmaya başlayan bir fenomendir. Örneğin; Eski Mısır'da yaşam beklentisi 40 yaş dolaylarında idi. Bu rakam karanlık ve orta çağlarda daha da aşağıya düştükten sonra 19. yüzyılın ortalarında eski seviyelerine geri döndü. Yaşam beklentisinin bugünkü düzeylere yükselmesi veba, kolera, diyabet, kötü beslenme, bebek hastalıkları gibi çok sayıda ölümcül hastalığın ve tüberküloz gibi diğeri bulaşıcı hastalıkların kontrol altına alınması ya da tedavi edilebilmesi sayesinde gerçekleşmiştir. Kanser modern zamanlara özgü olmayıp, yüzyıllardır var olan bir hastalıktır. Ancak genç yaşlara oranla daha çok ilerleyen yaşlarda görülen bir hastalık olduğu için bugün dünya nüfusundaki artış ve insanların ulaştıkları nispeten ileri yaşların da etkisiyle geçmişe oranla insanlarda daha sık görülmektedir (Boyle ve Levin 2008).

Tarih boyunca eski uygarlıklarda kanser tanımlanmasına, olgularına ve tedavi yöntemlerine ilişkin birçok bilgi yer almaktadır. Örneğin; Kos'lu Hipokrat (M.Ö. 460) 'ın söylemleri kötü huylu hastalığa bir dizi referans içermektedir. Bunlardan birinde "her kanser ele geçirdiği kısmı çürütmekle kalmaz, daha öteye de sıçrar" denmektedir. Galen (M.S. 131-200) "kanseri tümörler en sık olarak kadınların memelerinde gelişmektedir" şeklinde not düşmüştür. Galen lezyonu bir yengece benzetmiştir: Yunanca "karkinos", Latince "cancer" kelimeleri buradan gelmektedir. Yüzyıllar boyunca değişik kanser türleri tanınmış ve tedavi edilirken uygarlıktaki ilerlemeler ile buna eşlik eden yaşam

beklentisindeki artış kanserin dünya çapında bu kadar yaygın bir hastalık olmasına katkıda bulunmuştur. Birleşik Krallık'ta 1880'de nüfusun yaklaşık olarak yarısı 45 yaşından önce ölmekteyken bu rakam 1980'de %3'lere inmiştir (Boyle ve Levin 2008).

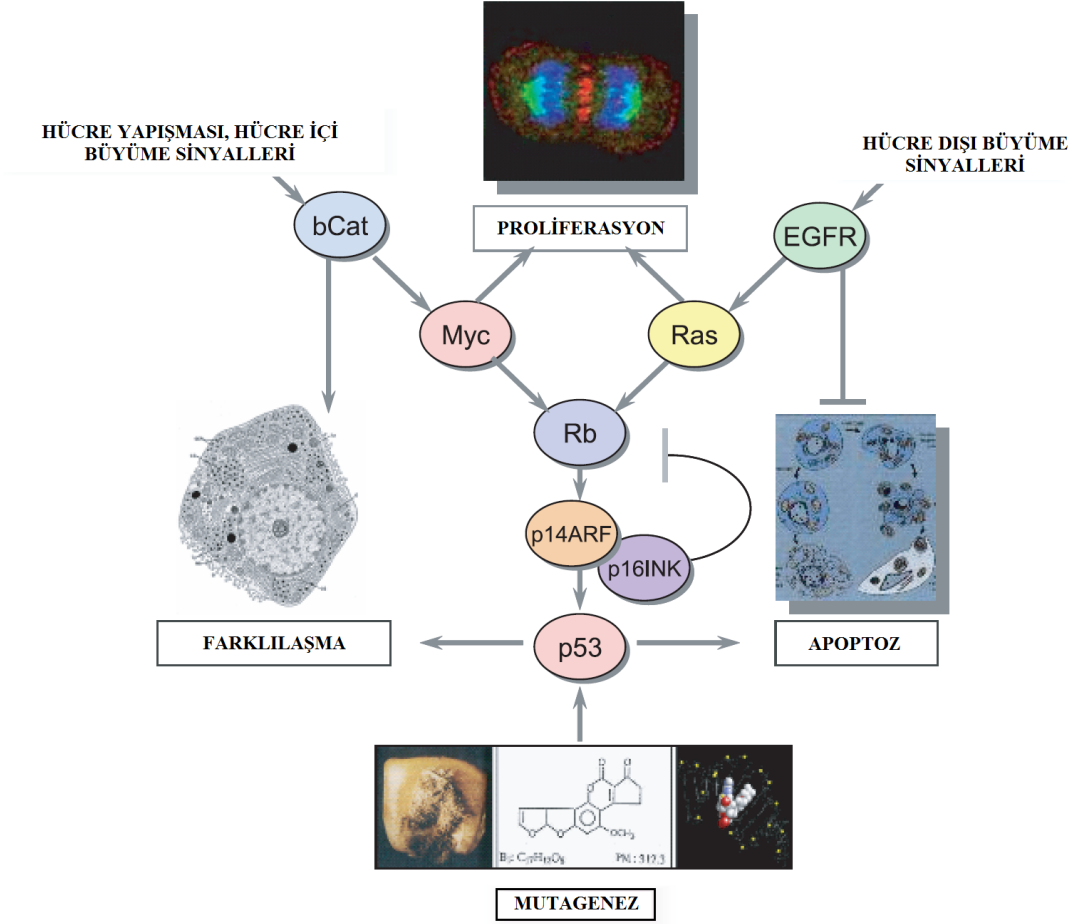
1.1.1.1. Kanser kutusu

Hücreler, içsel farklılıklarına karşın, hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden temel süreçlerin gerçekleştirilmesinde ortak planlar doğrultusunda hareket ederler. Bunun bir sonucu olarak, birçok kanserde, organın yeri ya da hastalığın nedenine bağlı olmaksızın, bazı onkogenler ve tümör baskılayıcıların değiştiği sıklıkla görülür. Bu genlerin ürünleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını kontrol etmek üzere birlikte çalışan öğeler ağının bir parçasıdır. Şekil 1.1. tüm kanserli hücrelerde değiştirilmesi gereken gen ve süreç ağının çekirdeği olarak tanımlanabilecek "kansere kutusunu" göstermektedir. Bu kanser kutusu, başlıca üç sinyal süreci içerir. Bunların ikisi büyümeyi artıran süreçlerdir; diğeri ise büyümeyi baskılayan bir mekanizmadır (Boyle ve Levin 2008).

Büyümeyi artıran süreçlerden biri ana etken olarak beta-katenin olarak adlandırılan bir proteini kullanır. Bu proteinin hücre içinde birkaç rolü vardır. Hücreler arasındaki bağlantıların ve hücrenin hücre içi lif iskeletinin bir bileşeni olarak, hücre zarının iç yüzeyinde bulunabilir. Ayrıca, sitoplazmada, hücre yüzeyi tarafından yakalanan büyüme ve çoğalma sinyallerini alan bir kompleksin bir parçası olarak bulunabilir. Böylesi sinyaller tarafından aktif hale geçirildiğinde, çekirdeğe geçer ve orada hücre çoğalmasında rol alan genlerin ifadesini uyarır. Çeşitli epiteliyel kanserlerin (örneğin akciğer, meme, karaciğer ya da kolon kanserleri) %10 ila %20 kadarında beta-katenini kodlayan gen olan CTNNB1 mutasyonla bozulmuştur. Bu süreçte rol alan diğer genler APC (kolon kanserinde çoğu kez mutasyon geçirmiştir), MYC ve CCND1'dir (siklin D1 kodlar). Kanser kutusundaki diğer belli başlı büyüme sinyali süreçleri arasında hücre zarının her iki tarafında da uzanan bir protein olan EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) gibi hücre yüzeyi reseptörleri sayılabilir. Dış tarafta, kandaki büyüme faktörlerini yakalar. İç tarafta, reseptör bir tirozin kinaz olarak, bir büyüme faktörüne bağlandığında aktif hale geçen enzimatik bir aktiviteye sahiptir. Bundan sonra tirozin kinaz, KRAS geninin ürünü gibi, molekülleri artırarak çoğalan bir zincirleme tepkimeye benzeyen bir hücre içi sinyaller dizisini başlatır. Bu sinyallerin son etkisi, hücre döngüsünde ilerlemenin uyarılması yoluyla hücre çoğalmasını etkinleştirmektir. Bu sinyallerin etkisini gidermek için, çoğalma karşıtı anasüreç TP53 geni

tarafından kontrol edilir. Bu genin ürünü olan p53, en iyi stres sensörü, özellikle de DNA hasarına neden olabilecek bir stresin sensörü olarak tanımlanabilir. Hücrenin DNA'sı hasar görüp de onarılamadığında, p53 bu anormalliği algılar, çekirdekte birikir ve çoğunlukla aynı anda çok sayıda çoğalma karşıtı mekanizmayı harekete geçirir. Bu çoğalma karşıtı mekanizmalar hücre döngüsünün ilerleyişini bloke edebilir (böylelikle yukarıda tanımlanan iki sürecin çoğaltıcı etkilerini giderir), hücreleri farklılaşmaya zorlar (böylelikle hücreleri çoğalmayacakları bir hale doğru itmiş olur) ya da apoptozis olarak tanımlanan hücre intiharı programını çalıştırır (bu hücrenin kendi DNA'sını ve diğer bileşenlerini yok ederek, geride sadece dokulardaki uzman çöp toplayıcıları olan makrofajlar tarafından yok edilecek küçük parçacıkların bırakılmasına yol açar) (Boyle ve Levin 2008).

Kanser kutusunun anahtarı, bu süreçlerin birbirleriyle nasıl bağlantılı olduklarında yatar. Ana bağlantı 9 numaralı kromozomun kısa kolunun uzaktaki ucunda bulunan son derece özel bir lokus tarafından sağlanır. Bu lokus CDKN2a adlı bir gen içerir ve RNA ve protein sentezi için şablon olarak aynı DNA parçalarını kullanan, birbiriyle örtüşen iki genden oluşması açısından benzersizdir. Bunlardan biri p16'dır ve hücre çevriminin negatif bir regülatörüdür (dolayısıyla çoğalma karşıtı etkiye sahiptir). p16 proteini, CDK inhibitörleri olarak adlandırılan, yani hücreleri daha hızlı çoğalmaya zorlayan enzimleri (sikline bağımlı kinazları) inhibe eden unsurlar olan bir regülatörler ailesinin üyesidir. CDK inhibitörleri, bu enzimleri bloke ederek, hücre bölünmesini engeller ve hücre çevriminin durdurulmasını içeren bir mekanizmayı harekete geçirirler. Diğer protein ise p14ARF (Alternative Reading Frame – Alternatif Okuma Çerçevesi) olarak adlandırılır ve p53'ün aktif hale geçirilmesini kontrol eder. Dolayısıyla, bu gen iki ürünü yoluyla kanser kutusunun çeşitli bileşenleri arasındaki bağlantıları denetler. Bu nedenle, hemen hemen her kanserde CDKN2a geninin birkaç mekanizmayla değişmesi beklenmedik bir durum değildir (Boyle ve Levin 2008).



Şekil 1.1. Kanser kutusu (Boyle ve Levin 2008).

1.1.1.2. Genetik değişiklikler

Genetik değişiklikler kanserin köşe taşlarıdır. İnsan genomunun bütününün diziliminin belirlenmesi, kanserlerdeki genetik değişimlerin şimdiye dek görülmemiş ayrıntılarla tanımlanabilmesini mümkün kılmıştır. İnsan kanserlerinde 300 kadar farklı genin aynı sıklıkla mutasyon geçirdiği gösterilmiştir. Bu katalog içerisinde, 2030 kadar gen (kanser kutusundakiler dahil) hemen tüm kanser çeşitlerinde sık sık mutasyona uğrar. Bu genler, hücre bölünmesinin kontrolü için gerekli çok temel işlevleri kontrol eden “ana genler” olarak görülebilir (Loeb ve ark 2008).

Birçok kanserde hücreler normal hücrelere kıyasla çok daha yüksek bir oranda mutasyon biriktirirler. Bu özelliğe “Mutasyoncu Fenotip” adı verilir. Dönüşüme uğramış bu özelliğin kanser gelişiminin yanı sıra kanser tedavilerine karşı direncin gelişmesinde de önemli olduğu düşünülmektedir. Mutasyoncu Fenotip normalde DNA onarımını ve bütünlüğünü kontrol eden genlerdeki mutasyonların bir sonucudur. Böylesi mutasyonlar

geçiren genler mutasyona yol açan DNA hasarlarını doğru şekilde onaramaz ve bu nedenle de mutasyonları normal hücelere kıyasla çok daha çabuk biriktirirler. Mutasyoncu fenotipin altında yatan moleküler mekanizmalar DNA onarımı, gen transkripsiyonu, hücre çevrimi kontrolü ve hücre ölümündeki hatalar olabilir (Loeb ve ark 2008).

Kanser genleri arasında en çok üzerinde çalışılan bir tümör baskılayıcısı olan p53 proteinini kodlayan TP53 genidir ve tüm insan kanseri vakalarının yaklaşık yarısında mutasyon geçirmiştir. Bu veri tabanı hemen her tür insan kanserinde saptanmış 24 000 kadar TP53 mutasyonu içermektedir. Günümüzde bu mutasyonların moleküler etkileri gayet iyi anlaşılmıştır. Bu mutasyonların çoğu p53 proteininin DNA'ya bağlanarak birkaç düzine başka geni regüle etmesini sağlayan parçasındadır. Bunlar çoğu kez tek bazın yerine başkasının geçtiği mutasyonlardır ve proteindeki bir amino asidin yerine başkasının geçmesine yol açarlar. Bu küçük değişiklik proteinin katlanmasını altüst etmeye ve dolayısıyla bir işlev kaybına neden olmaya yeterlidir (IARC Tp53 mutation database 2008).

1.1.1.3. Epigenetik değişiklikler

Epigenetik, modern biyolojinin en hızlı genişleyen alanlarından biridir ve biyolojik olgular ve hastalıklar, özellikle de kanser hakkındaki düşüncelerimiz ve anlayışımız üzerinde büyük bir etkisi vardır. Epigenetik, genetik kodun son çıktısını ve bunun kökenindeki DNA dizilimini değiştirmeden modifiye eden mekanizmaları kapsar. Herhangi bir organizmadaki hücrelerin hepsinin diğer hücrelerle aynı genomu paylaşması, ama buna karşın son derece farklı morfolojik ve işlevsel özellikler göstermeleri epigenetik ilkenin önemini vurgulamaktadır. Dolayısıyla, epigenetik olayların vücuttaki farklı hücrelerin kimliğini, çoğalma potansiyelini ve kanserde tipik olarak düzensizleşen özellikleri tanımladığı açıktır. Günümüzde, epigenetik, birçok hücre bölünmesi döngüsü boyunca kararlı bir biçime aktarılan ancak nükleotid dizilimini (genetik kodu) değiştirmeyen tüm değişimleri inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik kalıtım bir hücre neslinden diğerine gen etkinliği hallerinin kararlı olarak çoğalmasını sağlayan temel mekanizmalar olan DNA metillenmesini, histon modifikasyonlarını ve RNA ortamlı susturmayı kapsar. Epigenetik mekanizmaların önemiyle tutarlı olarak, epigenetik hallerin düzensizleşmesi insan hastalıklarıyla, özellikle de kanserle yakından ilişkilidir (Cortez ve Jones 2008, Herranz ve Esteller 2007).

1.1.1.4. Küresel kanser yükü

Dünya çapında kanseri önlemeye ve kanserle savaşa yönelik ilk büyük adım dünyanın değişik bölgelerindeki kanser yükünün ölçeği ve doğasını kavramak ve daha sonra da önlenebilir nedenleri ve diğer önceliklerin üzerine gitmektir. Düşük gelir grubundaki ülkeler hakkındaki verilerin yakın zamandaki artışı hala mükemmelden uzak olsa da küresel kanser yükünün daha iyi bir resmini çizmeye olanak tanımaktadır (Boyle ve Levin 2008).

2004 yılında 58,8 milyon insanın öldüğü tahmin edilmektedir (Mathers ve ark 2008). Bu ölümlerin yarısı 60 yaşın altında, 22 milyonu 70 ya da üstü yaşlarda ve 10,7 milyonu ise 80 ya da üstü yaşlarda meydana gelmiştir. Yaklaşık olarak beş ölümden biri beş yaş altı çocuklara aittir. Kanserden ölümler tüm ölümlerin sekizde birini oluşturmaktaysa da, doğrudan ölüm nedeni kanser olmayan ancak öldüğünde kanser hastası olan insanların sayısı daha da fazla olacaktır (Boyle ve Levin 2008).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Avrupa Bölgesinin ulusal nüfus sayımları oldukça iyi veriler sağlamaktadır. 2008'de 3.422.000 yeni kanser vakası (erkeklerde 1.821.000 ve kadınlarda 1.601.000) ve 1.847.000 kanser kaynaklı ölüm (yaklaşık olarak erkeklerde 1.034.000 ve kadınlarda 813.000) görüldüğü tahmin edilmektedir. Erkeklerde en yaygın görülen kanser türü olan akciğer kanserini prostat kanseri, kolorektal kanser, mesane ve mide kanserleri izlemektedir. Akciğer kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve mide kanseri erkeklerde en yaygın kanser kaynaklı ölüm nedenleridir. Kadınlarda meme kanseri en sık rastlanan kanser türü iken, onu kolorektal kanser, akciğer kanseri, korpus kanseri ve mide kanseri izlemektedir. Meme kanseri aynı zamanda en yaygın kanser kaynaklı ölüm nedenidir, onu kolorektal kanser, akciğer kanseri ve mide kanseri takip etmektedir. Küresel çapta bakıldığında ise akciğer kanseri en yaygın kanser türü ve kanserle ilişkili ölüm nedeni iken; kadınlarda en yaygın kanser türü ve kanserle alakalı ölüm nedeni meme kanseridir (Boyle ve Levin 2008).

Meme kanseri dünyada ve Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. ABD'de meme kanseri akciğer kanserinden sonra en sık ölüm nedenidir ve her yıl sadece ABD'de yaklaşık 232.000 kişiye meme kanseri tanısı konmakta ve bunların 41.000'i hayatını kaybetmektedir (Parkin ve ark 2002). Aynı zamanda meme kanseri kadınların kanserden

ölüm nedenleri arasında dünyada ve Türkiye’de ilk sırada bulunmaktadır. Günümüzde tüm kanserlerin %32’si, kansere bağlı ölümlerin ise %18’i meme kanserine bağlıdır (Semiglazov ve ark 1993, Koçak 2000, Tuncer 2000). Dünyada sekiz kadından birinde meme kanseri görülmektedir (Akınoğlu 2002, Onat 1997). WHO’nun 1990 yılında yaptığı çalışmada, 796.000 yeni meme kanserli olgu ve 314.000 meme kanserinden ölüm saptanmışken, yine WHO’ya bağlı International Agency on Cancer for Research (IARC)’ün 2002 yılındaki değerlendirmesinde 1.152.000 yeni meme kanserli olgu ve 411.000 meme kanserinden ölüm saptanmıştır. 2012 yılında dünyada kadınlarda en sık görülen beş kanser türü meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanseridir (Stewart ve Wild 2014). Türkiye’deki 2010 verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanser yine meme kanseridir (38,6/100000 Kişide YSH-Yaş GÖre Standardize Edilmiş Hızları). Yaklaşık her dört kadında görülen kanserden biri meme kanseridir (Özkan ve Keskinlikç 2015). 1990-2002 arasındaki on iki yıllık süre içerisinde dünyada meme kanserinin sıklık ve mortalite oranlarında %25’lik bir artış görülmektedir (Özmen 2008). Kanserler 2012 yılında dünyada 8,2 milyon ölüme neden olmuştur ve izleyen 20 yıllık süre içinde her yıl 13 milyon ölüm olacağı tahmin edilmektedir (Stewart ve Wild 2014).

Türkiye Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Çalışması’nın sonuçlarına göre, kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra Türkiye’deki toplam ölümlerin ikinci nedenidir (Sağlık Bakanlığı 2004). Yapılan tahminler kanser insidansının önümüzdeki yıllarda da yüksek olacağını ve kanserin görünür bir gelecekte birincil ölüm nedeni olacağını göstermektedir. Kanser tedavisi için yapılan harcamalar dünyadaki tüm ülkeler için sağlık harcamalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. ABD’de en yüksek maliyetli ilk beş hastalık kalp hastalıkları, kanser, travma, akıl ve ruh sağlığı hastalıkları ile pulmoner hastalıklar olmasına karşın, kişi başına yapılan sağlık harcamaları açısından karşılaştırıldığında ilk sırayı kanserin aldığı görülmektedir. ABD’de kanserin teşhis ve tedavisi için 72 milyar \$ harcanmaktadır. Toplam sağlık harcamaları içinde kanser harcamalarının payı %4.7’dir (Bosanquet ve Silora 2004). Meme kanseri ise yeni gelişen olgular içinde harcamaların %18.2’sini kapsamaktadır ve 5.4 milyar \$’lık bir paya sahiptir. Toplam harcamalar içinde de %13.1 ile en yüksek paya sahip kanser türüdür.

Meme kanseri için yapılan harcamalar ağırlıklı olarak ayakta verilen sağlık hizmetlerinde gerçekleşmekte ve en çok ilaç harcaması da meme ve prostat kanseri için yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar yeni ilaçların pahalı olmasına karşın daha uzun yaşam

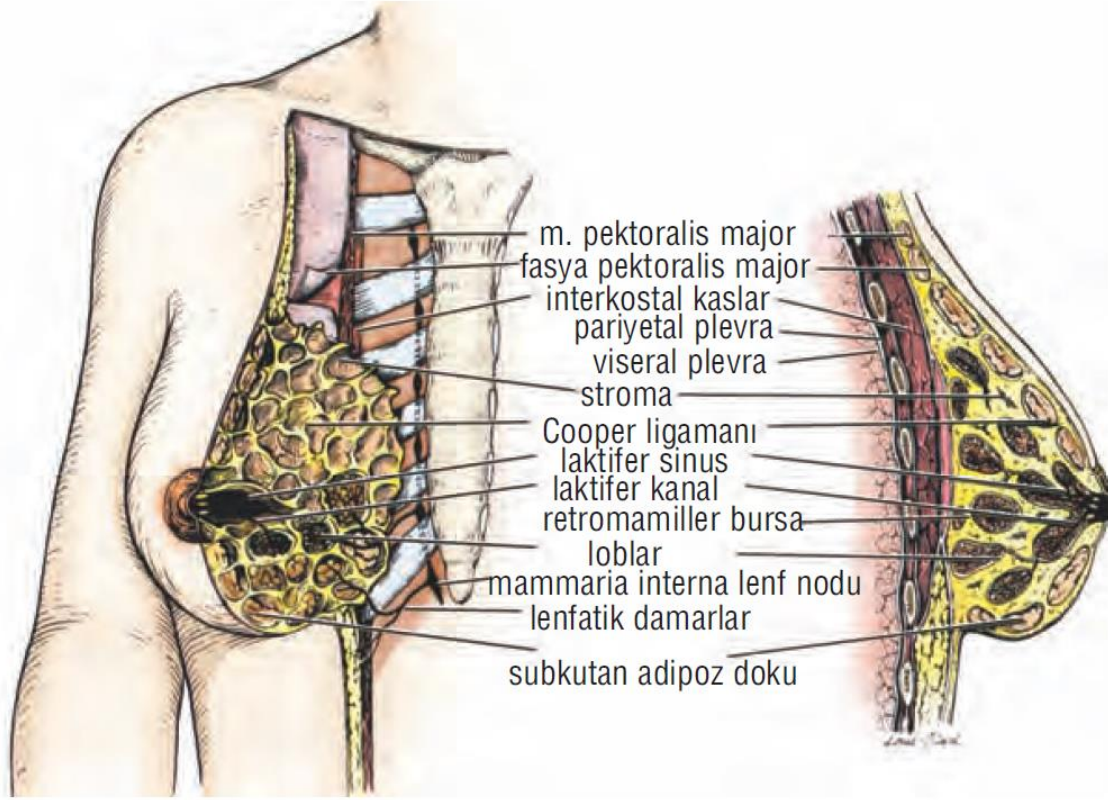
süresi, daha yüksek verimlilik, daha yüksek yaşam kalitesi, hastaneler ile diğer tıbbi hizmetlere daha az ihtiyaç duyulduğu ve bu nedenle kullanımı halinde hem hasta hem de sağlık sistemi açısından pozitif sonuçlara neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Örneğin meme kanserinin tedavisi için geliştirilen yeni bir ilaç, bu hastalıktan yılda yaklaşık 500 ölümü engellemektedir. Bir başka ifade ile yeni ilaç, yılda 5000 yaşam yılı kaybını engellemektedir. Bu nedenle yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin gelişimi maliyetlerine rağmen, birçok anlamda hem ülke ekonomisine hem de yaşam kalitesine getireceği faydalar göz önüne alındığında büyük önem arz etmektedir (Lichtenberg 2002).

1.1.2. Meme Dokusu

Meme çeşitli loblara ayrılmış ve göğüs duvarının fibroadipöz dokusuna gömülmüş modifiye bir apokrin bezdir. Memeler tam gelişimine dişilerde ulaşır ve gebelik ile laktasyon sırasında tam olarak diferansiye hale gelirler. Meme dört ana kısımdan oluşmaktadır; meme ucu, kanallar, lobüller ve fibroadipöz doku (Fawcett 1976). Her meme, herbirinde birçok lobül bulunan 15-20 loptan oluşmaktadır (Şekil 1.2).

Meme ucu sebasöz birimlerle birlikte epidermis (Montgomery bezleri) ve ekskretuar laktiferöz kanalların bir kompozisyonudur. Kanallar meme ucundan fibroadipöz doku içine uzanır ve santral terminal kanal ile dış alveolar kanaldan oluşan meme lobüllerinde sonlanır. Bu yapılar gevşek bir bağ doku stromasına gömülmüştür. Lobüller memenin fonksiyonel birimleridirler. Kanalların ve lobüllerin her ikisinin de lümenleri etrafı myoepitelyal hücreler dizilimi tarafından çevrili kübikten basit silindirik epitele doğru devam eden tek bir katmanla kaplıdır (Fawcett,1976).

Puberteye kadar erkekler ve kadınların meme dokuları arasında çok fazla bir farklılık bulunmamaktadır. Bu periyod yani puberte sonrası kadınlarda kanalların uzanımının ve daha ileri dallanmasının gerçekleştiği, lobüllerin geliştiği ve fibröz stroma ile yağ dokusunun proliferere olduğu dönemdir (Russo and Russo 1987). Gebelik esnasında terminal kanallar hiperplaziye uğrar ve gebeliğin sonlanması ile regrese olan asinusları şekillendirirler. Yaşamın üçüncü on yıllık diliminden sonra epitelial hücrelerin proliferasyon hızları azalır fakat toplam epitelial kısım menapoza kadar artış gösterir. Daha ileri safhalarda ilerleyici epitelial atrofi, kollajen ve yağ dokusu yoğunluğunda artış gözlenmektedir (Hutson ve ark 1985).



Şekil 1.2. Memenin tanjansiyel ve sagital kesiti (Özmen 2012).

1.1.3. Meme Hastalıkları

Meme hastalıkları çoğunlukla kanser gelişimine neden olmaz. Bunlardan biri stafilokok ve anaerobik enfeksiyonların neden olabileceği yangıdır. Bu durum doğumdan 2-3 hafta sonra ya da yaşamın daha ileri bir döneminde gözlenebilir (Scholefield 1987, Rogers 1990). Periduktal mastit kanalların pıhtılaşmış materyal ile dolu olduğu ve epitel atenuasyonunun bulunduğu kronik bir inflamatuvar lezyondur. Yağ nekrozunun klinik olarak tanısı invaziv meme karsinomu ile karışmasından dolayı zordur (Lee ve Adair 1920). Bu bazen deri ya da meme ucu retraksiyonuna neden olan ağrısız sert bir kitle şekillendirir ancak sınırlıdır ve skarlaşma ile iyileşir. Fibrokistik değişiklik üreme çağındaki kadınların yaklaşık %10'unu etkileyen diğer bir non-neoplastik meme hastalığıdır. Meme dokusu palpasyonda kabarcıklı, gevşek bir şekilde hissedilir ve ağrılıdır. Bu hastalık fibrozisi, epitelyal proliferasyonu ve kist formasyonunu içeren bir lezyonlar kompleksidir (Foote ve Stewart 1945). Epitelyal hiperplazinin bulunması tümör formasyonu için en önemli risk faktörüdür. Bu hücrelerdeki proliferasyonun hızı ve tipi

ikincil olarak bunu izleyen meme karsinomu gelişimi için ana indikatördür (Page ve ark 1978).

1.1.3.1. Meme kistleri

Memenin en sık rastlanan lezyonu olan fibrokistik değişiklikler, klinik belirti ve bulguları ile histolojik değişiklikleri içeren bir durumdur. Bazı zamanlar memede sıvı ile dolu keseler oluşur, bunlara meme kisti denilir. Bu değişiklikler genellikle 20 ile 50 yaşları arasındaki adet gören kadınları etkiler, hormon replasman tedavisi almayan postmenopozal kadınlarda nadirdir. Sıklıkla menopoza girmemiş 35 yaşın üzerindeki kadınlarda görülür. Kesin patogenezi net olarak bilinmese de hormonal dengesizliğin, özellikle progesterona karşılık östrojenin üstünlüğünün, oluşumunda önemli rol oynadığı sanılmaktadır. Östrojen varlığı semptomların oluşması için gerekli görülmektedir. Yerleşimi memenin derinlerine doğru ise sert kitle şeklinde hissedilir. Bazı kadınlarda kistler rahatsızlığa ve ağrıya neden olabilirler. Hatta bu kistler adet dönemi öncesi büyüyebilir ve daha hassas ve ağrılı olabilirler. Eğer memede bir kitle fark edilmişse, kist ile diğer kitlelere yönelik ayırımı yapılması gerekir. Meme ultrasonografisi, 40 yaşın üzerinde mamografi gibi tetkikler bu ayırımı yapmada başvurulan yöntemlerdir. Kistler zaman içinde küçülmüyor, aksine büyüyor ise içindeki sıvı iğne ile çekilir. Bu şekilde ağrı azalır veya kesilebilir. İçeriden alınan sıvı incelenmek üzere laboratuvara gönderilebilir. Eğer kan saptanırsa meme kanserinden şüphelenilir. Bu sebeplerden dolayı takip ve tedavisi bu konuda uzman hekimler tarafından yapılmalıdır. Fibrokistik değişiklikte tipik ya da atipik epitelyal proliferatif değişiklikler bulunmadıkça meme kanseri için risk taşımaz. İnvazif meme kanseri gelişmesi olasılığı biyopsi sonucu atipik duktal ya da lobüler hiperplazisi bulunan kadınlarda nonproliferatif hastalık bulunanlara göre yaklaşık beş kat daha fazladır. Aile öyküsü ve atipi birlikte ise meme kanseri riski 11 kat artar. Tek başına kistlerin bulunması riski artırmaz fakat kistlerle birlikte aile öyküsü varsa risk yaklaşık üç kat artar (Özmen 2012).

1.1.3.2. Granülatöz mastit

Klinik ve radyolojik özellikleri meme kanseri ile benzerlik gösteren, memenin granülatöz inflamasyonu ile seyreden bir hastalıktır. Granülatöz mastit spesifik ve non spesifik olmak üzere ikiye ayrılır. Non spesifik granülatöz mastite idiyopatik granülatöz mastit veya granülatöz lobüler mastit de denilmektedir. Granülatöz

mastit, memenin nedeni çok iyi aydınlatılmamış nadir görülen inflamatuvar hastalıklarındandır. Nedeni bilinen granülatöz mastitler tüberküloz, sarkoidoz, Wegener granülamatozu, yabancı cisim, mantar ve parazitik enfeksiyonlar sonrası gelişebilir. Bunlara ek olarak sigara içen, doğum kontrol hapı kullanan ve yeni doğum yapmış bayanlarda görülebilir. Sebebi bilinmeyen (İdiopatik) granülatöz mastit tanısı diğer etkenlerin dışlanması ve biyopside granülatöz inflamasyonla beraber kronik lobülit saptanması ile konur. İyi huylu bir durum olmasına rağmen meme kanserlerini taklit etme özellikleri ile beraber memede apse, sinüs oluşumu ve selülit gelişmesine neden olabilmektedir. Meme kanserini taklit etmesi nedeniyle de bu tanıyı dışlama amaçlı tekrarlayan biyopsilere gereksinim duyulabilmektedir. İdiopatik granülatöz mastit için uygun tedavi yöntemi net olmamakla beraber, hastalıklı alanın cerrahi olarak çıkartılması en çok önerilen tedavi yöntemidir. Bununla beraber, steroidlerin tedaviye eklenip eklenmemesi halen tartışmalıdır (Özmen 2012).

1.1.3.3. Meme başı dermatozları

Meme başı dermatozları oldukça seyrek görülür ve her birinin makroskobik görüntüsü birbirine benzediğinden ayırıcı tanıları büyük önem taşımaktadır. Genellikle erken dönemde lezyonlar pullu ve kızarıklık şeklinde olup, inflamatuvar deri lezyonları veya meme başı ekzemaları ile karıştırılabilirler. Kötü huylu olanları Paget hastalığı olarak adlandırılır. İyi huylu olanlara, meme başı adenomları, molluscum contagiosum, fibrom, epidermal kist, hücrsel mavi nevüsleri örnek verilebilir. Memenin Paget hastalığı (MPH) ilk olarak 1874 yılında Sir James Paget tarafından, kanserin ön bulgusu olarak meme başında ekzematöz değişiklikler ile karakterize, nadir bir meme kanseri formu olarak tarif edilmiştir. Paget, meme başı lezyonunun başlamasından yaklaşık olarak bir yıl sonra memede kanserin ortaya çıkması nedeniyle, benign olmasına rağmen bu lezyonun altta yatan malignitenin sorumlusu olabileceğini düşünmüştür. MPH, olguların %92-100'ünde altta yatan bir meme kanseri ile ilişkilidir. Tümör invaziv ya da *in-situ* duktal olabilir. Tedavileri bölgesel tedaviler şeklindedir. Temel olarak tedavi altta yatan tümörün doğası ile ilişkilidir ve radyoterapi, kemoterapi, hormonoterapi gibi ek tedavileri de içermektedir. Tümörün prognostik faktörlerindeki kötülük nedeniyle, radikal ya da modifiye radikal mastektomi tercih edilen tedavi biçimidir (Özmen 2012).

1.1.3.4. Meme başı akıntısı

Meme başı akıntısı doğrudan meme duktuslarından olan ve meme başının yüzeyinde görülen akıntıya denir. Emzirme ve gebelik gibi olağan durumlar dışında meme başından çeşitli özellikte sıvı gelmesi durumudur. Bu durum sıklıkla kadınlarda endişe yarattığı halde çoğu kez masum sebeplerden kaynaklanır. Sıklıkla hormonal sebepli ve iki taraflı olan meme başı akıntısı, genellikle meme başının sıkılmasıyla artar. En sık hormon dışı meme başı akıntısı nedenleri olan meme kanalı genişlemesi (duktal ektazi) ve kanal içi siğilleri (intraduktal papillom) sıklıkla tek taraflı görülür. Akıntı, şeffaf, sarı, yeşil, beyaz olabilir. Akıntının rengi kesinlikle altta yatan durumun iyi ya da kötü olması konusunda fikir vermez. Kanlı meme başı akıntısı hiçbir zaman normal kabul edilmez (Özmen 2012).

Meme başı akıntısının başlıca nedenleri şunlardır:

- Memenin fibrokistik değişiklikleri: Meme dokusu içinde süt yapan bezlerin dış kısmında destek bağ dokusunun sıkışması ve aralarında içi sıvı dolu minik keseciklerin oluşması durumudur. Meme başına gelen süt kanallarında sıvı birikimi ve meme başından akmasına neden olabilir.
- Galaktore: Memenin gebelik ve emzirme dönemi dışında süt üretmesi durumu. Bu durum, beyinde bir bezin (hipofiz bezi) fazla çalışmasına neden olan tümörler olması, bazı ilaç kullanımları ve madde bağımlılıkları (esrar gibi), anason ve rezene kullanımı, tiroid bezinin az çalışması halleri gibi durumlarda görülür.
- Memenin iltihabi durumları (meme apseleri): Daha çok emzirme döneminde görülmekle birlikte, diğer dönemlerde de görülebilir.
- Süt kanalı genişlemeleri (duktal ektazi): Tipik olarak menopoza yaklaşan kadınlarda (40-50 yaş civarı) görülen meme başı altındaki süt kanallarının yıllar içinde giderek genişlemesiyle görülen bir durumdur.
- Kanal içi siğilleri (intraduktal papillom): Süt kanallarının birleşim yerinde meme başının altında kanal içinde oluşan yumrulardır. İyi huyludur. Kadınlarda meme başı akıntısının en sık nedenidir. Kanal içinin iltihaplanması halinde akıntı kanlı hal alabilir.

Meme başı akıntıları klinik özelliklerine göre benign ve patolojik olarak sınıflandırılabilir. Benign MBA tipik olarak spontan olmayan ve genellikle memenin manipülasyonu sonucu oluşan akıntıdır. Patolojik meme başı akıntısı artmış meme kanseri riski ile ilgilidir. Meme başı akıntısına neden sebepler içinde en önemlisi meme kanseridir. Meme başı akıntısı ile birlikte kitle mevcutsa risk artar. Mutlaka detaylı araştırma gereklidir (Özmen 2012).

1.1.3.5. Jinekomasti (Erkeklerde meme büyümesi)

Jinekomasti, erkek meme dokusunun fizyolojik ya da patolojik nedenlerle iyi huylu proliferasyonu ve kadın memesine benzer bir görünüm kazanmasıdır. Tek veya her iki memede oluşabilir. Fizyolojik jinekomasti, yenidoğan dönemi, puberte dönemi ve yaşlılıkta en çok görülür. Esas neden artmış östrojen hormonu uyarısıdır. Genellikle büyüyen memede biraz hassasiyet vardır. Jinekomasti erkek meme kanserine eğilim yaratmaz ancak bazı genetik hastalıklarla (Klinefelter sendromu, Reifenstein sendromu) birliktelik durumunda meme kanseri riski artar. Patolojik jinekomasti, östrojen fazlalığı yaratan tümörlerde (testis, böbreküstü bezi, karaciğer tümörü), androjen eksikliği durumlarında (testisin fonksiyon göstermemesi, Klinefelter sendromu gibi doğuştan gelen genetik hastalıklar) ve bazı ilaçların yan etkisine bağlı olarak da gelişebilir. Jinekomastinin esas nedenleri, androjen üretiminde azalma, östrojen üretiminde artma veya artmış östrojen prekürsörleridir. Jinekomasti, az görülse de, mutlaka meme karsinomundan ayırt edilmelidir. Tedavide, meme başının etrafından girilerek meme dokusu alınır. Büyük jinekomastilerde ise meme başı korunarak meme dokusu ve meme derisi beraber çıkartılır (Özmen 2012).

1.1.3.6. Neoplastik lezyonlar

1.1.3.6.1. Fibroadenom

Fibroadenomlar genellikle 1-2 cm boyutunda, hareketli, iyi sınırlı, kauçuk kıvamında, düzgün şekilli, daha çok genç bayanlarda ve özellikle siyah ırkta görülen ve sık rastlanan iyi huylu meme kitleleridir. Bu 25 yaşına kadarki kadınlarda karşılaşılan en yaygın benign lezyondur (Ferguson ve Powell 1989). Epitel ve bağdokunun proliferasyonundan oluşmaktadır. Duktal epitel genellikle çift tabakalıdır. İki şekilde olabilir; perikanaliküler ve intrakanaliküler. İlk durumda epitelyal ve myoepitelyal hücreler gevşek fibroblastik stroma tarafından çevrili uzamış kanallar etrafında halka

şekillendirirler. Intrakanaliküler fibroadenomlar da kübik epitelyal ve myoepitelyal hücreler tarafından kaplı uzamış kanalları içerirler. Kanallar şekli bozulmuş gözüktür ve stroma tarafından sıkıştırılmışlardır. Fibroadenom meme kanseri gelişimi için sadece küçük bir risk oluşturmaktadır (Carter ve ark 1988). Fibroadenomlar lastik kıvamlı, sınırları belirgin, yuvarlak veya lobüle, iyi huylu kitlelerdir. Ağrısızdırlar. Elle muayene edildiğinde çok hareketli oldukları görülür. Bazen birden fazla olabilirler. Çoğunluğu 1-3 cm çapındadır. Zaman zaman genç bayanlarda büyük boyutlara ulaşabilirler. Bunlara dev ya da juvenil fibroadenomlar denir. Fibroadenomlar memenin daha çok destek bağ dokusundan gelişen iyi huylu yumrularıdır. Fibroadenomun patogenezi net değildir. Genç yaş ve doğum kontrol hapı kullanma önemli faktörlerdir. Basit fibroadenomlarda meme kanseri riski artışı yoktur. Moleküler çalışmalarda da risk artışı saptanamamıştır. Sadece kompleks fibroadenomlarda risk artışı vardır. Kesin tedavisi cerrahi olarak çıkartılmasıdır. Sıklıkla estetik kaygılar veya büyüdüğü için çıkartılırlar. Yineleme olursa, fibroadenomlara çok benzeyen filloides tümör olabileceği düşünülmelidir (Özmen 2012).

1.1.3.6.2. Filloides tümör

Filloides tümörleri, memenin nadir görülen fibroepitelyal tümörleridir. Tüm meme tümörlerinin %0.3-1'ini oluştururlar. Fibroadenomaya benzer şekilde epitel ve stromadaki proliferasyonun bir kombinasyonudur, selim gidiş gösterebildikleri gibi, metastaz (sıçrama) yapma eğiliminde de olabilirler. Çoğunlukla ileri yaşlarda görülür. Epitel atipik hiperplazi ya da *in situ* karsinoma gösterebilir. Stroma'daki aşırı büyüme epitel içine kadar genişleyebilir. Çalışmalar %20'sinin histolojik olarak malign olduğunu ve %50'sinden daha fazlasının metastaz yaptığını göstermiştir (Grimes 1992). Klinik olarak davranışları değişkenlik gösterir. Fibroadenoma benzer şekilde histolojik olarak yapısal özelliklerine göre, benign, sınırda malign ve malign olarak sınıflandırılırlar. Hiçbir morfolojik ve radyolojik bulgu, filloides tümörlerin biyolojik davranışını öngörmeye tam olarak güvenilir değildir. Genelde 35-55 yaş arası kadınlarda görülürler. Patolojik olarak saptanan metastaz oranı %3-5'i geçmez. Filloides tümörlerinin metastaz ve yayılımı genellikle kan yolu ile olur. Malign filloides tümörler yüksek oranlarda %25 lokal nüks ve metastaz riski taşırlar. Filloides tümörlerin en temel tedavisi cerrahidir. Ameliyat öncesi tanı doğru konulursa, kitlenin geniş eksizyonu genellikle tercih edilen cerrahi yöntemdir (Özmen 2012).

1.1.3.6.3. Adenom

Fibroadenomlar kadar sık görülmezler. Tubüler ya da laktasyon adenomları olarak karakterize edilirler. Meme içinde belirgin kitleler oluştururlar ve kendisini çevreleyen az miktardaki stroma ile yoğun olarak sıkıştırılmış terminal kanallardan oluşmuşlardır. Meme başı adenomu duktal ve stromal hücrelerin proliferasyonunu içeren oldukça farklı bir tiptir (O'Hara ve Page 1985).

1.1.3.6.4. Papillom

Meme başı akıntısı ve nadiren palpe edilebilir bir kitleye neden olan benign büyükçe bir intraduktal lezyondur. Sıklıkla sitolojik atipi bulunmayan epitelyal hiperplazi mevcuttur. Papillomalar soliter ya da multiple olabilirler. Soliter olanlar çoğunlukla subareolar kanallarda oluşurlar fakat multiple yapıdakiler genellikle terminal kanal lobüler üniteleri kapsayan periferik kısımlardadırlar. Papillomalar özellikle multiple forma sahip hastalarda kanser gelişim riskini az oranda artırır (Murad ve ark 1981). Her bir histolojik tür farklı derecede kanser geliştirme riskine sahip olduğu gibi, birkaç duktal sistemde çok sayıda olabilir. Bu nedenle lezyonların tam olarak çıkartılması, tanısal olduğu kadar tedavi açısından da anlam taşımaktadır. Patolojik meme başı akıntısı varlığında, akıntının kaynağı durumundaki lezyon ya da lezyonların eksizyonu tanısal olduğu kadar, hastada rahatsızlık yaratan akıntı semptomunun da ortadan kalkmasını sağlar. Son dönemlerde geliştirilen duktoskopik eksizyon ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Özmen 2012).

1.1.4. Meme Kanseri

1.1.4.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

Meme karsinoması kadınlarda en yaygın görülen malignitedir. Avrupa ve Amerika'da sekiz kadından biri meme kanseri gelişimi riski taşımaktadır. Türkiye'de bu hastalık kadınlardaki kanserlerin %24,1'ine karşılık gelmektedir. Ancak Japonya'da meme kanseri oranı Amerika'dakinin %20'si kadardır. Japonya'daki bu düşük insidans hastalığın gelişiminde önemli genetik, kültürel ve çevresel faktörlerin bulunduğunu göstermektedir. Japonlar için risk Avrupa ya da ABD'ye yerleştiklerinde hormonlar ya da yaşam tarzı gibi genomik olmayan faktörlerin dahil olduğunu ispatlar şekilde artmaktadır (Muir 1992). Çeşitli meme kanseri risk faktörleri yıllardır bilinmekte ve halen daha bu konuda

araştırmalara devam edilmektedir. Risk ve ilişkili faktörler Çizelge 1.1'de özetlenmiştir (Hankinson ve ark 2004).

Çizelge 1.1. Doğrulanmış meme kanseri risk faktörleri ve koruyucu faktörler

Risk Faktörü	Meme Kanseri Gelişimine Etkisi
Birinci dereceden akrabalarda ailesel öykü	Orta-Yüksek Artış
Benign meme hastalığı	Orta-Yüksek Artış
Mamografik olarak dens meme	Orta-Yüksek Artış
İlk doğum yaşı (>30'a karşı <20)	Orta-Yüksek Artış
Geç menapoz (>54'e karşı <45)	Orta-Yüksek Artış
Yüksek endojen östrojen düzeyleri	Orta-Yüksek Artış
Çocuklukta iyonize radyasyona maruz kalım	Orta-Yüksek Artış
İleri yaş	Orta-Yüksek Artış
Boy	Hafif-Orta Artış
Postmenopozal hormon tedavisi	Hafif-Orta Artış
Erken menarş (<12'e karşı >14)	Hafif-Orta Artış
Postmenopozal yüksek vücut kitle endeksi	Hafif-Orta Artış
Yüksek-yağ diyeti	Hafif-Orta Artış
Alkol kullanımı (~ 1 yada daha fazla içki/günde)	Hafif-Orta Artış
Doğum sayısı	Hafif-Orta Azalış
Laktasyon (uzun süreli)	Hafif-Orta Azalış
Premenopozal yüksek vücut kitle endeksi	Hafif-Orta Azalış

Önemli verilere göre, oral kontraseptiflerin kullanımı, *in utero* maruziyet, yüksek prolaktin düzeyleri ve yüksek premenopozal insulin-benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) düzeyleri meme kanseri gelişimi için risk oluşturabilen faktörlerdir. Buna karşılık fiziksel aktivite, menarşın başlamasını geciktirerek ve kiloyu kontrol ederek hastalığın

önlenmesinde bir role sahip olabilmektedir. Boy ve meme kanseri riski arasındaki ilişki IGF-I etkisinden dolayı olabilir. Radyasyona maruz kalma süresi de meme kanseri gelişimi için oldukça önemlidir. Yaşamın erken döneminde görülen radyasyona maruziyet daha geç dönemdekine oranla daha yüksek bir risk doğurabilmektedir (Miller ve ark 1989, Land ve ark 1994). Erken yaşta maruz kalınan durumlar, duyarlı hale gelmiş risk taşıyan meme dokusu kök hücrelerinin sayısını ve bu hücrelerde mutasyonların oluşma durumunu belirleyebilmektedir. Buna örnek olarak doğum ağırlığı ve boy ölçüsünün meme kanseri gelişimi ile olan ilişkisi *in utero* meydana gelen olayların dahi etkili olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir. Düşük düzeylerdeki folat, bereberinde kofaktörlerinin (Vitamin B6, B12) yoksunluğu ile birlikte, özellikle yüksek alkol alımıyla bağlantılı olarak meme kanserine neden olan anormal DNA metilasyonu yanısıra anormal DNA sentezi ile onarımına neden olabilmektedir (Mason ve Levesque 1996).

Özellikle erken yaştaki gebelik meme kanseri riskini azaltmaktadır. Bu durum menarş ile başlayıp ilk gebelik ile sonlanan süreçte memenin mutasyonlara duyarlı olduğu sürenin kısalmamasından dolayı olabilmektedir (Russo ve Russo 1997). Uzun süreli östrojen maruziyeti hastalığın gelişme riskini artırır. Östrojen maruziyetini artıran faktörler ovulatuvar siklusların sayısındaki artıştan dolayı erken menarş ve geç menopoza kapsamaktadır. Meme kanseri gelişim riski menarşın başlangıcının geciktiği her yıl için %20 oranında azalmaktadır (Henderson 2003). Laktasyon da ovulasyonu geciktirdiği için meme kanserine karşı koruyucu etkilidir.

Günlük olarak bir alkollü içki tüketen kadınlar içmeyenlere göre %10-30 daha yüksek hastalık gelişim riskine sahiptirler (Smith-Warner ve ark 1998, Longnecker 1994). Bu etkiyi açıklayabilmek için çeşitli hipotezler geliştirilmiştir. İlki, alkolün sirküle olan hormon düzeylerini artırdığını ileri sürmektedir (Schatzkin ve Longnecker 1994). Diğer hipotez ise alkolün güçlü bir mitojen olarak fonksiyon gören IGF'nin üretimini artırabileceği yönündedir (Yu 1998).

İnsan diyeti serbest radikallerin oluşumu üzerinden etki gösterebilen çeşitli karsinojenleri içermektedir. Örneğin çok pişmiş et tüketimi ve yüksek yağlı diyet meme kanseri riskini artırır (Zheng ve ark 1998). Ancak omega-3 gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin belirli tipleri bu riski azaltabilir (Bartsch ve ark 1999). Fazla miktarda lif içeren diyetler, belki de bu liflerin biliyer sistem yoluyla ekskrete edilen östrojenlerin intestinal

reabsorbsiyonunun azaltılmasındaki rolünden dolayı meme kanserine karşı koruyucu olabilmektedirler (Hunter ve Willett 1994).

1.1.4.2. Meme kanseri patolojisi

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır ve günümüzde bunların memenin terminal duktal lobüler ünitesinden köken aldığı kabul edilmektedir. Histolojik olarak meme karsinomları *in situ* ve invaziv (infiltratif) karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. *In situ* karsinomda malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken, invaziv karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. İnvaziv meme karsinomları morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilen tümörlerdir ve bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan karakteristik özellikleri vardır. Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özellikleri yanı sıra oluşturdukları yapısal paternler de göz önüne alınmaktadır. Meme karsinomaları, kanalları ya da lobülleri kaplayan epitelyal hücrelerden köken alırlar, bu yüzden duktal ya da lobüler karsinomlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Her iki tip de lokalize kalabilir ya da invaziv hale gelip ikincil tümörler oluşturabilirler. Meme karsinomlarının histolojik sınıflamasında en çok kullanılan WHO tarafından önerilen sınıflamadır (Çizelge 1.2) (İlvan 2006).

Çizelge 1.2. Meme kanserinin histolojik sınıflaması

1. *In situ* (Non-İnvaziv) karsinom

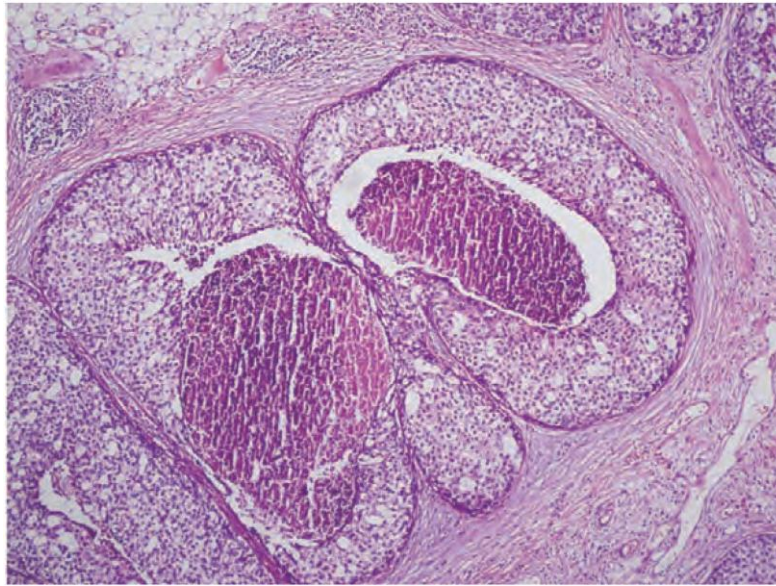
In situ duktal karsinom, *In situ* lobuler karsinom

2. İnvaziv karsinom

İnvaziv duktal karsinom, İnvaziv lobüler karsinom, Tubuler karsinom, İnvaziv kribriform karsinom, Medülller karsinom, Müsinöz karsinom, İnvaziv papiller karsinom, İnvaziv mikropapiller karsinom, Apokrin karsinom, Sekretuar (juvenil) karsinom, Adenoid kistik karsinom, Metaplastik karsinom, Nöroendokrin karsinom, İnflamatuar karsinom

1.1.4.2.1. Non-invaziv meme kanseri

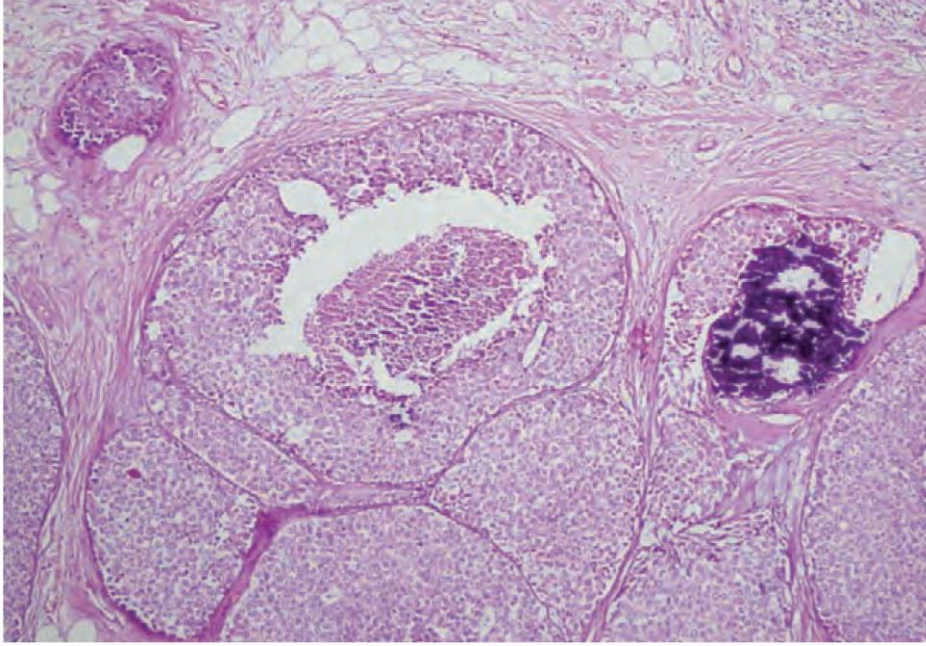
Duktal karsinoma *in situ* (DKIS). Tüm meme karsinomalarının içinde %5'lik bir paya sahiptir, DKIS lümeni dolduran fakat bazal membrana ve kendisini çevreleyen stromaya girmeyen duktal luminal hücrelerin proliferasyonunun sonucu olmaktadır (Şekil 1.3). Mikrokalsifikasyon olarak adlandırılan kalsiyum birikimleri bu hastalığın tipik bir özelliğidir. Tüm intraduktal karsinomalar tedavi edilmedikleri sürece invaze olmaya eğilimlidirler. Komedo duktal karsinoma kanalın santral alanının nekroze olduğu bir DKIS alt tipidir. Tümör hücreleri lobüllere kadar yayılabilir ve bu kanserizasyon olarak adlandırılır. Non-komedo DKIS, eksizyon sonrası düşük nüks riski (Silverstein ve ark 1992), hormon reseptörlerinin bulunması gibi olumlu biyolojik özellikleri (Poller ve ark 1993) ve düşük proliferasyon oranı (Meyer 1986) ile komedo DKIS'ten daha az agresiftir. Solid non-komedo DKIS asinuslar ya da mikropapillalar şekillendirmeyen solid proliferasyon ile karakterize diğer bir alt tiptir. Kribriform patern eşit oranda aralıklı, uniform mikroasinuslar şekillendiren hücrelerden oluşmuştur. Mikropapiller non-komedo DKIS hücreleri küçük papiller projeksiyonlar ortaya koyarlar.



Şekil 1.3. *In situ* duktal karsinom (Komedo tipte) (Özmen 2012).

Lobüler karsinoma *in situ* (LKIS). Meme kanseri olgularının %5-10'una karşılık gelmektedir. Yuvarlak çekirdekli, belirgin hücre membranlı ve orta düzeyde göreceli olarak saydam sitoplazmalı üniform küçük hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 1.4). LKIS'da vakaların yaklaşık %20'sinin 20-25 yıllık bir süre içerisinde invaziv karsinoma

ilerlediği gösterilmiştir. Her ikisi de meme lobüllerine ve ekstralobüler kanallara yayılabildiğinden bazen DKIS ve LKIS'i birbirinden ayırt etmek zordur. Bazı durumlarda histoloji paterni ara bir form sunabilmektedir. Duktal lezyonlarda hemen daima pozitif olan e-cadherin ekspresyonu lobüler neoplaziler ve invaziv lobüler karsinomlarda genellikle saptanmaz. Pleomorfik, taşlı, yüzük hücreli ve komedo nekroz içeren LKIS'larda DKIS gibi davranılması ve reeksizyon yapılması önerilmektedir (Özmen 2012).



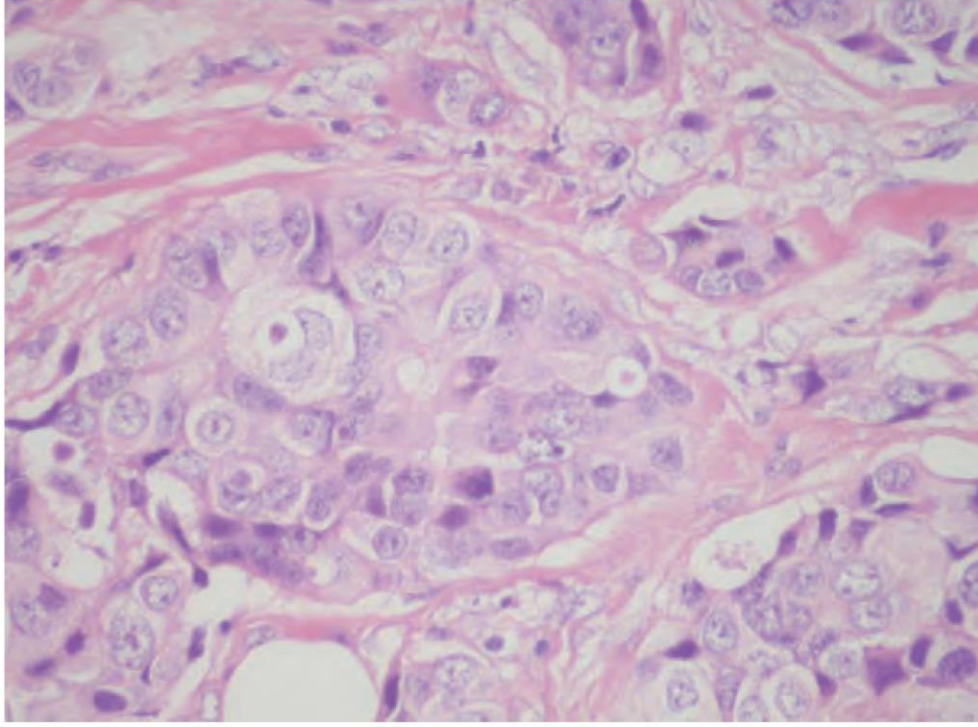
Şekil 1.4. Pleomorfik lobüler karsinoma *in situ* (Özmen 2012).

1.1.4.2.2. İnvaziv meme kanseri

İnvaziv karsinomalar meme kanserlerinin %90'ını oluşturmaktadır. Bu kanserleri kategorize etmek heterojeniteden dolayı oldukça zor olmasına rağmen, metastatik yayılım ile davranışın paterni ve prognoz hakkında bilgi sağlama açısından önemlidir. (İlvan 2006, Özmen 2012).

İnvaziv duktal karsinoma (İnfiltratif DKIS): Tüm meme kanserlerinin %60'ı ve invaziv olanların %70'i bu gruptandır. Memenin diğer invaziv karsinomalarının içinde en agresif olan tipidir. Makroskopik inceleme sırasında palpasyonda serttir ve mikroskopik pütürlü bir dokuya sahiptir. İnvaziv DKIS bağ doku dizileri ile etrafı örtülü bezler ya da solid yuvalardan meydana gelmektedir fakat tipik bir histolojiye sahip değildir (Şekil 1.5). Sitolojik özellikleri de hücrelerin boyutlarının küçükten büyüğe değişebildiği ve şekillerinin yuvarlak, pleomorfik ya da ikisinin arasında olabildiği heterojen bir durum

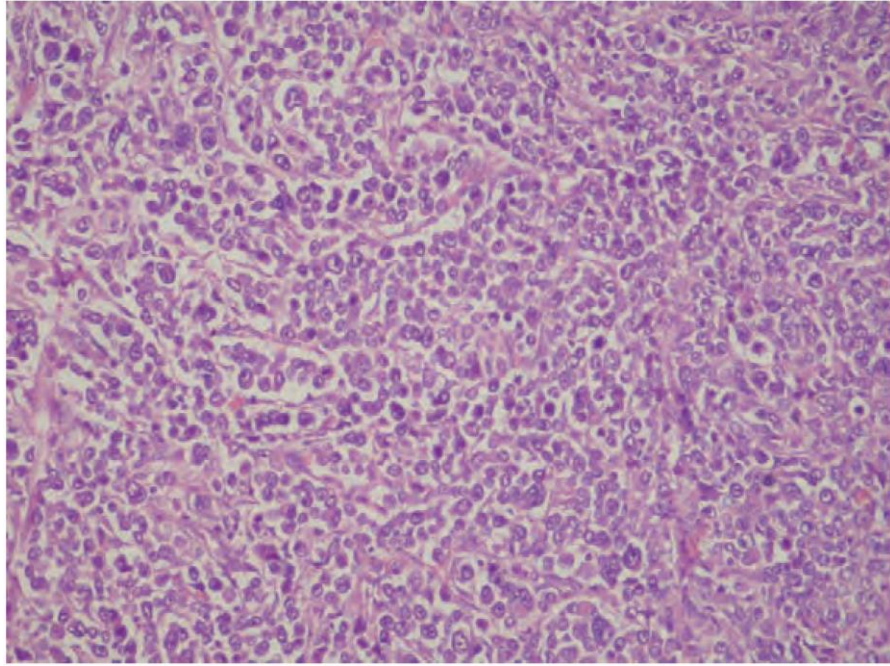
gösterir. Ayrıca sitoplazmanın miktarı da oldukça değişkendir. Boyut, şekil, kromatin ve nükleolustan meydana gelen çekirdek özellikleri hafiften şiddetliye atipik formlar gösterebilirler. İnvaziv DKIS'leri kategorize etmede çeşitli derecelendirme sistemleri (Bloom-Richardson dereceleme sistemi) belirlenmiştir (Bloom ve Richardson 1957). Bloom-Richardson dereceleme sistemi tubül formasyonu yüzdesi, çekirdek pleomorfizminin derecesi ve bir alandaki mitoz sayısı gibi başlıca temel histolojik özelliklere bağlı bulunmaktadır.



Şekil 1.5. İnvaziv duktal karsinoma (Özmen 2012).

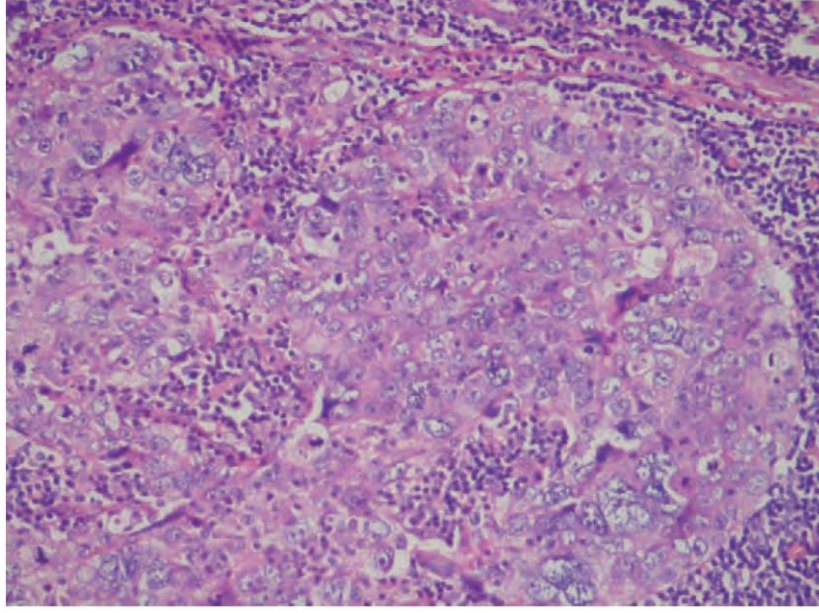
İnvaziv lobüler karsinoma (İnfiltratif LKIS): İnvaziv meme kanseri olgularının %15'ine karşılık gelmektedir (Simpson ve Page 1992, Page 1991, Anderson ve ark 1991). Bu tip, tespit edilebilen palpe edilir bir kitle şekillendirebilir fakat diffüz bir lezyonun varlığı palpasyon ya da mammografiyle teşhise olanak tanımaz. Klasik invaziv LKIS'nin histolojik görünümü düşük-dereceli nükleer özellikler gösteren küçük, yuvarlak, zayıfça ve yetersiz düzeyde birleşmiş hücreleri içerir (Şekil 1.6). Birbirlerinden ayrışık hücreler, patolojiye uğramamış kanalların çevresinde tek sıra halinde dizilimler (Indian file) ya da targetoid paternler (bull's-eye/öküz gözü paterni) şekillendirirler. Solid, alveolar, mikst ve pleomorfik alt tipler olarak çeşitli varyantlar tanımlanmıştır. Pleomorfik alt tip haricindeki tüm tiplerin sitolojik özellikleri klasik invaziv LKIS'teki ile aynıdır ve büyüme paternleri

tarafından ayırt edilirler. Pleomorfik LKIS diffüz bir büyüme paterni gösterir ve yüksek dereceli nükleer özelliği ile ayırt edilir. İnvaziv DKIS ile karıştırılabilir.



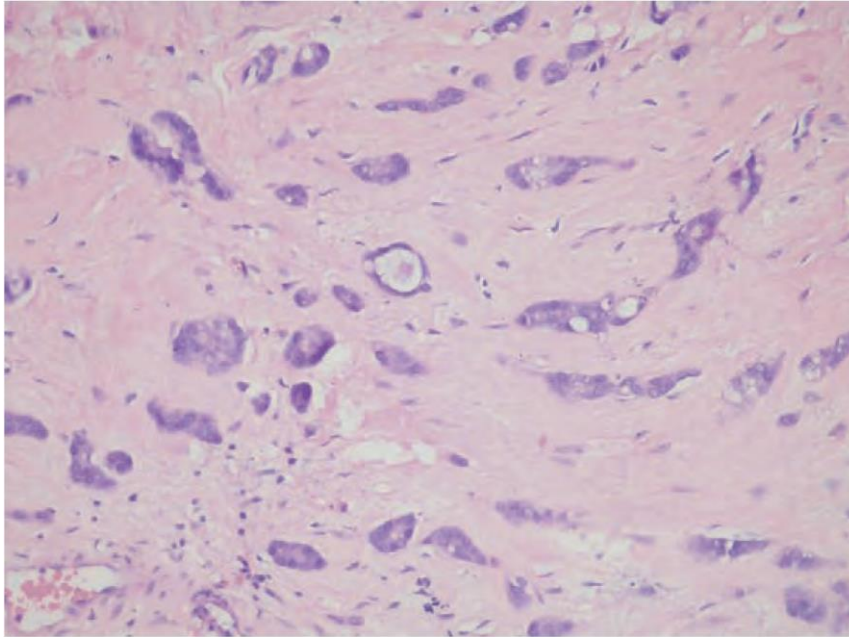
Şekil 1.6. İnvaziv lobüler karsinoma solid patern (Özmen 2012).

Medüller karsinoma: Genç kişilerde görülen meme karsinomalarının göreceli olarak yaygın olmayan bir tipidir (%5). Genellikle palpe edilebilir tiptedir. Tipik medüller karsinomanın mikroskopik özellikleri kenara itilen yüksek dereceli nükleuslar, gevşek stroma ve lenfositik infiltrasyon ile karakterize solid-sinsisyal hücre gruplarıdır (Şekil 1.7). Atipik alt tip iyi tanımlanmış bir kenar itilimine sahip değildir ve daha az lenfoid infiltrasyon gösterir (Özmen 2012).



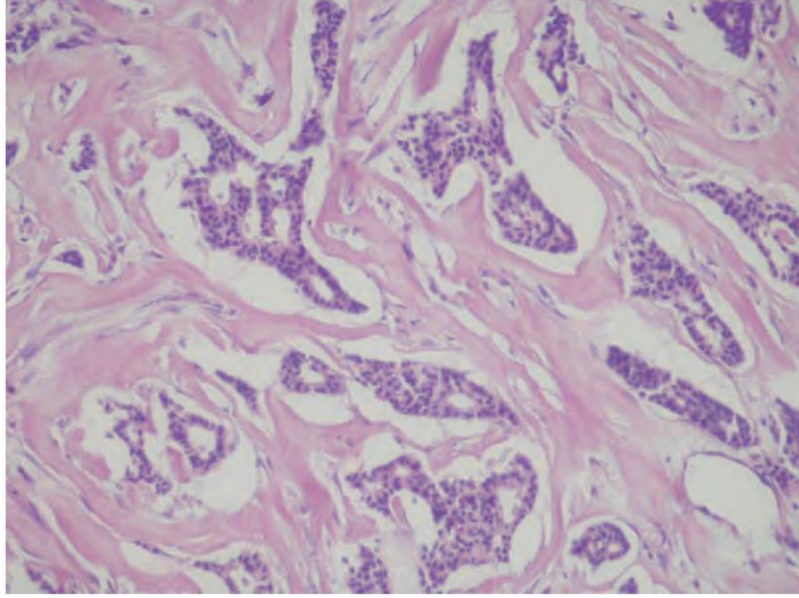
Şekil 1.7. Medüller karsinoma (Özmen 2012).

Tübüler karsinoma: Fazlasıyla diferansiye bir invaziv meme karsinom tipidir. Tüm meme kanserlerinin %5'ine tekabül eder ve tübüllerin formasyonunu içermektedir. Bu kendine özgü alt tipin prognozunun tüm invaziv meme karsinomalarının en iyisi olduğu belirtilmektedir. Mammografi ile tespit edilebilen palpe edilebilir bir kitle gösterebilir. Mikroskopik olarak değişen şekillerde küçük bezler ya da tübüllerden oluşmaktadırlar (Şekil 1.8). Nükleuslar yüksek dereceli özellikler göstermezler (Özmen 2012).



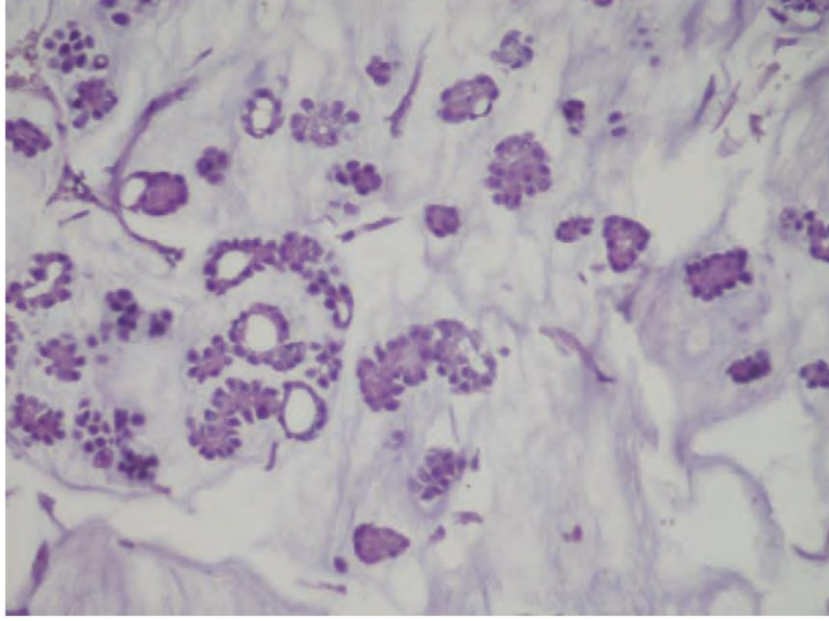
Şekil 1.8. Tübüler karsinoma (Özmen 2012).

İnvaziv kribriform karsinoma: Bir önceki lezyonda olduğu gibi küçük düzenli hücre kitlelerinden oluştuğu için biyolojik olarak tübüler karsinomaya benzerdir (Venable ve ark 1990). İnvaziv adalar kribriform bir görünüm sergiler (Şekil 1.9). Nükleuslar yüksek dereceli atipi göstermezler. Meme karsinomları içinde çok iyi prognoza sahip tümörler arasında yer alır (Özmen 2012).



Şekil 1.9. İnvaziv kribriform karsinoma (Özmen 2012).

Müsinöz karsinoma: Mukoid, jelatinöz ya da kolloid karsinoma olarak da bilinir ve tüm meme kanserlerinin %2-3'üne tekabül etmektedir. Tipik ve değişken alt tiplere sahiptir, ayrıca ilki daha iyi bir prognoz sergilemektedir. Değişken alt tip ileri yaşlı kadınlarda daha yaygındır (Rosen ve ark 1985). Yumuşak palpe edilebilir bir kitle ile karakterizedir. Mikroskopik olarak ekstraselüler müsin içinde askıda duran küçük malign hücre adalarından oluşmaktadır. Sitolojik ve nükleer özellikler düşük ile orta-dereceli tümörlerdeki gibi olmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Müsinöz karsinoma (Özmen 2012).

Meme kanserinin nadir tipleri: Toplu olarak bu kanserler tüm meme kanseri olgularının %1'inden daha azına tekabül etmektedir. Adenokistik karsinoma, karsinosarkoma, metaplastik karsinomalar (Wargotz ve Norris 1990), invaziv papiller karsinoma (Fisher ve ark 1980), bazal hücreli karsinomalar, taşlı-yüzük hücreli karsinoma (Merino ve LiVolsi 1981) ve lipidden zengin karsinomalar denilen bu kanserler az sayıda hastada gözlemlenmiştir. Az rastlanılan tipler oldukları için klinik korelasyonları gerçekleştirilememiştir (Damjanov 1996).

1.1.4.3. Meme kanseri moleküler biyolojisi

Meme kanseri esas olarak farklı genlerdeki birçok genetik değişikliğin ve/veya mutasyonların akümülyasyonundan kaynaklanmaktadır. Meme kök hücrelerindeki mutasyonlar ve iyonize radyasyon, kimyasal karsinojenler ya da oksidatif hasar nedeniyle edinilen somatik mutasyonlar hastalıktan sorumlu olabilmektedirler.

Hastalığın herediter formu tüm olguların %5-10'unu temsil etmektedir. BRCA1 ve BRCA2 meme kanserine yakınlıkla ilişkili en temel genlerdir (Marcus ve ark 1996, Miki ve ark 1994, Stratton ve Wooster 1995). Bu genlerin her ikisi de homolog rekombinasyon ve çift zincir kırıklarının tamiri yoluyla genomik stabiliteyi sürdürmektedir. Bu genler transkripsiyon ve hücre siklusu kontrolünde tümör supresör genler olarak görev yaparlar (Venkitaraman 2002). BRCA1'in RNA helikaz A üzerinden RNA polimeraz II ile

kompleks oluşturduğu ve transkripsiyonu regüle ettiği bulunmuştur. BRCA1'in p53 ve androjen reseptörünün transkripsiyonel aktivitesini stimüle ettiği (Park ve ark 2000, Yeh ve ark 2000), östrojen reseptör- α (ER α) (Fan ve ark 1999, Ma ve ark 2005) ve c-myc (Wang ve ark 1998) aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir. BRCA1 çeşitli büyüme inhibe edici genlerin ekspresyonunu da stimüle eder (Somasundaram ve ark 1997, Jin ve ark 2000, Williamson ve ark 2002). Çeşitli çalışmalar S-fazına girişi bloklayan BRCA1 (p21 ve p27KIP1) aracılığında çeşitli siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin transaktivasyonunu göstermektedir (Somasundaram ve ark 1997, Williamson ve ark 2002). Ancak BRCA2'nin transkripsiyonel regülatör olduğuna dair daha az miktarda kanıt bulunmaktadır. BRCA1'deki mutasyonlar herediter olguların %40'ını, BRCA2'dekiler %25'ini oluşturmaktadır (Berry ve ark 1997, Couch ve ark 1997). BRCA1 geninin her iki son ucundaki mutasyonlar daha agresif tümörler ile ilişkilidir. 5' ucundaki mutasyonlar meme ve yumurtalık kanserlerinde gözlenirken, 3' ucuna yakın olanlar sadece meme kanserinde gözlenmektedir. BRCA1'in promotor hipermetilasyonu nedeniyle epigenetik inaktivasyonu meme kanseri olgularının bazılarında gözlemlenmiştir (Dobrovic ve Simpfendorfer 1997). Ancak BRCA1 mutasyonları inkomplet penetransa sahiptirler, yani fonksiyonel olarak genetik aktarıma uğramayabilir, bu nedenle BRCA1/BRCA2 mutasyon taşıyıcılarının %16-55'i meme kanseri geliştirmemektedir (Antoniou ve ark 2003, Ford ve ark 1998).

BRCA genlerinden başka p53, ATM, CHEK2, ve PTEN'in germ hattı mutasyonlarının meme kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Hill ve ark 1997, Bell ve ark 1999, Cantor ve ark 2001). Bir tümör supresör gen olan p53'ün mutasyonları tüm meme kanseri olgularının yaklaşık %75'inde (Norberg ve ark 1998, Geisler ve ark 2001) ve sporadik olanların %20-40'ında (Beroud ve Soussi 1998, Soussi 2000) gözlenmiştir. p53'ün, hücre siklusu regülasyonu, DNA hasarı tamiri, apoptoz ve anjiyogenezin inhibisyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle fonksiyonel protein kaybının DNA hasarına yanıt olarak büyüme arestini ortadan kaldırdığı ve mutasyona uğramış DNA'nın replikasyonuna olanak sağladığı öne sürülmüştür. p53-regüle genlerin değişmiş ekspresyonları da gözlenebilmiştir.

ATM proteini, iyonize radyasyondan kaynaklanan çift zincir kırıklarının tespiti ve tamiri aracılığıyla görev yapar. Homozigot ATM mutasyonları taşıyan bireyler Ataksi Telenjektazi hastasıdır ve bu kansere yatkınlık oluşturan dejeneratif bir hastalıktır (Thompson ve Easton 2004). CHEK2 DNA kırıklarını tamir eden bir G2 kontrol noktası

kinazıdır. BRCA1/2 mutasyonları bulunmayan ailesel meme kanseri olgularının %5'inde CHEK2 geninin delesyon mutasyonları tanımlanmıştır (CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium 2004). PTEN tümör supresör gen adayı olarak tanımlanmış bir lipid fosfatazdır. PTEN'in hücre büyümesi ve sağ kalımı için gerekli olan PKB/Akt'yi inhibe ettiği (Downward 1998) ve integrin-aracılı hücre migrasyonunu bloke edip böylece metastazı engellediği (Tamura ve ark 1998) ileri sürülmektedir. Bu bulgu PTEN'in fonksiyon kaybı durumunda metastazın şekillendiğini ortaya koymaktadır.

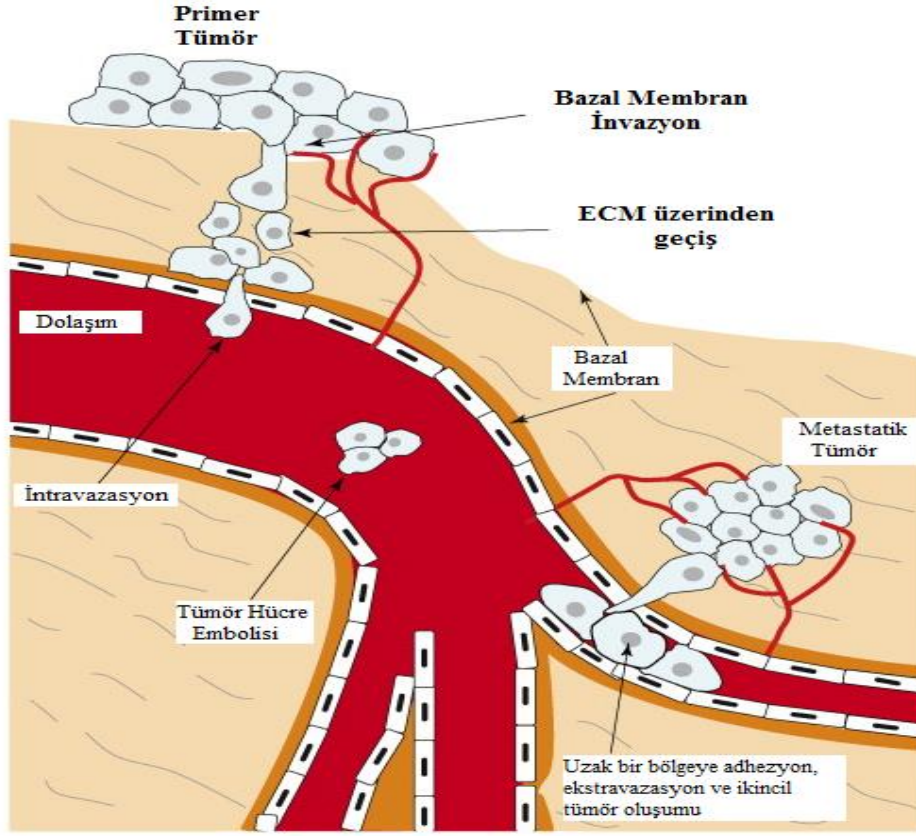
HER2'nin meme kanserindeki rolü 20 yıl önce tanımlanmıştır. HER2 (c-erb-B2) epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörlerinden biridir. EGF reseptörlerinin, bu reseptörlerin hetero ya da homodimerizasyonunu indükleyen birçok ligandla (EGF, TGF- α , hergulin gibi) etkileşime girdiği bilinmektedir. Bunu otofosforilasyon ve intrinsik katalitik bölgenin aktivasyonu takip eder. EGF proliferasyonu, anjiyogenezi, metastazı ve EGFR bağlanımı üzerinden apoptozun engellenmesini stimüle eder (Sunpaweravong ve Sunpaweravong 2005). HER2 geninin bir proto-onkogen olarak fonksiyon gösterdiği bilinmektedir ve bu gen tüm meme kanseri olgularının %25-30'unda aşırı eksprese edilmektedir (Slamon ve ark 1987). Aşırı ekspresyon hastalığın hızlı ilerlemesi ve metastaz, daha agresif klinik seyir, yaşam süresinin kısalması ve kemoterapiye daha az yanıt verilmesi ile ilişkilidir (Horton 2002, Slamon ve ark 1987, Tetu ve Brisson 1994). Bu nedenlerle HER2'ye yönelik monoklonal bir antikor olarak hücre proliferasyonunu, hücre büyümesini inhibe eden ve meme kanseri hücre apoptozunu indükleyen Trastuzumab geliştirilmiştir (Kita ve ark 1996, Kunisue ve ark 2000). Bu bulgular HER2 ekspresyonu olan hastalarda Trastuzumab'ın tedavi amaçlı kullanımını mümkün kılmıştır.

Meme kanseri başlangıcı ve ilerleyişindeki epigenetik değişiklikler son 10 yılda yoğun olarak çalışılmıştır. Belirli genlerin hipermetilasyonu ve global hipometilasyonu meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Tümör supresör gen p16'nın hipermetilasyonunun hücre büyümesini düzenleyici sinyalleri artırdığı (Herman ve ark 1995, Silva ve ark 2003) ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu (Hu ve ark 2003) ileri sürülmüştür. Meme kanseri olgularında DNA hasarına yanıt genlerinden örneğin; BRCA1 (Niwa ve ark 2000) ve uyumsuzluk tamiri genleri hMLH1 ve hMSH2'nin (Murata ve ark 2002) metilasyonu bildirilmiştir. Tamir genlerindeki bozulma kanser hücreleri için olumlu olan sporadik mutasyonların akümüülasyonunu artırabilir. Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve retinoik asit beta 2'nin (RAR β 2) metilasyon üzerinden genetik olarak susturumu bazı *in*

vitro ve *in vivo* çalışmalarda tespit edilmiştir (Piva ve ark 1990, Lapidus ve ark 1996, Sirchia ve ark 2000, Widschwendter ve ark 2000). E-cadherin geni (hücre adhezyon molekülü) ve TIMP-3 geninin (proteazların inhibitörü) metilasyonu meme kanserinin metastazını kolaylaştırabilir (Graff ve ark 2000, Bachman ve ark 1999). Cyclin D2 ve varsayılan putatif bir sitokin olan High in Normal-1 (HIN-1) genlerinin invaziv meme kanseri olgularında metile olduğu gösterilmiştir (Fackler ve ark 2003, Krop ve ark 2001). Sinyal iletimi, hücre siklusu regülasyonu, apoptoz ve malign transformasyonda role sahip olan 14-3-3 σ geninin primer invaziv meme karsinomalarının %50'sinden fazlasında metile olduğu bulunmuştur (Evron ve ark 2001). Ayrıca global hipometilasyon da meme kanserinde genomik instabilite ile ilişkilendirilmiştir (Vilain ve ark 1999). Bunun tümör tetikleyici genler ya da pro-metastatik genlerin aktivasyonundan dolayı olduğu ileri sürülmüştür. Hiçbir proto-onkogenin demetile olduğu gösterilememesine rağmen, invaziv meme kanseri hücrelerinde heparan sülfat proteoglikanları degrade eden heparanaz ve bir serin proteaz olan uPA gibi bazı metastaz genlerinin hipometile olduğu bildirilmiştir (Shteper ve ark 2003, Guo ve ark 2002).

1.1.4.4. Meme kanseri metastazı

Metastaz kanserin hayatı en çok tehdit eden evresidir. Meme kanserinin benign ve malign formları metastaz ile ayrılmaktadır. Metastaz; bir primer tümörden hücrelerin ayrılması, bazal membranın proteolitik enzimlerin sekresyonu yoluyla degradasyonu, kan ya da lenfatik dolaşım sistemine girişi (intravazasyon), ikincil bir dokuya adezyonu ve anjiyogenezi içeren kompleks bir süreci kapsamaktadır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Metastaz (Lee ve Lim 2007).

1.1.4.4.1. Primer tümörden hücrelerin ayrılması

Bir tümör hücresi metastaz yapabilmek için ilk olarak primer tümör ile bağlantısını kaybetmek zorundadır. İmmünglobülin-benzeri adezyon molekülleri (CAMs) ve kaderinler hücreleri birbirine bağlayan CAM'lerin iki ayrı ailesidir. Kaderinler, kateninler aracılığıyla hücre iskeleti ile etkileşime giren transmembran glikoproteinlerdir. Bir tümör supresör gen olarak tanımlanan E-kaderin kanser hücrelerinin birlikteliğini kaybettiği ve invaziv özellikler kazandığı karsinomaların bazılarında kaybolmuştur (Behrens ve ark 1989). Metastatik ve non-metastatik kanser hücre hatlarının adheziv kapasitesi üzerine yapılan çalışmalar metastatik olanların non-metastatik olanlardan daha az adheziv kapasitesine sahip olduklarını göstermiştir (Mycielska ve ark 2004). İntegrinler hücre-ekstraselüler matriks (ECM) etkileşimlerine ve intraselüler sinyal iletimine aracılık eden moleküllerdir. İntegrinlerin ekspresyon paterninin değişmesi tümör hücrelerine motilite ve bazal membran boyunca invazyon yeteneği kazandırabilir.

1.1.4.4.2. Proteolitik enzimlerin sekresyonu yoluyla bazal membranın degradasyonu

Bazal membran ve altında uzanan stroma ekstraselüler matriks içerir ve organ kompartmanlarını birbirinden ayıran ana bağ doku birimlerini oluşturur. Göç eden tümör hücrelerinin metastaz sırasında epitelyal bazal membrandan penetre olması ve stromaya girmesi gerekmektedir. Bazal membran tip 4 kollajen, glikoproteinler (örn: laminin), fibronektin, proteoglikanlar ve gömülü büyüme faktörlerini içermektedir. Bazal membranın organizasyonu ve yayılımı invaziv bir karsinomaya dönüşüm esnasındaki değişime bağlıdır. Tümör hücreleri ekstraselüler matriks bariyerlerini degrade edebilmek için proteolitik enzimleri sekrete etmek zorundadır. Göç eden tümör hücrelerinin neredeyse tümü bu enzimlerden bir ya da daha fazlasını aşırı eksprese etmektedir (Nagase ve Woessmer 1999). Bazal membranın degradasyonu sadece mevcut proteolitik enzimlerin miktarına değil, aynı zamanda aktif proteazlar ve bunların inhibitörleri arasındaki dengeye de bağlıdır.

1.1.4.4.3. İntravazasyon

Göç eden tümör hücrelerinin ikincil bir tümör alanına ulaşmak için dolaşıma penetre olmaları gerekmektedir. Bu ise damarın stromal yüzüne bağlanma, bazal membranın proteolizi, endotelyal hücreler arasında hareket ve vasküler sistemde canlı kalmasına bağlıdır. Sadece birkaç hücre canlı kalabilir ve hedef organların kapiller yataklarında tutulup, invaze olarak ikincil tümörleri şekillendirirler. Bir proteaz reseptörü olan ürokinaz reseptörünün intravazasyon sürecinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Hollas ve ark 1991). Ekstravazasyon tümör hücrelerinin damardan kaçışı için gereklidir ve intravazasyon süreci ile aynı fakat ters yöndedir. Bir transmembran adhezyon molekülü olan E-selektin endotelyal hücrelerde eksprese edilir ve kanser hücrelerinin endotele yapışıp bağlanmalarında önemlidir (Pecorino 2005).

1.1.4.4.4. İkincil bir dokuya adhezyon

Dolaşımdaki tümör hücreleri başarılı bir şekilde metastatik bir koloni oluşturmak için immunolojik denetimden kaçmalı, uzak bir alanda tutulmalı ve ekstravazasyon gerçekleştirmelidir. Hücre adhezyon moleküllerinin, integrinlerin ve kaderinlerin kaybı ya da değişimi hücre motilitesini, bu sayede de organ parenşimi boyunca invazyonu kolaylaştırabilir (Chan ve ark 1991). Bu basamak için bazal membranın ve bağ dokunun ekstraselüler bileşenlerinin proteolitik degradasyonu gereklidir.

1.1.4.4.5. Anjiyogenez

Tümör hücrelerinin ikincil dokuya tutunur tutunmaz, bu yeni çevrede prolifer olmaları ve sağ kalmaları gerekmektedir. Hücrelerin proliferasyonu için gerekli olan besinler ve oksijen anjiyogenez aracılığıyla sağlanır. Tümör vaskülarizasyonu bu nedenle tümör metastazı ve büyümesi için hız sınırlayıcı basamaklardan biridir (Folkman 1974). Anjiyogenez olmadan hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengenin sabit olduğu ve bu nedenle primer tümörlerin hacminin sabit tutulduğu hipotezi kurulmuştur (Holmgren ve ark 1995). 0.125 mm²'den daha büyük bir tümör kitlesi sadece besin difüzyonu ile sağkalım gerçekleştiremez, bu nedenle anjiyogenezi başlatır (Folkman 1974). Anjiyogenez olgun damarların destabilizasyonunu, endotelial hücrelerin proliferasyonu ile migrasyonunu ve olgunlaşmayı gerektirmektedir. Anjiyogenik anahtar ve değişim anjiyogenik uyarıcılar ve inhibitörler arasındaki dengeye bağlıdır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) benzeri büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri (VEGFR), anjiyopoetinler, Tie reseptörleri, efrinler ve efrin reseptörleri (Ephrin-Eph) anjiyogenik uyarıcıların örnekleridirler (Pecorino 2005). Anneksini bloke eden anjiyostatin ve endotelial hücrelerde MAPK yolağı ile MMP'leri bloke eden endostatin iyi bilinen anjiyogenez inhibitörleridirler.

1.1.4.4.6. Metastaz supresör genler

Bu genler primer tümör büyümesini etkilemeden spesifik olarak metastazı baskılayan proteinleri kodlamaktadırlar. Non-metastatik 23 (Nm23) böyle tanımlanmış ilk gendir (Steeg ve ark 1988). Bugüne kadar farklı kanser türlerinde 11 metastaz supresör gen tanımlanmıştır (Dong ve ark 1995, Seraj ve ark 2000, Lee ve ark 1996, Gildea ve ark 2002, Goldberg ve ark 2003, Xia ve ark 2001, Fu ve ark 2003, Guan ve ark 2000). Non-metastatik olanlar ile karşılaştırıldığında, bu genlerin ortak özelliği yüksek derecede metastatik kanser hücrelerinde azalmış ekspresyonlarıdır (Steeg 2003). Metastatik supresör genler invazyonu, büyüme faktörü reseptör sinyalizasyonunu, MAP kinaz yolağını, hücre-hücre iletişimi ve transkripsiyonel düzenlenmeyi içeren çeşitli hücre fonksiyonları etkilerler (Bogenrieder ve Herlyn 2003).

1.1.4.4.7. Metastaz mekanizmaları

Kanserdeki metastatik potansiyeli açıklamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Bu hipotezlerden en geçerli olanı Stephan Paget (1889) tarafından öne sürülen

"Tohum ve toprak fenomeni"dir. Burada spesifik kanserlerin belirli organlara metastazı ve metastaz gösteren tümör hücrelerinin (tohumların) belirli organlara (toprak) affinitesinin olduğu açıklanmaktadır. Paget sadece seçili hücrelerin invazyonu başardığı, dolaşımda sağ kaldığı ve ikincil bir dokuya bağlandığı böylece metastazı başardığı metastatik heterojeniteyi ileri sürmüştür. Hedefe yönelik bir metastaz için bu hücreler organ tarafından eksprese edilen spesifik hücre yüzeyi reseptörleri ve büyüme faktörlerine gereksinim duymaktadır (Fidler 2003). Kemokinlerin metastatik meme kanseri hücrelerini akciğerlere ve lenf nodüllerine toplayan bu reseptörlerden biri oldukları bulunmuştur. Metastaz yapan kanser hücreleri kemokin reseptörlerini eksprese ederler ve hedef alanlar bu reseptörlere bağlanan molekülleri eksprese ederler (Muller ve ark 2006). Sitokinleri eksprese eden özefagus, baş-boyun ve diğer bölgelerin kanserlerinin spesifik alanlarda ikincil tümörler şekillendirdikleri belirlenmiştir (Kaifi ve ark 2005, Muller ve ark 2006, Ishikawa ve ark 2006, Saur ve ark 2005). PDGF gibi büyüme faktörleri de metastaz alanını ve başarısını etkileyebilir (Uehara ve ark 2003). Birçok çalışma farklı kanserler için Paget'in hipotezini desteklemektedir (Holleran ve ark 2002, Gauthier ve ark 2004). Genetik analiz sonuçları metastatik bir tümör hücresinin mutasyonların birikimine gereksinim duyduğu, oysa non-metastatik hücrenin buna ihtiyaç duymadığı fikrini doğrulamıştır. Farklı evrelerdeki tümörlerde meydana gelen genetik değişikliklerin analizi, ileri evre tümörlerdeki değişimlerin erken evrede olanlardakinden daha fazla olduğunu göstermiştir (Yokota 2000). Hayvan deneyleri metastazın seyrek olduğunu ve tümör hücrelerinin sadece %0,001'nin ikincil bir lezyonu şekillendirmede payı olduğunu göstermiştir (Weiss 1990, Egan ve ark 1987). Çeşitli çalışmalarda meme kanseri hücrelerinin farelere enjeksiyonu ile metastaz oluşturulmuştur. Sonuçlar farklı organlarda oluşmuş metastazların gen ekspresyon profillerinde farklılıkları göstermiştir (Kang ve ark 2003, Minn ve ark 2005). Araştırmacılar gen ekspresyon profillerinin organ-spesifik olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmalardaki en temel sorun farklılıkların metastaz sırasında meydana gelen ya da primer tümörün yayılımı için gerekli olan ikincil olaylardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemedeki zorluktur.

Ancak klinik bulgular klasik mutasyon birikimi profilinin kanserlerin sadece küçük bir kısmında bulunduğunu göstermiştir. Buna ek olarak meme, prostat ve akciğer kansinomları için mutasyonların artan sayısı ve histolojik agresiflik arasında pozitif bir korelasyon kurulamamıştır (Schedin ve Elias 2004). Bu gözlemler tümör progresyonu ve metastazı için yeni bir hipotezin kurulmasına yol açmıştır. Bu hipotez metastazın

mutasyonların birikimine gereksinim duymadığını ve geç evredeki bir olay olmadığını fakat metastatik olmak için doğan tümör hücrelerinin bulunduğunu ileri sürmektedir. Primer tümörlerin ekspresyon profilleri metastaza neden olan mutasyonların tümör progresyonunda göreceli olarak erken dönemde edinildiğini ortaya koymuştur (Van't Veer ve ark 2002). Metastatik kanser hücreleri ve primer tümör hücrelerinin her ikisinin de gen ekspresyon paternlerindeki benzerlikleri gösteren DNA mikroarray çalışmalarından bu durumu destekleyici sonuçlar alınmıştır (Bernards ve Weinberg 2002, Weigelt ve ark 2003, Budhu ve ark 2005). Bu hipotez küçük-boyutlu primer tümörlerde gözlemlenen metastazın nedenini açıklayabilir. Primer ve sekonder tümörlerin gen ekspresyon paternlerini analiz eden diğer bir çalışma (Braun ve ark 2001)'da primer tümör gelişiminin erken döneminde metastazın rotasının belirlendiği ileri sürülmüştür. Metastatik potansiyel tümör gelişiminin başlangıcından beri bulunabildiğinden dolayı araştırmacılar, kanseri başlatan onkogenler ve tümör supresör genlerin de metastazı tetikleyebileceğini bildirmektedirler. Bu durum, metastazın ras ve myc onkogenlerindeki mutasyonlara yanıt olarak başladığını gösteren çalışmalarda kullanılan fare modellerindeki bulgular ile de doğrulanmıştır ve metastazda rol oynayan kanser genleri tanımlanmıştır (Bernards ve Weinberg 2002).

Başka bir hipotez metastaz sürecinde kalıtımın önemine işaret etmektedir (Park ve ark 2005). Sinyal-indüklemeli proliferasyon-ilişkili gen 1'in (Sipa1) metastaz etkinliğindeki türe spesifik farklılıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur ve bu predispozisyon modeli için bir kanıt oluşturmaktadır. Bu çalışmada Sipa1 allelik varyantlarının değişmiş ekspresyonunun metastatik etkinliği hücresel adhezyon ve proliferasyonu değiştirmesi sayesinde modüle ettiği gösterilmiştir. Bu bulgu metastatik potansiyelde polimorfizmlerin önemine işaret etmektedir. Başka bir çalışmada (Qiu ve ark 2004) primer meme tümörlerinde metastaz öngörülebilir farelerde 17-gen ekspresyon profili belirlenmiştir. Aynı profil farelerin normal meme dokularında da tanımlanmıştır. Bu durum metastaz-ilişkili gen ekspresyon paterninin normal dokuda önceden var olduğunu göstermektedir. Yazarlar buradan hareketle metastazın yapısal ya da kalıtsal bir karakter olabildiğini ve mutasyonların birikimine gereksinim duymadığını belirtmişlerdir.

Diğer bir hipotez (Freireich ve ark 2005) de metastazın kökeninin vücudun primer tümöre değil, sistemik olarak rol oynayan karsinogene karşı yanıt olduğunu ileri sürmüştür. Primer ve sekonder tümörler arasındaki farkın klonal evrimin sonucu olmadığı, sistemik bir karsinojenden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bilinmeyen primer bir kökeni olan

tümörlerin gözlemlenmesi bu hipotezi desteklemektedir. Fakat bu hipotez biyolojik bir bakış açısından olaya yaklaşmakta, metastazın kesin mekanizmasını moleküler düzeyde açıklamaktan uzak kalmaktadır.

1.1.5. İyon Kanalları ve Kanser

İyon kanallarının eksitasyon, kas kasılması, hacim düzenlenmesi ve hormon sekresyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Farklı tür kanserlerde tümör şekillenmesi ve ilerleyişinde iyon kanallarının rolü 10 yıldan daha fazla bir süre çalışılmıştır. Voltaj-kapılı potasyum kanallarının (VGPC) çeşitli tipleri kolon, meme, prostat, akciğer, mide, idrar kesesi, pankreas, lenfoma ve melanoma kanserleri ile ilişkilendirilmiştir (Abdul ve Hoosein 2002a, Abdul ve Hoosein 2002b, Lastraioli ve ark 2004, Kim ve ark 2004, Pardo ve ark 1999, Quadid-Ahidouch ve ark 2001, Quadid-Ahidouch ve ark 2004a, Quadid-Ahidouch ve ark 2004b, Abdul ve ark 2003, Mu ve ark 2003, Fraser ve ark 2003, Rane 2000, Takanami ve ark 2004, Shao ve ark 2005, Jager ve ark 2004, Smith ve ark 2002, Meyer ve ark 1999, Schwab ve ark 1999). Bazı VGPC'lerin kanserde upregüle olduğu ve tümör hücrelerinin proliferasyonunda rol oynadıkları gösterilmiştir. K^+ kanal alt tiplerinden birine ait aktivitenin hücre siklusu ilerleyişi sırasında M/G1 fazında artış fakat S/G2 fazında bir azalış gözlemlendiğinde değiştiği gösterilmiştir (Day ve ark 2001). Bu kanalın MAPK, CDK-1(Camacho ve ark 2000) ve yukarıdaki dalgalanmayı açıklayabilen diğer hücre siklusu düzenleyici proteinler (Piros ve ark 1999) için bağlanma alanları içerdiği bulunmuştur. Öte yandan mikrotübüllerdeki ve intraselüler Na^+ konsantrasyonundaki değişiklikler hücre siklusu boyunca K^+ kanalı aktivitesini etkilemektedir (Day ve ark 2001). Hücre bölünmesi sırasında büyüme faktörleri ve kinazlar vasıtasıyla da K^+ kanallarının düzenlendiği belirlenmiştir (Roderick ve ark 2003). Örneğin; PI-3 kinaz üzerinden aktive olan serum ve glikokortikoid kinaz SGK1'in ubikuitin ligaz Nedd4-2'yi inhibe ettiği, böylece iyon kanallarının endositozunu engellediği bulunmuştur. Bu bulgu mitojenik sinyaller aracılığıyla iyon kanallarının aktivasyonunun oluşma nedenini açıklayabilir (Lang ve ark 2003). p21ras, Raf ve ras gibi kinazlar K^+ kanallarını aktive etmektedir (Huang ve Rane 1994) ve Src kinaz K^+ kanallarını direkt olarak fosforile etmektedir (Sobko ve ark 1998). K^+ kanalları üzerinde bu gibi post-translasyonel modifikasyonlar kanser gelişimi ve ilerleyişi üzerinde bir etkiye sahip olabilirler.

Voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının (VGCC) upregülasyonunun kolon, akciğer, prostat ve melanoma kanserleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Wang ve ark 2000,

Tsavalier ve ark 2001, Wissenbach ve ark 2001, Peng ve ark 2001). Ancak bu kanalların kanser gelişimindeki rolü henüz gösterilmemiştir.

Voltaj-kapılı sodyum kanalları (VGSC) iyon kanallarının meme, prostat kanseri ve küçük hücreli akciğer karsinomu ile ilişkilendirilmiş diğer bir grubudur (Fraser ve ark 2005, Roger ve ark 2003, Diss ve ark 2001, Abdul ve Hoosein 2002b, Onganer ve Djamgoz 2005). Fonksiyonel analizler yönlü motilite (Djamgoz ve ark 2001, Fraser ve ark 2003); sekretuar membran aktivitesi (Krasowska ve ark 2004, Mycielska ve ark 2003); adhezyon (Palmer ve ark 2007) ve invazyonda (Fraser ve ark 2004, Fraser ve ark 2005, Grimes ve ark 1995, Laniado ve ark 1997, Roger ve ark 2003, Smith ve ark 1998) VGSC'lerin rolünü göstermiştir. Metastaz ile ilişkili olan bu hücrel davranışlar VGSC'lerin kanserin yayılımında da rol oynadıklarını açıklamaktadır.

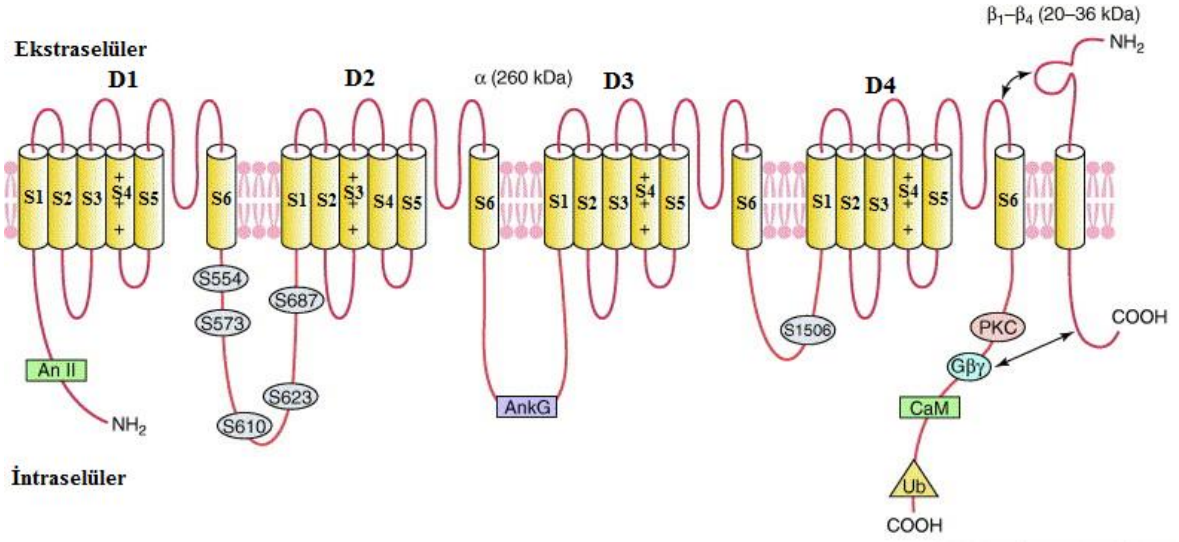
Ökaryotik hücrelerin çoğunda normal Na^+ , K^+ gradiyentini sürdüren bir ubikuitöz plazma membranı iyon pompası olan sodyum/potasyum ATPaz (Na^+ , K^+ -ATPaz)'ın da kanserle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Skou ve Esmann 1992). Na^+ , K^+ -ATPaz normal dinlenme potansiyellerine ve çeşitli hücrel aktivitelere olanak sağlar. İyonik homeostazisin hücre büyümesi, farklılaşması ve canlılığı için kritik bir öneme sahip olduğu bulunmuştur. Na^+ , K^+ -ATPaz'ın hücre göçünü (Vogel ve ark 1993, Woo ve ark 2000) ve hücre-hücre etkileşimini (Barwe ve ark 2005, Contreras ve ark 1995) de modüle ettiği gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar sidik kesesi, mide, prostat, üroteliyal, renal berrak hücreli karsinoma ve meme kanserlerinde Na^+ , K^+ -ATPaz'ın aktivitesinin ve ekspresyonunun değiştiğini göstermiştir. Kanser hücrelerinin iyon homeostazisindeki dengesizliklerin Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesindeki değişikliklerden dolayı olduğu ortaya koyulmuştur. . Bu durum, mide ve sidik kesesi kanserinde Na^+ , K^+ -ATPaz alt ünitelerinin ekspresyonunun arttığı bulgularına dayandırılmaktadır (Lee ve ark 2002). Ancak invaziv renal berrak karsinoma hücrelerinde Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesi ve β -alt ünitesi ekspresyonu azalmıştır (Rajasekaran ve ark 2003). Çeşitli çalışmalar östrojenin Na^+ , K^+ -ATPaz'ın aktivitesini artırdığını ve alt ünitelerinin ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir. Na^+ , K^+ -ATPaz inhibitörlerinin proliferasyonu engellediği ve yapısal benzerliklerinden dolayı özellikle membrana bağlı ER'lere karşı ER antagonistleri olarak davrandıkları gösterilmiştir. Na^+ , K^+ -ATPaz'ın bu özellikleri ve inhibitörleri Na^+ , K^+ -ATPaz'ın ER'ler ile kombinasyon halinde meme kanseri karşıtı ilaç geliştirme için potansiyel hedefler olabilecekleri fikrini desteklemektedir (Chen ve ark 2006).

1.1.6. Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalları

VGSC'ler uyarılabilir birçok hücrede aksiyon potansiyellerini oluşturabilmek için hücrelerin içine doğru gerçekleşen Na^+ iyon akımına aracılık ederler. VGSC ilk olarak elektrikli yılan balığı elektrik organlarından (elektroplax) izole edilmiştir ve fonksiyonel ekspresyon analizi *Xenopus* oositlerinde gerçekleştirilmiştir (Goldin ve ark 1986). VGSC'ler bir adet fonksiyonel katalitik α -alt ünitesi ve düzenleyici β -alt ünitelerinden oluşmaktadırlar. En az 10 farklı α -alt ünitesi insan izoformu (Nav 1.1- Nav 1.9 ve Nav)(260kDa) ve 4 farklı β -alt ünitesi ($\beta 1$ - $\beta 4$) (33-36 kDa) tanımlanmıştır. α -alt ünitesi *Xenopus* oositlerinde tek başına eksprese edildiğinde bile fonksiyonel bir kanal oluşturmak için yeterli olmaktadır (Goldin ve ark 1986). β -alt üniteleri kanalın, inaktivasyonunun hızlandırılması, voltaj bağımlılığı ve kapılanma gibi elektrofizyolojik özelliklerini modüle eder şekilde davranmaktadır (Isom 2001). β -alt üniteleri VGSC'lerin kinetiklerini etkilemenin yanısıra VGSC α 'nın plazma membranı üzerine bağlanması ve trafiğini kolaylaştırır böylece fonksiyonel VGSC'lerin kullanılabilirliğini artırır. β -alt üniteleri birçok hücre adhezyon molekülünde bulunanlara benzer immunoglobülin-benzeri motiflere sahip olduklarından dolayı, hücre-hücre bağlantılarında rol oynadıkları ileri sürülmektedir (Isom 2002). Bu durum $\beta 1$ ve $\beta 2$ 'nin hücre-hücre kontakt alanına ankrin proteinini toplayıp dahil ettiği ve ekstraselüler matriks proteinleri ile etkileşime girdiğinin tespit edildiği bir çalışmada doğrulanmıştır (Xiao ve ark 1999, Srinivasan ve ark 1998).

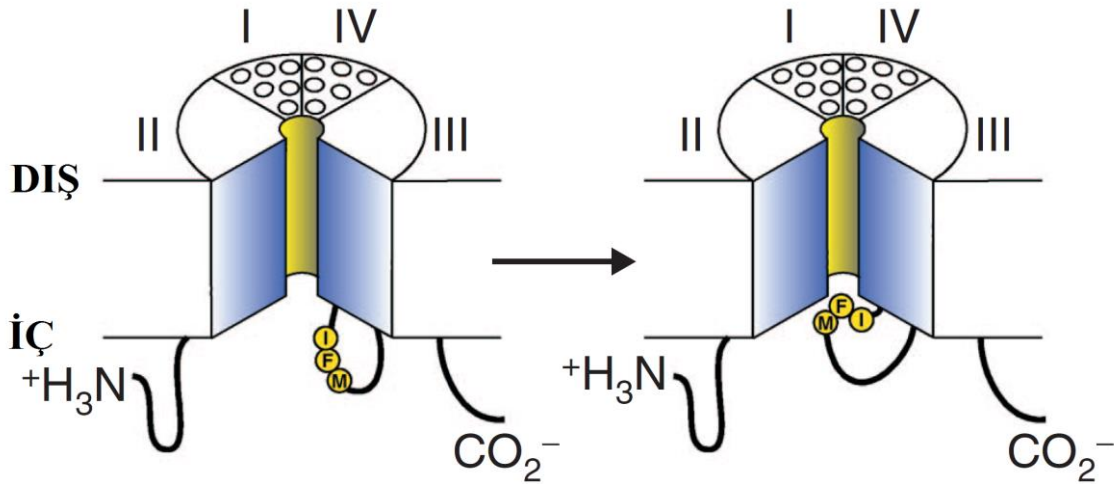
VGSC α her biri 6 adet segment içeren (S1-S6) 4 adet homolog transmembran alandan (D1-D4) oluşan bir glikoproteindir (Şekil 1.12). Bu 4 alan yapısal bileşenlerinin kanalın selektivitesini ve iletkenlik özelliklerini belirleyen santral bir poru meydana getirmek için birlikte katlanma gösterirler. Voltaj sensörü pozitif yüklü amino asit rezidülerinden (Lizin yada Arjinin) oluşmuş tekrarlayan bir motif içeren S4 segmentinde yerleşmektedir. Bu amino asitler komşu transmembran segmentlerdeki negatif yüklü rezidülerle olan iyonik etkileşimler ile stabilize edilirler. Depolarizasyon poru açan bir konformasyonel değişikliğe yol açan S4 segmentinin dışarıya doğru serbestlenmesine neden olur. İyon seçici poru meydana getiren S5-S6 sarmalları arasında bir kıvrım (loop) bulunmaktadır. Tüm 4 alanda da analog pozisyonlarda bulunan glutamat ve aspartat rezidülerinin selektivite filtresi için bir reseptör alan olarak görev yapan negatif yüklü dış ve iç halkaları meydana getirdikleri düşünülmektedir. Bu amino asitlerin karboksil yan

zincirleri kanal boyunca geçen Na^+ ile etkileşime girer, böylece kanalın selektivitesini belirlerler.



Şekil 1.12. Voltaj-kapılı Na kanalı α altünitesi yapısı (Chahine ve ark 2005).

İnaktivasyon kapısı D3-D4 arasındaki intraselüler kıvrım üzerindedir. Hücre membranı depolarize olduğunda VGSC açılışından sonra birkaç milisaniye için inaktivedir. 3 hidrofobik amino asit rezidüsü Ile-Phe-Met (IFM motif) aynı açılır-kapanır bir kapak gibi por blokajı ile etkileşime girer (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Voltaj-kapılı Na kanalı inaktivasyon kapısı (Yu ve Catterall 2003).

VGSC α genleri farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmuş en az 20 ekzondan oluşmaktadır (Goldin 2001). Na⁺ kanalları esas olarak farmakolojik özellikleri ile karakterize edilmektedir. Aynı kromozom üzerinde bulunan genler genellikle sekans, biyofiziksel ve farmakolojik karakteristiklerde benzerlikler gösterirler. Tetrodotoksin (TTX) nanomol aralığında sinir (örn. Nav1.1-1.3) ve iskelet kası (Nav1.4) izoformlarını bloklarken, kardiyak (Nav1.5) izoform bloke edilmek için mikromolar konsantrasyonlara gereksinim duymaktadır (Çizelge 1.3). D1'de 387 pozisyonundaki glutamat TTX-duyarlılığını belirler (Cummins ve ark 1999, Akopian ve ark 1996, Satin ve ark 1992). Ancak kanalın kardiyak izoformunda D1 bölgesinde pozisyon 385'de tirozin ya da fenilalaninin sisteinle olan değişimi beyin ve iskelet kası izoformları ile karşılaştırıldığında TTX affinitesinde 200-kat bir azalmaya neden olur (Heinemann ve ark 1992).

Çizelge 1.3. VGSC α 'nın kromozomal ve doku dağılımı ile TTX duyarlılığı

VGSC Alt Tipi	Kromozom	Doku Lokalizasyonu	TTX Duyarlılığı
Nav1.1	2q24	SSS, PSS, Kalp	TTX-Duyarlı
Nav1.2	2q23-24	SSS	TTX-Duyarlı
Nav1.3	2q24	SSS, Kalp	TTX-Duyarlı
Nav1.4	17q23-25	İskelet Kası	TTX-Duyarlı
Nav1.5	3p21	Kalp, SSS	TTX-Dirençli
Nav1.6	12q13	SSS, PSS, Kalp, Glia, Ranvier Boğumları	TTX-Duyarlı
Nav1.7	2q24	PSS, Schwann Hücreleri	TTX-Duyarlı

Nav1.8	3p22-24	PSS	TTX-Dirençli
Nav1.9	3p21-24	PSS	TTX-Dirençli
Nav _x	2q21-23	Kalp, Uterus, Akciğer, PSS, Düz Kas, Glia	TTX-Dirençli

1.1.6.1. VGSC'lerin doku dağılımı

VGSC'lerin sinir, kalp ve iskelet kası gibi uyarılabilir hücrelerde eksprese edildikleri bilinmektedir. Çalışmalar VGSC mRNA ve proteinlerinin bu hücrelerde bulduklarını göstermiştir. Elektrofizyolojik çalışmalar kalp kası hücrelerinin plazma membranları üzerinde fonksiyonel VGSC proteinini belirlemişlerdir ve bu proteini immunohistokimyasal olarak miyositler boyunca elektrik depolarizasyonun üniform iletimini sağladıkları kümeler halinde lokalize etmişlerdir (Cohen 1996). Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Periferik Sinir Sistemi'nde (PSS) farklı hücreler farklı VGSC alt tipleri içermektedirler. Beyinde VGSC mRNA ve proteini granül hücrelerinin aksonlarında (Nav1.2), Purkinje hücrelerinde (Nav1.2), korteksin piramidal hücre katmanlarında ve nöronal hücre gövdelerinde (Nav1.1) tespit edilmiştir (Whitaker ve ark 2001, Chung ve ark 2000). PSS'de VGSC'ler esas olarak Ranvier boğumlarında ve aksonların internodal alanlarında kümelenmişlerdir (Shrager 1989). Bunlar dorsal kök gangliyon nöronları, Schwann hücreleri ve nöroendokrin hücrelerde de tespit edilmişlerdir (Sangameswaran ve ark 1997, Belcher ve ark 1995, Klugbauer ve ark 1995).

Uyarılmayan hücreler de VGSC'lerin varlığı açısından incelenmiştir. Elektrofizyolojik çalışmalar sonucu VGSC'ler glia (Chiu ve ark 1984), osteoblastlar (Black ve Waxman 1996), fibroblastlar (Bakhrarov ve ark 1995) ve endotelial hücrelerde (Walsh ve ark 1998, Gosling ve ark 1998) tespit edilmiştir. Bir diğer *in vitro* çalışmada insan umbilikal endotelial hücrelerinin (HUVEC) kayma gerilimi-aracılı ERK1/2 aktivasyonunu inhibe eden Nav1.4 ve Nav1.6'yı eksprese ettikleri bulunmuştur. Bu bulgu VGSC'lerin sinyal iletiminde bir role sahip olduklarını ileri sürmüştür (Traub ve ark 1999). RNA

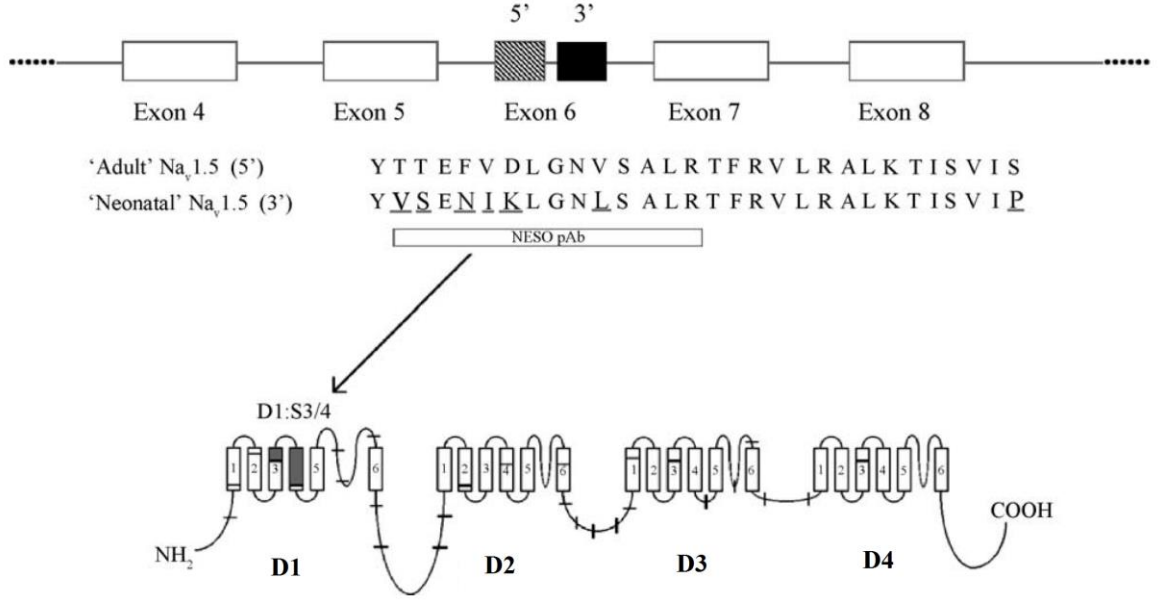
tabanlı bir çalışmaya göre Nav1.9 testisin spermatogonia ve spermatozoidleri gibi non-nöral hücrelerinde, oositleri çevreleyen granüler hücrelerde, plasentanin sinsiyo-trofoblastlarında ve ince bağırsakların goblet hücrelerinde eksprese edilmektedir (Ogata ve ark 2000). Bunu takiben kardiyak VGSC'nin bir izoformu, Nav1.5 jejunal sirküler düz kasta tanımlanmıştır. Bu tanımlanmış Nav1.5'in bilinen Nav1.5'ten D2-D3 arasındaki bağlayıcı (linker) bölgede 8 amino asit farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir (Ou ve ark 2002). Enfeksiyon alanına hareket eden lenfositlerin de VGSC'leri içerdikleri bilinmektedir. Model bir sistemdeki detaylı araştırma, hücrelere invaziv kapasite kazandıran Nav1.5'in ekspresyonunu tanımlamıştır (Fraser ve ark 2004).

1.1.6.2. VGSC ve kanser metastazı

Küçük-hücreli akciğer karsinomu (SCLC) gibi bazı kanser hücrelerinde VGSC'lerin varlığı bilinmektedir (Marx ve ark 1991, Pancrazio ve ark 1989). Grimes (1995), prostat kanser hücrelerinde hücre metastazı ve VGSC ekspresyonu arasındaki ilişkiyi belirlemiştir. Daha sonra moleküler analizler Nav1.7'yi metastatik hücrelerdeki bu akımların nedeni olarak tanımlamıştır (Diss ve ark 2001). Daha ileri *in vivo* analizler VGSC α proteininin farklı derecelerde prostat kanseri dokularındaki epitelyal hücre membranlarında lokalize olduğunu göstermiştir (Abdul ve Hoosein 2002b, Diss ve ark 2005). Fonksiyonel çalışmalar VGSC α ilişkili hücresel aktivitelerin prostat kanserinde metastaz için gerekli olduğunu belirlemiştir (Fraser ve ark 1999, Fraser ve ark 1998, Djamgoz ve ark 2001, Mycielska ve Djamgoz 2004).

Farklı metastatik yeteneklere sahip meme kanseri hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda fonksiyonel VGSC proteininin sadece son derece metastatik meme kanseri hücrelerinde var olduğu belirlenmiştir (Roger ve ark 2003, Fraser ve ark 2005). VGSC'nin çeşitli hücresel davranışlar üzerine olan etkisinin incelenmesi VGSC'nin proliferasyonla değil, metastatik meme kanseri hücrelerinin invazyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Roger ve ark 2003). VGSC'nin metastazın temel basamakları olan yönlü motilite ve endositoz ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fraser ve ark 2005). Bu çalışmada metastatik meme kanseri hücreleri ve dokularında kardiyak sodyum kanalı Nav1.5'in neonatal splice formunda (nNav1.5) upregülasyon belirlenmiştir. Küçük bir hasta grubunda nNav1.5 ekspresyonu ile metastaz arasında pozitif bir korelasyon tanımlanmıştır (Fraser ve ark 2005). Daha ileri bir çalışmada nNav1.5'in alternatif splicing alanının adult izoform ile karşılaştırıldığında 31 nükleotid (7 amino asit) farklılığı ile sonuçlandığı D1:S3

ekstraselüler kıvrımı üzerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 1.14). Amino asitler arasında böylesine bir farklılık nNav1.5'e karşı spesifik bir antikor (NESO pAb) geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Epitop ekstraselüler kıvrım üzerinde olduğu için antikorun *in vitro* uygulanması nNav1.5 transfekte hücrelerde Na⁺ akımını spesifik olarak hedefler ve bloke eder. NESOpAb'ın duyarlılığı ve seçiciliğinin Tetrodotoxin (TTX) gibi VGSC blokörlerinden daha iyi olduğu belirlenmiştir (Chioni ve ark 2005).



Şekil 1.14. nNav1.5 gen ve proteininde alternatif splicing alanının lokalizasyonu (Chioni ve ark 2005).

Son yıllarda VGSC'lerin yüksek düzeyde agresif bir kanser olan küçük-hücreli akciğer karsinomunda (SCLC) da varlığı incelenmiştir (Onganer ve Djamgoz 2005). SCLC hücreleri üzerindeki *in vitro* analizler prostat ve meme kanseri olgularında olduğu gibi VGSC'nin endositozdaki rolünü göstermiştir (Fraser ve ark 2005, Mycielska ve ark 2003). Bu çalışmanın ilk gözlemi test edilen hücre hatlarında Nav1.3, Nav1.5 ve Nav1.6 genlerinin ekspresyonunu belirtmektedir.

Nöroblastoma tümör hücrelerinin analizi bu hücrelerin farklı tipte VGSC'ler içerdiklerini göstermiştir (Urbano ve ark 1997). Karakterizasyon çalışmaları Nav1.5'in hastalığın fizyopatolojisi üzerindeki etkisi henüz bilinmeyen iki farklı splice varyantının ekspresyonunu tanımlamıştır (Ou ve ark 2005).

1.1.6.3. VGSC'lerin düzenlenmesi

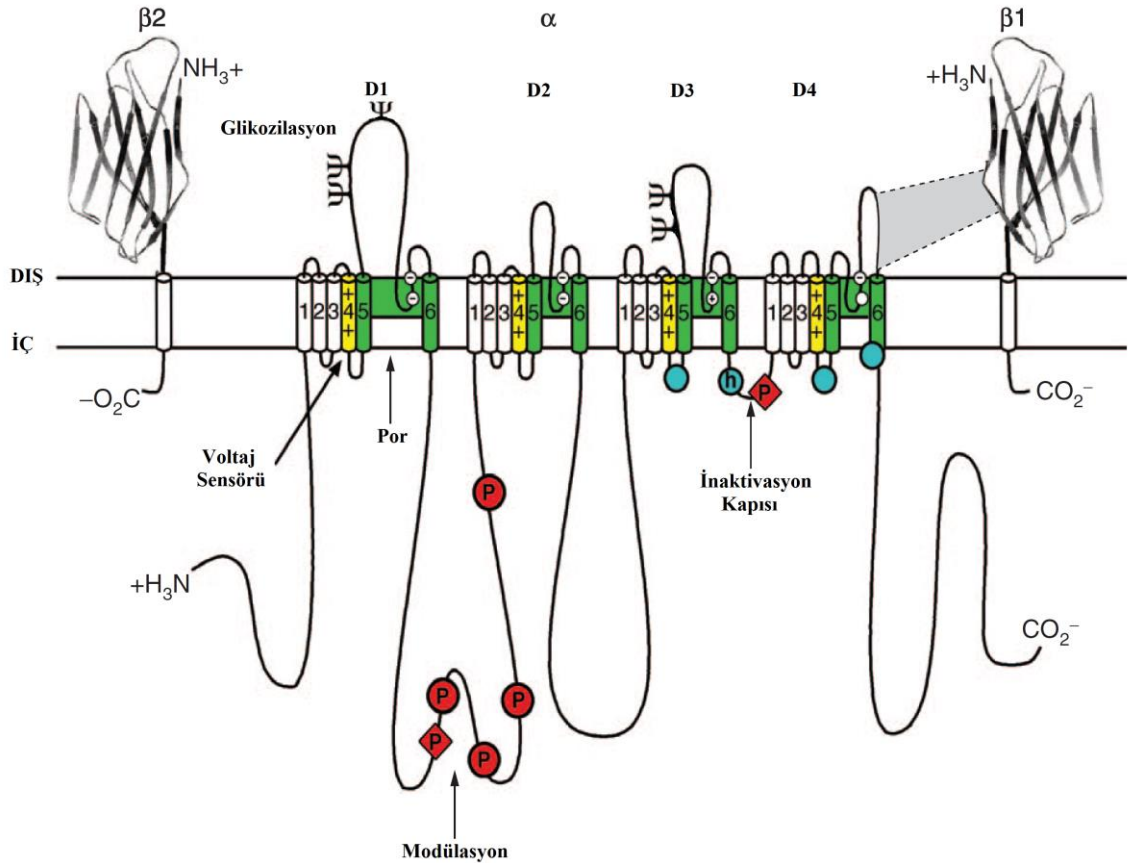
VGSC düzenlenmesi transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeylerde olabilmektedir. Bu gibi modifikasyonlar kanalın fonksiyonel özelliklerinde, transkripsiyon/translasyon düzeylerinde ve lokalizasyonunda farklılıklara neden olabilir. Sinir Büyüme Faktörü (NGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve bunun homolog faktörü 1B (FHF1B/FGF12), Glial Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar (örn: androjen ve deksametazon) hücre tipine ve kanalın alt tipine bağlı olarak VGSC ekspresyonunu ve/veya aktivitesini etkilemektedir (Avila ve ark 2003, Cummins ve ark 2000, Waxman ve ark 2000, Liu ve ark 2003). NGF ve GDNF her ikisinin de spinal duyu nöronlarda Nav1.8 ve Nav1.9'u upregüle ettiği, buna karşın Nav1.3'ü downregüle ettiği bulunmuştur (Black ve ark 1997, Fjell ve ark 1999). FHF1B'nin Nav1.5'e bağlandığı ve kanalın inaktivasyon durumunu modüle ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark 2003).

Transkripsiyonel düzeyde VGSC regülasyonunun incelenmesi Nav1.2'nin promotörü üzerindeki RE-1 elementi üstünde transkripsiyon baskılayıcı REST için bir bağlanma alanı belirlemiştir (Kraner ve ark 1992, Mori ve ark 1992). Bağlanma sonrasında nöronal hücrelerde VGSC ekspresyonu sınırlandırılmıştır. Alternatif splicing VGSC α 'nın fonksiyonel çeşitliliğinin artırılmasının bir diğer yoludur. Şu ana kadar farklı VGSC α genlerinde 5 farklı splice alanı tanımlanmıştır. Bunlar D1:S3, interdomain 1-2 (ID1-2), ID2-3, D3 ve D4:S3 alanlarında bulunmaktadır (Diss ve ark 2004). Splice olmuş ürünler proteinin yüksek düzeyde korunmuş bölgelerinde büyük farklılıklara sahip olabilirler. Bunlar diğer VGSC α varyantları ile birleşebilir, tam uzunlukta bir proteinin sentezini/aktivitesini engeller ya da fonksiyonel olmayan bir protein üretirler. Trans-splicing eksonların sayısında artışa ya da ekson sırasında değişikliklere neden olabilir. Bu gibi olaylar VGSC'lere yeni fonksiyonlar kazandırabilir (Diss ve ark 2004).

VGSC'lerin post-translasyonel modifikasyonları α -alt ünitesinin fosforilasyonu, glikozilasyonu ve palmitolasyonunu kapsar. VGSC α PKA, PKC, Kalsiyum kalmodulin kinaz II (CAM kinaz II) ve tirozin kinaz tarafından fosforile edilebilir (Şekil 1.15). PKA VGSC α 'yı Şekil 1.15'teki kıvrım 1-2 üzerinde bulunan Ser 573, 610, 623 ve 687 pozisyonlarındaki 4 serin rezidüsü üzerinden (kırmızı yuvarlak fosforilasyon P alanları) fosforile eder (Murphy ve ark 1993). PKC fosforilasyonu ise inaktivasyon kapısındaki (Ser 1506) serin rezidüsünde ve kıvrım 1-2'deki ser 576'da (kırmızı karo fosforilasyon P

alanları) meydana gelmektedir (Numann ve ark 1991, West ve ark 1991, Cantrell ve ark 2002) (Şekil 1.15).

Fosforilasyonun etkisi hücre tipine ve VGSC'nin alt tipine bağlıdır. Örneğin; Nav1.2 ve Nav1.1'in PKA fosforilasyonu kanalın aktivitesinde bir azalmaya neden olan iyon akım amplitüdünü azaltırken (Şekil 1.15) (Smith ve Goldin 1996), Nav1.5'in iyon iletkenliğini (Marban et al., 1998) ve Nav1.8'in aktivasyon hızını (Fitzgerald ve ark 1999) artırmaktadır. Nav1.2'nin PKC fosforilasyonu PKA'da olduğu gibi iyon akımlarını ve kanalın aktivitesini azaltır (Schreibmayer ve ark 1991). Tek kanalların detaylı analizi iyon akımındaki azalışın ya mevcut kanalların sayısındaki azalmadan ya da kanalın açık formundaki azalmadan dolayı olduğunu göstermiştir (Numann ve ark 1991). Öte yandan PKC Nav1.8'deki Na^+ akımını artırır (Gold ve ark 1998).



Şekil 1.15. VGSC α 'nın çeşitli kinazlar aracılığıyla uğradığı fosforilasyon ve glikozilasyon paterni. Kırmızı yuvarlak alanlar PKA fosforilasyon bölgeleri, kırmızı karo alanlar PKC fosforilasyon bölgeleri, Ψ : Glikozilasyon bölgeleri (Yu ve Catterall 2003).

VGSC'nin fosforilasyonunun kanalın fonksiyonu için esansiyel olan plazma membranı üzerindeki lokalizasyonunu etkilediği ileri sürülmektedir. Fonksiyonel bir VGSC'nin işlenmesinin Endoplazmik Retikulum'dan Golgi'ye geçiş yoluyla olduğu bulunmuştur. PKA'nın farklı hücrelerde Na⁺ akımlarını aktive ettiği iyi bilinmektedir. Zhou (2000) ve Vijayaragavan (2004) bu aktivasyonun, bir hücre içi veziküler trafik inhibötörünün iyon akımını bloke etmesinden dolayı ilave VGSC'lerin Golgi'den hücre membranına transportu ve inkorporasyonundan dolayı kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Serum ve glukokortikoid indüklenebilir kinazlar SGK1 ve SGK3 gibi protein kinazlar Nav1.5 tarafından oluşturulan Na⁺ akımını artırır ve kanalın fonksiyonunu düzenlerler (Boehmer ve ark 2003). CAM kinaz II de VGSC akım amplitüdünü artırır (Carrier ve ark 2000). Diğer CAM kinazların VGSC'lerin kanal inaktivasyonunu ve çeşitli elektrofizyolojik özelliklerini alt tipe spesifik bir biçimde modüle ettikleri bilinmektedir (Deschenes ve ark 2002).

VGSC'nin fosforilasyonu protein fosfatazlar tarafından tersine döndürülür. Reseptör benzeri protein fosfataz β (RPTP β), Ca⁺²/Kalmodulin-bağımlı protein fosfataz 2B, Kalsinörin ve Protein fosfataz 1-2'nin VGSC'leri defosforile ettiği ve Na⁺ akımlarını artırdığı gösterilmiştir (Ratcliffe ve ark 2000).

VGSC α 'nın glikozilasyonu D1 ve D3'ün por kaplayan bölgelerindeki spesifik alanlar üzerinde belirlenmiştir (Şekil 1.15) (Bennett 2002). Her bir VGSC α alt tipindeki glikozilasyonun oranı oldukça farklıdır. Örn: aşırı glikozilasyon Nav1.1-Nav1.4'te (%15-30) gözlemlenmiştir fakat Nav1.5 ve Nav1.9'ta (%5) gözlemlenmemiştir (Marban ve ark 1998, Tyrrell ve ark 2001). Karbonhidrat gruplarının varlığı kanalların yapısını, lokalizasyonunu/hücre yüzey ekspresyonunu ve elektrofizyolojik özelliklerini etkiler (Zhang ve ark 2003). Çalışmalar glikozilasyonun gelişimsel olarak düzenlenebildiğini (Tyrrell ve ark 2001) ve glikozilasyon paternindeki değişimin kardiyak aritmi ve nöropatik ağrı gibi belirli hastalıklarda VGSC fonksiyonunu bozabildiğini göstermiştir (Zhang ve ark 2003).

VGSC'lerin palmitolasyonunun Golgi'de meydana geldiği ve plazma membranına VGSC taşınımına aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Bu geri dönüşümlü olan dinamik bir süreçtir ve bu yüzden kanalın çeşitli fonksiyonlarını düzenlemek için önemli bir araç olabilir (Huang ve El-Husseini 2005).

VGSC üzerindeki modifikasyonlardan ayrı olarak proteinler ve VGSC β ile etkileşimler kanalın fonksiyonunu, bulunabilirlik ve kullanılabilirliğini düzenler. VGSC ile etkileşen proteinler sitoplazmik elemanlar, bağlayıcı proteinler (örn:aktin), enzimler, iyon kanalları (örn: voltaj-bağımlı anyon kanalı), membran ilişkili proteinler ve motor proteinlerdir (dinein, ara ve hafif zincir) (Malik-Hall ve ark 2003). VGSC-protein etkileşimleri alt tipe spesifik olabilir ve VGSC ekspresyonunu ve/veya hücrel yanıtı düzenlerler. Örneğin, kompakt myelinin sırasıyla retinal gangliyon hücrelerinde ve Ranvier boğumlarında Nav1.2 ve Nav1.6'nın lokalizasyonunu düzenlediği bulunmuştur (Boiko ve ark 2001). Bir FGF ailesi üyesi olan FHF2B Nav1.6 ile etkileşir ve Ranvier boğumlarında kolokalizdir (Wittmack ve ark 2004). Distrofin ve sintrofinin de Nav1.4 ve Nav1.5 ile, bu kanalların nöromusküler kavşağa lokalizasyonlarını düzenleyebilir şekilde etkileşime girdikleri ileri sürülmektedir (Caldwell 2000). Distrofinin VGSC α 'ya bağlanması kanalı aktin sitoskeletona ve ekstraselüler matrikse bağlayabilir. Sitoskeletal elemanlar ile etkileşim VGSC'nin açılma olasılığını ve kalıcı aktivitesini indüklemektedir (Maltsev ve Undrovinas 1997, Undrovinas ve ark 1995). Ubiquitin-protein ligazlar Nedd4 ve Nedd4-2'nin Nav1.5 tarafından aracılık edilen Na⁺ akımını azalttığı gösterilmiştir. Sonrasında Nedd4 ve Nedd4-2'nin nöronal VGSC'lere bağlandığı, ubikütinasyon ve endositoz yoluyla kanal aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (Fotia ve ark 2004). Araştırmacılar dokuz adet VGSC'den yedisinin Nedd4 ve Nedd4-2 için bağlanma motifi içerdiğini ve bunların döngüsünün bu proteinler yoluyla ubikütinasyon üzerinden olabildiğini ileri sürmektedirler.

Bilgiler meme kanserinin tanı ve tedavisinde problemlerin varlığını göstermektedir. Mevcut durumda kullanılan işaretçiler mikroskopik metastazları belirleyememektedir. Bu nedenle hastaların önemli bir kısmı yaşam kalitelerini azaltan destekleyici tedaviler almaktadırlar. Bunlara ek olarak hastalığın ilerleyen safhalarında hormon tedavisine direnç gelişmektedir. Çeşitli çalışmalar VGSC α 'nın kanser metastazı ile ilişkisi olduğunu göstermiştir ve bunlardan biri nNav1.5'in erken dönem bir işaretçi olarak kullanımını ileri sürmüştür. Ancak kanalın ekspresyonunu kontrol eden moleküler mekanizmalara ve nNav1.5'in hücrel davranışları düzenlediği sinyalizasyon yollarına ilişkin çok az bir bilgi mevcuttur. Büyüme faktörleri ve hormonların (örn: östrojen) meme kanserinin ilerlemesi için ve uyarılabilir hücrelerde VGSC aktivitesinin düzenlenmesinde önemli olduğu çok iyi bilinmektedir. nNav1.5 ekspresyonunun kanser metastazıyla ilişkisinin daha fazla sayıda olguda doğrulanması gerekmektedir ve meme kanseri metastazında bu kanalın

spesifik ekspresyonu prognostik bir işaretçinin gereksinimlerini başarıya ulaştırmak için test edilmelidir. Buna ek olarak nNav1.5'in metastatik hücre davranışını regüle etmesinin altında yatan mekanizmanın tanımlanması gerekmektedir.

1.1.7. RNA İnterferans (RNAi) Mekanizması

Klasik bilginiz dahilinde olan ve protein sentezinde rol oynayan RNA'ların (mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)) yanısıra protein kodlanmasına dahil olmayıp hücrede daha başka fonksiyonlar gerçekleştiren farklı küçük RNA tipleri de (siRNA, miRNA, piRNA) bulunmaktadır.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, değişik organizmalarda yaklaşık 300'e varan sayıda nükleotid içeren, çeşitli boyutlarda pek çok küçük düzenleyici RNA'ların varlığı tespit edilmiştir (Gerald 2002, Grobhans ve Filipowicz 2008). 20–30 nükleotid içeren küçük düzenleyici RNA'lar, küçük boyutlara sahip olmaları, birçok miRNA'nın karmaşık görev ağı, biyokimyasal analizlerde kolay bir biçimde kaybolmaları ve klasik genetik yöntemlerle inaktivasyonda zayıf hedefler oldukları için geç keşfedilmişlerdir. İlk olarak *Caenorhabditis elegans*'da yapılan genetik denemelerde 1990'larda lin-4 ve let-7 adlı iki miRNA keşfedilmiştir (Gerald 2002, Grobhans ve Filipowicz 2008, Karagüzel ve ark 2007). Daha sonra hayvanlarda, bitkilerde ve mantarlarda da etkin siRNA'lar tespit edilmiştir (Grobhans ve Filipowicz 2008, Gündoğdu ve Çelik 2009, Karagüzel ve ark 2007).

RNAi, evrimsel anlamda iyi korunmuş, biyolojik transkripsiyon sonrası post-transkripsiyonel bir RNA sessizleştirme mekanizmasıdır (Gartel ve Kandel 2006, Gerald 2002, Gündoğdu ve Çelik 2009, Karagüzel ve ark 2007, Pan ve ark 2006). İlk olarak 1990 yılında iki botanikçi tarafından Petunya'da gen sessizleştirilmesi keşfedilmiştir. 1998 yılında Andrew Fire ve Craig Mello bir nematod olan *C.elegans*'da dsRNA (double-strand RNA) molekülleri tarafından meydana getirilen gen sessizleştirme mekanizmasına RNAi adını vermişler ve 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülünü kazanmışlardır. 2001 yılında da Tom Tuschl ve ekibi, siRNA'ların memeli hücrelerinde gene spesifik sessizleşmeye sebep olduklarını göstermişlerdir (Gartel ve Kandel 2006, Gerald 2002, Grobhans ve Filipowicz 2008, Gündoğdu ve Çelik 2009, Karagüzel ve ark 2007, Pan ve ark 2006, Pehlivan ve ark 2006).

Hedef bir gen transkriptinin, sekansa spesifik bir şekilde, çift zincirli RNA (dsRNA) ile durdurulması olayı, RNAi olarak tanımlanmaktadır. Aslında dsRNAi, hücrede normal bir savunma sistemine ait katalitik yolu aktifler. Bu mekanizmanın temeli, hedef mRNA zincirine komplementer olan dsRNA'nın tek bir zincirini kullanmaktır (Antisense zincir, 21 baz). Öncelikle dsRNA, aktarıldığı hücrelerde küçük interfere edici RNA'lara (siRNA) parçalanır. Bu hücrel bir mekanizmadır ve hücrede oldukça kompleks bir regülatör mekanizma olarak rol oynamaktadır. RNAi, hücrede istenmeyen yabancı genlerin (eksternal RNA'lar ve viral genler, transpozonlar v.b. gibi) eliminasyonu ve bunun yanında gen ekspresyonunun transkripsiyonel olarak regüle edilmesinde hücrede yoğun şekilde kullanılan bir mekanizmadır (Fire ve ark 1998).

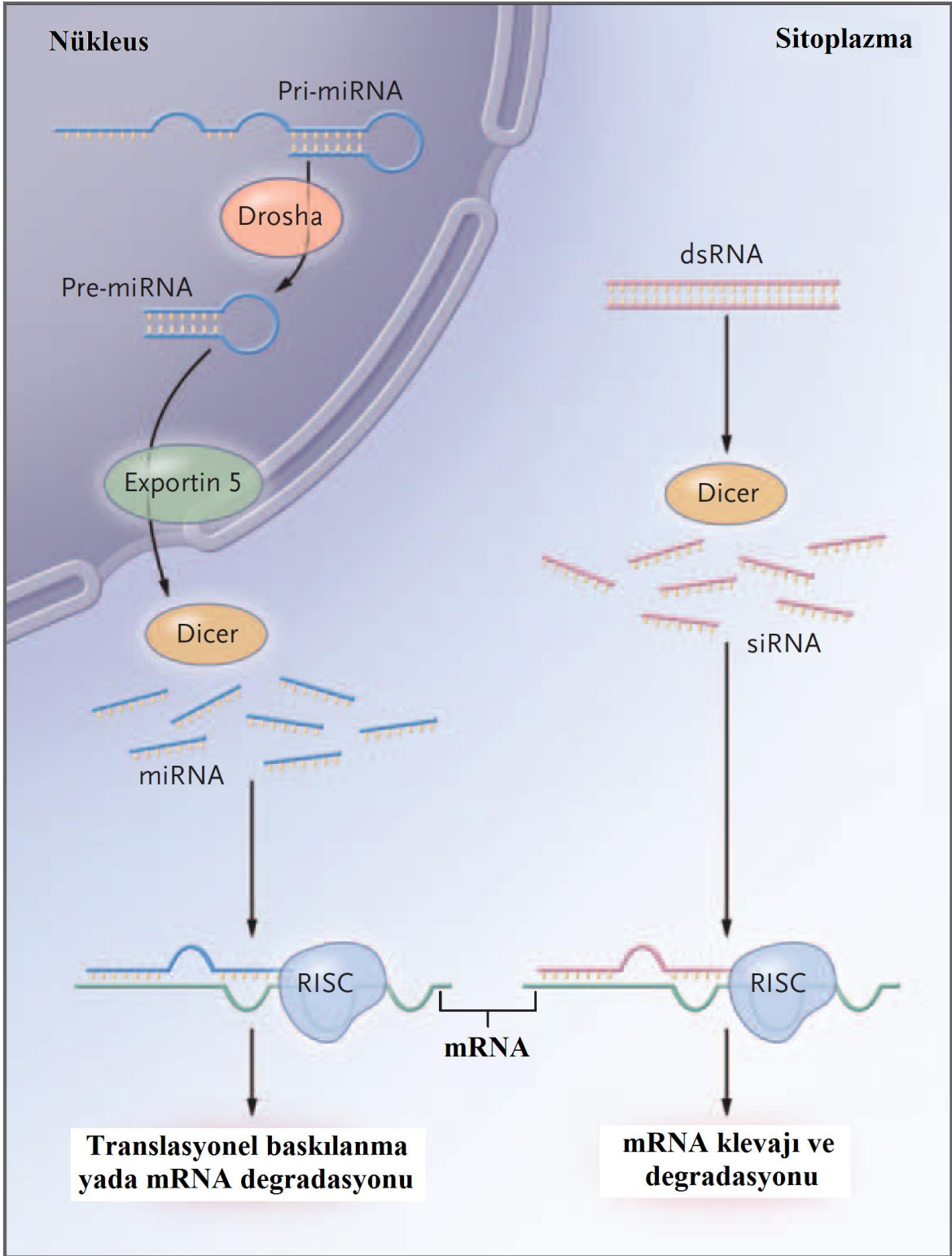
1.1.7.1. siRNA (Small interfering RNA, Küçük sessizleştirici/interferans RNA)

siRNA'lar eksojen kaynaklı moleküllerdir ve çift zincirli yapıda olup hedef RNA'nın komplementeridirler. Endonukleolitik yıkım yaparlar ve 21-23 nukleotidlik uzunluğa sahiptirler (Gerald 2002, Gündoğdu ve Çelik 2009, Karagüzel ve ark 2007, Pehlivan ve ark 2006).

Sentetik olarak sentezlenerek hazırlanan siRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturdukları bir mekanizma üzerinden mRNA'ları yıkarlar. Bu mekanizmada; 21-23 nukleotid uzunluğunda küçük çift zincirli sessizleştirici RNA olan siRNA'lar hücre içine lipid yapıdaki transfeksiyon ajanı vasıtasıyla verilirler ve bu siRNA'lar, RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksine (RNA-inducing silencing complex=RISC) bağlanır. RISC'in moleküler ağırlığı 500 kDa'dır, yapı olarak endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerine sahip, nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksidir (Karagüzel ve ark 2007, Song ve ark 2004). RISC'in temel bileşeni olan Argonaute (Ago) proteini, mRNA kesimi için temel katalitik bölgedir ve bu protein, antisense zincirin 3' ucuna bağlanmada görev yapan Piwi – Argonaute - Zwillie (PAZ) bölgesini ve ayrıca yapısal olarak RNaz H'in aktif bölgesine benzeyen, hedef mRNA'nın kesiminde rolü olduğu düşünülen PIWI bölgesini içermektedir (Gündoğdu ve Çelik 2009, Pehlivan ve ark 2006, Song ve ark 2004). Ago, sense siRNA'ya bağlandıktan sonra antisense siRNA'yı dalından ayırır ve uzaklaştırır. Geriye kalan antisense siRNA ile RISC, hedef mRNA'daki komplementer bölgeye yapışıp endonukleolitik olarak parçalanmasına, dolayısıyla da protein sentezinin post-transkripsiyonel düzenlenmesine neden olur (Gerald 2002, Gündoğdu ve Çelik 2009, Karagüzel ve ark 2007, Song ve ark 2004). Bu olaya, post-transkripsiyonel gen

sessizleştirilmesi (post-transcriptional gene silencing=PTGS) adı verilmektedir (Şekil 1.16).

RNA interferans canlı organizmadaki normal mekanizmalardan biri olup, *in vitro* olarak sentezlenen siRNA'ların kullanılmasıyla da endojenik genlerin ekspresyonunu baskılamak mümkün olmaktadır. RNAi diğer tekniklerle kıyaslandığında daha hızlı ve ucuz bir yöntem olması yanısıra, fonksiyonel genomik araştırmalarda da çok ideal bir teknik olarak etkin bir biçimde kullanılmaktadır. RNAi tekniğinin kullanılması ile gen ekspresyonunun baskılanması sadece gen fonksiyonunu araştırmada değil, aynı zamanda gen tedavisinde de önem arz etmektedir. Genetik altyapıya sahip bir hastalık durumunda normal bir proteinin fazla miktarda ekspresyonu ya da mutant bir proteinin ekspresyonu söz konusu ise RNAi bu hedef proteinin düzeyini azaltmak ya da onun zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için kullanılabilir (Gündoğdu ve Çelik 2009). Özellikle RNAi, kanser hücrelerinde hücre döngüsü için önemli olan genlerin, anti-apoptotik genlerin ya da proliferasyon/invazyon/migrasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını baskılayarak kanserin tedavisinde ve tanısında kullanılmaktadır (Duursma ve Agami 2003, Gündoğdu ve Çelik 2009, Reddy ve ark 2007, Scholzova ve ark 2007).



Şekil 1.16. RNA İnterferans Mekanizması (Merritt ve ark 2008).

1.2. Amaç

Meme kanserinin Dünyada ve Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanser olduğu, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30’unu oluşturduğu, ayrıca kanser tedavisi için yapılan ekonomik harcamaların dünya ülkeleri için sağlık harcamalarının büyük bir kısmını oluşturduğu, önceki bölümlerde ayrıntılı bir biçimde vurgulanmıştır. Bu amaçla daha ekonomik ve etkin yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin hem ülke ekonomilerine hem de bireylerin yaşam kalitesine getireceği faydalar düşünüldüğünde günümüz bilim dünyası için en ilgi çeken konular arasında önem arz etmektedir.

Ekspresyonları kanserde değişim gösteren bazı plazma membranı iyon kanalları tümör metastazının şekillenmesinde ve hastalığın ilerlemesi için çok önemli olan hücre migrasyonu, motilitesi ve invazyonu süreçlerinde rol oynamaktadırlar (Prevarskaya ve ark 2010). Kanser hücrelerinde VGSC’ler ilk olarak 1995 yılında sıçan prostat kanser hücre hattında tespit edilmiştir (Goldin ve ark 2000). Ardından insan prostat kanser hücre hattında da benzer yapıda bir kanal bulunmuştur (Grimes ve ark 1995). Aktif VGSC’lerin kanser hücrelerinde galvanotaksis, motilite ve invaziv potansiyel ile ilişkili oldukları tespit edilmiştir (Laniado ve ark 1997 Mycielska ve Djamgoz 2004, Fraser ve ark 2000).

Prostat ve meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda eksprese edilen iki izoformun da fetal izoformlar olduğu belirlenmiştir (fNav1.7 ve fNav1.5). Meme kanserine ilişkin VGSC’ler ile yapılan çalışmada bu fetal izoforma uygun antikolar tarafından metastatik hücrelerde Nav1.5 fetal izoformunun ekspresyonu gösterilmiştir. Birçok çalışma VGSC’lerin kanser gelişimi, invazyonu ve metastazı üzerine oldukça etkili olduğunu ileri sürmektedir. Meme kanseri gelişiminde ve metastatik yolaklar ile ilişkili hücre içi olayları etkilemede Nav1.5 kanalının özellikle neonatal izoformundaki ekspresyon ve aktivite artışının önem taşıdığı belirtilmiştir (Fraser ve ark 2005). Ancak bu konuda literatürde kanalın meme kanserine olan etkilerine ilişkin detaylı bir mekanizma, hücre içi protein değişimleri vb. ortaya konulmamıştır. Eldeki umut verici veriler Nav1.5 kanalının meme kanserine klinik yaklaşımda yeni bir terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmada Nav1.5 kanalının Adult ve Neonatal tiplerine spesifik siRNA’lar aracılığıyla genetik olarak sessizleştirilmesi ve inhibisyonun *in vitro* ve

farede *in vivo* olarak meme kanseri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu bağlamda aşağıdaki hipotezlerin ve soruların cevaplarının araştırılması hedeflenmiştir;

- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* normal meme epiteli hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının olası sitotoksik etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının standart kemoterapötiklerle olan kombine etkileri ve ilaç dirençliliği üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* metastatik meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücrelerinin invazyon/migrasyon/yara iyileşmesi yetenekleri üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü (Apoptoz) üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücrelerinde hücre siklusu üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücrelerinde Nav1.5 kanalı mRNA düzeylerine olan etkilerinin araştırılması,
- *In vitro* meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'larının olası tüm bu etkilerine ilişkin hücre içi mekanizmalar ve görev alan proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve ilişkilerinin araştırılması,
- *In vivo* atimik nude farelerde ksenograft ortotopik meme kanseri modelinin oluşturulması ve Adult - Neonatal Nav1.5 siRNA'larının tümör büyümesi ve progresyonu üzerine olan terapötik etkilerinin araştırılması,

- *İn vivo* atimik nude farelerde ksenograft akciğer metastaz modelinin oluşturulması ve Adult - Neonatal Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri metastazı üzerine olan terapötik etkilerinin araştırılması.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Tübitak-BİDEB 2214 kodlu Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında Texas Medical Center, Houston, TX, USA'da yer alan University of Texas MD Anderson Cancer Center'deki Department of Experimental Therapeutics'de gerçekleştirildi.

2.1. Gereç

2.1.1. Hücre Hatları

İnsan meme epitel hücre hattı (MCF-10A) ve meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231, MDA-MB-231-luc, MDA-MB-468 ve MCF-7), University of Texas MD Anderson Cancer Center'deki Experimental Therapeutics Departmanının American Type Culture Collection'dan (Manassas, VA) satın aldığı hücre hatları stoğundan temin edildi.

2.1.2. Kimyasallar, Tamponlar ve Solüsyonlar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar, tamponlar ve solüsyonlar aşağıda verilen içerik listelerine göre hazırlandı.

2.1.2.1. 10 X PBS (Phosphate buffered saline)

80 g NaCl, 2.25 g KCl, 23.27 g Na₂HPO₄.12H₂O ve 2.05 g KH₂PO₄ 1000 ml bidistile su içinde çözdürüldü ve pH 7.4'e ayarlandı.

2.1.2.2. 10 X TBS (Tris buffered saline) stok solüsyonu

80 g NaCl ve 31.5 g Tris-HCl 1000 ml bidistile su içinde çözdürüldü ve pH 7.6'ya ayarlandı.

2.1.2.3. Yürütme/Transfer tamponu stok solüsyonu

10 X stok solüsyon için 30 g Tris-Base ve 144 g Glisin 1000 ml bidistile su içinde çözdürüldü.

2.1.2.4. 1 X Yürütme tamponu

10 X yürütme stok solüsyonundan 100 ml, 10 ml %10'luk SDS çözeltisi 890 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.1.2.5. 1 X Transfer tamponu

10 X transfer stok solüsyonundan 100 ml ve 200 ml methanol, 700 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.1.2.6. 1 X TBS-Tween-20

10 X TBS stok solüsyonundan 100 ml ve 1 ml Tween-20 alındı ve 899 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.1.2.7. Protein lizis tamponu stok solüsyonu

250 ml lizis tampon stok solüsyonu için; 200 ml H₂O, 2.19 g NaCl, 0.76 g Tris + %1'lik Triton X (2.5 ml) eklendi ve pH 7.6'ya ayarlandı. 50 ml H₂O eklendi ve santrifüj edildi.

2.1.2.8. Protein lizis tamponu çalışma solüsyonu

Stok solüsyonun her 1 ml'si için 4 µl NaF (1M), 4 µl Na₃VO₄ (1M) ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli eklendi ve hafifçe vortekslendi.

2.1.2.9. % 10'luk stok SDS çözeltisi

10 g SDS tartılıp son hacim 100 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözdürüldü.

2.1.2.10. PCR yürütme tamponu (Tris Borat EDTA-TBE 10 X Stok)

108 g Tris Base, 55 g Borik Asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH ~ 8.0) distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.1.2.11. 3X yükleme tamponu

1.8 ml Gliserol, 1.2 ml %30'luk SDS, 0.9 ml Beta-Mercaptoetanol, 0.18 ml B-Blue (%2.5), 1.1 ml Tris-HCL (0.5 M) (pH 6.8) ve 0.82 ml distile su karıştırılarak hazırlandı.

2.1.2.12. Kullanılan diğer malzemeler, kimyasallar, solüsyonlar ve kitlerin listesi

Katolog no	Malzemenin Cinsi	Marka
Hücre kültürü malzemeleri		
21875034	DMEM Besiyeri 10 x 500 ml (paket kodu)	Invitrogen/Gibco
10082-147	FBS Isı ile inaktive edilmiş 500 ml	Invitrogen/Gibco
25200056	Tripsin 0.25% EDTA 100 ml	Invitrogen/Gibco
15140122	Penisilin/Streptomisin Solüsyonu 100 ml	Invitrogen/Gibco
SH30028.03	Steril DPBS	Thermo
18082E	Steril Filtre Ünitesi (12 x 500 mL; kutu)	Nalgene
13-680-65	Steril 75 cm ² flask, (60 adet/kutu) 353631	FISHER
10-126-9	Steril 25 cm ² flask, (100 adet/kutu) 353108	FISHER
353046	Steril 6 kuyucuklu plate, (100 adet/kutu)	BD FALCON
353047	Steril 24 kuyucuklu plate (100 adet/kutu)	BD FALCON
353072	Steril 96 kuyucuklu plate, 100 ad/kutu	BD FALCON
352096	Steril 15 ml mavi kapaklı falcon tüp (500 adet/kutu)	BD FALCON
352070	Steril 50 ml mavi kapaklı falcon tüp(500 adet/kutu)	BD FALCON
357525	Steril pipet 25 ml (200 adet/kutu)	BD FALCON
357551	Steril pipet 10 ml (200 adet/kutu)	BD FALCON
357543	Steril pipet 5 ml (200 adet/kutu)	BD FALCON
357528	Steril aspirasyon pipeti,(200 adet/kutu)	BD FALCON
NC9390742	Cryovial	FISHER
09-719C	Şırınga için steril filtre (50 adet)	FISHER
T8154	Trypan Blue solüsyonu	SİGMA
	Cryoboxes (81 adetlik ve numaralandırılmış kutular)	

	Ependorf (1,5ml) DNaz, RNaz free; 500 ad/pk	
	Ependorf (0,5 ml) DNaz, RNaz free; 1000 ad/pk	
	Ependorf (0,2 ml) PCR için 1000 ad/pk	
	Pipet ucu (0-10 µl)	
	Pipet ucu (10-100 µl)	
	Pipet ucu (200-1000 µl)	
FB69000	Şarj edilebilir pipetleme cihazı	FISHER
G5430	CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; MTS Testi 5000 testlik	Promega
Western Blot malzemeleri		
IPVH00010	PVDF membran	Millipore
161-1158	4–15% Ready Gel® Tris-HCl Gel, 10 kuyucuk, 50 µl	BioRad
2108-10	3X SDS-PAGE Yükleme Tamponu; 5x2 ml	Biovision
106008	Metanol, 2,5 L	MERCK
E9884-500G	EDTA; 500 Gram	Sigma
B7901-500G	Borik asit	Sigma
BP36031	EZ-Run Prestained Rec Protein Marker	Fisher
500-0202	Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 2 (Protein Kuantifikasyon Kiti)	BioRad
21059	Western Blot Stripping Buffer; 500 ml	Thermo
B6404	BCIP/NBT solüsyonu; 100 ml	Sigma
PCR Malzemeleri		
15596018	Trizol Reagent, 200 ml	Invitrogen
B9673	1-Bromo-3-chloropropane, 200 ml	Sigma
I9030	Izopropil alkol, 100 ml	Sigma

1000983	Etanol, 2,5 Lt	Merck
10966030	PLATINUM TAQ DNA Polimeraz ,500 reaksiyon	Invitrogen
EP0402	Taq DNA Polymerase (rekombinant) (5 U/ μ L), 500 reaksiyon	Thermo
K1612	First strand cDNA sentez kiti (100x20 uL)	Thermo
R0192	dNTPmix 10mM 1ml	Thermo
	Adult ve Neonatal Nav1.5 primerleri forward 100 nmol PCR Grade , 22 bazlık	IDT
	Adult ve Neonatal Nav1.5 primerleri reverse 100 nmol PCR Grade , 22 bazlık	IDT
BP1356	Agaroz, 100 Gram	Fisher
10488-058	TrackIt™ 100 bp DNA Marker	Invitrogen
10816-015	10X BlueJuice™ Jel Yükleme Tamponu	Invitrogen
10977015	UltraPure™ DNaz/RNaz-Free Distile Su; 500 ml	Invitrogen
301806	HiPerFect HTS Transfeksiyon Ajanı (2 x 1 ml)	Promega
	Otomatik Pipet Seti (0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L)	Eppendorf
E1385	Etidium bromide solüsyonu; 5 ml	Sigma
E1270	ECM jel; 5 ml	Sigma
354230	Matrigel; 10 ml	Corning
353097	BD Falcon Hücre Kültürü İnvazyon İnsertleri	BD Biosciences

2.1.3. Primerler

Çalışmada Real-Time PCR ve klasik PCR yöntemleri için farklı primer çiftleri kullanıldı.

Real-Time PCR Primer Çiftleri:

Adult Nav1.5 Forward Primer: 5'-CATCCTCACCAACTGCGTGT-3'

Adult Nav1.5 Reverse Primer: 5'-ACATTGCCAGGTCCACAAA-3'

Neonatal Nav1.5 Forward Primer: 5'-CATCCTCACCAACTGCGTGT-3'

Neonatal Nav1.5 Reverse Primer: 5'-CCTAGTTTTTCTGATACA-3'

β -Aktin Forward Primer: 5'-TCACCCACATGTGCCCATCTACGA-3'

β -Aktin Reverse Primer: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

Klasik PCR için Primer Çiftleri:

Neonatal Nav1.5 Forward Primer: 5'-TACACCTTCACCGCCATTTACACCTT-3'

Neonatal Nav1.5 Reverse Primer: 5'-CTGGCTGATGTGATGGTCCT-3'

Integrin β 1 Forward Primer: 5'-CCTACTTCTGCACGATGTGATG-3'

Integrin β 1 Reverse Primer: 5'-CCTTTGCTACGGTTGGTTACATT-3'

Cyclin D1 Forward Primer: 5'-GGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAAC-3'

Cyclin D1 Reverse Primer: 5'-GAGAGGAAGCGTGTGAGGCGGTAG-3'

GAPDH Forward Primer: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'

GAPDH Reverse Primer: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

2.1.4. siRNA Sekansları

Çalışmada kontrol amacıyla anlamlı herhangi homolojisi olmayan hedeflenmemiş dizilerden oluşan Kontrol siRNA, tedavi ve etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla Adult Nav1.5 kanalına spesifik olarak Adult Nav1.5 siRNA ve Neonatal Nav1.5 kanal tipine spesifik olarak da Neonatal Nav1.5 siRNA (1) ve (2) olacak şekilde siRNA'lar kullanıldı. Bunların bazıları üretici firma olan Sigma'nın hazır siRNA listesinden en iyi susturma/sessizleştirme derecesine sahip olanlardan seçildi, diğerleri ise literatürden etkinliği gösterilmiş sekanslar üzerinden isteğe bağlı olarak firmaya sentez ettirildi.

Kontrol siRNA: 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

Adult Nav1.5 siRNA: SASI_Hs02_00320579 (Sigma Aldrich SCN5A siRNA listesinden)

Neonatal Nav1.5 siRNA (1): 5'-UUUGUCGGCUCUUCGAACU-3'

Neonatal Nav1.5 siRNA (2): 5'-GAGUCCUGAGAGCUCUAAA-3'

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1 Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzeme ve ajanlar steril edilerek kullanıldı. Radyasyona maruz bırakılan hücre kültürü flaskları ve kullanıma hazır durumdaki steril besiyerleri ticari firmalardan elde edildi. Çok yüksek ısıya dayanıksız materyaller, 8 kg basınç ve 115°C'de 20 dk, cam malzemeler ise 160°C'de 60-90 dk otoklavlandı. Sıvı ajanlar por büyüklüğü 0.22 µm olan mikrobiyolojik filtreden geçilerek steril edildi. Cam pipetler, kromat çözeltisinde bekletilerek steril edildi. Zefiran, %70 alkol ve özel dezenfektanlarla çalışma ortamı ve steril kabinin temizliği yapıldı. Steril kabine alınacak malzemeler %70 alkolle silindi. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

2.2.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının çoğaltımı ve idamesi

Hücre kültürü işlemleri steril laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde gerçekleştirildi. -80°C'de saklanan hücreler, 37°C'lik su banyosunda çözüldü ve 75 cm²'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı.

Tüm hücre hatları DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu eklenerek çoğaltıldı. MCF-10A hücreleri ise aynı besiyerine EGF, hidrokortizon, insülin, %5 ısı ile inaktive edilmiş at serumu ve kolera toksini eklenerek, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Tüm besiyerlerine penisilin ve streptomisin eklendi (100 ünite/ml).

Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi. Flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

2.2.1.3. Pasajlama

Yeterli çoğalma olan flaskdaki besiyeri tek kullanımlık steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flaska, por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek enjektör yardımıyla önceden 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml (hücre yoğunluğuna göre) eklendi. Bir iki dakika beklenip, steril cam pastör pipeti yardımıyla bu sıvı çekildi. Tripsini çekilen flaslara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flasklar %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 5-7 dakika bekletilerek flask tabanına tutunmuş hücrelerin ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edildi. Flask tabanından ayrılan hücreler, her flask için bir tane olmak üzere, içinde 3 ml besiyeri bulunan, önceden hazırlanmış kapaklı santrifüj tüplerine steril cam pastör pipet yardımıyla aktarıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde kalan hücrelerle birlikte 0.5 ml sıvı da bırakılarak, üstte kalan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan hücreler steril cam pastör pipeti yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml besiyeri konmuş 2 ayrı kültür flaskına (hücre yoğunluğuna göre, 2-4 flask olabilir) eşit miktarda dağıtıldı. Pasajlanan hücrelerin flask içindeki yoğunlukları her gün inverted mikroskopta gözlemlendi. Tabanı hücre ile tamamen kaplı olan flasklar ölçüme alındı.

2.2.1.4. Hücre stoklama, dondurma ve çözme

Tripsin ile muamele edilen hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pelet halindeki hücreler stok medyum (%10 DMSO + %90 büyüme medyum veya serum) içerisinde yavaşça süspanse edilerek 1,5 ml'lik kriyo tüplere alındı ve -80°C'de bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot tankına aktarıldı. Her bir kriyo tüpe 1 ml hücre süspansiyonu kondu.

Sıvı azotta depolanan hücreler 37°C'de hızlı şekilde çözündürüldü, daha sonra DMEM:F12 besi yeri ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pelet, taze DMEM:F12 ile tekrar süspanse edilerek hücrelerin toplanabilmeleri amacı ile 25 cm²'lik flaslara alındı.

2.2.1.5. Hücrelerin sayımı

Hücrelerin sayımı için öncelikle flask zemininden ayrılmaları sağlandı. Bu işlem için, MCF10-A, MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerini içeren flaslardaki besiyerleri döküldü. Üzerine 4 ml Tripsin EDTA eklenen hücreler yaklaşık 10 dakika 37°C'lik

inkübatörde bekletildi. Mikroskopta kontrol edilen hücreler, zeminden ayrılınca 1:1 oranında besiyeri ile nötrale edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre peleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Bu süspansiyondaki hücrelerin sayısı Tripan Blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak belirlendi.

2.2.1.6. Tripan Blue boyama yöntemi

Tripan Blue boyama yöntemi, hücre sayımı için kullanılan çeşitli yöntemlerden biridir. Tripan blue boyası ölü hücreleri veya dokuları boyamada kullanılan canlı (vital) bir boyadır. Hücreler zardan geçen bileşenlere karşı çok seçici olduklarından tripan blue canlı hücreler tarafından absorbe edilemeyip boyanmazken, ölü hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğu için ölü hücreler tripan blue boyası ile boyanırlar. Dolayısıyla ölü hücreler mikroskop altında mavi renkte görülür. Bu yöntemle göre boyama işlemi aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapıldı:

1. Küçük bir ependorf tüpüne Tripan Blue solüsyonu ile hücre süspansiyonundan alınan örnek 1'e 1 olacak şekilde kondu ve pipetlenerek karıştırıldı.

2. Bu süspansiyondan pipetle bir damla alınarak Neubauer lamı üzerine kondu.

3. Neubauer lamının ortasındaki 1 mm alandaki karelerde bulunan tüm hücreler sayıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak her hücre örneği için ortalama bir sayı belirlendi.

4. Mavi boyanan cansız hücreler ile boyanmayan canlı hücreler ayrı ayrı sayıldı.

Hücrelerin kümeler halinde görülmesi %10'dan fazla olduğunda, hücrelerin yayıldığından emin oluncaya kadar tüm yöntem tekrarlandı.

5. Neubauer lamının her bir karesi 0.1 mm^3 ya da 10^{-4} cm^3 toplam hacmi gösterir. 1 cm^3 , yaklaşık 1ml'ye eşit olduğu için, her ml'deki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Hücre Sayısı= Her Karedeki Sayım X Dilüsyon Faktör (2) X 10^4 / ml

2.2.2. siRNA Transfeksiyonu

RNAi yöntemi ile gen sessizleştirmeyi kanıtlamak ve siRNA dağılımının optimize edilmesi için sentetik siRNA molekülleri kültür hücrelerine verilirken, kimyasal transfeksiyon ajanı olarak HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA) kullanıldı.

2.2.2.1. Kültür hücrelerine siRNA'ların dağıtılması

Meme kanseri hücre dizileri için Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA'ları kullanıldı. Ayrıca kontrol siRNA (nonsequence-specific siRNA) da kullanıldı. Kontrol siRNA, anlamlı homolojisi olmayan hedeflenmemiş diziler olup, hücrede belli spesifik mRNA ve protein seviyeleri üzerine etkili değildir; böylece, hedef siRNA'nın etkilerini ölçmek için bir temelin oluşturulmasını sağlar.

siRNA'ların kültür hücrelerine dağıtılması işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Uygulanacak deney protokolüne ilişkin sayıda hücre yine uygun deney ortamına transfeksiyondan 24 saat önce pasajlandı ve hücrelerin yapışması beklenildi.
2. Kontrol, Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA'ları için DNaz-RNAz bulundurmayan su ile ürün bilgilerine göre konsantrasyonlar hazırlandı.
3. Transfeksiyon için serumsuz besiyeri ve bir transfeksiyon ajanı olan HiPerFect Transfection Reagent oda ısısına getirildi.
4. Steril bir kriyo tüp içinde serumsuz besiyeri, siRNA ve HiPerFect aşağıda belirtilen miktarlarda hazırlandı ve 20 dakika oda ısısında laminar kabin içerisinde bekletildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. siRNA hesaplama yöntemi

siRNA (50-200 nM doz için)	Karışıma eklenecek siRNA miktarı	Karışıma eklenecek serumsuz besiyeri miktarı	Karışıma eklenecek HiPerFect miktarı	Eklenecek son hacim miktarı
Western Blot ve İnvazyon/Migrasyon (T25'lik flask için) (50 nM doz)				
siRNA ana stok konsantrasyon (20 µM)	10 µl	180 µl	15 µl	205 µl
siRNA ana stok konsantrasyon (10 µM)	20 µl	180 µl	15 µl	215 µl
siRNA ana stok konsantrasyon (50 µM)	4 µl	180 µl	15 µl	199 µl
siRNA ana stok konsantrasyon (250 µM)	0.8 µl	180 µl	15 µl	195.8 µl
Hücre Proliferasyon Testi /MTS Testi (96 kuyulu plak için) (200 nM doz)				
siRNA ana stok konsantrasyon (20 µM)	1 µl	25 µl	0.9 µl	26.9 µl
siRNA ana stok konsantrasyon	2 µl	25 µl	0.9 µl	27.9 µl

(10 μ M)				
siRNA ana stok konsantrasyon (50 μ M)	0.4 μ l	25 μ l	0.9 μ l	26.3 μ l
siRNA ana stok konsantrasyon (250 μ M)	0.08 μ l	25 μ l	0.9 μ l	25.98 μ l
Klonojenik ve Yara İyileşmesi Testi (6 kuyulu plak için) (50 nM doz)				
siRNA ana stok konsantrasyon (20 μ M)	5 μ l	95 μ l	7.5 μ l	107.5 μ l
siRNA ana stok konsantrasyon (10 μ M)	10 μ l	95 μ l	7.5 μ l	112.5 μ l
siRNA ana stok konsantrasyon (50 μ M)	2 μ l	95 μ l	7.5 μ l	104.5 μ l
siRNA ana stok konsantrasyon (250 μ M)	0.4 μ l	95 μ l	7.5 μ l	102.9 μ l

5. İnkübasyon sonunda oluşan karışım, 24 saat öncesinde ekimi gerçekleştirilmiş hücreler üzerine yukarıda bahsedilen son hacimler dikkate alınarak eklendi. Tüm bu grupların dışında deneylere kontrol amacıyla herhangi bir siRNA ya da transfeksiyon ajanı muamelesi yapılmayan (non-treated/NT) grup eklendi.

6. Farklı deney protokolleri için farklı sürelerde transfeksiyon gerçekleştirildi. Ancak siRNA ile transfeksiyon ajanı karışımı, hücrelere en az 10 saat süreyle uygulandı ve bu süre sonunda ortam serumlu besiyeri ile değiştirildi.

2.2.3. *İn Vitro* Deneyler

2.2.3.1. MTS hücre proliferasyon testi

Hücre canlılığını ve proliferasyonunu tayin etmek için kullanılan MTS testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt), 37°C'de yaşayan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu, tetrazolium tuzunun (suda çözünebilen formazan ürünü), renkli bir yapıya dönüştürülmesi ve bunun ölçülmesi temeline dayanır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır ve 490 nm'de ölçülebilir.

Meme kanseri hücre hatlarının herbiri için reaksiyonlar kuruldu ve her reaksiyon üç kere tekrarlandı. Hücreler, 100 µl'de ortalama $1-1,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plaklara ekildi. 24 saat sonra, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelere siRNA transfeksiyonları gerçekleştirildi (8-10 saat transfeksiyon).

Hücreler siRNA (200 nM) ile 120 saat inkübe edildikten sonra besiyeri yenilendi ve CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferasyon Assay kiti (Promega) kullanılarak MTS deneyi yapıldı.

MTS ve PMS (phenazine methosulfate) içeren solüsyondan (20:1 v/v) 20 µl alınarak 100 µl besiyeri içeren her bir kuyuya eklendi, 37°C'de 2-3 saat inkübasyondan sonra spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Ortalamalar hesaplandı ve Microsoft Excel programı yardımıyla ortalama absorpsiyon \pm standart sapma baz alınarak grafikler çizildi.

2.2.3.2. Klonojenik testi (Klon oluşturabilme yeteneklerinin incelenmesi)

Meme kanseri hücreleri, 6 kuyulu plaklara her 2 ml'de ortalama 750-1000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24-48 saat inkübasyon sonrası hücrelerin yüzeye tutunduklarından emin olunduktan sonra siRNA transfeksiyonları gerçekleştirildi. 1 hafta sonra ikinci kez siRNA transfeksiyonları yapıldı ve yaklaşık 2. hafta sonunda tedavi uygulanmamış kontrol kuyusundaki koloni sayısı ve yoğunluğu dikkate alınarak deney

sonlandırıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyular bir kez PBS ile yıkandı. 40 ml metanol içinde 0.2 g kristal viyole eklenerek hazırlanmış stok solüsyon distile su ile 1/10 oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu elde edildi. Bu solüsyondan kuyulara 1 ml eklendi ve 5 dk beklendi. Sonrasında kuyular 3 kez distile su ile birer dakika süreyle yıkandı. Ardından plaklar kapakları açık vaziyette kurumaya bırakıldı. Son olarak da plaklardan resimler çekilerek kuyulardaki koloni sayıları ya da histogramik değerleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

2.2.3.3. İnvazyon testi (Hücrelerin invazyon yeteneklerinin incelenmesi)

Bu yöntemde BD Falcon Cell Culture Inserts Sistemi (BD Biosciences, Cat No:353097, 8 mikronluk porlardan oluşan PET membranı) ve onun üzerini ince bir matrijel bazal membranla kaplamak için BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, Cat No:354234) ile 24 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Matrijel matriks *in vitro* şartlarda bazal membran olarak fonksiyon görmekte ve membranın porlarını tıkayarak non-invaziv hücrelerin membrandan invazyonunu engellemektedir. İnvaziv özellikteki hücreler, matrijel matriksden ve 8 mikronluk porlardan geçerek invaze olurlar.

Kontrol ve Nav1.5 siRNA'ları ile tedavi sonrası meme kanseri hücrelerinin invazyon kapasitesi "BD Falcon Cell Culture Inserts" sistemi ile ölçüldü.

Bu insert sisteminin kuyucuklarına öncesinde 3 ml soğuk serumsuz besiyerine 200 µl matrijel eklenerek hazırlanan karışımdan 100'er µl dağıtıldı. 24 kuyucuklu plaklar içinde matrijel eklenmiş insertler önce oda ısısında (Laminer flow içinde) 1 saat kurumaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda membrana zarar vermeden üzerindeki kalan matrijel uzaklaştırıldı. Ardından bu plaklar +4°C'de bir gece bekletildi. Sonrasında deneye başlamadan serumlu besiyeri içeren (500 µl) kuyucuklara, hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek steril forseps ile insertler transfer edildi.

Takiben ölçümü yapılacak siRNA ile tedavi uygulanmış hücre süspansiyonlarından 200'er µl (Her birinde 5×10^4 hücre olacak şekilde) serumsuz besiyeri içinde insertler üzerine eklendi. Sonrasında bu insertler 24 saat inkübatörde bırakıldı (37°C). 24 saat sonunda plak inkübatörden çıkarıldı. İnvaziv özellik göstermeyen hücreler membranın üst yüzeyinden steril pamuklu bir çubuk yardımıyla uzaklaştırıldı. Membrana invaze olan hücreler PROTOCOL™ Hema 3™ Manual Staining System (Fisher HealthCare; PROTOCOL, Cat No: 22-122-911) ile boyandı. Boyama sonrası insertler bir gece

kurumaya bırakıldı. Sonraki gün tekrar membranların üst yüzeyinden pamuklu bir çubuk kullanılarak boya artıkları ve kalan hücreler uzaklaştırıldı. Boyanan membran, keskin bir bistüri (No: 11) ile çıkarılıp forseps yardımıyla lam üzerine yerleştirildi. Membranların alt kısmına doğru lam üzerine yaklaşık 100-150 µl Permout™ Mounting Medium (Fisher Chemical, Cat No:SP15-100) bırakıldıktan sonra hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek lamel kapatıldı. Kamera entegre edilmiş ışık mikroskopunda her bir membran için en az 5 farklı alanın resmi alınıp, bu resimlerden ImageJ programı vasıtasıyla hücre sayımı yapılarak invaze olmuş ortalama hücre sayıları ± standart sapmalar değerlendirilerek Microsoft Excel'de grafikler hazırlandı.

2.2.3.4. Migrasyon testi (Hücrelerin migrasyon yeteneklerinin incelenmesi)

Bu yöntemde yine "BD Falcon Cell Culture Inserts" sistemi ve onun üzerini bu kez ince bir bazal membranla kaplamak için %10 jelatin ile 24 kuyucuklu plaklar kullanıldı.

Kontrol ve Nav1.5 siRNA'ları ile tedavi sonrası meme kanseri hücrelerinin migrasyon kapasitesi BD Falcon Cell Culture Inserts Sistemi ile ölçüldü.

Bu insert sisteminin kuyucuklarına 100 µl %10'luk jelatin eklenerek hazırlanan 24 kuyucuklu plaklar önce oda ısısında (Laminer flow içinde) 1 saat kurumaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda membrana zarar vermeden üzerindeki jelatin uzaklaştırıldı. Sonrasında deneye başlamadan serumlu besiyeri içeren (500 µl) kuyucuklara, hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek steril forseps ile insertler transfer edildi.

Takiben ölçümü yapılacak siRNA ile tedavi uygulanmış hücre süspansiyonlarından 200'er µl (Her birinde $10-15 \times 10^4$ hücre olacak şekilde) serumsuz besiyeri içinde insertler üzerine eklendi. Sonrasında bu insertler 8-10 saat inkübatörde bırakıldı (37°C). Bu süre sonunda inkübatörden plak çıkarıldı. Migrasyon gösteren hücreler PROTOCOL™ Hema 3™ Manual Staining System (Fisher HealthCare; PROTOCOL, Cat No: 22-122-911) ile boyandı. Boyama sonrası insertler bir gece kurumaya bırakıldı. Sonraki gün membranların üst yüzeyinden pamuklu bir çubuk kullanılarak boya artıkları ve kalan hücreler uzaklaştırıldı. Boyanan membran, keskin bir bistüri (No: 11) ile çıkarılıp forseps yardımıyla lam üzerine yerleştirildi. Membranların alt kısmına doğru lam üzerine yaklaşık 100-150 µl Permout™ Mounting Medium (Fisher Chemical, Cat No:SP15-100) bırakıldıktan sonra hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek lamel kapatıldı. Kamera entegre edilmiş ışık mikroskopunda her bir membran için en az 5 farklı alanın resmi alınıp,

bu resimlerden ImageJ programı vasıtasıyla hücre sayımı yapılarak migrasyon gerçekleştiren ortalama hücre sayıları \pm standart sapmalar değerlendirilerek Microsoft Excel'de grafikler hazırlandı.

2.2.3.5. Yara iyileşmesi testi (Wound-healing assay)

Yara iyileşmesi testi basit, ucuz, kolay uygulanabilir ve *in vitro* hücre migrasyonunun değerlendirilmesinde ilk olarak geliştirilmiş bir metottur. Bu yöntem *in vivo* yara iyileşmesi sırasındaki hücre migrasyonunu mimik etmektedir. Temel olarak tek katlı hücre katmanında bir yara oluşturmak, başlangıç zaman noktasındaki görüntüleri almak, düzenli aralıklar ile yaranın kapanması sırasındaki hücrelerin migrasyonuna ilişkin görüntülerin alınması ve son olarak bu görüntülerin karşılaştırılarak hücrelerin migrasyon oranının değerlendirilmesinden oluşmaktadır.

Meme kanseri hücreleri 6-kuyulu plaklara 15×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat kadar inkübasyona bırakıldı. Sonrasında uygun siRNA'lar ile 10 saatlik bir transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon sonrası her bir kuyu için 100 μ l'lik pipet ucu ile çizik atılarak yara modelleri oluşturuldu. Yüzeyden kalkmış hücre ve kalıntıları uzaklaştırmak için kuyular besiyeri ile yıkılarak yenilendi. Hemen ardından inverted mikroskopta her kuyu için oluşturulan yaraların yaklaşık aynı bölgelerinden 3'er adet görüntü alındı ve bu süre 0 saat olarak kaydedildi. Hücreler siRNA'lar ile 72 saat kadar tedaviye bırakıldı. Oluşturulan yaralar üzerindeki 3 ayrı noktadan mesafeler 0, 12, 24 ve 48 saat için görsel olarak karşılaştırılarak değerlendirildi.

2.2.3.6. Total RNA eldesi

Meme kanseri hücreleri 2 ml medium içeren 6-kuyulu plaklara 3×10^5 hücre/kuyu veya 4 ml medium içeren T25 flasklara $4-5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilerek 37°C de inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler yüzeye yapışmasının ardından Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA'ları ile uygun konstrasyonda 72 saat boyunca tedavi edildi. 72 saatlik tedavinin sonunda kuyulardaki eski besiyerleri uzaklaştırıldı ve bir kez PBS ile yıkama yapıldı. Sonrasında her bir kuyu için 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen) eklendi ve yaklaşık 1 dk beklendi. Kuyular içindeki TRIzol ile yıkama işlemi yapılarak içerikler RNAz içermeyen steril Ependorf tüplere toplandı. Kısa süreli bir vorteksin ardından 5 dk kadar oda ısısında bekletildi. Bekleme sonrası her bir tüpe 200'er μ l %100'lük kloroform eklendi (3 faz ayrımı; üst faz RNA-renksiz, orta faz DNA-beyaz, alt faz protein ve organik

moleküller-renkli). 20 saniye kadar vortekslendi ve oda ısısında 3 dk beklemeye bırakıldı. Sonrasında tüpler 10500 rpm ve +4°C'de 15 dk kadar santrifüje edildi. Santrifüj sonrası dikkatli bir şekilde fazları birbirine karıştırmadan ve ortaya değmeden 200-300 µl süpernatant çekilerek yeni RNAz içermeyen steril ependorf tüplere aktarıldı. Bu kez tüplere 500'er µl soğuk %100 izopropanol (2-propanol) eklendi (1 ml TRIzol'e 500 µl izopropanol eklenir). Kısa bir vorteksin ardından tüpler 10 dk oda ısısında bekletildi. Ardından tüpler yine 10500 rpm ve +4°C'de 10 dk kadar santrifüje edildi. Supernatanlar dipteki RNA peletini kaybetmeden uzaklaştırıldı ve ardından her tüpe %75'lik etanolden 1'er ml eklendi. Tüpler alt-üst edilip çok kısa (1sn) vortekslendi. Ardından 7000 rpm ve +4°C'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatantlar çok dikkatli bir pipetleme ile dipteki pelete dokunmadan uzaklaştırıldı ve tüpler ağzı açık ters bir şekilde kurulama kağıtları üzerine kapatıldı. Bu şekilde yaklaşık 10 dk kadar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Bu süre sonunda DNAz-RNAz bulundurmayan 80 µl su eklenerek kısa süre vortekslenip ardından santrifüj edildi. Daha sonra 55-60°C'ye getirilmiş ısıtıcıya tüpler yerleştirilip 10-15 dk kadar çözünmeye bırakıldı. En sonunda çözülmüş RNA'ların miktarları spektrofotometrede okundu (Nanodrop, Thermo Scientific, ABD). Kullanılmayan RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

2.2.3.7. Total RNA miktar tayini

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı NanoDrop 2000C spektrofotometrede (Thermo Fischer Scientific, USA) 260 ve 280 nm'deki optik dansitelerin ölçümü yoluyla belirlendi (ng/µL). 260 nm'deki absorbans RNA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılırken, 260 nm/280 nm absorbans oranı RNA'nın saflığını göstermektedir. Saf RNA örnekleri için referans A260/A280 oranı (1.6-2.1 arasında olmalı) 2.0 ± 0.1 olarak alındı.

2.2.3.8. Revers transkripsiyon (cDNA sentezi)

cDNA sentezi için Reverse Strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, USA) kullanıldı. RNA örneklerinden 1000 ng çekildi ve bu miktar DNAz-RNAz bulundurmayan su ile 11 µl'ye tamamlandı. Bu karışıma kit içindeki Oligo dT'den 1'er µl eklendi ve tüpler vortekslenip, santrifüj edilerek 65°C'de 5 dk süreyle RNA'nın sekonder yapılarını elimine etmek için ön uzatmaya (annealing) maruz bırakıldı. Bu süre sonunda örnekler +4°C'de bekletildi. Sonrasında ise master mix hazırlandı. Bu amaçla her bir örnek için 4 µl Reaction

Buffer, 2 µl dNTPmix ve 1 µl RNAz inhibitörü karıştırıldı ve en son olarak 1 µl Reverse Aid RT enzimi eklendi. Mix 3 kısa vorteksin ardından santrifüj edildi ve örneklere 8'er µl olacak şekilde paylaştırılarak pipetleme yapıldı. Son bir kısa vorteks ve santrifüjün ardından örnekler thermal cycler'da 42°C'de 60 dk, ardından 70°C'de 5 dk ve en son +4°C'de diğer işlemler bitirilene kadar tutuldu. Bu şekilde hazırlanan cDNA'lar hemen kullanıldı ya da PCR için -20°C'de saklandı.

2.2.3.9. Primerlerin hazırlanışı

PCR analizi öncesinde firmadan temin edilen liyofilize primerler uygun reaksiyon koşullarına hazır hale getirildi. Bu amaçla klavuzda yer alan miktar baz alınarak, bu değerin 10 katı, örneğin: 36.7 nM için 367 µl DNAz-RNAz bulundurmeyen su eklenerek primerler çözdürüldü. Böylece 100 µM'lik stok elde edildi. Ancak normal PCR reaksiyonları için primerler 10 µM olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple primerlerden 10 µl stok + 90 µl DNAz-RNAz bulundurmeyen su olacak şekilde yeni dilüsyonlar hazırlandı. Bunun için önce liyofilize primerlerin tüpleri santrifüj edildi. Çözümleri için su eklendikten sonra 2-3 kez kısa bir vorteks ve ardından 37°C'de 3 dk ısıtıcı tablada bekletildi. Bunun ardından tekrar kısa bir süre vortekslendi.

2.2.3.10. Real-Time PCR (qRT-PCR)

Realttime metodu, her bir amplifikasyon döngüsüyle PCR ürünü birikirken, aynı anda artış gösteren floresan ışığa yapan işaretçi moleküllerinin tespitine dayanmaktadır. Bu moleküller çift-iplikli DNA'ya bağlanan boyalar (SYBR Green) ya da DNA dizisine özgü propları (Taqman vb.) içermektedir. Her bir döngü sonundaki PCR ürününün kesin veya göreceli kantifikasyonuna olanak tanıyan qPCR, geleneksel PCR yöntemlerinin sınırlamalarını aşan bir tekniktir. Metodun hassaslığı amplifikasyon halen ekspanansiyel fazdayken verilerin toplanmasına olanak vermektedir. Floresan emisyon yoğunluğunun 'background noise' üzerine çıktığı nokta eşik değerdir. Eşik değerin amplifikasyonun ekspanansiyel fazında olacak şekilde ayarlanması, doğru değerlendirme için gereklidir. Tedavi örneği reaksiyonunun bu değere ulaştığı siklus ise Cycle Threshold (Ct) olarak adlandırılır. Ct değeri hedeflediğimiz DNA kalıbının kopya sayısı ile ters orantılıdır; yani kalıp ekspresyonu ne kadar yüksek ise Ct değeri o oranda küçüktür.

Realttime (kantitatif) PCR amplifikasyonları, elde edilen total cDNA kalıp olarak kullanılarak iQ™ SYBR® Green Supermix kiti (Bio-Rad) ile gerçekleştirildi.

5 µl 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 0.2 µl gene özgül forward primer, 0.2 µl gene özgül reverse primer, 3 µl cDNA (daha önceden 5x oranında sulandırıldı) ve 1.6 µl bidistile su ile reaksiyon hacmi 10 µl'ye tamamlandı. Master mix hazırlanırken primer dimerlerini önlemek için önce su konuldu, ardından primerler ve son olarak SYBR Green eklendi.

384 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna önce bu karışımdan 7 µl eklendi ve ardından 3'er µl kalıp cDNA'ler bu karışımların üzerine pipete edildi. Negatif kontrol için cDNA yerine yine 3 µl bidistile su kullanıldı. Sonrasında plaka şeffaf kaplama jelatini ile kapatılıp, çok kısa süreli vortekslenip ardından baloncuklar uzaklaşana dek santrifüje edildi. Bunun sonunda plaka iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) cihazına yerleştirildi.

PCR, 95°C'de 3 dk'lık ilk denatürasyonu takiben 40 döngü, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 45 sn bağlanma ve 72°C'de 30 sn uzatma adımını içerecek şekilde uygulandı (iCycler iQ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, USA). Her bir cDNA kalıbının normalizasyonu için her molekülün yanında deney içi kontrol olarak Beta Actin kullanıldı. Elde edilen veriler Bio-Rad CFX Manager yazılımı ile analiz edildi. Süre sonunda örneklerin, ekspresyon miktarının belirlenmesinde önemli olan CT değerleri elde edildi. CT değeri eşik-değer döngüsü (treshhold cycle) ya da ilk anlamlı ekspresyonun gerçekleştiği döngü değeridir. Bu değer, sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Bir CT değeri 40 veya daha yüksekse bunun anlamı amplifikasyonun olmadığı ve bu değer hesaplanamayacağıdır. Gen ekspresyonunun relatif kuantifikasyonunun hesaplanması için karşılaştırmalı $\Delta\Delta CT$ metodundan yararlanıldı. siRNA ile muamele edilmiş ve edilmemiş (kontrol) hücrelerdeki gen ekspresyonlarının karşılaştırılması için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Gen ifadesi oranı değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{ilaçla muamele edilmiş}) - \Delta CT (\text{kontrol}).$$

ΔCT ; Hedef gen ve housekeeping gen arasındaki CT değerleri farkının logaritması.

2.2.3.11. Klasik PCR

Real-Time PCR sonrası doğrulama amacıyla klasik PCR yapıldı ve ürünler jelde yürütülerek, bantlara ait görüntüler değerlendirildi. Doğrulama amacıyla ilk olarak

Western Blot tekniğinin uygulanması planlandı ancak Neonatal Nav1.5 kanalı için ticari olarak hazır bir antikor bulunmadığından dolayı klasik PCR yöntemi uygulandı. Bu amaçla öncelikli olarak neonatal Nav1.5 kanalının mRNA düzeyi, bununla birlikte Integrin $\beta 1$ ile Cyclin D1 ve kontrol olarak GAPDH gen ekspresyonu mRNA düzeyi değerlendirildi.

PCR için Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) kiti kullanıldı. Önce cDNA'lar buz üzerinde çözdürüldü ve kısa bir vorteks sonrasında 2'şer μl steril PCR tüplerine konuldu. 25 μl final PCR hacmi için öncelikle master mix hazırlandı. Master mix için 10 X reaksiyon tamponundan 2,5 μl , dNTPmix'ten 0,5 μl , MgCl_2 'den 0,75 μl ve otoklavlanmış ya da DNaz-RNAz bulundurmeyen sudan 17,15 μl örnek sayısı + 1 olacak şekilde karıştırıldı. Bunun ardından 10 μM 'lik primerlerden (forward ve reverse) ayrı ayrı 1'er μl yine örnek sayısı + 1 kadar master mix'e eklendi. En son olarak da Taq polimeraz enzimi örnek başına 0,1 μl olacak şekilde bu karışıma eklendi ve kısa bir vorteksin ardından santrifüj edildi. Bu master mix'ten 23'er μl PCR tüplerindeki cDNA'lar üzerine eklendi ve yine kısa bir vorteksin ardından santrifüj edildi. Tüpler termal cyclus'a yerleştirildikten sonra 94°C'deki 2 dk'lık ilk denatürasyonu takiben 35 döngü, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 45 sn bağlanma ve 72°C'de 1 dk'lık uzatma ile 72°C'de 5 dk son uzatma ve reaksiyon sonunda da +4°C'de sabit tutma süreci gerçekleştirildi.

PCR ürünleri, %1,2'lik (w/v) agaroz jel ve 1 X TBE tamponu kullanarak yatay elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldı. %1,2'lik agaroz jeli hazırlamak için 0,6 g toz agaroz 50 ml 1 X TBE tamponu içinde çözdürüldü. 1 X TBE tamponu hazırlamak için 10 X TBE tamponundan 100 ml alınıp 900 ml distile su eklendi. İyi çözünüm için mikrodalga fırında ısıtma gerçekleştirildi. Ardından biraz soğuma sonrası jel karışımına 5 μl Etidyum Bromür eklendi. Sonrasında jel elektroforez için uygun sayıda yuva bulduran tarak takılı jel kalıbına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Ardından 1 X TBE tamponu da eklendi. Yükleme için öncelikle 10 X yükleme tamponundan (BlueJuice™ Gel Loading Buffer) her bir örnek için 3'er μl parafilm üzerine kondu ve ardından PCR örneklerinin her birinden 12'şer μl bu yükleme tamponları ile karıştırıldı. Bu karışımdan 12 μl alınarak kuyulara yüklendi. 6 μl de TrackIt™ 100 bp DNA Ladder marker'ından yüklendi. Elektroforez, 1L 1 X TBE tamponu içinde başlangıç olarak 50V, örnekler kuyulardan tamamen ayrılıp belli bir seviyeye geldikten sonra ise 90 V'a çıkılarak yaklaşık 1 saat içinde tamamlandı. Elektroforez sonunda jel UV ışık altında incelendi ve fotoğraflandı. Görüntüdeki bant yoğunluklarının

dansitometrik ölçümleri ImageJ yazılımı (ImageJ, Image processing and analysis in Java, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2.3.12. Western Blot (WB) yöntemi

mRNA düzeyinde elde edilen sonuçların protein düzeyinde doğrulanması ayrıca hedeflenen siRNA tedavileri sonucundaki protein değişimlerinin değerlendirilmesi için Western Blot yöntemi uygulandı. Öncelikle normal meme epitelyumu ve kanser hücre hatları Nav1.5 protein ekspresyonu açısından değerlendirildi. PCR sonuçlarına ait kısımda bahsedildiği üzere neonatal Nav1.5 kanalına spesifik ticari bir antikor bulunmadığı için Western Blot ile değerlendirilemedi. Ayrıca Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA'ları ile MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları tedavi edilerek sonrasında ilişkili olabilecek yollar ve bunlara ait proteinlerin ekspresyonları incelendi.

2.2.3.12.1. Protein izolasyonu

Meme kanseri hücreleri 4 ml besiyeri içeren T25'lik flasklara $2.5-5 \times 10^5$ hücre/flask olacak şekilde ekilerek 37°C de yaklaşık olarak 24 saat inkübe edildi. Hücreler yüzeye yapışma sonrası siRNA ile tedavi edilip 72 saat inkübe edildi. Normal hücre ve kanser hatları karşılaştırması için ise hücreler uygun sayıda ekildikten sonra yaklaşık yine 72 saat %80 konfluent olana kadar inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda protein izolasyonuna geçiş amaçlı ilk olarak flask içindeki besiyerleri ayrı ayrı falcon tüpler içine boşaltıldı. Ardından T25 flasklar için yaklaşık 2 ml tripsin eklendi ve flasklar inkübatörde 5-7 dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted mikroskopta belirlendikten sonra bu flask içindeki tripsin miktarının 2 katı kadar taze besiyeri ile flask içleri yıkandı ve tüm hücreler toplanarak bu karışım ilk baştaki falcon tüplerin içine boşaltıldı. Bu tüpler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırıldı, dipteki peletler 1'er ml soğuk PBS ile çözdürülerek 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Tüpler 5000 rpm'de 3 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra kalan peletler lizis işlemine tabi tutuldu.

Lizis işlemi için ilk olarak lizis tampon stok solüsyonu hazırlandı. Lizis tampon stok solüsyonu için; sırasıyla 200 ml H₂O, 2.19 g NaCl, 0.76 g Tris + %1 Triton X (2.5 ml) eklendi ve pH 7.6'ya ayarlandı. Sonra 50 ml H₂O eklendi ve santrifüj edildi. Stok solüsyonun her 1 ml'si için 4 µl NaF (1M), 4 µl Na₃VO₄ (1M) ve 10 µl proteaz inhibitör karışımından eklendi ve hafifçe vortekslendi. Bu hazırlanmış solüsyondan peletin

büyükliğüne göre 80-100 µl alınarak Ependorf'lardaki peletler üzerine kondu, pipetleme yapılarak peletin kalkması sağlandı. Ardından yaklaşık 30-40 saniyelik vorteksleme sonrası 10 dk kadar tüpler buzda bekletildi. Pelet tamamen parçalanana dek bu işlemler ortalama 3 kez tekrarlandı ve sonunda tüpler 13000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Bu santrifüj sonunda üstteki süpernatantlar dipteki pelete dokunmadan yeni Ependorf tüplerine aktarıldı. Her örnek için bu yeni tüplerde proteinler izole edildi ve bu örnekler -80°C'de saklandı ya da direkt protein miktarı tayini işlemine geçildi.

2.2.3.12.2. Protein miktarının ölçümü

Total protein miktarının ölçümünde DC Protein Assay kiti (Bio-Rad) kullanıldı. Protein Standard II (Bio-Rad) kullanılarak konsantrasyonları 25 µg ile 1250 µg arasında değişen beş adet Bovine Serum Albumin (BSA) dilüsyonları oluşturuldu. Hiç BSA bulunmayan standart için distile su kullanıldı. Standartlar uygun konsantrasyonda (µg/µl) hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plak üzerinde yan yana her standarttan 2 tekrar olacak şekilde 5'er µl konuldu. Buz üzerinde çözdürülen örnekler plak kuyucuklarına konulmadan önce vortekslendi. Örnekler de aynı standartlar gibi yan yana 2 tekrar şeklinde yukarıdan aşağı şekilde konuldu. Bu şekil sütündan örneğin yoğunluğu baz alınarak 2x ve 4x (gerekirse daha yüksek) oranında dilüe edilerek her bir kuyucuğa örneklerden 5'er µl konuldu. 2x dilüsyon için 5 µl örnek + 5 µl distile su; 4x dilüsyon için 5 µl örnek + 15 µl distile su konuldu.

Kit içerisinde bulunan Reagent A (Bio-Rad, Cat.No: 500-0113)'dan 980 µl ve Reagent S (Bio-Rad, Cat.No: 500-0115)'den 20 µl alınarak ayrı bir falcon tüp içinde yavaşça karıştırıldı ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edilerek. 2-3 sn kadar vortekslendi. Hazırlanan bu karışımdan 20'şer µl bir önceki kuyucukların üzerine balon yapmayacak şekilde orta hattan bırakıldı. Sonra her bir kuyucuğa 175 µl Reagent B (Bio-Rad, Cat.No: 500-0114) solüsyonundan eklendi. Plak 3 dakika kadar orbital karıştırıcıya bırakıldı. Süre sonunda absorbanslar Molecular Devices VMax® Kinetic Microplate Reader cihazında 595 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirildi. Cihazın yazılımı üzerinden plak içindeki standartlar tanıtılıp standart eğri hazırlandı. Standartlar ile oluşturulan eğrinin korelasyon katsayısının (Correlation Coefficient - R² değeri) bire yakın olması sağlandı. Hücrelerden izole edilen protein örneklerinden ölçülmüş absorbans değerleri oluşturulan standart eğri yardımıyla yazılım üzerinden karşılaştırılarak protein miktarları belirlendi. Her yeni deney için standart eğri yeniden elde edildi.

2.2.3.12.3. Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülmesi

Elde edilen proteinlerin elektroforezde yürütülmesi için % 4–15 Ready Gel® Tris-HCl Gel, 10 kuyulu, 50 µl hacimli hazır jeller (Bio-Rad, Cat. No:161-1158) kullanıldı. Elektroforez öncesi gerekli tamponlar hazırlandı. Bunun için öncelikle 10 X Yürütme/Transfer tamponu stok solüsyonu yapıldı. Jel elektroforezinde yürütme için kullanılacak çalışma solüsyonu, 100 ml stok solüsyonu, 10 ml %10'luk SDS çözeltisi ve 890 ml distile su kullanılarak hazırlandı. Transfer işlemi için kullanılacak solüsyon, 100 ml stok solüsyonu, 200 ml methanol ve 700 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp -20°C'de soğutulduktan sonra kullanıldı.

2.2.3.12.4. Örneklerin yükleme için hazırlanması

Daha önceden toplam protein konsantrasyonları belirlenmiş olan örneklerin her birinden 40 µg olacak şekilde (1.3 hata payı da hesaba katılarak) protein karışımı alındı ve yeni ependorf tüplere konuldu. Üzerine, 40 µl olan total yükleme hacminin yine 1.3 olan hata payı dahil edilerek (52 µl) bu hacmin 2/3'ünü tamamlayacak kadar distile su eklendi. Son olarak yine hata payı dahil olmak üzere total yükleme hacminin 1/3'ü oranında 3X yükleme tamponu eklendi. 4-5 kez pipetaj ile tüp içerikleri karıştırıldı. Böylece her bir örnek 40 µl içinde 40 ug protein içerecek şekilde hazırlanmış oldu. Sonrasında tüpler 100°C'ye ayarlanmış ısıtıcıda 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandıktan sonra yüklenmeden önce 13000 rpm'de 1-2 sn kadar santrifüj edildikten sonra direkt yükleme işlemine başlandı yada buz üzerinde bekletildi.

2.2.3.12.5. Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

Yürütmeden 1 saat kadar önce hazır jel 4°C'den alınıp elektroforez tankına yerleştirildi. Taraklar çıkartılarak dikey elektroforez tankına yerleştirilmiş jelin üzerine 1X yürütme tamponundan döküldü. Tankın orta kısmı dolana kadar tampon ilave edildi ve enjektör yardımı ile kuyucuklardaki baloncuklar uzaklaştırıldı. Tercihe göre ilk baştaki ya da sondaki kuyuya 7 µl EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder (Fisher BioReagents, Cat.No: BP3603-500) moleküler ağırlık belirteci yüklendi. Sonrasındaki kuyulara ısıtıcıda denatüre edilmiş, yükleme tamponu ile karışmış ve santrifüj edilmiş olan protein örneklerinden 40'ar µl yüklenerek elektroforez işlemi başlatıldı. Jelin yığınlama kısmında örnekler kuyulardan düzgünce çıkıp aynı hizaya gelene dek 50 V akım uygulanırken,

örnekler ayırma jeline geçtiğinde ise voltaj 100'e çıkartıldı ve yükleme tamponu boyası jelin alt kısmındaki beyaz çizgi hizasına gelince işlem sonlandırıldı.

2.2.3.12.6. Elektrobloiting (Protein örneklerinin nitroselüloz membrana aktarılması)

Bu işlem için ıslak transfer yöntemi kullanıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra çıkartılan jelin kenarlarındaki bantlar kesilerek camlardan ayrıldı. Bu arada jel boyutuna uygun PVDF membran kesilip hazırlandı. Hidrofobik olan bu membran metanolde 30 sn bekletilip, 2-3 defa distile su ile yıkandı ve 1 X transfer tamponu içinde bekletildi. Jelin kuyuların bulunduğu üst kısmı ve alt kısımları PVDF membran büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilip atıldı ve jel 1 X soğuk transfer tamponu içeren kabın içerisine alındı. Başka bir kabın içerisinde de HyBlot 17™ Blotting Paper (Cat.No: B6017-20) filtre kağıtları koyularak transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Transfer kasedinin negatif kutba (siyah) bakacak olan kısmına bir adet sünger yerleştirildi. Sonra ayrı bir kaptaki bir filtre kağıdının üzerine jel ve bu jelin üstüne de daha önceden transfer tamponunda bekletilen PVDF membran yerleştirildi. Membranın üstüne de yine bir adet filtre kağıdı konuldu. Ardından membran ile jel arasındaki hava bir spatül aracılığı ile dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra bu şekilde hiç yön değiştirmeden (alttan itibaren; sırasıyla filtre kağıdı, jel, PVDF membran, filtre kağıdı) negatif kutup üzerindeki sünger üstüne yerleştirildi (jel katot, membran anot yakınında olmalı). Üzerine yine ıslatılmış sünger konuldu. Bundan sonra transfer kasedi kapatılarak elektrobloiting tankına yerleştirildi (negatif-negatif; siyah-siyaha bakacak şekilde) ve tank soğuk 1 X transfer tamponu ile dolduruldu. Tank içine manyetik balık karıştırıcı atıldı ve buz kalıbı konuldu. Ardından +4°C'lik soğuk odadaki manyetik karıştırıcı üzerine tank yerleştirildi ve solüsyonun çok hızlı olmamak kaydı ile karıştığından emin olundu. Transfer işlemi için kapak kapatıldı ve tank akım üreticiye bağlandı. Transfer 23-24 V akımda bir gece süreyle gerçekleştirildi. 20-24 saatlik süre sonunda transfer sonlandırıldı.

2.2.3.12.7. Bloklama

Bloklama öncesi membran transfer kasedinden çıkartıldı ve uygun şekilde jelin temas etmediği kısımları kesilip uzaklaştırıldı. İşaretçilerin olduğu bantların orta kısımları üzerine küçük noktalar şeklinde işaretler konuldu. Sağ üst köşesine isim ve deneyin kodu yazıldı. Antikorun membran yüzeyine özgül olmayan bağlanma yapmasını engellemek için 1 X TBS-Tween ile hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu (Bio-Rad, Blotting-Grade Blocker,

Cat.No:170-6404) kullanıldı. %5'lik süt tozu ile bloklama işlemi oda ısısında bir saat süreyle ve orbital karıştırıcı üzerinde gerçekleştirildi.

2.2.3.12.8. Membran zerindeki proteinin immunolojik olarak gösterilmesi

Bloklama süresi sonunda membran 5 kez 5'er dk kadar TBS-Tween tamponu ile orbital karıştırıcıda yıkandı. Dokuda ifade edilen proteinin gösterilmesi için, primer antikor bloklama amaçlı kullanılan %5'lik yağsız süt tozu içerisinde 1:1000 oranında seyreltildi. Sonrasında antikor içeren bu %5'lik süt tozu membran üzerine döküldü ve +4°C'de orbital karıştırıcıda bir gece inkübe edildi. Süre sonunda membran yine TBS-Tween tamponu içerisinde 5 kez 5'er dk kadar yıkandı. Sonra proteinleri görünür hale getirebilmek için, primer antikorları tanıyacak olan 1:2000 oranında sulandırılan HRP konjuge anti-rabbit yada anti-mouse IgG sekonder antikorunu ile oda ısısında 1 saat kadar inkübe edildi. Süre sonunda membran tekrar 5'er dk süreyle 3 kez yıkandı ve görüntüleme işlemine geçildi.

2.2.3.12.9. Membran görüntüleme işlemi

Membran, reaktifleri 1:1 oranında karıştırılan ChemiGlow West Chemiluminescence Substrate Kit (Protein Simple, Cat.No:60-12596-00) materyali ile kaplandı ve 1-2 dakika kadar bekletildi. Sonrasında FluorChem 8900 Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA) içerisine yerleştirilerek uygun pozlandırma ayarı ve süre tanımlandı. Optimal ayarlarda membranın görüntüsü ve ayrıca işaretilere ait görüntü tif formatında kaydedildi. Çekilen fotoğrafların dansitometrik analizi Alpha Imager Application Program (Alpha Innotech, San Leandro, CA) yazılımı ile gerçekleştirildi.

2.2.3.12.10. Membranın tekrar kullanımı

Membran, zerindeki başka bir proteinin incelenmesi için tekrar kullanılabilir. Bu amaçla öncelikle membran Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Cat.No: 46430) ile yaklaşık 20 dk kadar orbital karıştırıcıda yıkandı. Sonrasında membran yine TBS-Tween tamponu ile 3 kez 5'er dk kadar yıkanarak antikor vb. kalıntılar uzaklaştırıldı ve tekrar primer antikor ile muamele edilmeye hazır hale getirildi.

Aynı membran çok yıpratılmadan ilk olarak fosforile ve zayıf sinyal veren proteinler görüntülenmeye çalışıldı. Hedeflenen proteinler bakıldıktan sonra en son olarak β -aktin görüntülendi ve yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

2.2.3.13. Flow Sitometri ile hücre ölümünün araştırılması

Normalde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) mevcut bulunmaktadır. Eğer hücrede apoptoz başlarsa, normalde iç yüzeyde bulunan PS molekülleri hücre zarının dış yüzeyine translokasyon şekillendirirler. Membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken dönemlerinde bahsedilen yer değiştirme meydana gelmektedir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğundan, floresan bir maddeyle (FITC) işaretleme yoluyla apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma miktarı Flow Sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür kullanılmaktadır. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine imkan tanımaktadır (Kockx ve ark 1998, Overbeeke ve ark 1998).

Meme kanseri hücrelerine uygulanan siRNA'ların apoptoza neden olup olmadığı Annexin V boyası kullanılarak gerçekleştirilen Flow Sitometri (Fluorescence-activated cell sorting (FACS)) ile incelendi. Önce hücreler T25'lik flasklara 3×10^5 hücre/flask olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat sonra siRNA'lar (50 nM) ile transfekte edildi ve 72 saat kadar tedavi edildi. Ardından Annexin V/propidium iodide (PI) (BD Pharmingen FITC–Annexin V kit, San Diego, CA) boyası uygulandı. Apoptotik hücrelerde membran fosfolipidi fosfatidilserin (PS), membranın iç kısmından dışa doğru translokasyona uğramakta ve PS-bağlayan protein, Annexin V kullanılarak tespit edilebilmektedir. Bu şekilde Annexin V ile bağlanmış pozitif hücreler tespit edilerek FACS yöntemi ile değerlendirildi (Vermes ve ark 1995). FACS analizi, örneklerin protokole göre hazırlanmasının ardından MD Anderson Cancer Center'deki Flow Cytometry and Cellular Imaging Core Facility'de gerçekleştirildi.

2.2.3.14. Flow Sitometri ile hücre siklusunun araştırılması

DNA, çift sarmala bağlanabilen floresan boyalarla işaretlenerek sitokiyometrik olarak boyanabilir ve boya miktarı hücrede bulunan DNA miktarıyla doğru orantılı olmaktadır. Propidyum iyodür bu teknikte kullanılan boyalardan birisidir. Diploid bir

hücredeki DNA miktarı $2n$ olarak tanımlanmaktadır. İncelenen hücredeki DNA'nın normal hücrelerdeki DNA miktarlarına oranlanması ile elde edilen değer DNA indeksidir ve hücrenin DNA içeriğini yansıtmaktadır. Bu değer normal olarak $1 \pm \%10$ olması beklenmektedir; bundan farklı değerler bulunduğu anaploididen bahsedilebilir. DNA indeksi >1 ise hiperploidi, <1 ise hipoploidi olarak tanımlanır. Flow Sitometri yöntemiyle hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğu tespit edilebilmektedir. Bu sayede hücrelerin çoğalma hızları hakkında bilgi edinilir. Diploid hücreler, G0/G1 (istirahat) fazında yer alırken, sentez (S) fazındaki hücrelerin DNA içeriği diploid ile tetraploid hücreler arasında bulunmaktadır. G2 ve mitozdaki (G2/M) hücreler ise $4n$ miktarında DNA taşıdıklarından tetraploid olarak tespit edilmektedir (Dalva 2012).

Meme kanseri hücrelerinde uygulanan siRNA'lar ile hücre siklusunda ve geçiş fazlarında değişikliklerin meydana gelip gelmediği Propidium Iodide (PI) boyası kullanılarak gerçekleştirilen Flow Sitometri (Fluorescence-activated cell sorting (FACS)) ile incelendi. Bu işlem için önce hücreler T25'lik flasklara 3×10^5 hücre/flask olacak şekilde ekildi. Hücrelerin flasklara yapışmasının ardından sikluslarının senkronize olabilmesi için yaklaşık 8 saat kadar serumsuz besiyeri içinde inkübe edildi. Sonrasında hücreler siRNA'lar (50 nM) ile transfekte edildi ve 72 saat kadar tedavi edildi. Etüvden alınan flaskların içerisindeki besiyeri 15 ml'lik bir falkon tüpüne alındı. Tripsinize edildikten sonra hücreler daha önce üzerlerindeki besiyerlerinin konulduğu 15 ml'lik falkonlara alındı ve santrifüjlendi. Sonrasında bu peletler 1 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkandı. Fikse etmek için vorteks üzerinde karıştırılarak 2 ml soğuk %70'lik etanol ile muamele edildi ve -20°C 'de yaklaşık 4-5 saat kadar fiksasyon sağlandı. Fiksasyon işleminin ardından ortamdaki etanolü uzaklaştırmak için tekrar 2 ml PBS eklenerek santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücreler üzerine 70 μl RNAz ve 50 μl Propidium Iodide eklendi, karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Flow Sitometri cihazında (Beckman Coulter, USA) 10.000 hücre sayılarak hücre siklusu analizi yapıldı. FACS analizi, örneklerin protokole göre hazırlanmasının ardından MD Anderson Cancer Center'deki Flow Cytometry and Cellular Imaging Core Facility'de gerçekleştirildi.

2.2.4. *In Vivo* Deneyleler

2.2.4.1. Ksenograft akciğer metastaz modeli oluşturulması

Bu amaçla MD Anderson Cancer Center'daki Experimental Radiation Oncology Departmanı'ndan temin edilen 5 haftalık dişi atimik nude fareler (nu/nu fareler: UT MDACC'de üretilen, timusu bulunmayan, bağışıklığı baskılanmış fareler) kullanıldı. Fareler standart akrilik cam kafeslerde kafes başına 3 fare olacak şekilde sabit sıcaklık ve neme sahip bir odada 12 saat karanlık 12 saat aydınlık siklusunda, yem ve suyu *ad libitum* alacak şekilde barındırıldı. Tüm çalışmalar M.D. Anderson Institutional Animal Care and Use Committee tarafından onaylanmış etik kurul onayı ve deneysel protokole göre gerçekleştirildi. Metastaz modeli için kullanılan ve görüntüleme gerçekleştirilen hücre olan MDA-MB-231-luc hücre hattı lusiferaz geninin transfeksiyonu yolu ile elde edildi ve UT MDACC Experimental Therapeutics Departmanı'ndan temin edildi. MDA-MB-231-luc hücrelerine farelere enjeksiyon öncesi T25 flasklar içinde 50 nM siRNA tedavisi uygulandı (Kontrol-Nav1.5-nNav1.5). siRNA'ların transfeksiyonu yapıldıktan 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve sayımları yapıldı. Ardından her bir gruba (n=3) uygun siRNA ile işlem görmüş MDA-MB-231-luc hücrelerinden 1×10^6 olacak şekilde kuyruk veninden enjekte edildi. 24 saat sonra her bir fareye i.p D-luciferin enjeksiyonu yapıldıktan 5 dakika sonra anestezi altında Xenogen (Caliper LS) Biyoluminesans görüntüleme (BLI) cihazında grupların ilk gün görüntüleri alındı. Takiben her bir fareye DMPC-nanolipozomal taşıyıcılar içinde 150 mg/kg (4 mg/fare) dozunda ve haftada 2 kez kontrol ve hedef gen siRNA enjeksiyonları (Kuyruk veninden 100 mL serum fizyolojik içinde i.v enjeksiyonlar şeklinde) yapıldı. Bu süreç üç hafta sürdü. İlk görüntülerden sonra her hafta olacak şekilde yine Xenogen görüntüleme cihazı yoluyla hayvan gruplarının haftalık görüntüleri kaydedildi, haftalık ve deney sonu değişimler değerlendirildi.

2.2.4.1.1. Biyoluminesans görüntüleme sistemi (BLI)

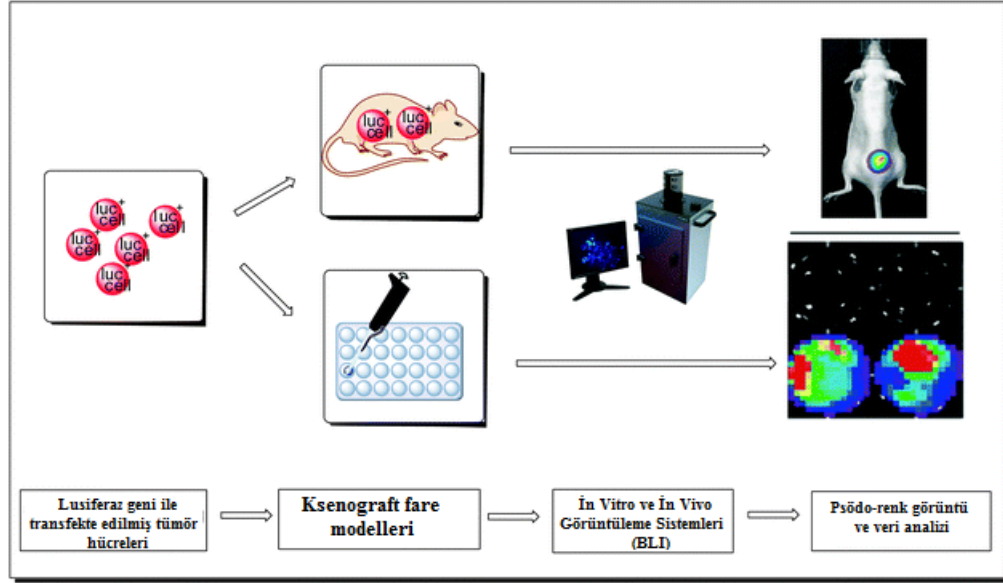
Son yıllarda BLI, hayvan modellerinin incelenmesinde kullanılmaya başlanan yeni bir yöntem olup primer tümör odakları ile metastazların kantitatif olarak değerlendirilmesine ve kanser ilaçlarına yanıtın takip edilmesine imkan sağlamaktadır (Edinger ve ark 2002).

BLI, lusiferaz-lusiferin enzimatik reaksiyonu sonucu açığa çıkan fotonların CCD kameralarla algılanması prensibine dayanmaktadır (Şekil 2.1). Açığa çıkan ışığın emisyon spektrumu 400-620 nm arasında değişmektedir (Shepherd ve Rinker 2004).



Görüntüleme sisteminde kullanılan CCD kameralar maviden infrarede kadar hemen hemen tüm dalga boylarında yüksek ve sabit sensitiviteye sahiptir ve 512 X 512 piksellik CCD kameralar -40°C'ye kadar soğutulmuştur. Işığa duyarlı olan CCD kameralar ışık geçirmeyen kapalı bir kutuda tutulmakta ve görüntülenecek objeden istenilen uzaklığa otomatik olarak ayarlanabilmektedir.

Bu yöntemin tanı ve takip amaçlı kullanılabilmesi için çalışılacak hücre serisinin lusiferaz ile transfekte edilmesi gerekmektedir. Hazırlanan hücre serisi kuyruk veni yoluyla sistemik olarak veya direkt ilgili organ içine (mesane, pankreas, meme) enjekte edilerek tümör oluşturması beklenir. Deney hayvanları haftada bir düzenli olarak BLI ile görüntülenerek, kontrol grubundaki tümör gelişimi veya tedavi grubunun terapötik ajana verdiği yanıt kantitatif olarak takip edilir. Görüntülemeden önce lusiferazın substratı D-lusiferin 1 X PBS içinde 25 mg/ml olacak şekilde sulandırılır ve *in vivo* deneyler için 6 mg/kg kullanılır. Işığa sensitif olduğundan 4°C'de ve karanlıkta saklanır. D-lusiferin, intraperitoneal, intravenöz yolla veya cilt altına verilebilir, intravenöz yolla elde edilen sinyal diğerlerinden 4-10 kat daha fazladır. İntraperitoneal yolla verildikten 10 dk sonra maksimum sinyal elde edilmektedir ve sinyalin şiddeti 60-70 dk içinde giderek azalarak kaybolmaktadır.



Şekil 2.1. Biyoluminesans görüntüleme sistemi (BLI) (Li ve ark 2013).

D-lusiferin, hücre membranlarını ve kan-beyin bariyerini geçebilmektedir, ayrıca kullanılan dozlarda toksik ve immunojenik değildir. BLI görüntüleme sistemi ile hayvanlara zarar vermeden birden fazla görüntü alınabilmesi mümkündür. Normal dokulardan kaynaklanan luminesansın düşük olması ve lusiferinin immunojenik olmaması, bu metodu araştırmalar için ideal bir görüntüleme yöntemi yapmaktadır (Söling ve Rainov 2003, Nogawa ve ark 2005). BLI ile peritoneal kavitedeki 10^3 , cilt altı alandaki 10^4 , dolaşımdaki 10^6 ve kemik iliğine metastaz yapmış 2×10^4 kadar az sayıdaki hücrenin saptanabilmesi mümkündür (Wetterwald ve ark 2002).

2.2.4.2. Ksenograft ortotopik meme kanseri modeli oluşturulması

5 haftalık dişi atimik nude fareler MD Anderson Cancer Center'daki Experimental Radiation Oncology Departmanı'ndan temin edildi ve standart akrilik cam kafeslerde kafes başına 3 fare olacak şekilde sabit sıcaklık ve neme sahip bir odada 12 saat karanlık 12 saat aydınlık siklusunda, yem ve suyu *ad libitum* alacak şekilde barındırıldı. Tüm çalışmalar M.D. Anderson Institutional Animal Care and Use Committee tarafından onaylanmış etik kurul onayı ve deneysel protokole göre gerçekleştirildi. Model için kullanılan MDA-MB-231 hücreleri (1×10^6 hücre/ 100 μ l besiyeri) her bir farenin sağ orta kadrındaki meme yağ dokusuna (mammary fat pad) % 10 Matrigel içerecek şekilde 100 μ l besiyeri içinde enjekte edildi. Hücre enjeksiyonundan 2 hafta sonra tümörler yaklaşık 3-5 mm boyuta ulaştıklarında nanolipozomal siRNA tedavisi başlatıldı. Her bir gruba (Kontrol siRNA-

Nav1.5 siRNA-nNav1.5 siRNA) DMPC-nanolipozomal taşıyıcılar içinde her bir fareye 150 mg/kg (4 mg/fare) dozda haftada 2 kez olmak üzere kontrol ve hedef gen siRNA enjeksiyonları 5 hafta boyunca uygulandı (Kuyruk veninden 100 ml serum fizyolojik içinde i.v enjeksiyonlar şeklinde). Tümörlerin başlangıç boyutları ölçüldü ve hayvanların canlı ağırlıkları kaydedildi. Bu nanolipozomal enjeksiyon süreci boyunca da her hafta tümör boyutları ölçüldü. Tedavi sürecinin sonunda farelere CO₂ ile ötenazi yapıldı. Hayvanların son ağırlıkları ve tümör ölçümleri tamamlandı. Ardından hayvanlardan çıkarılan tümörlerin de ağırlıkları tartıldı ve kaydedildi.

2.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen *in vitro* deneyler birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı. *In vitro* veriler grafiklerde ortalama \pm SD (Standart Sapma) değerleri olarak ifade edildi. *In vivo* deney sonuçları ise ortalama \pm SEM (Standart Hata) şeklinde düzenlendi. Sonuçlar hem GraphPad Prism 5.0 hem de SPSS v15.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi. İki'den fazla farklı grubu karşılaştırmak için tek yönlü varyans (One-way ANOVA) analizi ve Tukey's Post Hoc testi uygulandı. Önemlilik düzeyi $P < 0.05$ olarak alındı.

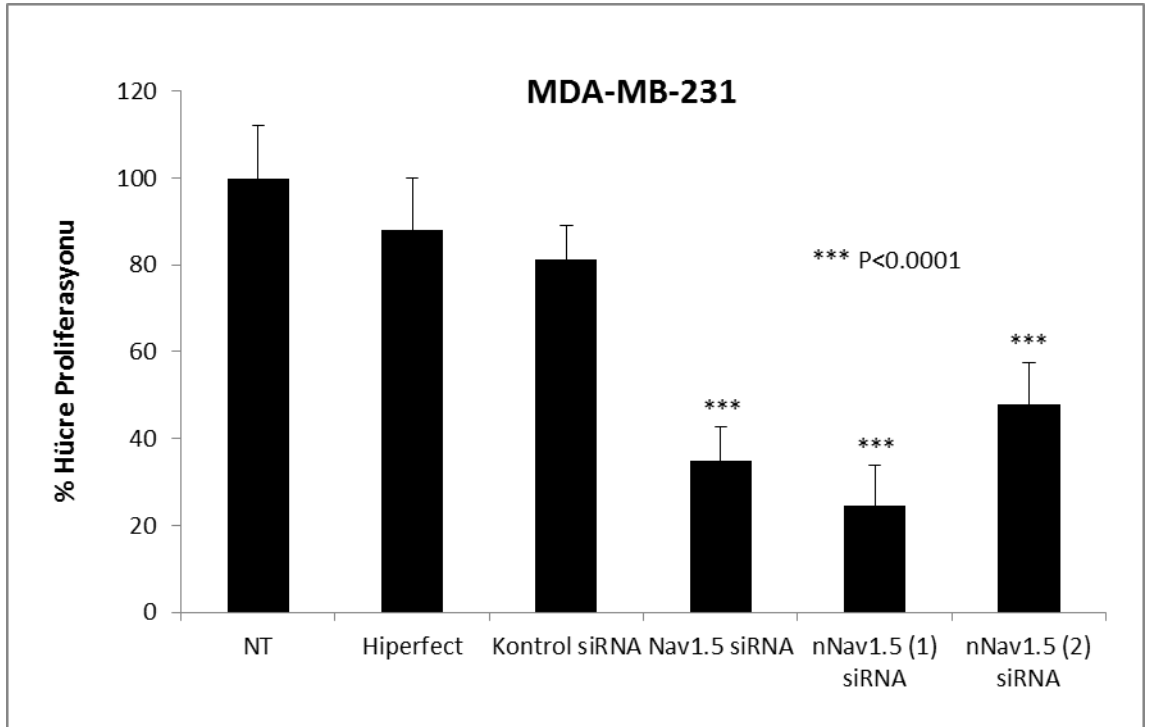
3. BULGULAR

3.1. *In Vitro* Deney Bulguları

3.1.1. Hücre Proliferasyonu Üzerine Olan Etkiler

Nav1.5 kanalının adult ve neonatal formlarının spesifik siRNA'ların kullanılmasıyla genetik olarak susturulmasının MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonu üzerine etkileri değerlendirildi.

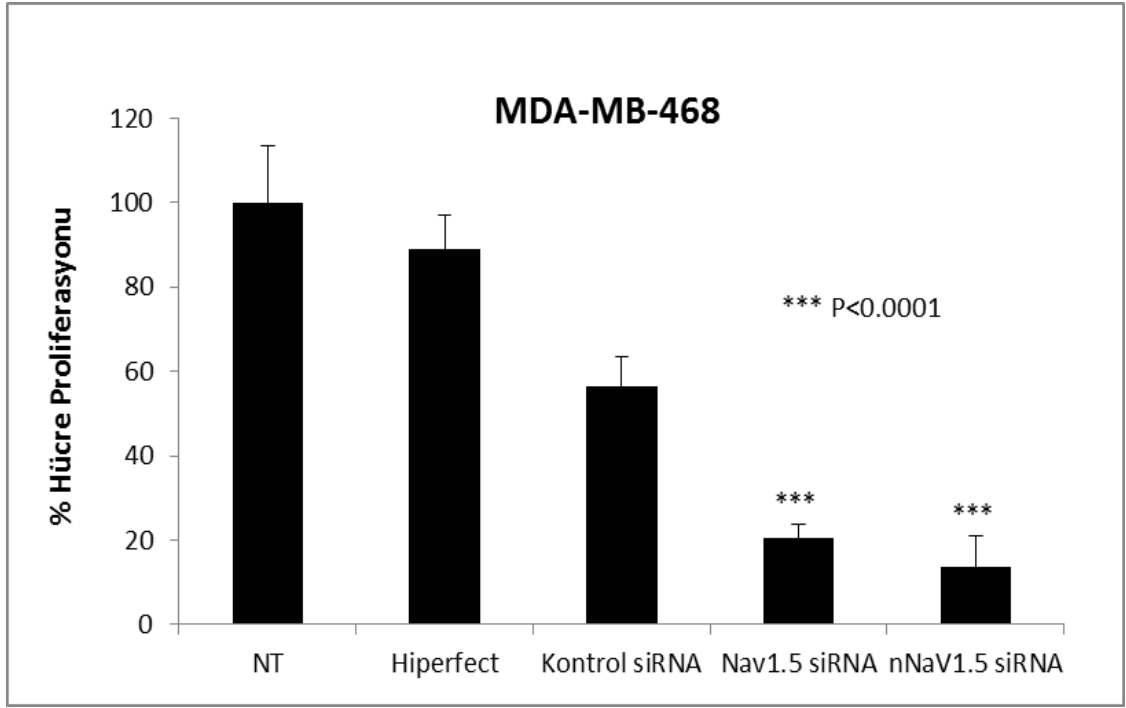
Spesifik Nav1.5 siRNA'larının protokole göre uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında hücre çoğalma düzeyleri, kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5, Neonatal Nav1.5 (1) ve Neonatal Nav1.5 (2) siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.0001$) (Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine etkileri

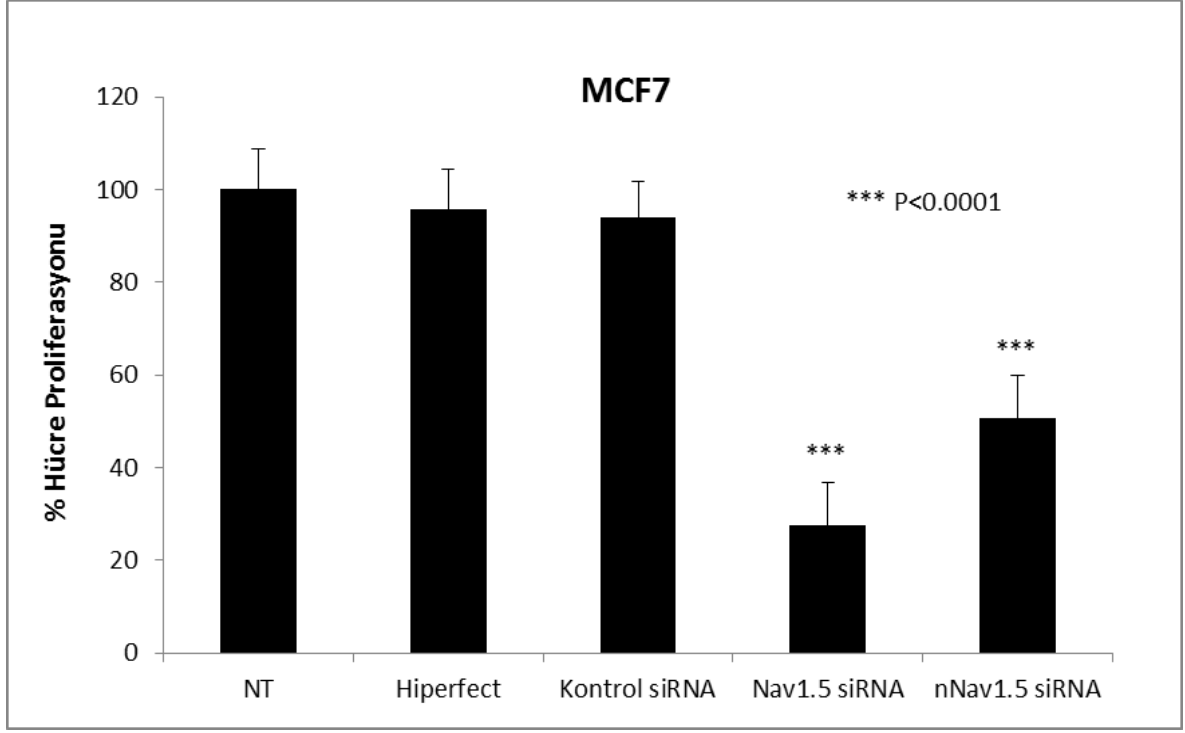
MDA-MB-468 hücre hattında da benzer şekilde hücre çoğalma düzeyleri, kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA

tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.0001$) (Şekil 3.1.2).



Şekil 3.1.2. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine etkileri

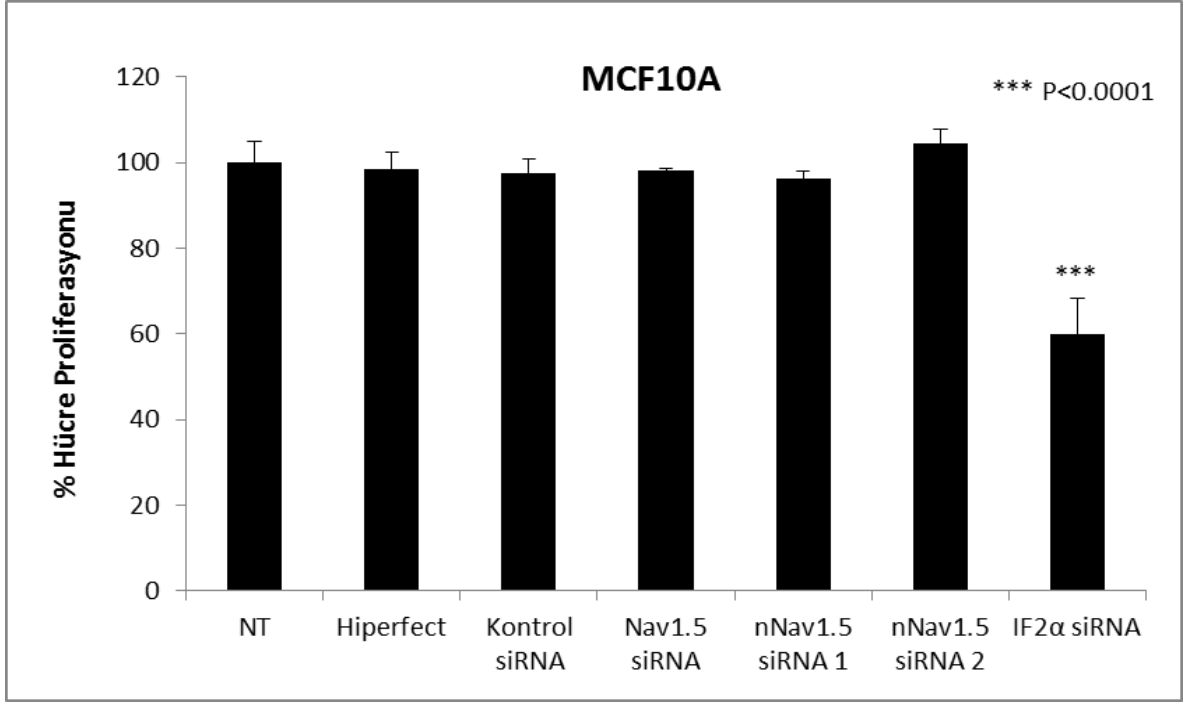
Benzer şekildeki siRNA uygulamasından sonra MCF7 hücre hattında da çoğalma düzeyleri, kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5 ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.0001$) (Şekil 3.1.3).



Şekil 3.1.3. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MCF7 hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine etkileri

3.1.1.1. Normal meme epiteli hücre hattı üzerine olan etkiler

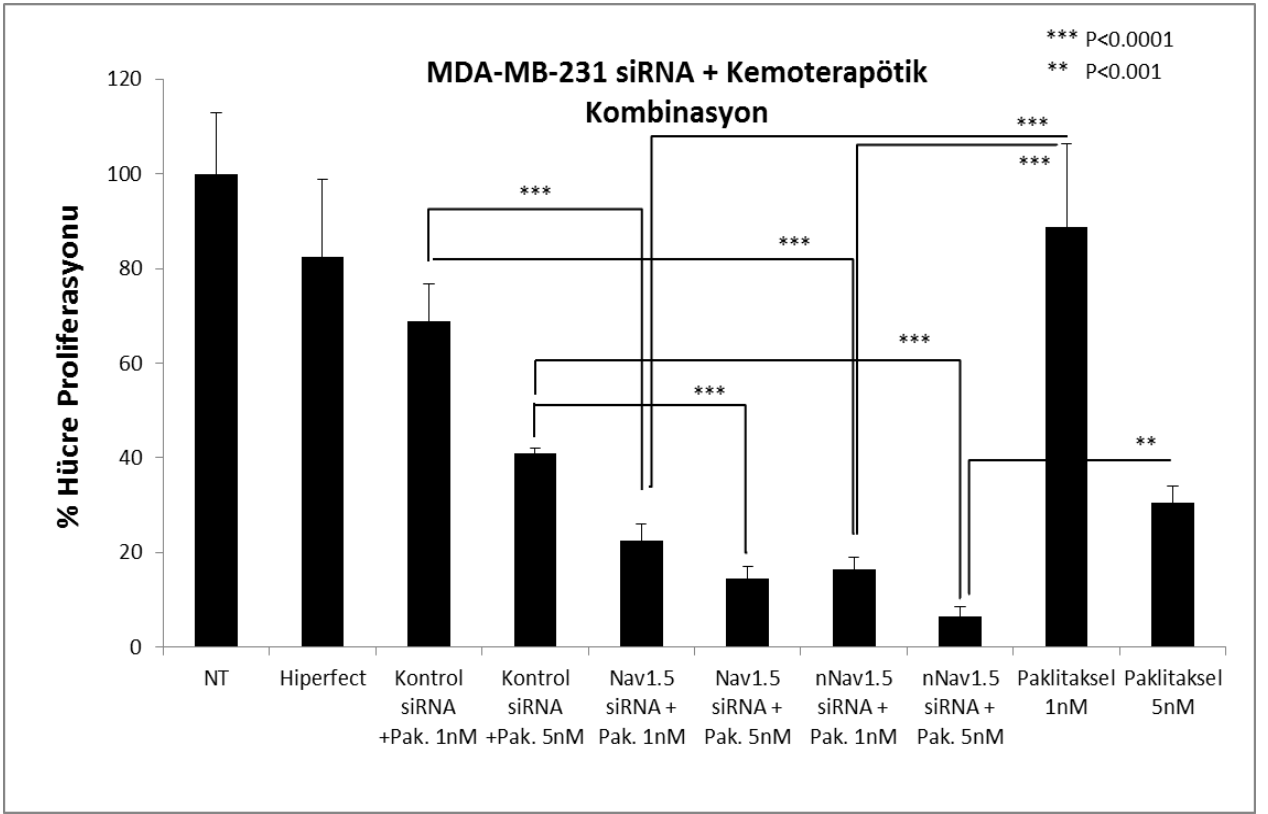
MCF10A normal meme epiteli hücre hattı 96 kuyulu plaklara 2000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. siRNA dozları ve protokol kanser hücre hatlarındakiyle aynı olacak şekilde uygulandı. Pozitif kontrol amacıyla da normal epitel hücresinde de hücre proliferasyonunu azaltabilecek, yüksek etkinlik düzeyine sahip IF2 α siRNA'sı deney gruplarına eklendi. Deney sonunda MCF10A hücre hattında kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve Neonatal Nav_v1.5 (2) siRNA tedavilerinde hücre çoğalma düzeylerinde önemli bir azalma gözlenmedi ($P > 0.05$). Ancak kontrol siRNA'ya göre IF2 α siRNA grubunda hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($P < 0.0001$). Bu sonuçlara göre adult ve neonatal Nav_v1.5 siRNA'larının normal meme epiteli hücre hattı MCF10A üzerinde hücre proliferasyonunu azaltıcı ve sitotoksik etkilere sahip olmadıkları belirlendi (Şekil 3.1.4).



Şekil 3.1.4. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MCF10A hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine etkileri

3.1.1.2. Hedef tedavinin ilaç dirençliliği üzerine olan etkileri

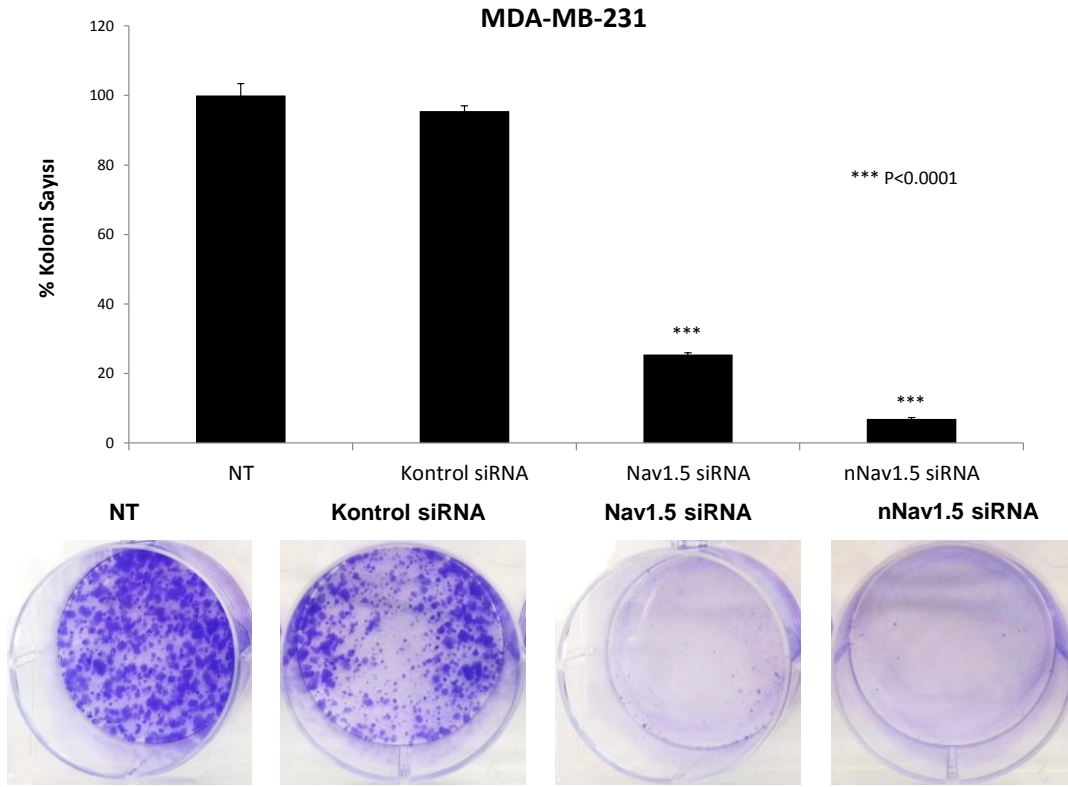
Tedavi grupları olarak 0,5 nM Paklitaksel, 1 nM Paklitaksel, Adult Nav_v1.5 ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA'ları ile ayrıca bu grupların birbirleri ile olan kombinasyonları uygulandı. Deney sonunda MDA-MB-231 hücre hattında hücre çoğalma düzeylerinde kullanılan kontrole göre, Adult ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA'ları uygulanan tüm gruplarda önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($P < 0.0001$). Ayrıca paklitakselin her iki dozunun siRNA'lar ile ayrı ayrı kombinasyonları, kendilerinin tek başlarına olan uygulama gruplarına göre hücre çoğalma düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gösterdi (Sırasıyla: $P < 0.0001$, $P < 0.001$). Bu sonuçlar ile Adult ve Neonatal Nav_v1.5 kanalının downregülasyonunun standart bir kemoterapötik olan paklitakselin etkinliğini artırdığı ve metastatik meme kanseri hattı MDA-MB-231'de paklitaksele karşı ilaç dirençliliğini azalttığı gösterildi (Şekil 3.1.5).



Şekil 3.1.5. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında Paklitaksel ile kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkileri

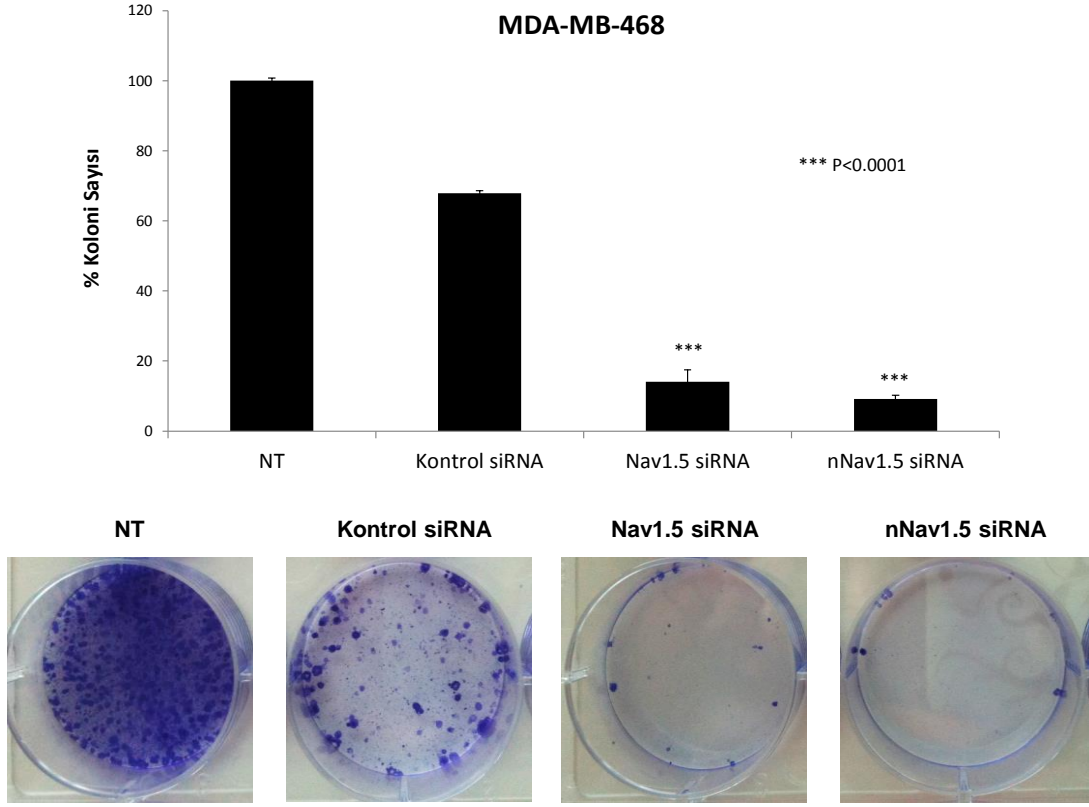
3.1.2. Hücrelerin Koloni Oluşturabilme Yeteneklerine Üzerine Olan Etkiler

MDA-MB-231 hücre hattında koloni sayıları kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi ($P<0.0001$) (Şekil 3.1.6).



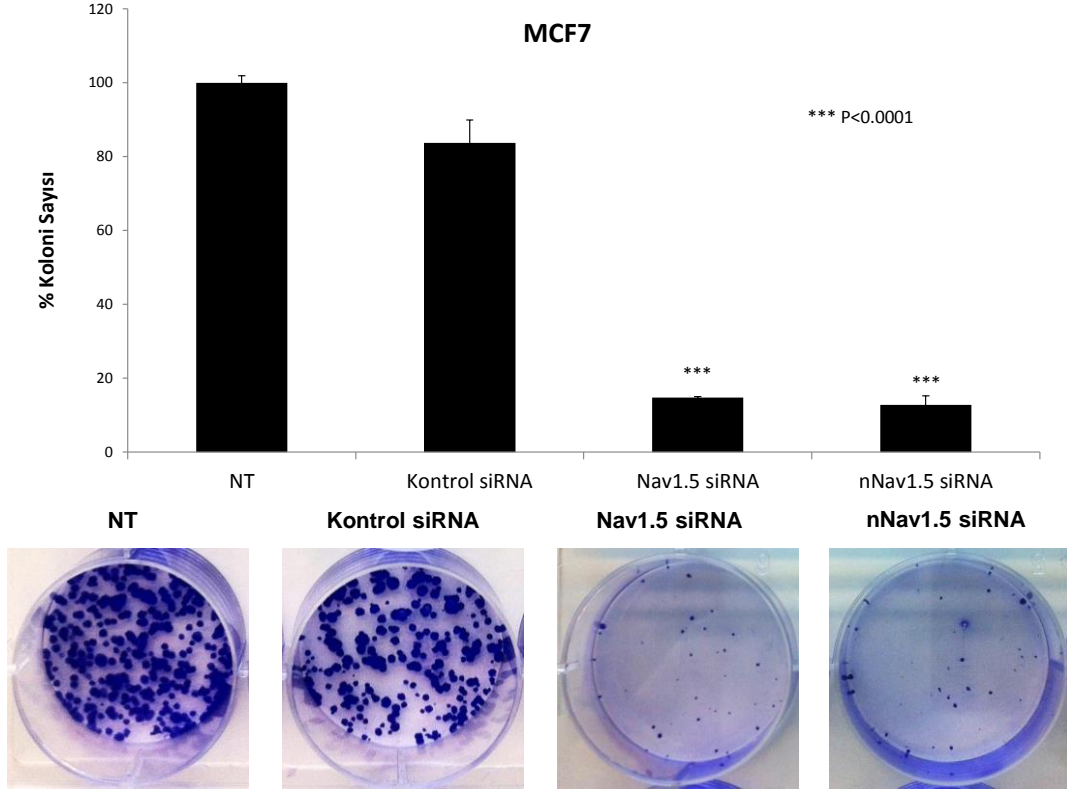
Şekil 3.1.6. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri

MDA-MB-468 hücre hattında da benzer şekilde koloni sayılarında kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gözlemlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.0001$) (Şekil 3.1.7).



Şekil 3.1.7. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri

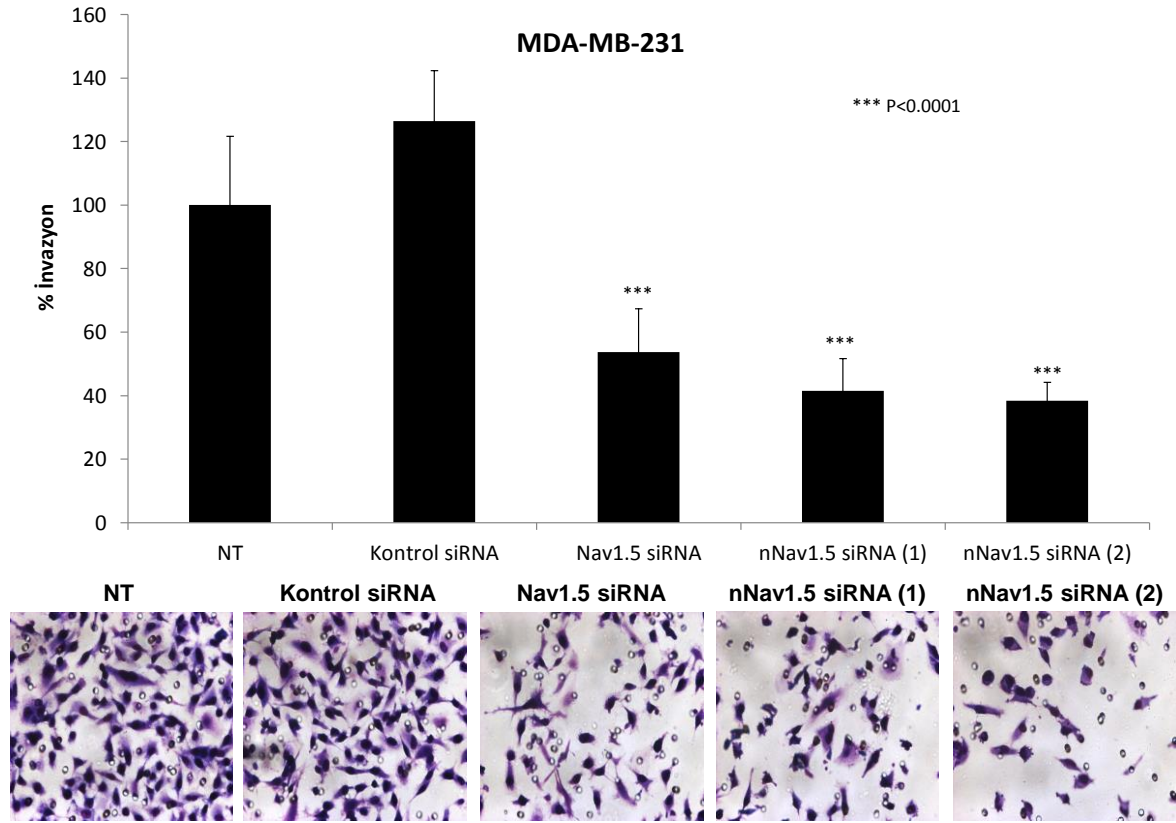
Benzer şekildeki siRNA uygulamasından sonra MCF7 hücre hattında da koloni sayıları kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5 ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi (P<0.0001) (Şekil 3.1.8).



Şekil 3.1.8. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MCF7 hücre hattında hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkileri

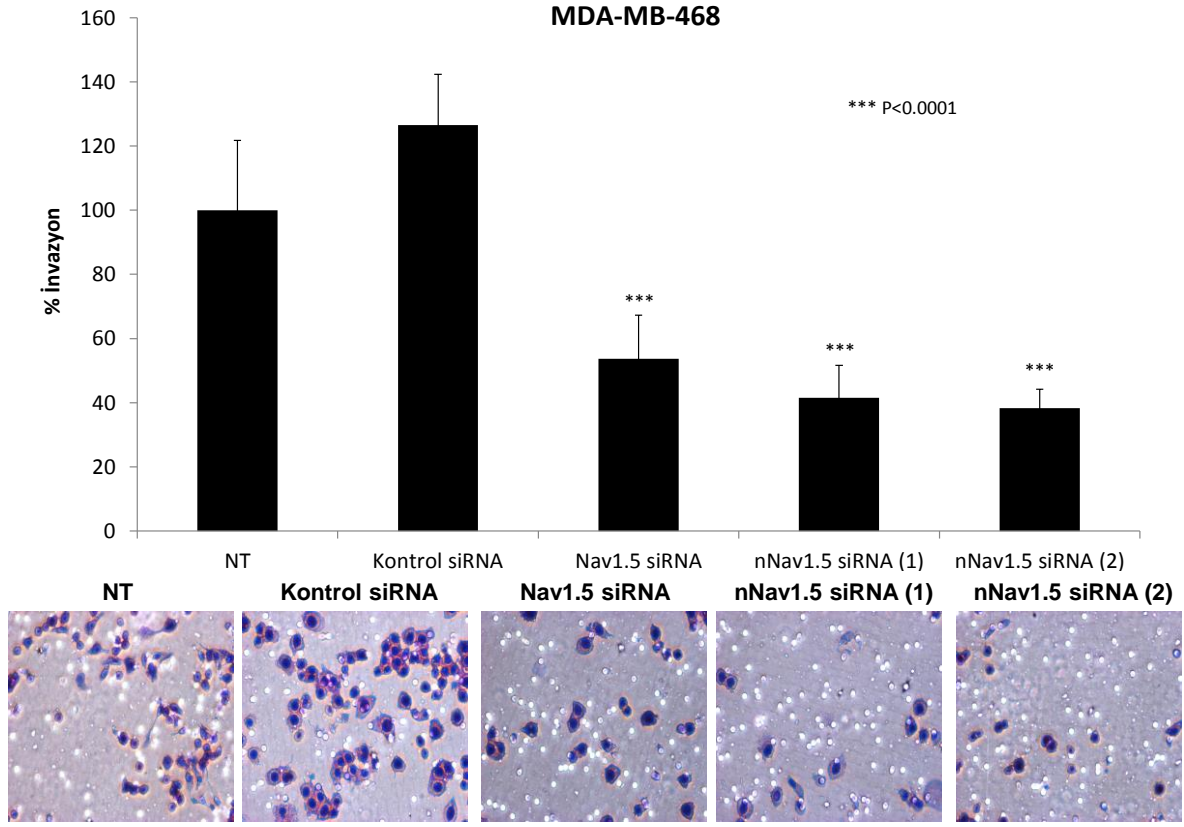
3.1.3. Hücrelerin İnvazyon Yetenekleri Üzerine Olan Etkiler

Spesifik Nav_v1.5 siRNA'ları 72 saat öncesinden hücrelere uygulandı ve sonrasında insertlerde geçen 48 saatlik protokolün ardından MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin invazyon düzeyleri kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve Neonatal Nav_v1.5 (2) siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.0001) (Şekil 3.1.9).



Şekil 3.1.9. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri

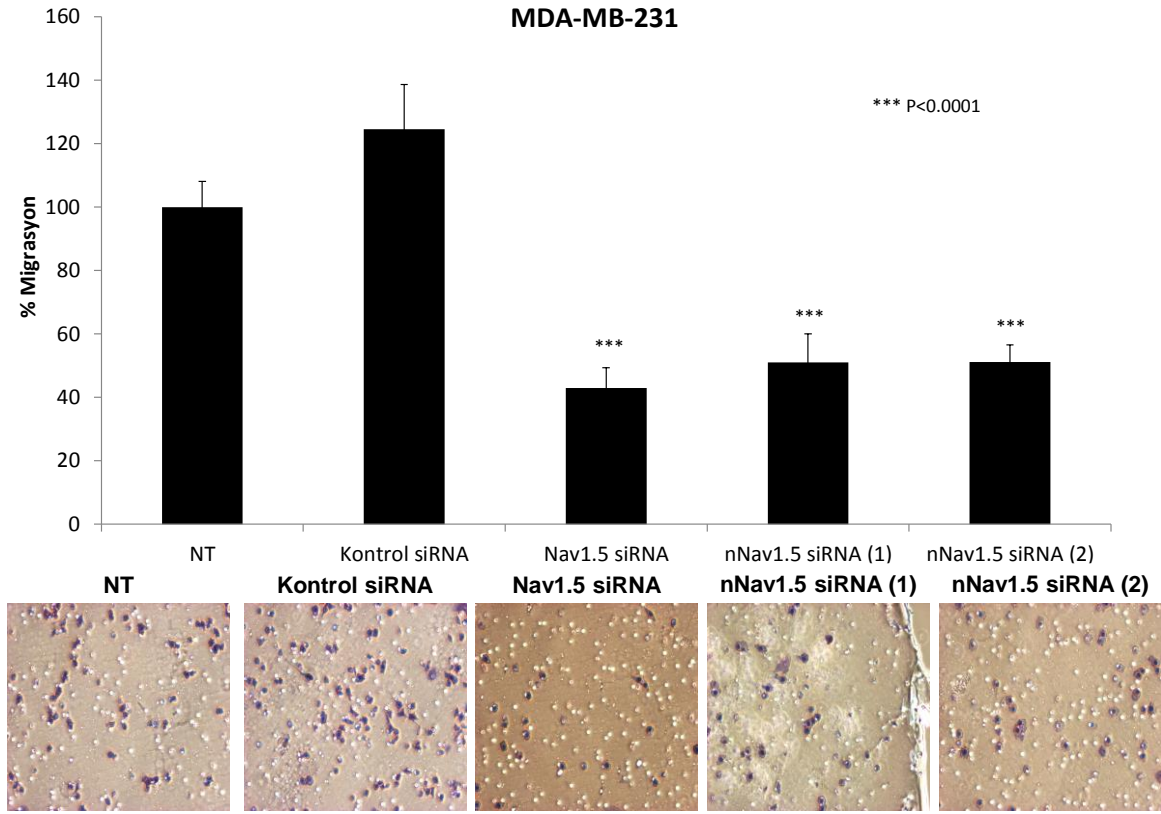
Benzer şekildeki uygulamanın ardından MDA-MB-468 hücre hattında da hücrelerin invazyon düzeyleri kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve Neonatal Nav_v1.5 (2) siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi (P<0.0001) (Şekil 3.1.10).



Şekil 3.1.10. Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının MDA-MB-468 hücre hattında hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri

3.1.4. Hücrelerin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Olan Etkiler

Çalışmada kullanılan en invaziv meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 olduğu için migrasyon yeteneğinin değerlendirilmesinde sadece bu hat kullanıldı. Hücrelerin migrasyon düzeyleri kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve Neonatal Nav_v1.5 (2) siRNA tedavilerinde önemli düzeyde azalma gösterdi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.0001) (Şekil 3.1.11).



Şekil 3.1.11. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin migrasyon yapabilme yeteneği üzerine etkileri

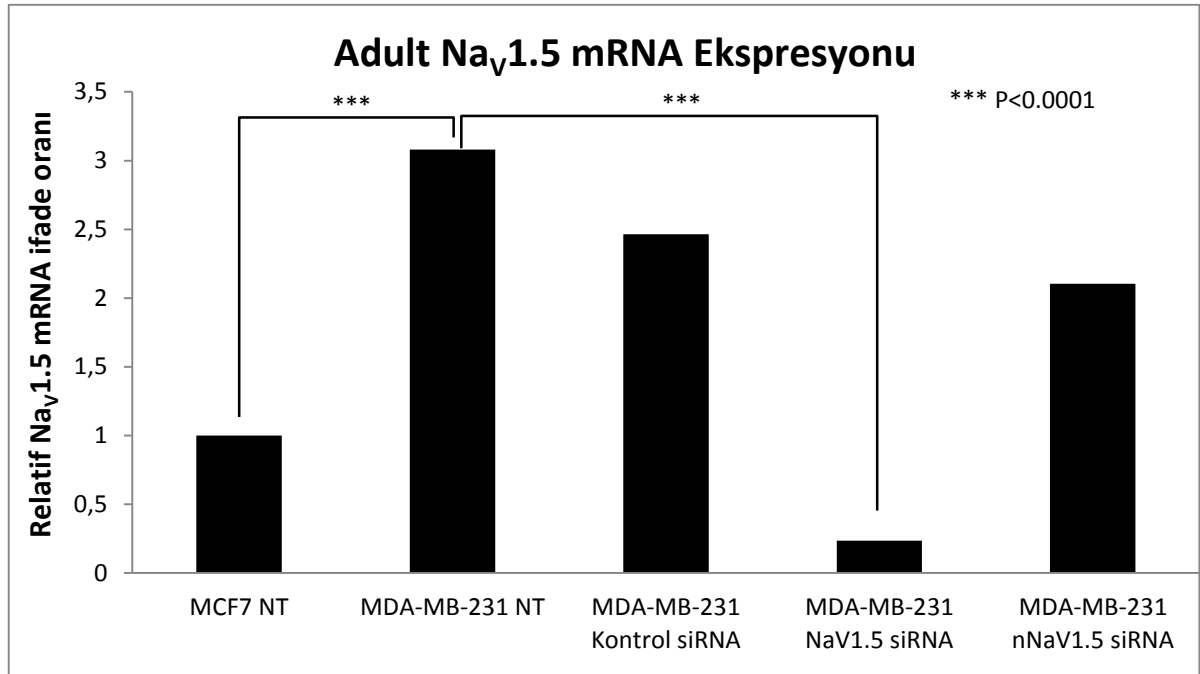
3.1.5. PCR ile İlgili Bulgular

3.1.5.1. Real-Time PCR metoduna ilişkin bulgular

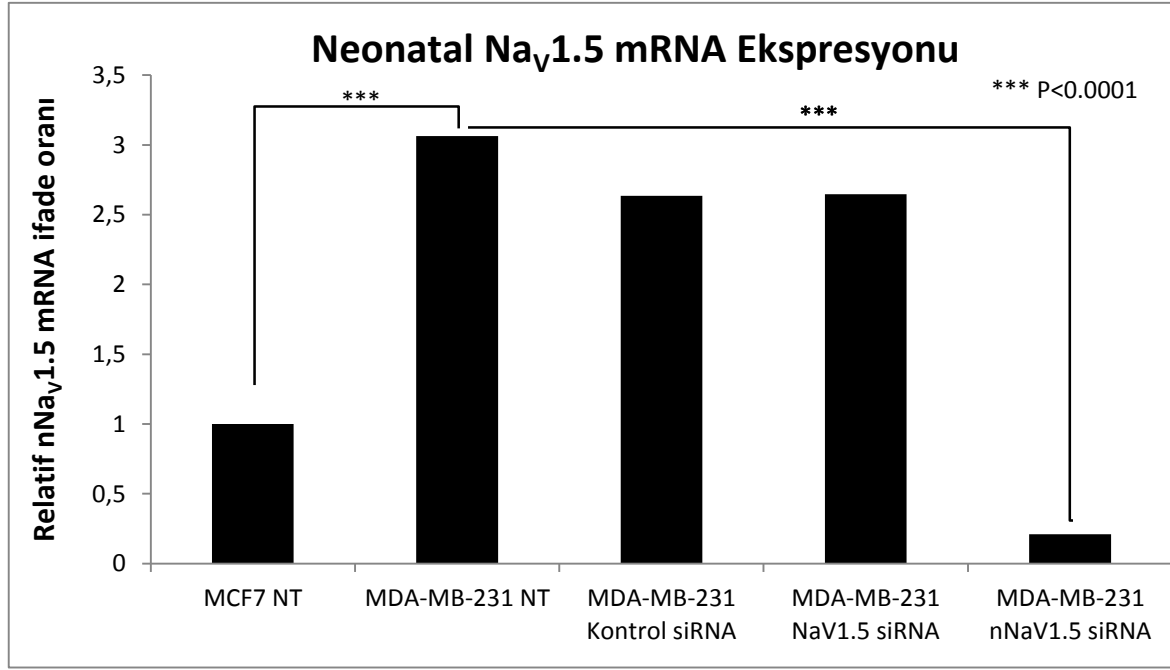
Nav1.5 kanalının adult ve neonatal alt tiplerinin gen ekspresyon düzeyleri yüksek düzeyde metastatik MDA-MB-231 ve metastatik olmayan MCF7 hücre hatlarında değerlendirildi. MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatları için kontrollerdeki ve her bir deneysel örnekteki Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 ekspresyonu β -aktin mRNA düzeyine normalize edildi.

Tedavi uygulanmamış hücre hatlarındaki ekspresyonlara bakıldığında Adult Nav1.5 kanalı ekspresyonu MDA-MB-231 hücre hattında MCF7 hattına göre daha yüksek düzeyde gözlemlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.0001$). Neonatal Nav1.5 kanalı ekspresyonu ise MDA-MB-231 hücre hattında MCF7 hattına göre belirgin artış gösterdi ($P < 0.0001$) (Şekil 3.1.12 ve Şekil 3.1.13).

Spesifik Nav1.5 siRNA'larının protokole göre uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında kanallara spesifik Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavilerinde bu kanalların ekspresyonlarında kontrol siRNA tedavi grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalmalar gözlemlendi ve bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.0001$). Ayrıca sonuçlar detaylı incelendiğinde, Adult Nav1.5 siRNA'sının spesifik olarak sadece Adult Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyini azalttığı ancak Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyonu üzerine herhangi bir etkide bulunmadığı, yine Neonatal Nav1.5 siRNA'sının da benzer şekilde kanal tipine spesifik olarak etki ettiği gözlemlendi ve çalışmaya bu spesifik siRNA sekansları ile devam edildi (Şekil 3.1.12 ve Şekil 3.1.13).



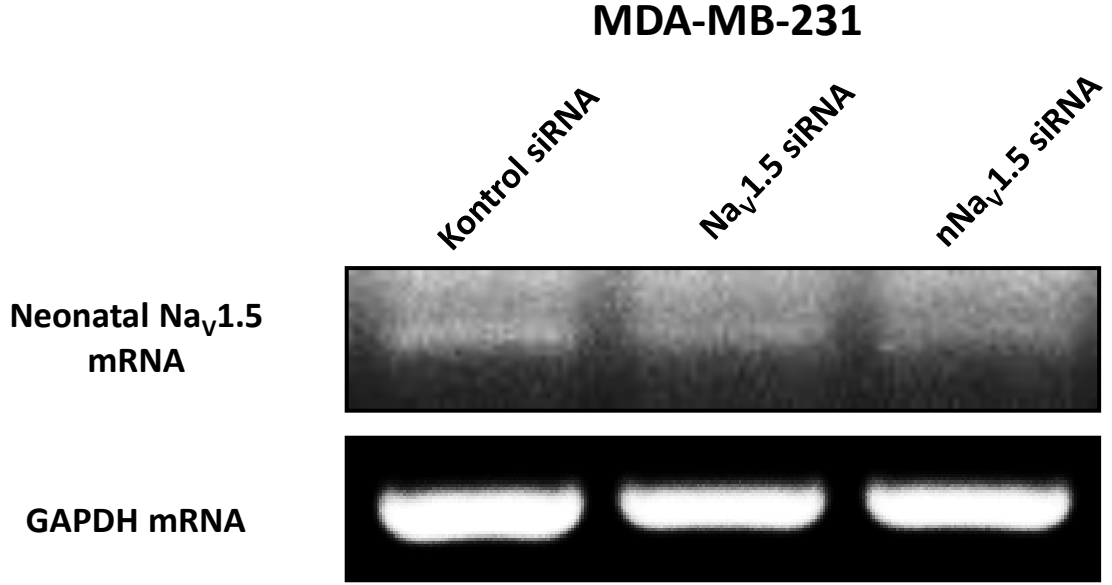
Şekil 3.1.12. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Adult Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri



Şekil 3.1.13. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri

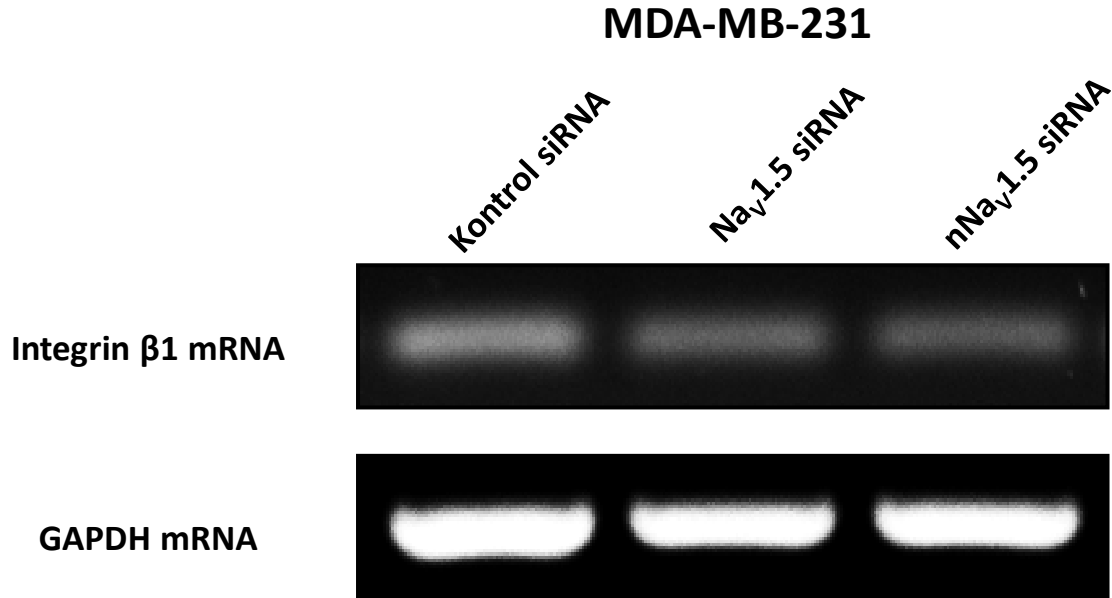
3.1.5.2. Klasik PCR metoduna ilişkin bulgular

Spesifik Nav1.5 siRNA'larının protokole göre uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında Neonatal Nav1.5 kanalının mRNA düzeyi spesifik neonatal Nav1.5 siRNA tedavi örneğinde kontrol siRNA'ya göre belirgin düzeyde azalma gösterdi (Şekil 3.1.14).



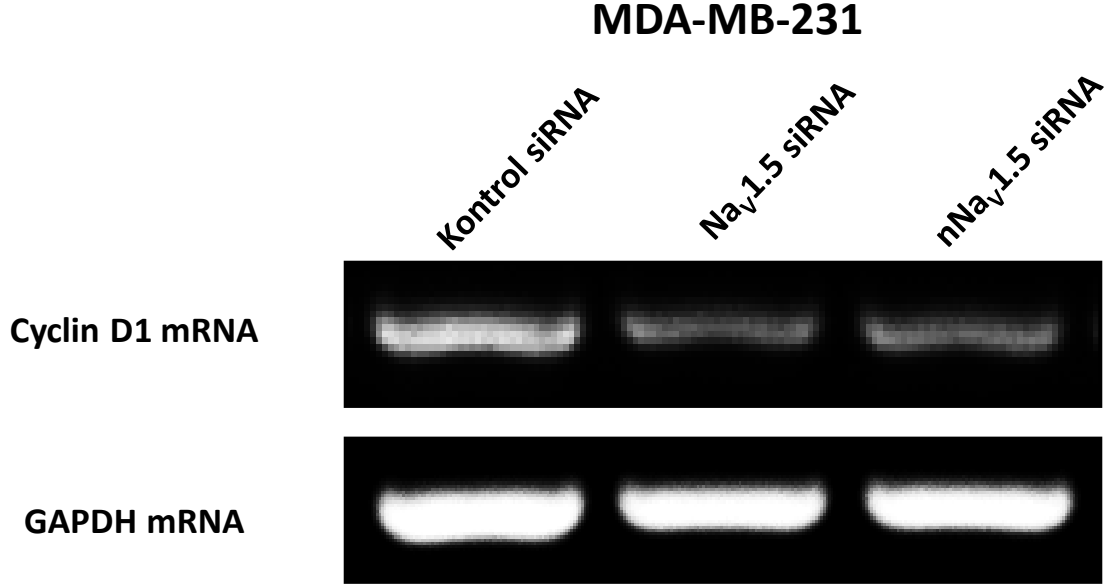
Şekil 3.1.14. MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının Neonatal Nav_v1.5 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri

MDA-MB-231 hücre hattında Integrin β 1 mRNA düzeyi spesifik Nav_v1.5 ve nNav_v1.5 siRNA tedavi örneklerinde kontrol siRNA'ya göre azalmalar gösterdi (Şekil 3.1.15).



Şekil 3.1.15. MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının Integrin β 1 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri

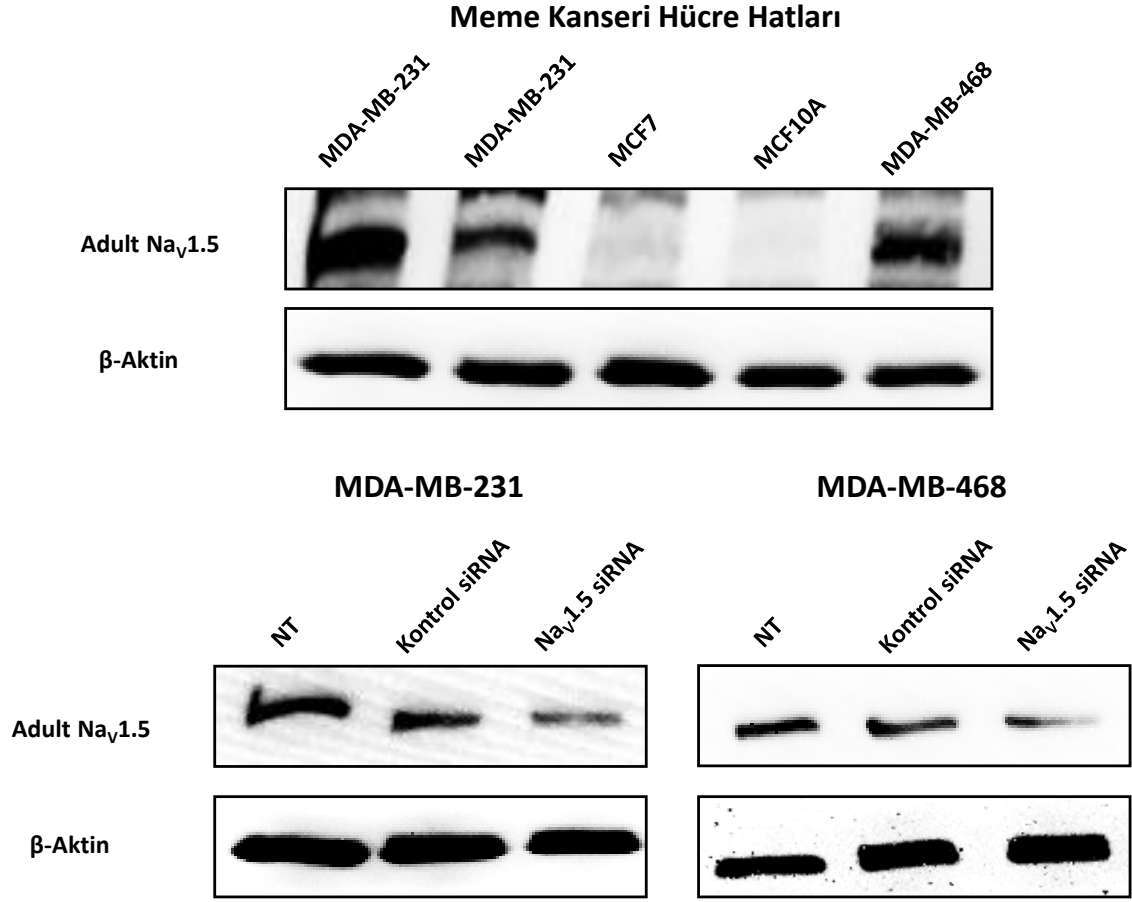
MDA-MB-231 hücre hattında Cyclin D1 mRNA düzeyinde de spesifik Nav1.5 ve nNav1.5 siRNA tedavi örneklerinde kontrol siRNA'ya göre azalmalar gözlemlendi (Şekil 3.1.16).



Şekil 3.1.16. MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav1.5 siRNA'larının Cyclin D1 mRNA ekspresyon düzeyi üzerine etkileri

3.1.6. Western Blot ile İlgili Bulgular

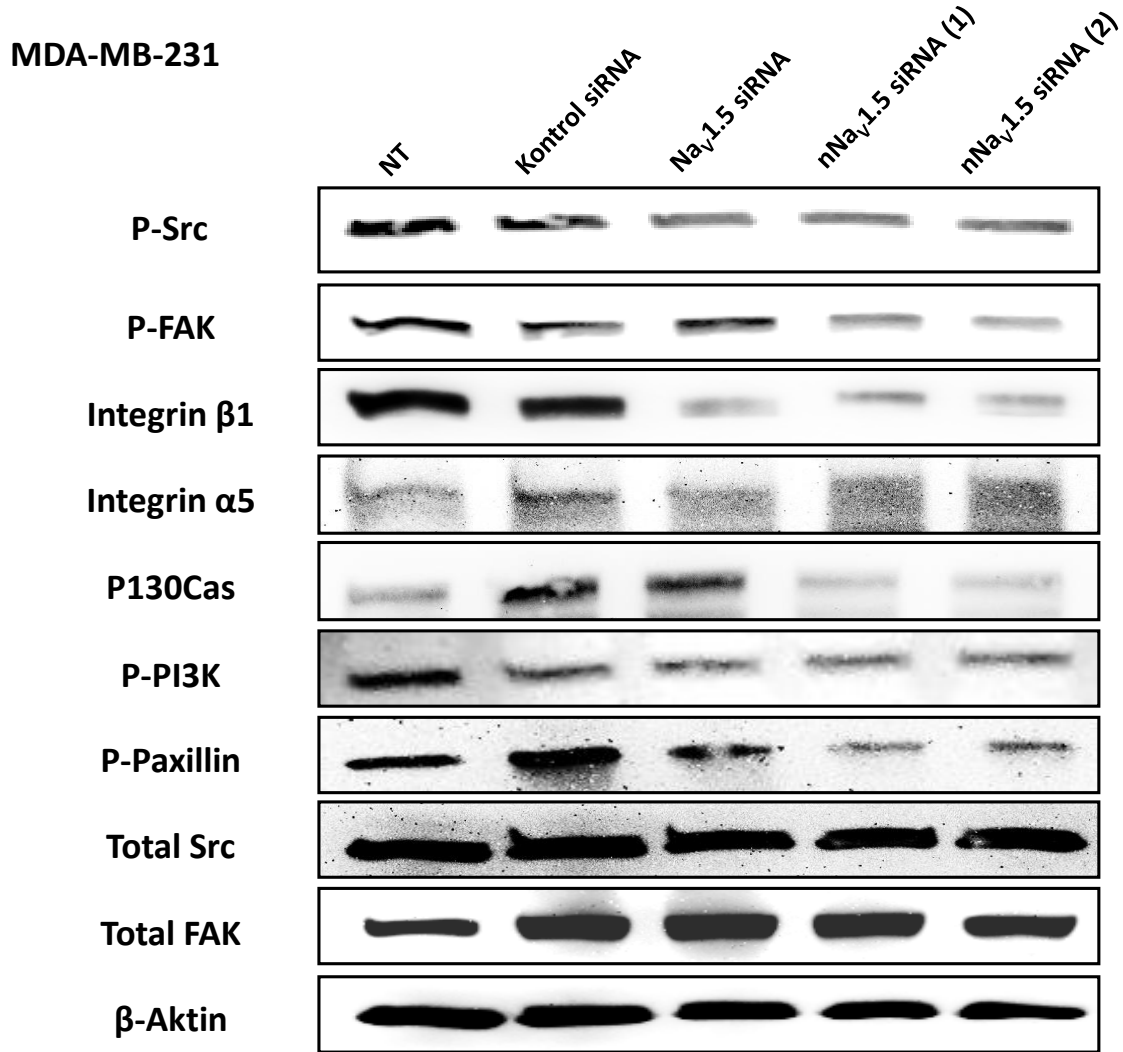
Normal meme epiteli hücre hattı MCF-10A ve tedavi uygulanmamış meme kanseri hücre hatlarına bakıldığında Adult Nav1.5 kanalının protein ekspresyonu MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hattında MCF7 hücre hattına göre daha yüksek düzeyde belirlendi. MCF-10A hücre hattında ise bu kanalın ekspresyonu meme kanseri hücre hatlarından oldukça düşük düzeyde tespit edildi. Bu bulgular da Nav1.5 kanalının invaziv meme kanseri gelişimine ve metastaz yapabilme kapasitesi üzerine önemli etkileri olabileceğini ve bu kanalın hedeflenmesinin normal meme epiteli üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermeyeceğini doğruladı. Ayrıca yine MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında Adult Nav1.5 protein düzeyine bakıldığında spesifik adult Nav1.5 siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre önemli düzeyde azalmalar gösterdi. Membranlarda yükleme kontrolü olarak β -Aktin protein düzeyi değerlendirildi (Şekil 3.1.17).



Şekil 3.1.17. Meme kanseri hücre hatlarında Adult Nav_v1.5 kanalının protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve spesifik Nav_v1.5 siRNA'sının MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hattında Adult Nav_v1.5 protein ekspresyon düzeyi üzerine etkileri

Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının protokole göre uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında öncelikle metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili proteinler incelendi. Bu amaçla P-SRC, P-FAK, Integrin β1, Integrin α5, P130Cas, P-PI3K ve P-Paxillin protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Tüm bu protein düzeylerine bakıldığında spesifik Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre belirgin azalmalar gösterdi. Total Src ve Total FAK protein düzeylerinde ise herhangi bir değişim gözlenmedi. Bu durum kanalın susturulmasının Src ve FAK fosforilasyonunun inhibisyonu üzerinden etkilere sahip olabileceğini gösterdi. Neonatal Nav_v1.5 kanalına yönelik siRNA'ların invazyon, migrasyon ve metastaz ile ilişkili yollar üzerine olan etkileri daha fazla ve önemli bulundu, bu

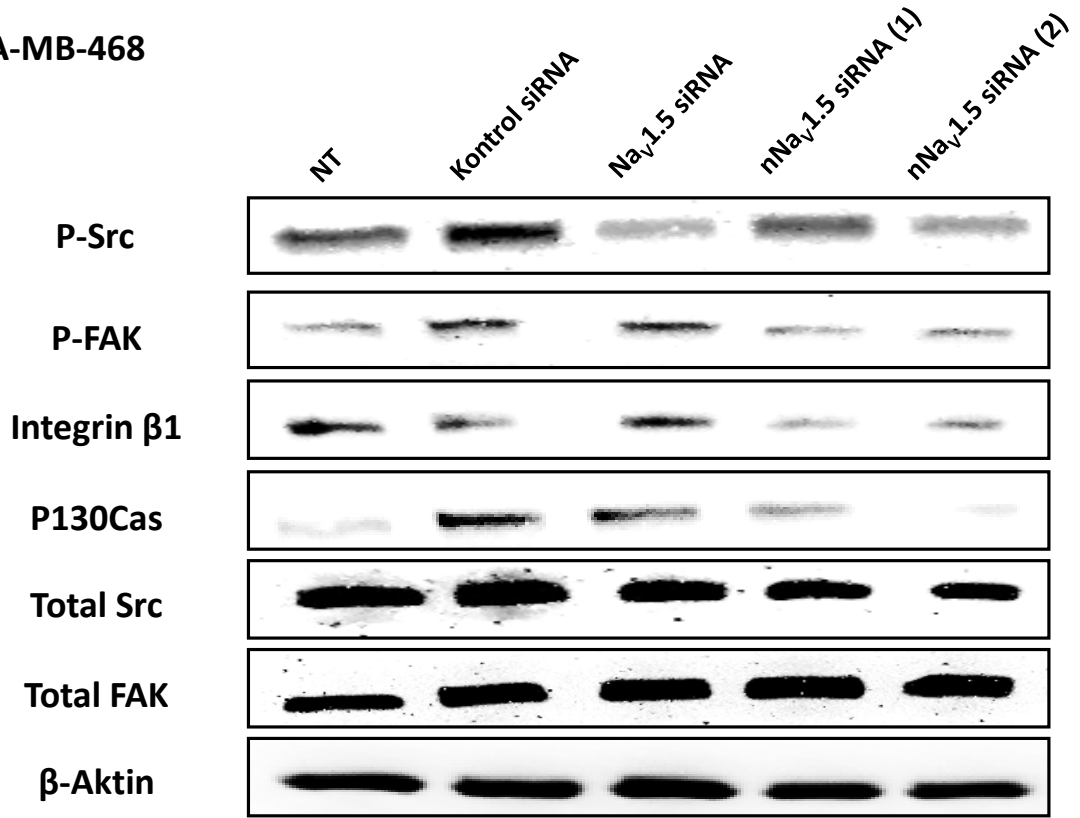
sonuçlar da kanalın bu tipinin metastazik meme kanserinde oynadığı rolü doğruladı (Şekil 3.1.18).



Şekil 3.1.18. MDA-MB-231 hücre hattında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri

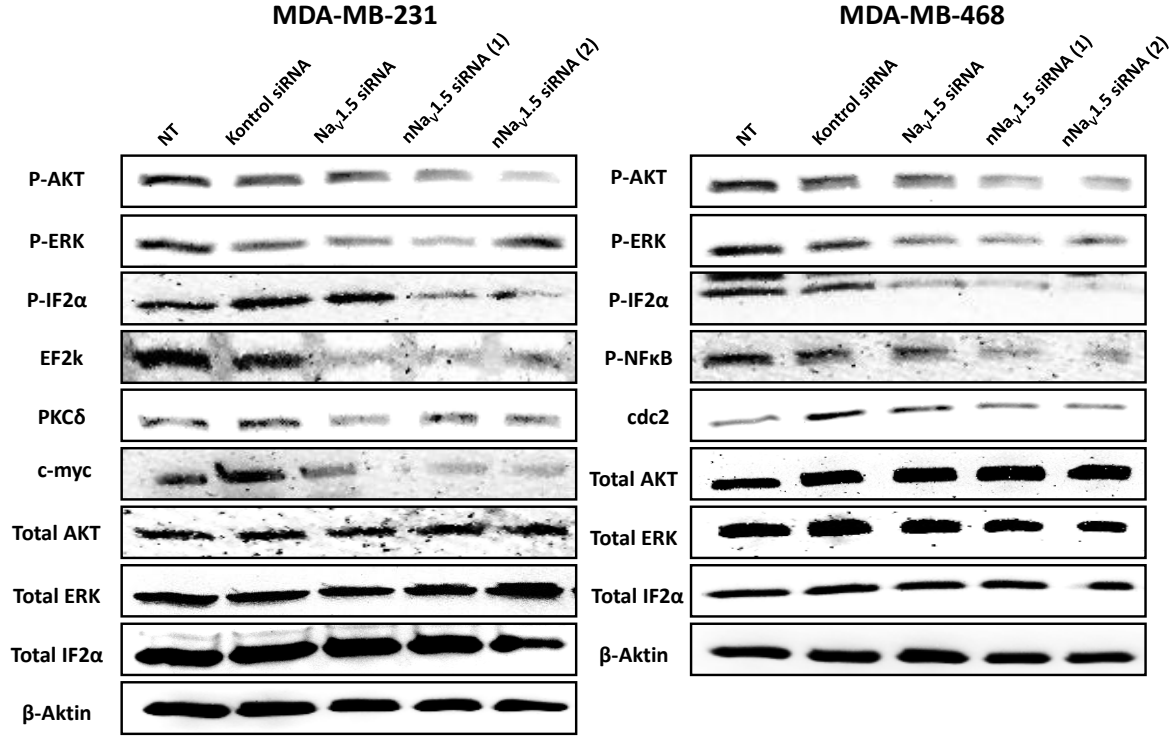
MDA-MB-468 hücre hattında da metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili P-SRC, P-FAK, Integrin β1, P130Cas protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. Spesifik Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre önemli düzede azalmalar gösterdi. Benzer şekilde Total Src ve Total FAK protein düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmedi. Yine Neonatal Nav_v1.5 kanalına yönelik siRNA'ların invazyon, migrasyon ve metastaz ile ilişkili yollar üzerine olan etkileri daha fazla ve önemli bulundu (Şekil 3.1.19).

MDA-MB-468



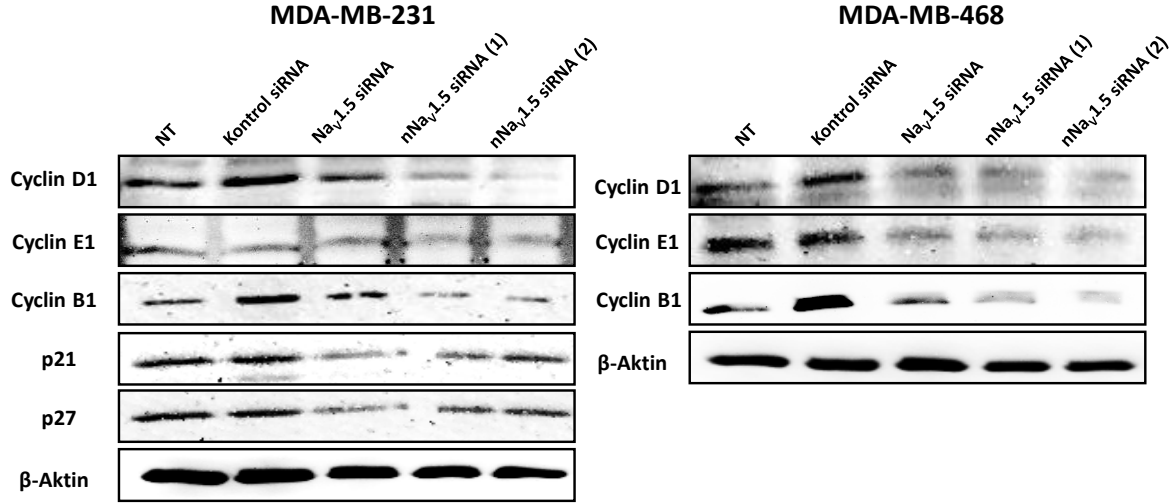
Şekil 3.1.19. MDA-MB-468 hücre hattında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri

Bu yolların ardından MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında meme kanseri gelişimi, hücre proliferasyonu, büyüme ve translasyon ile ilişkili proteinler incelendi. Bu amaçla P-AKT, P-ERK, P-IF2 α , EF2k, PKC δ , P-NF κ B, c-myc ve cdc2 protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. Tüm bu protein düzeylerine bakıldığında spesifik Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre belirgin düzeyde azalmalar gösterdi. Total AKT, Total ERK ve Total IF2 α protein düzeylerinde ise herhangi bir değişim gözlenmedi (Şekil 3.1.20).



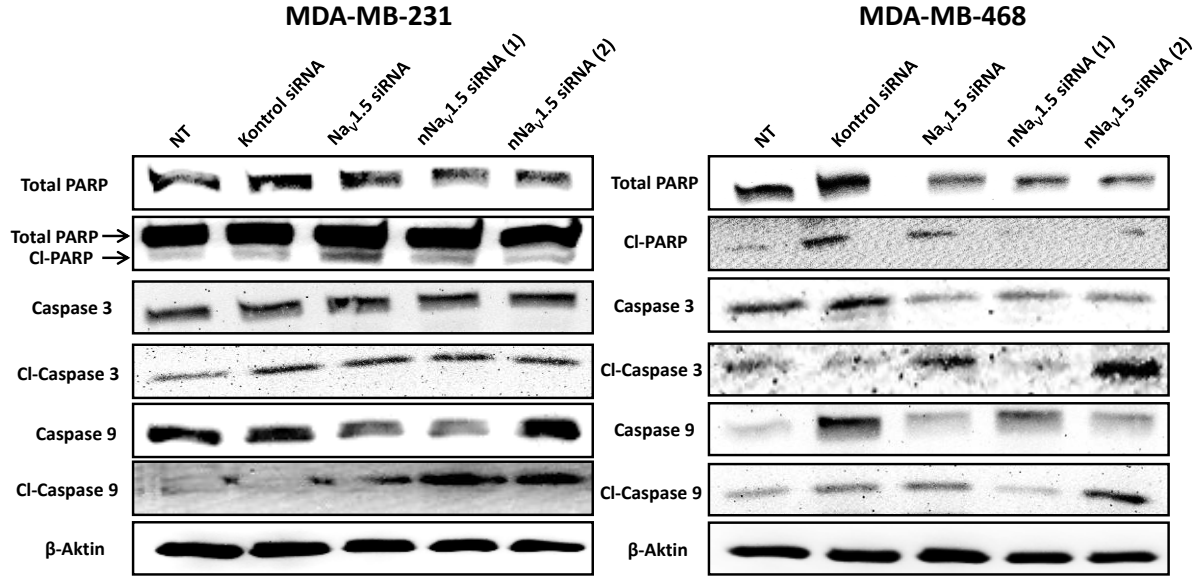
Şekil 3.1.20. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının meme kanseri gelişimi, hücre proliferasyonu, büyüme ve translasyon ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri

Elde edilen bulgulardan sonra her iki hücre hattında da bu kez hücre siklusu ile ilişkili proteinler değerlendirildi. Bu amaçla Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin B1, p21 ve p27 protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. Cyclin proteinlerinde spesifik Adult Nav1.5, Neonatal Nav1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre önemli düzeyde azalmalar gösterdi. p21 ve p27 düzeylerinde ise benzer şekilde azalış gözlemlendi (Şekil 3.1.21).



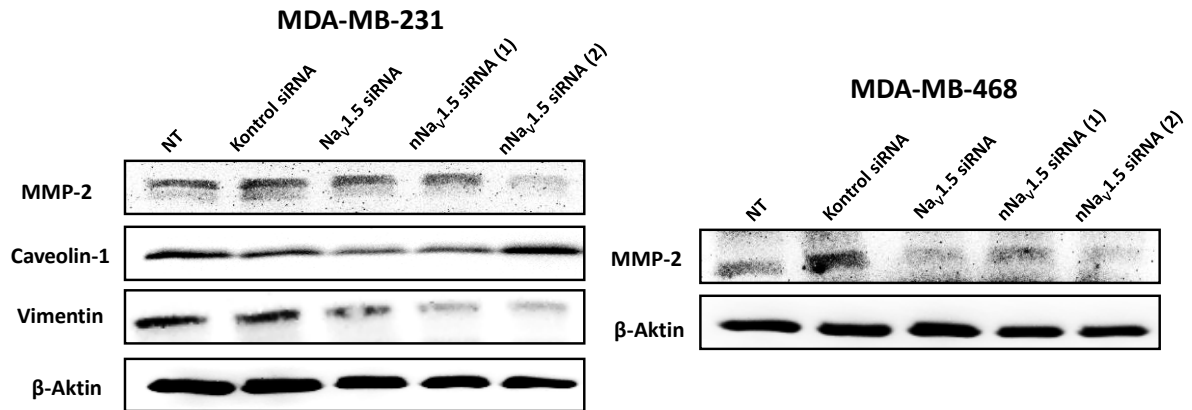
Şekil 3.1.21. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının hücre siklusu ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri

Kanalın inhibisyonunun hücre ölümü üzerine olan etkileri de değerlendirildi. Bu amaçla her iki hücre hattında PARP, Caspase-3 ve Caspase-9 protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. PARP ekspresyonunda özellikle spesifik Adult Nav_v1.5 siRNA tedavisinin Cleaved-PARP'ı artırdığı ve Total-PARP'ı azalttığı gözlemlendi. Cleaved-Caspase-3 ve Cleaved-Caspase-9 düzeylerinin spesifik Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerinde kontrol siRNA'ya göre belirgin artış gösterdiği ve Total Caspase-3 ile Total Caspase-9 düzeylerinde de buna karşılık azalma şekillendiği tespit edildi. Bu bulgular Adult ve Neonatal Nav_v1.5 kanalına yönelik siRNA'ların meme kanseri hücreleri üzerine apoptotik etkiye sahip olabileceğini gösterdi (Şekil 3.1.22).



Şekil 3.1.22. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının apoptoz ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri

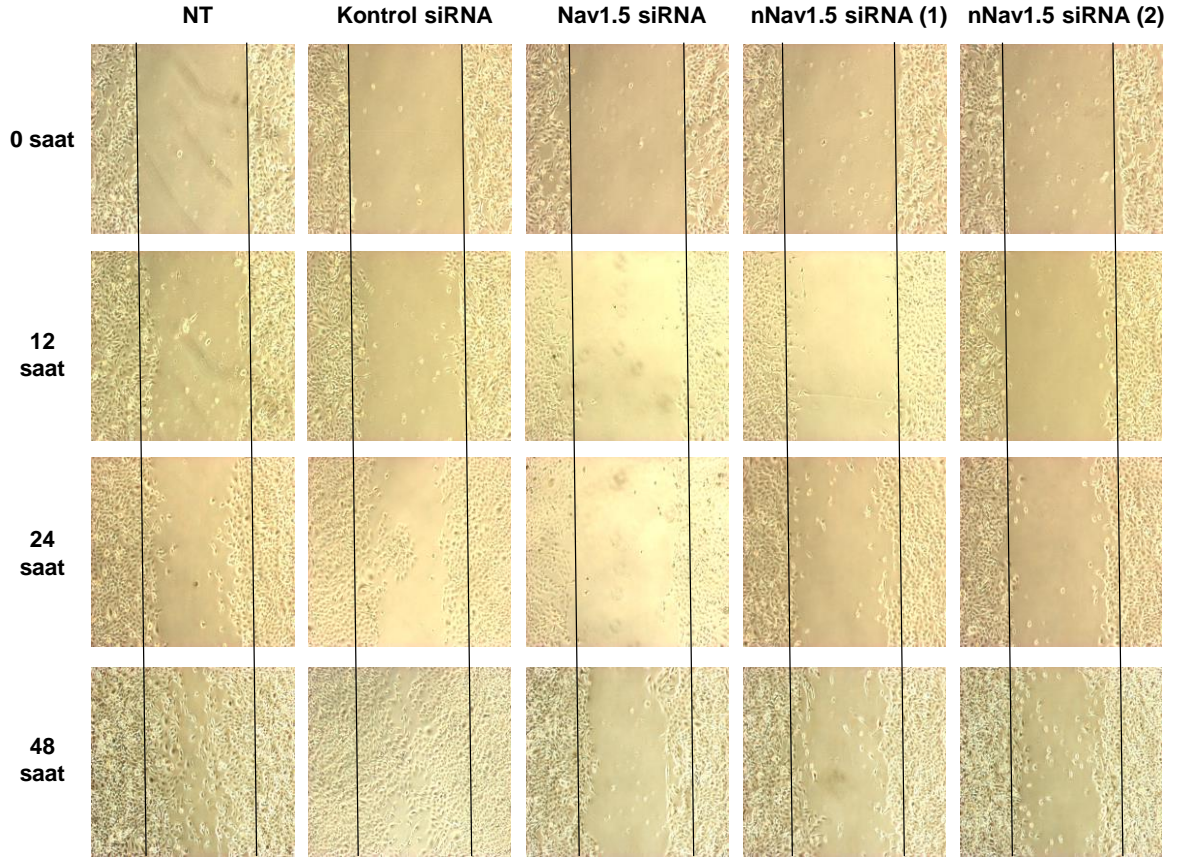
Son olarak EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) ve yine invazyon/migrasyon/metastaz ilişkili MMP-2, Caveolin-1 ve Vimentin protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. Spesifik Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve (2) siRNA tedavi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri kontrol siRNA'ya göre önemli düzeyde azalmalar gösterdi (Şekil 3.1.23).



Şekil 3.1.23. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) ve invazyon/migrasyon/metastaz ilişkili (MMP-2) protein düzeyleri üzerine etkileri

3.1.7. Yara İyileşmesi Testine İlişkin Bulgular

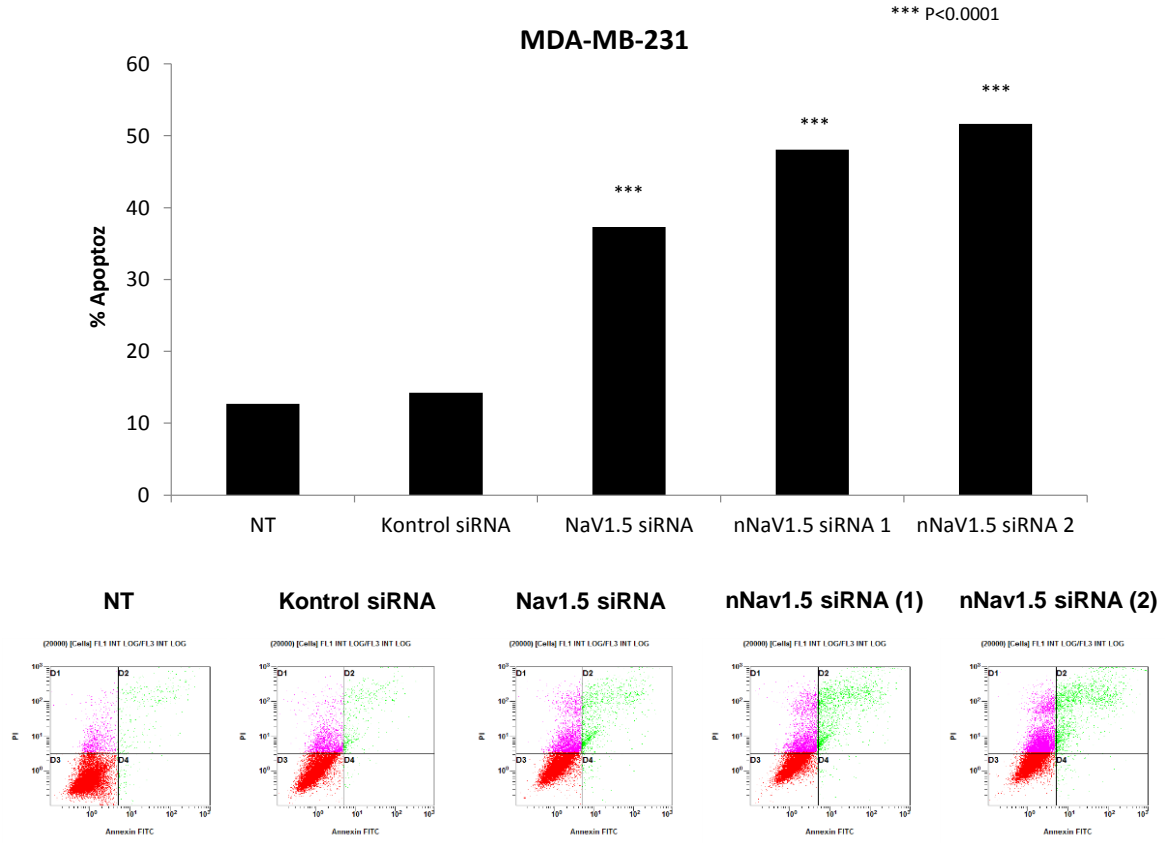
Spesifik Nav1.5 siRNA'larının protokole göre uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin yara iyileşmesi testindeki migrasyon düzeyleri kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5, Neonatal Nav1.5 (1) ve Neonatal Nav1.5 (2) siRNA tedavilerinde belirgin azalmalar gösterdi (Şekil 3.1.24).



Şekil 3.1.24. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre ölümü üzerine olan etkileri

3.1.8. Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular

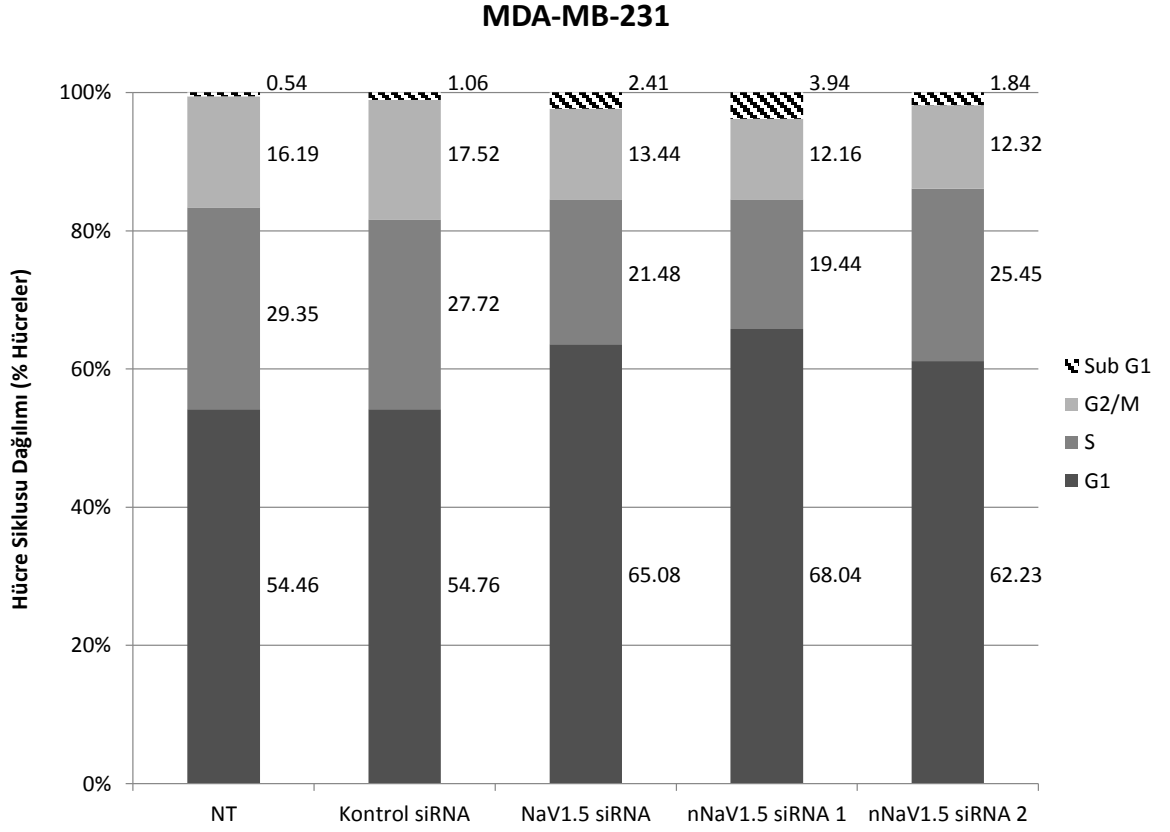
MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz düzeyleri kullanılan kontrol siRNA'ya göre, uygulanan Adult Nav1.5, Neonatal Nav1.5 (1) ve Neonatal Nav1.5 (2) siRNA tedavilerinde önemli düzeyde artışlar gösterdi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.0001$) (Şekil 3.1.25).



Şekil 3.1.25. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre ölümü üzerine olan etkileri

3.1.9. Hücre Siklusuna İlişkin Bulgular

MDA-MB-231 hücre hattında uygulanan Adult Nav_v1.5, Neonatal Nav_v1.5 (1) ve Neonatal Nav_v1.5 (2) siRNA tedavi örnekleri kontrol siRNA ile karşılaştırıldığında hücrelerde önemli düzeyde G1 arresti gözlemlendi (Şekil 3.1.26).

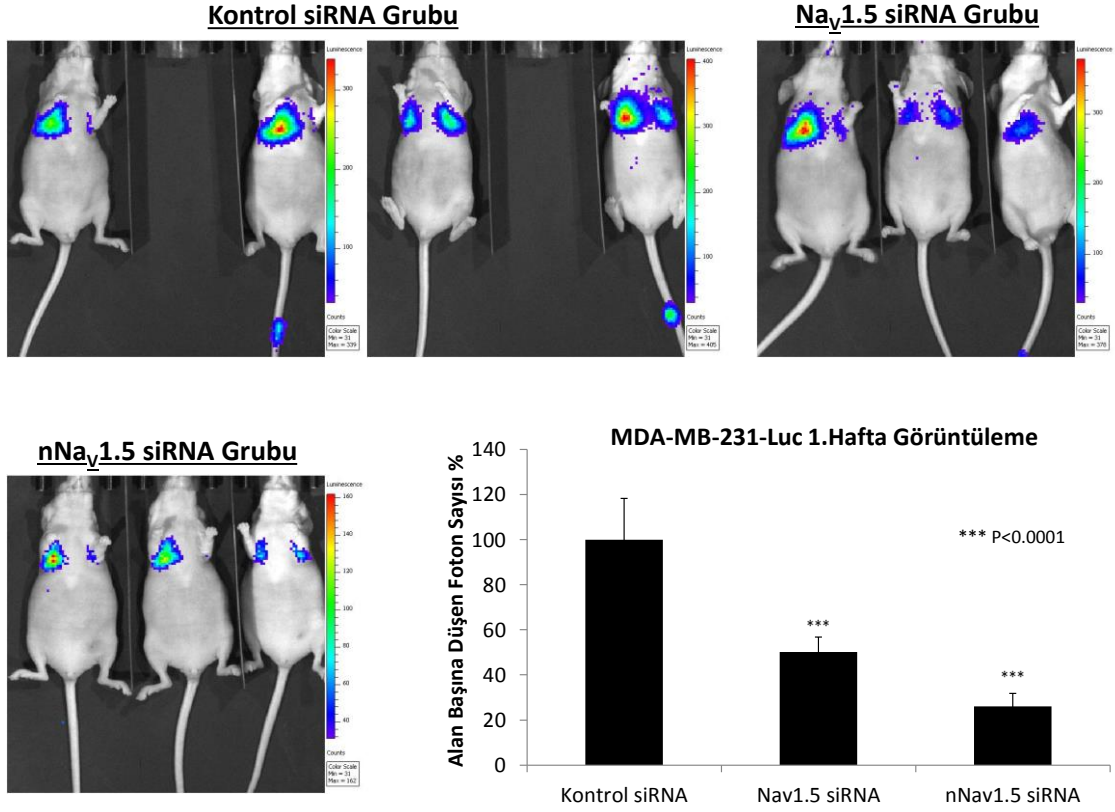


Şekil 3.1.26. Spesifik Nav1.5 siRNA'larının MDA-MB-231 hücre hattında hücre siklusu üzerine olan etkileri

3.2. *In Vivo* Deney Bulguları

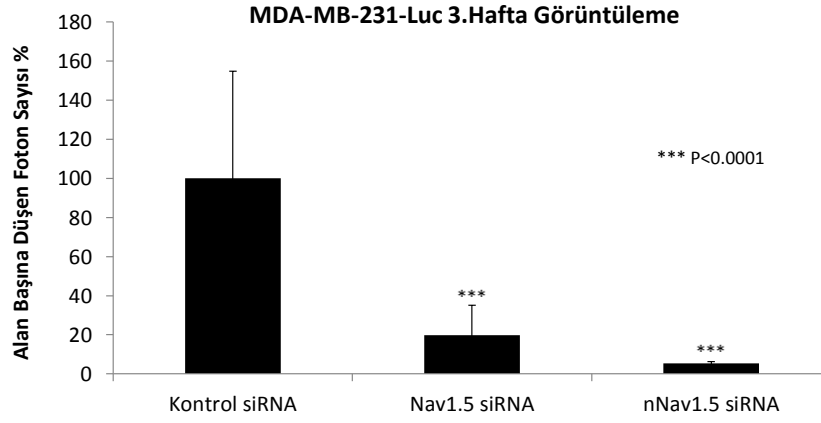
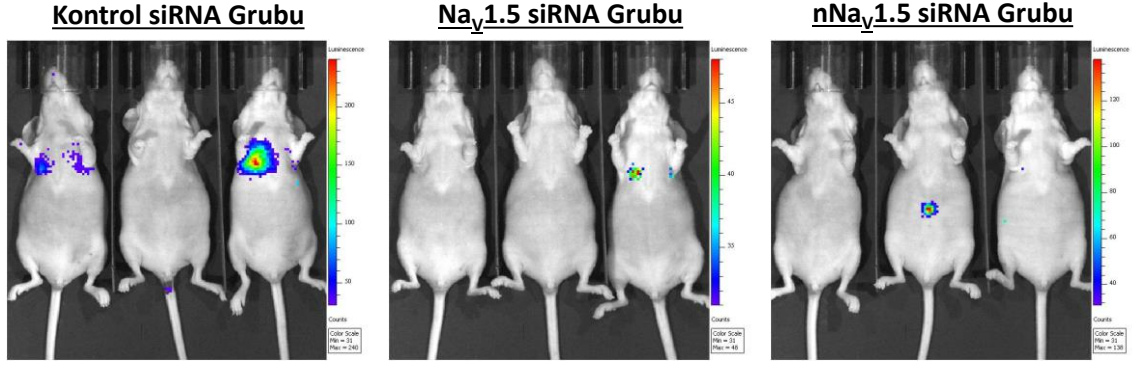
3.2.1. Ksenograft Akciğer Metastaz Modeli

MDA-MB-231-luc hücre hattı ile oluşturulan modelde kontrol siRNA alan gruba göre, Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda hücrelerin enjeksiyonundan 24 saat sonrasındaki dönemde akciğerdeki tümör büyüklüğünde ve birim alan başına düşen foton sayısında önemli düzeyde azalma görüldü ($P < 0.0001$) (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft akciğer metastaz modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının akciğer metastazı üzerine olan etkilerine ait 1.hafta görüntüleme verileri

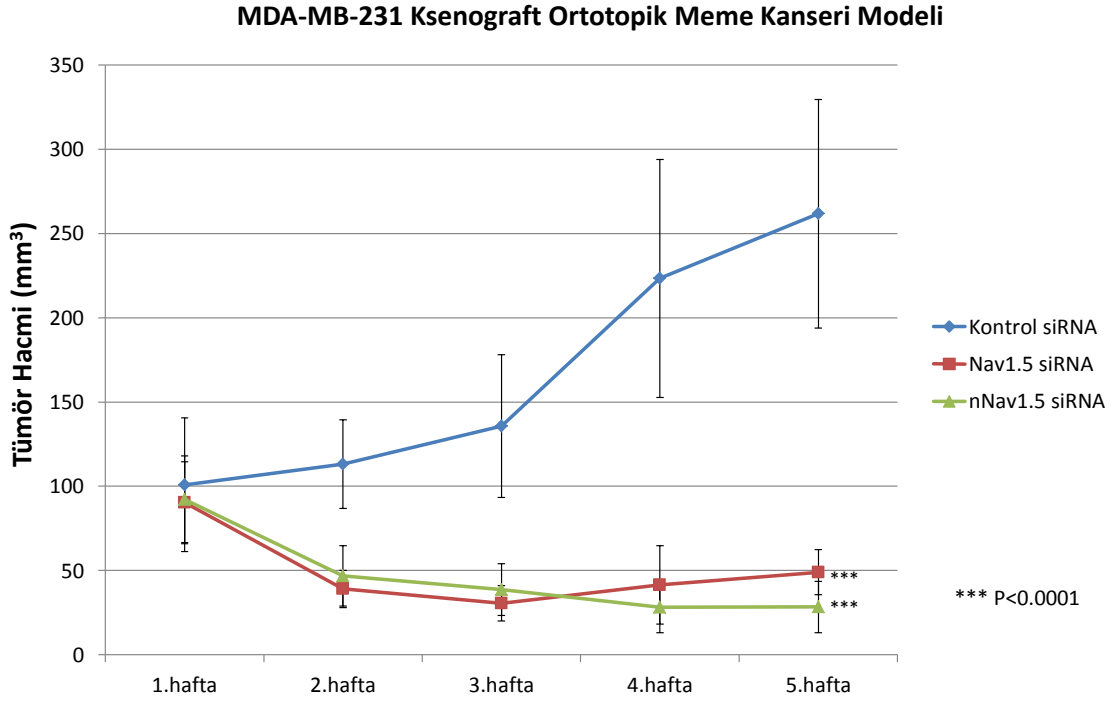
Aynı gruplarda ilerleyen haftalarda da bu azalmanın belirgin olarak ilerlediği tespit edildi. Deneyin sonunda alınan görüntülere bakıldığında yine Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda kontrol siRNA alan gruba göre akciğerlerdeki tümör büyüklüğünde ve birim alan başına düşen foton sayısında önemli düzeyde azalma tespit edildi ($P<0.0001$) (Şekil 3.2.2).



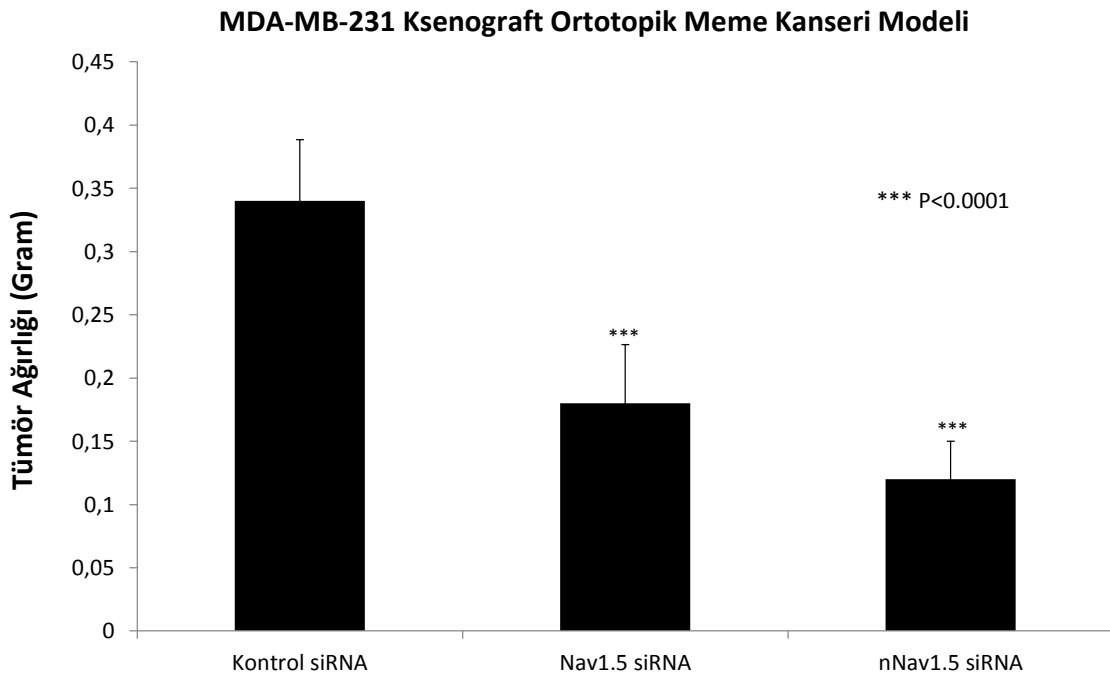
Şekil 3.2.2. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft akciğer metastaz modelinde spesifik Nav_v1.5 siRNA'larının akciğer metastazı üzerine olan etkilerine ait son hafta görüntüleme verileri

3.2.2. Ksenograft Ortotopik Meme Kanseri Modeli

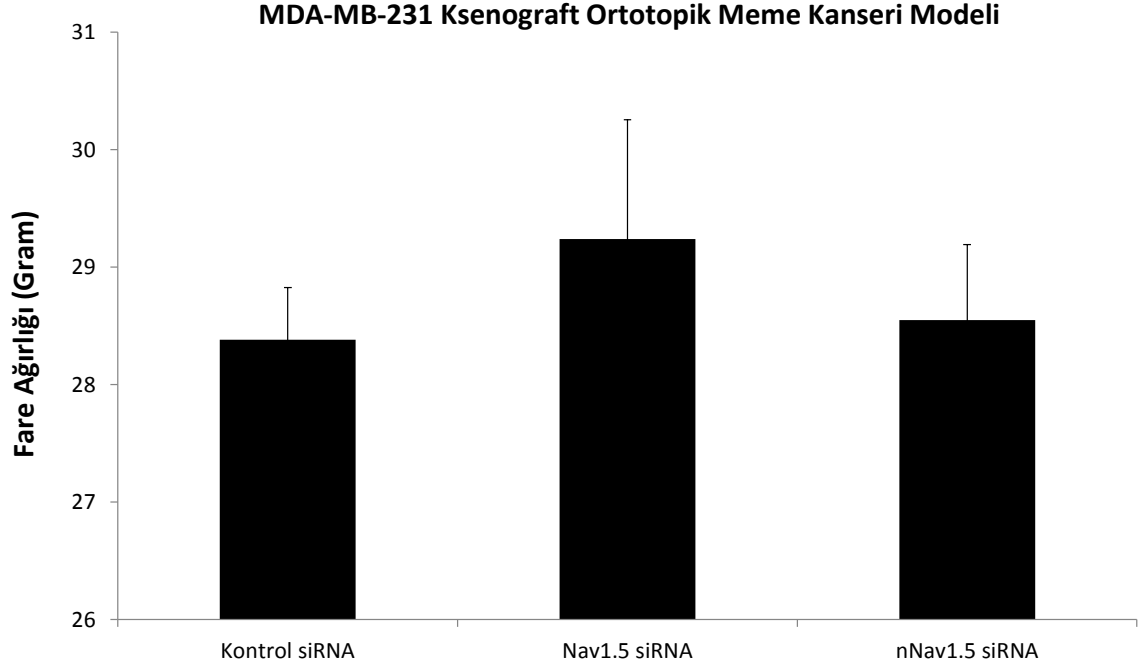
MDA-MB-231 hücre hattı ile oluşturulan modelde kontrol siRNA alan gruba göre, Adult Nav_v1.5 ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda ilk haftalardan başlayarak ilerleyen bir şekilde tümör büyüklüğünde önemli düzeyde azalmalar görüldü ve bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.0001$). Aynı gruplarda ilerleyen haftalarda da bu azalmanın belirgin olarak ilerlediği tespit edildi. Deneyin sonunda yapılan ölçümlerde Adult Nav_v1.5 ve Neonatal Nav_v1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda kontrol siRNA alan gruba göre tümör büyüklüğünde ve tümör ağırlığında önemli düzeyde azalma tespit edildi ($P<0.0001$) (Şekil 3.2.3 ve Şekil 3.2.4). Tedavi grubundaki farelerin hiç birinde su içiminde ve yem tüketiminde azalma, kilo kaybı, kanama eğilimi ve tetani vb. gibi toksisite belirtileri gözlenmedi (Şekil 3.2.5).



Şekil 3.2.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotropik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör hacmi üzerine olan etkileri

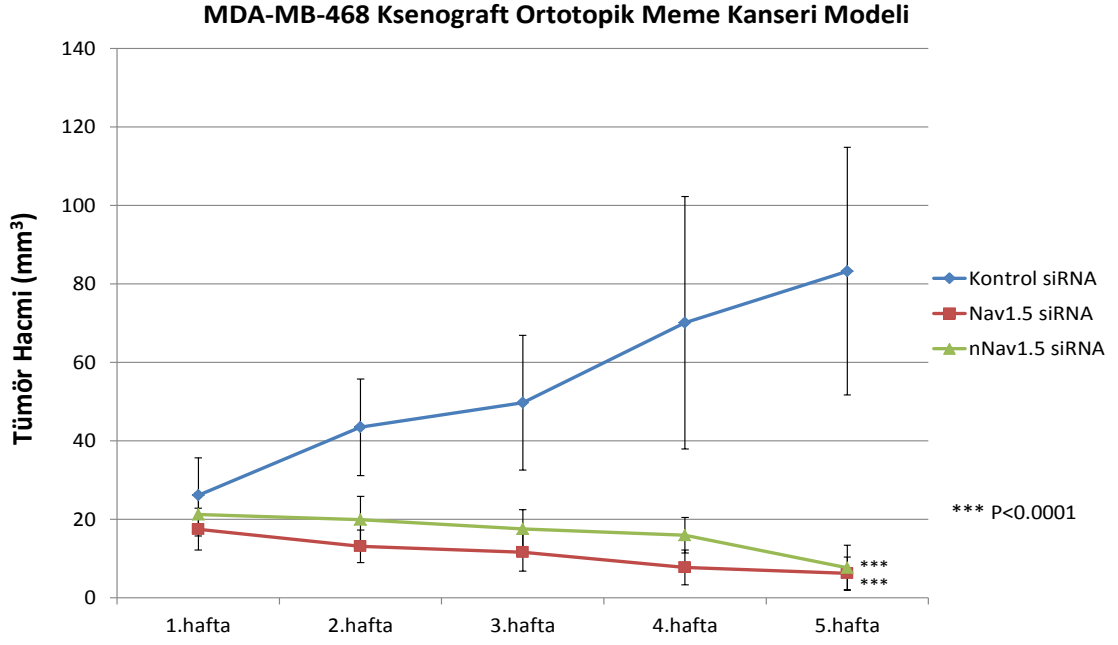


Şekil 3.2.4. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotropik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör ağırlığı üzerine olan etkileri

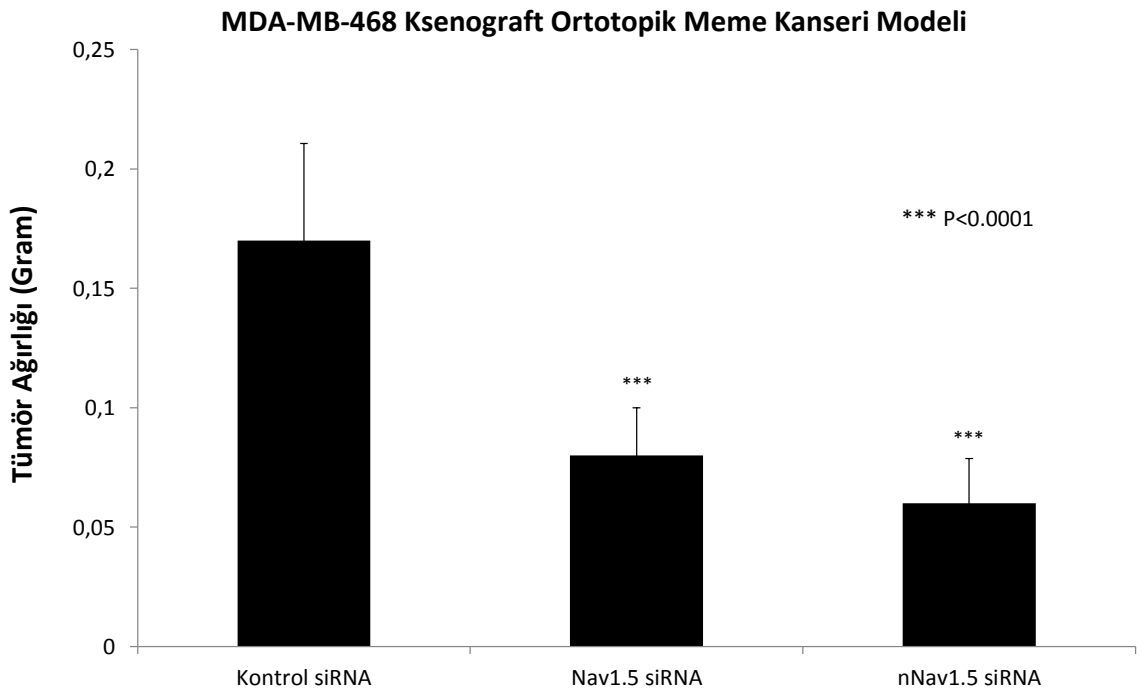


Şekil 3.2.5. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının fare ağırlığı üzerine olan etkileri

Benzer şekildeki protokolün ardından MDA-MB-468 hücre hattı ile oluşturulan modeldeki sonuçlara bakıldığında kontrol siRNA alan gruba göre, Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda hem haftalar ilerledikçe hem de deneyin sonunda yapılan ölçümlerde tümör büyüklüğünde ve tümör ağırlığında önemli düzeyde azalma tespit edildi ($P < 0.0001$) (Şekil 3.2.6 ve Şekil 3.2.7). Yine tedavi grubundaki farelerin hiç birinde su içiminde ve yem tüketiminde azalma, kilo kaybı, kanama eğilimi ve tetani vb. gibi toksisite belirtileri gözlenmedi (Şekil 3.2.8).

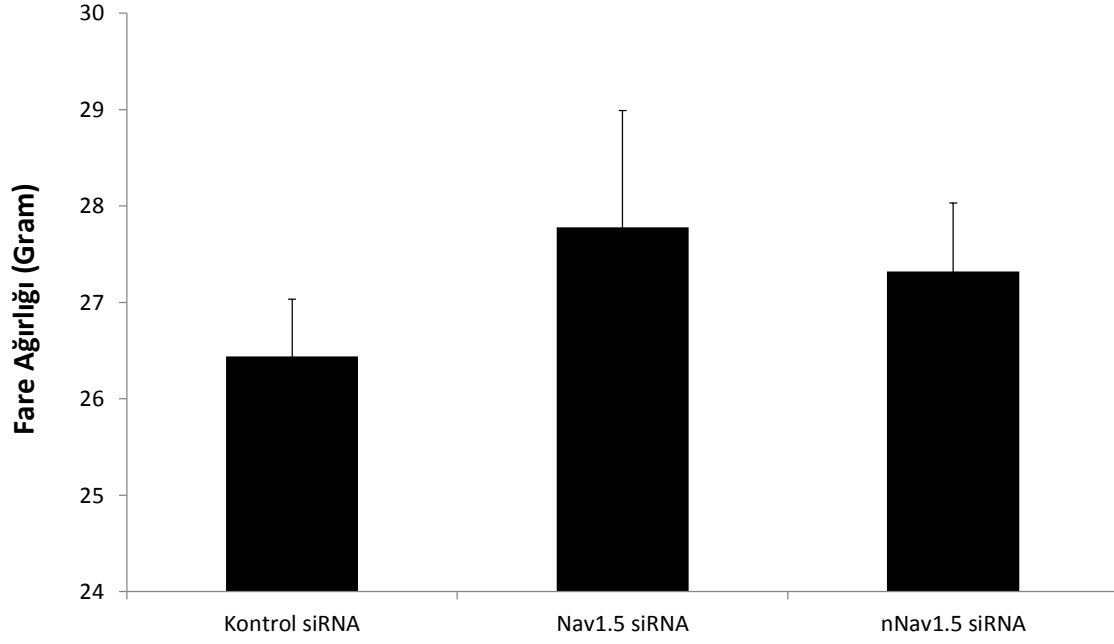


Şekil 3.2.6. MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör hacmi üzerine olan etkileri



Şekil 3.2.7. MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının tümör ağırlığı üzerine olan etkileri

MDA-MB-468 Ksenograft Ortotopik Meme Kanseri Modeli



Şekil 3.2.8. MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan Ksenograft ortotopik meme kanseri modelinde spesifik Nav1.5 siRNA'larının fare ağırlığı üzerine olan etkileri

4. TARTIŞMA

Kanser dünya genelinde ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer almaktadır. 2012 yılında tahminen 14.1 milyon yeni kanser vakası gözlenmiştir. Meme kanseri kadınlarda en sıklıkla karşılaşılan kanser türüdür. Kadınlardaki kanser türlerinin %23'ünden ve kansere bağlı ölümlerin %14'ünden sorumludur. Kanserle ilişkili ölümlerde ise akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer almaktadır. 40-59 yaş arası kadın ölümlerinin temel nedenini oluşturmaktadır. Her sekiz kadından birinde hayatı boyunca invaziv meme kanseri gelişeceği düşünülmektedir. 2010 yılı Türkiye verilerine göre kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir. Yaklaşık her dört kadın kanserinden biri meme kanseridir (Özkan ve Keskinlik 2015). Kadınlarda 2012 yılında dünyada en sıklıkla görülen beş kanser meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanseridir (Stewart ve Wild 2014). 1990-2002 arasındaki on iki yıllık süre içerisinde, dünyada meme kanserinin sıklık ve mortalite oranlarında %25'lik bir artış görülmüştür (Özmen 2008). Ayrıca dünyada sekiz kadından birinde meme kanseri tanısı konmuştur (Akinoğlu 2002, Onat 1997). Günümüzde bu oranın her dört kadından birine yükseldiği ve kadınlarda meme kanser insidansının bir önceki tahminlere göre %20, meme kanserinden ölümlerin ise %14 oranında arttığı belirlenmiştir (Ferlay ve ark 2012).

Tümör hücreleri yüksek migrasyon, motilite ve invazyon potansiyelleri nedeniyle kan ya da lenfatik damarlardan penetre olabilir, intravasküler sistem boyunca sirküle olarak başka bir alanda proliferasyon gösterebilirler. Bu süreç metastaz olarak adlandırılır. Metastatik fenotipin altında yatan hücre migrasyonu, hücrelerin ön kısmında tekrarlayan invadopod/lamellipod uzamasını, adhezyon alanlarının şekillenmesini, hücre gövdesinin kontraksiyonunu ve kuyruk adhezyon alanlarının ortaya çıkmasını kapsayan döngüsel bir süreçtir. Artmış metastazın, uyarılabilir membranların karakteristiği olan akımlar ve membran kanallarının varlığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum öncelikle yüksek derecede metastatik kanser hücre hatları yanı sıra metastatik meme, prostat ve servikal karsinoma biyopsilerinde artmış ekspresyonu tespit edilmiş olan voltaj-kapılı Na^+ kanallarıyla (VGSC) ilgilidir (Diaz ve ark 2007). Bu kanalların aktivitelerinin motiliteyi, endositozu ve invazyonu desteklediği belirlenmiştir. Özellikle $Nav1.5$ kanalının *in vitro* yüksek metastatik potansiyele ve klinik olarak meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda lenf nodu metastazı görülen hastalarda $Nav1.5$ ekspresyonu artışı ile korelasyon bulunmaktadır. Buna karşın zayıf metastatik ya da tümorojenik

olmayan hücre hatlarının fonksiyonel voltaj-kapılı Na⁺ kanalı eksprese etmedikleri görülmüştür.

2000'li yılların başında iki farklı araştırma grubu aynı dönem içinde yüksek derecede metastatik meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'de voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının ekspresyonunu göstermişlerdir (Roger ve ark 2003, Fraser ve ark 2002). Yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda MDA-MB-231'de görülen Na⁺ akımları, MCF-7 ve MDA-MB-468 gibi daha az metastatik hücre hatlarında tespit edilmemiştir (Roger ve ark 2003, Zhang ve ark 1991). Hepsi birlikte ele alındığında ve çalışmalar incelendiğinde Voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının metastazla olan ilişkisi bildirilmekte, ancak bunun altında yatan sinyalizasyon yolları ve moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenlerle gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında öncelikle Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 kanallarının yüksek derecede metastatik MDA-MB-231 ve göreceli olarak daha az düzeyde metastatik kapasiteye sahip MCF7 meme kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon düzeylerine bakıldı. Önceki çalışmaları doğrular şekilde Real-Time PCR yöntemi ile tedavi uygulanmamış hücre hatlarındaki ekspresyonlara bakıldığında Adult Nav1.5 kanalı ekspresyonu MDA-MB-231 hücre hattında MCF7 hattına göre daha yüksek düzeyde gözlemlendi. Benzer şekilde Neonatal Nav1.5 kanalı ekspresyonu da MDA-MB-231 hücre hattında MCF7 hattına göre yüksek düzeyde tespit edildi. Western blot yöntemi ile de doğrulama yapıldığında Adult Nav1.5 kanalının MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında daha yüksek düzeyde eksprese olduğu tespit edildi. Neonatal Nav1.5 kanalına ait ticari antikor bulunmadığı için RT-PCR ile inceleme yapıldı ve benzer sonuçlar elde edildi. Bu da özellikle Neonatal ancak genelde her iki tipin de metastatik meme kanseri gelişimi, progresyonu ve metastaz şekillendirmesinde önemli role sahip olduklarını ve bu nedenle her iki kanalın da hedeflenmesinin yeni bir potansiyel terapötik girişim olabileceğini ortaya koydu.

Çalışmamızda Nav1.5 kanalının Adult ve Neonatal tiplerine özgül spesifik siRNA'lar kullanıldı. Kontrol amacıyla da herhangi bir susturma etkisi göstermeyen kontrol siRNA'lar temin edildi. Brackenbury ve ark. (2007) çalışmalarında neonatal tip için bahsedilen bu 2 spesifik sekansı denemiştir. Bu iki sekans ile yapılan 3 günlük tedavinin ardından nNav1.5 mRNA düzeyi yaklaşık %80-90 oranında azalış göstermiştir. Bununla birlikte kontrol amacıyla incelenen Adult Nav1.5 mRNA düzeyinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Böylece bu iki sekansın özgüllüğü doğrulanmıştır. Çalışmamızda

kullanılan bu spesifik siRNA'ların kontrol siRNA ile karşılaştırıldığında meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarının mRNA ve protein düzeylerini bahsedilen çalışmaya benzer şekilde önemli düzeyde azalttığı belirlendi. Bu yüzden çalışmanın geri kalanında fonksiyonel etkileri ve ilgili mekanizmaları incelemek için yapılan deneylerde bu siRNA sekansları kullanıldı.

Bu kanal tipleri ve benzerlerinin kanser hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırma sayısı oldukça azdır ve farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Örneğin, Voltaj-kapılı K kanalının bloke edilmesinin meme, serviks, prostat, kolon kanseri gibi farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Pardo ve ark 2005). Yine Voltaj-kapılı Na kanalı blokörlerinin prostat kanseri hücrelerindeki proliferasyonu inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (Abdul ve Hoosein 2002, Anderson ve ark 2003). Ancak Roger ve ark. (2007) Voltaj-kapılı Na kanalı inhibisyonunun küçük-hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonuna etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde Brackenbury ve ark. (2007) da voltaj-kapılı Na kanallarının spesifik siRNA'lar ile susturulmasının ve spesifik antikor ile hedeflenmesinin meme kanseri hücre hatlarındaki proliferasyona etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ise Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA'lar ile MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki tedavinin kanser hücrelerindeki proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi. Bu inhibisyonun apoptoza bağlı hücre ölümden ya da hücre siklusundaki arreste bağlı olarak şekillenip şekillenmediği çalışmanın ilerleyen kısımlarında incelendi. Ancak tekrarlayan deneylerle ortaya konan bu inhibisyon, Nav1.5 kanalının meme kanseri hücre proliferasyonu üzerine önemli etkileri olduğunu ve altında yatan mekanizmaların incelenmesinin gerekliliğini gösterdi.

Nav1.5 kanalının siRNA ile hedeflenmesinin meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici etkisinin görülmesinin ardından bu tedavinin normal meme epiteli hücre hattı üzerinde olabilecek etkileri değerlendirildi. Kanalın susturulmasının ya da blokör ile inaktive edilmesinin kanser hücre hatları proliferasyonu üzerine etkileri ile ilgili farklı bilgiler bulunmasına rağmen, bu hedeflemenin normal meme epiteli hücreleri üzerindeki etkilerine dair herhangi bir değerlendirme yapılmadığı görülmektedir. Buna bağlı olarak çalışmamızda Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının spesifik siRNA ile susturulmasının MCF-10A normal meme epiteli hücre hattında proliferasyona etkisinin,

susturulması normal hücrelerde de önemli etkiye sahip olabilecek olan IF2 α siRNA tedavisi ile karşılaştırıldığında kontrol siRNA düzeylerinde kaldığı ve proliferasyonda herhangi bir inhibisyona neden olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla da spesifik olarak Nav1.5'in hedeflenmesinin normal meme epiteli üzerinde proliferasyonu inhibe edici ve sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı, böylece bunun hem *in vivo* hem de sonrasında klinik uygulamaya aktarılabilir önemli yeni bir tedavi girişimi olabileceği söylenebilir.

Hücre proliferasyonuna ilişkin bulguların ardından Nav1.5 kanalının meme kanseri hücrelerinin koloni şekillendirme kapasitesi üzerine de etkisi değerlendirildi. Buna ilişkin Gillet ve ark.(2009)'ın gerçekleştirdiği tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre TTX ile voltaj-kapılı Na kanalının bloke edilmesi, meme kanseri hücre hattında hücre proliferasyonu artışı ile gelişen koloni şekillendirme kapasitesinde (%50 oranında), yine koloni büyüklüğü ile koloniden kaçan hücre sayısında da azalmaya neden olmaktadır. Çalışmamızda spesifik Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücre hatlarında koloni şekillendirme kapasitesini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Bu sayede elde ettiğimiz bulgular hem literatürdeki veriyi hem de Nav1.5 kanalının koloni şekillendirme kapasitesi ve dolaylı olarak da meme kanseri hücre proliferasyonu üzerine olan etkisini doğrulayarak *in vivo* ve klinik anlamda meme kanseri gelişimi ve büyümesine yönelik önemli bir tedavi opsiyonu olabileceğini gösterdi.

Metastazın tümör hücrelerinin yüksek migrasyon, motilite ve invazyon potansiyelleri nedeniyle kan ya da lenfatik damarlardan penetre olarak, intravasküler sistem boyunca sirküle olup başka bir alanda proliferasyon gösterebildikleri bir süreç olarak adlandırıldığından bahsedilmiştir. Metastatik fenotipin altında hücre migrasyonu, invadopod/lamellipod uzaması, adhezyon alanlarının şekillenmesi, hücre gövdesinin kontraksiyonu ve kuyruk adhezyon alanlarının ortaya çıkmasının yattığı bilinmektedir. Ekspresyonları kanserde değişim gösteren bazı plazma membranı iyon kanalları tümör metastazının şekillenmesi ve hastalığın ilerlemesi için çok önemli olan hücre migrasyonu, motilitesi ve invazyonu süreçlerine karışmaktadır (Prevorskaya ve ark 2010). VGSC aktivitesinin metastaz için önemli olabilecek birçok hücre davranışına dahil olduğu ve rol oynadığı gösterilmiştir. Voltaj kapılı Na kanallarının rol oynadığı gösterilen bazı hücre davranış ve süreçler; migrasyon (Fraser ve ark 2003, Fulgenzi ve ark 2006, Chioni ve ark 2010), invazyon (Fraser ve ark 2005, Roger ve ark 2003, House ve ark 2010, Hernandez-Plata ve ark 2012, Roger ve ark 2007, Chioni ve ark 2010, Smith ve ark 1998),

galvanotaksis (Fraser ve ark 2005, Djamgoz ve ark 2001), adezyon (Palmer ve ark 2008) ve invadopod şekillenmesi (Brisson ve ark 2013) gibi özellikleri kapsamaktadır. Grimes ve ark. (1995)'in yaptığı çalışmada voltaj-kapılı Na kanalının TTX ile blokajının prostat kanseri hücrelerinde invazyon yeteneğini azalttığı belirtilmiştir.

Benzer şekilde Brackenbury ve ark.(2007)'in gerçekleştirdiği çalışmada ise nNav1.5 kanalının spesifik siRNA ve antikor ile tedavi edilmesinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında migrasyon kapasitesini azalttığı ve yine sadece spesifik antikorun uygulanmasının invazyon kapasitesini düşürdüğü gösterilmiştir. Çalışmamızda ise Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA'ların uygulanmasının meme kanseri hücre hatlarının invazyon kapasitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Yine aynı hücre hatlarında da Nav1.5 kanalının spesifik siRNA'lar ile hedeflenmesinin meme kanseri hücrelerinin migrasyon yeteneğinde de ciddi anlamda düşüş şekillendirdiği ortaya konuldu.

Metastaz kapasitesi ile ilişkili başka bir değerlendirme kriteri olabilen yara iyileşmesi düzeyi çalışmalarda az da olsa Nav1.5 ile ilişkilendirilmiştir. Pappalardo ve ark.(2014)'in yaptığı çalışmada Nav1.5 kanalının TTX ve siRNA ile inhibisyonunun astrositlerde yara kapanma düzeyini ciddi anlamda azalttığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada (Xing ve ark 2014) ise, nNav1.5 kanalının spesifik siRNA ile downregülasyonunun astrositoma hücrelerinde yara iyileşmesi düzeyini azalttığına dair sonuçlar ortaya konulmuştur. Çalışmamızda da Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarının spesifik siRNA ile downregülasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında yara iyileşmesi düzeylerini önemli düzeyde düşürdüğü tespit edildi. Tüm bu bulgulara bakıldığında elde ettiğimiz veriler az sayıda çalışmayı doğrulayarak Nav1.5 kanalının metastatik süreçlerde kritik hücrel davranışlar olan invazyon, migrasyon ve yara iyileşmesi süreçlerinde önemli bir role sahip olduğu ve hedeflenmesinin meme kanseri metastazını önlemede yeni ve etkili bir tedavi girişimi olabileceği hipotezimizi güçlü bir şekilde destekledi.

Kanser tedavisindeki ana sorunlardan ve zorluklardan birisi de kemoterapiye karşı şekillenen çoklu ilaç direncidir (Multi-drug resistance-MDR). Bu yüzden mevcut ilaçların etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Kanser hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesinde farklı mekanizmalar sunulmasına rağmen, iyon kanallarının ekspresyonlarındaki değişimler bunların arasında yer almaktadır. Bazı araştırmalarda pro-apoptotik ve anti-apoptotik iyon kanallarından bahsedilmektedir ve bunların ilaç dirençliliğine olan

etkilerine değinilmektedir (Hoffmann ve Lambert 2014). Yine başka bir derlemede voltaj-kapılı K kanallarının, NHE1 (Na/H değiştiricisi) ve bazı Na pompalarının kemoterapötik ilaç dirençliliğinde rol oynadıklarını gösteren araştırmalara yer verilmiştir (Arcangeli ve Becchetti 2010). Meme kanserinde kullanılan kemoterapötiklerden Tamoksifen ile Na kanal aktivitesi arasındaki ilişkiye dayalı bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Wang ve Jiao 2009, Smithermann ve Sontheimer 2001, He ve ark 2003). Çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının spesifik siRNA'lar ile susturulmasının standart kemoterapötiklerden biri olan paklitakselin etkinliğine olabilecek etkileri de değerlendirildi. siRNA ve paklitakselin kendi başlarına olan uygulamaları ile karşılaştırıldığında kombinasyon tedavilerin hücre proliferasyonunu daha önemli düzeyde inhibe ettiği tespit edildi. Böylece çalışmamızda Nav1.5 kanalının siRNA ile downregülasyonunun kemoterapötik etkinliği ve dirençliliği üzerinde potansiyel bir role sahip olduğu ortaya konuldu. Ancak etkili olan mekanizmaların gelecekteki çalışmalar ile açıklık kazanması beklenmektedir.

Hücre proliferasyonu üzerindeki inhibisyonun gözlenmesinin ardından bunun apoptoz ya da hücre siklusundaki arrestten mi kaynaklandığı sorusunu incelemek için flow sitometri analizine başvuruldu. İyon kanallarının apoptoz üzerindeki etkilerine dair birçok bilgi bulunmaktadır (Lehen'kyi ve ark 2011). Apoptoz ile ilgili en çok çalışmanın yapıldığı kanallar K, Ca, Cl, TRP gibi kanallardır. Özellikle K kanalı aracılı K iyon hareketinin hücre volümünün ayarlanması ve apoptoz ile ilişkisini gösteren birçok çalışma kaynaklarda yer almaktadır. Voltaj-kapılı Na kanallarına bakıldığında ise apoptoz ile ilişkisine dair çok az sayıda çalışma vardır. Özellikle VGSC'lerin apoptozdaki rolüne ilişkin ulaşılabilen tek çalışma Jurkat hücre hattında gerçekleştirilmiştir (Roselli ve ark 2006). Çalışmamızda Nav1.5 kanalının apoptoz ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarının spesifik siRNA'lar ile downregülasyonunun önemli düzeyde apoptoz şekillendirdiği tespit edildi. Bu etkinin Adult Nav1.5'in susturulmasında daha belirgin olarak ortaya çıktığı gözlemlendi. Western blot yöntemi ile de apoptozla ilişkin destekleyici bulgular elde edildi. Böylece hücre proliferasyonundaki azalmaya, şekillenen apoptozun belli oranda etkisi olduğunu söylemek mümkün olabilecektir.

Apoptozun dışında hücre proliferasyonundaki inhibisyona katılabilecek bir diğer durum ise hücre siklusundaki arresttir. İyon kanallarının hücre proliferasyonu üzerindeki

etkilerinin bu kanalların aktivitelerinin hücre siklusundaki kontrol noktalarını düzenlemesi üzerinden olduğuna işaret eden birçok çalışma bulunmaktadır (Becchetti 2011). Ca kanallarının ve intraselüler Ca düzeyinin neoplastik proliferasyonda bu kontrol noktalarını düzenlediğine ilişkin çalışmalar yapılmıştır (Panner ve Wurster 2006, Monteith ve ark 2007). Yine voltaj kapılı K kanallarının ve akuaporin-1'in hücre siklusunun düzenlenmesinde rola sahip olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Vacca ve ark 2001, Saadoun ve ark 2002, Moon ve ark 2003). Lee ve ark.(2015), KV9.3 kanalının siRNA ile susturulmasının kolon ve akciğer kanseri hücrelerinde hücre siklusu arrestine neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarda iyon kanallarının hücre siklusunu düzenlemede özellikle hücre içi Ca düzeyleri, membran voltajı ve yüzey potansiyellerini değiştirmeleri yanısıra kendi aktiviteleri sonucu alt ünitelerinin enzimatik fonksiyonu sayesinde hücre içindeki bazı proteinler ile etkileşime geçerek onları aktiflemeleri ve hücre içi sinyalizasyonları tetiklemelerinin de payı olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Becchetti 2011).

Bununla birlikte Voltaj-kapılı Na kanallarının kanser hücrelerinde hücre siklusu üzerindeki etkilerine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Nav1.5 kanalının siRNA ile downregülasyonunun hücre siklusu üzerine etkileri de incelendi. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının spesifik siRNA ile susturulmasının hücrelerde önemli düzeyde G1 arrestine neden olduğu gözlemlendi. Nav1.5 siRNA tedavileri sonrası Western blot ile yapılan analizlerde de hücre siklusunda role sahip siklin bağımlı kinazları düzenleyen bazı siklin proteinlerinin ekspresyonlarında azalma tespit edildi. Böylece çalışmamızda meme kanseri hücre hatlarında Nav1.5 downregülasyonu sonucu oluşan hücre proliferasyonundaki inhibisyonda bu hücrelerde meydana gelen hücre siklusu arrestinin de önemli rol oynadığı ortaya konuldu.

Voltaj-kapılı Na kanallarının kanser hücrelerinde etkileşime girdikleri hücresel olaylara ait mekanizmaların tam olarak açıklandığı çalışmaların sayısı azdır. Bu hücresel davranışlar arasında en çok incelenerek açıklanmaya çalışılan Na kanallarının kanser metastazı üzerine olan etkileridir. Bugüne dek yapılan birkaç çalışmada değişik mekanizmalardan bahsedilmektedir (Onkal ve Djamgoz 2009). Bunlardan biri pH düzenlenmesi yolu üzerindedir. VGSC'ler üzerinden hücre içine doğru şekillenen Na⁺ akımının hücre içinde alkalinizasyon, hücre dışında plazma membranına yakın bölgede

asidifikasyona neden olduğunu, ayrıca Na/H değiştiricisi olan NHE1'in de voltaj-kapılı Na kanalları ile ko-eksprese olarak ie doğru Na⁺ akımının artışı ile dışa doğru H akışını artırdığı böylece ekstraselüler matrikste degradasyona ve invazyona katkı sağladığı şeklinde bilgiler ileri sürülmüştür (Gillet ve ark 2009, Brisson ve ark 2011). Bir diğer etkinin ise bu kanalın kanser hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenlemesi üzerinden meydana geldiği ileri sürülmektedir. VGSC'lerin nöronlar ve kardiyomiyositler gibi uyarılabilir hücreler ile kanser hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenleyebildiklerine ilişkin bazı çalışmalar bulunmaktadır (Chioni ve ark 2009, Brackenbury ve Djamgoz 2006, Mycielska ve ark 2005, Lopez-Santiago ve ark 2007, Tolon ve ark 1996). Kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada VGSC'lerin invazyon ile ilişkili bir gen şebekesini regüle ettiği ve invazyondan sorumlu sinyalizasyon yolaklarının erken dönem düzenlenmesinde fonksiyon görebildiği ifade edilmektedir (House ve ark 2010). Son olarak da VGSC'lerin bu hücrel etkilerini intraselüler Ca düzeyini düzenlemesi üzerinden gerçekleştirdiğinden bahsedilmektedir. Bu kanallar üzerinden gerçekleşen Na⁺ akımının voltaj-kapılı Ca kanalları üzerinden hücre içindeki Ca miktarını artırdığı ve bu Ca artışının hücrede invadopod oluşumu ile invazyon gelişiminde etkili olabildiğine yönelik çalışmalar da mevcuttur (Dravid ve ark 2004, Fekete ve ark 2009, Carrithers ve ark 2009). VGSC'lerin öncelikle invazyon-metastaz üzerine olan etkilerine dair hücre içi sinyalizasyon mekanizmalarının tam olarak açıklanamaması ve daha yüzeysel düzeyde farklı görüşlerin bildirilmiş olması sebebiyle çalışmamızda, tespit edilen tüm bu hücrel etkilere ilişkin hücre içindeki protein yolaklarının spesifik siRNA tedavileri sonrası değişimleri incelendi.

Nav1.5 kanalının meme kanseri metastazı ve invazyonuna olan etkilerine ilişkin potansiyel mekanizmaları değerlendirmede ilk olarak non-reseptör tirozin kinaz c-Src proteininin olası katılımı değerlendirildi. Non-reseptör protein tirozin kinazlardan olan Src ailesinin meme kanseri hücrelerinde proliferasyonun yanısıra adhezyon, migrasyon ve invazyonda kritik rol oynadığı bilinmektedir (Finn 2008), ve c-Src tedaviye yönelik moleküler bir hedef olarak dikkate değer düzeyde ilgi çekmektedir (Summy ve Gallick 2006). c-Src, EGFR ailesini de kapsayacak şekilde reseptör tirozin kinazların aşağı yönlü (downstream) birçok etkisinin önemli bir mediyatördür ve esas olarak MDA-MB-231 hücrelerinde aktiftir ve aşırı eksprese olmaktadır (Biscardi ve ark 1998). c-Src aktivasyonu Tyr-416 fosforilasyonu ve negatif düzenleyici bölgedeki Tyr-527 defosforilasyonu ile ilişkilidir (Roskoski 2004). Fokal adhezyon kinaz (FAK) da hücre adhezyonu ve

migrasyonunu düzenlemekte ve Tyr-397 alanında oto-fosforile olmaktadır. Ayrıca bu proteinin integrinler ile olan etkileşimleri kinaz aktivitesinde artışla sonuçlanmaktadır (Schaller ve ark 1994). Fokal adhezyon kinaz, Src ile birlikte integrin-bağımlı sinyalizasyon yolağının en temel bileşenlerini oluşturmaktadırlar (Playford ve Schaller 2004, Thomas ve Brugge 1997). İntegrinler de hücre invazyonunun önemli mediyatörlerindendir (Blasi ve Sidenius 2010, Mitra ve Schlaepfer 2006). Adhezyon fonksiyonu sunmaları yanısıra integrinler ekstraselüler matriks proteinlerine bağlamalarının ardından tirozin kinazların (örn: Src) aktivasyonları ve aşağı yönlü substratların tirozin fosforilasyonları gibi etkileri kapsayan intraselüler sinyallerin transdüksiyonunu ortaya koymaktadırlar (Hood ve Cheresch 2002, Giancotti ve Tarone 2003). Ayrıca yine integrin kümelenmesi tümör hücrelerinde proliferasyonu, sağkalımı ve migrasyonu tetikleyen intraselüler sinyalizasyon yollarını tetikleyebilmektedir (Gabarra-Niecko ve ark 2003). İntegrin $\beta 1$ 'in Src aktivasyonunu FAK/Src kinaz kompleksinin bir araya gelmesi ve aktivasyonu üzerinden indüklediği bilinmektedir (Mitra ve Schlaepfer 2006). İntegrin $\alpha 5/\beta 1$ tümör metastazı ve anjiyogenez kapsayan birçok biyolojik fonksiyon ile ilişkilidir ve fibronektin ligandı ile etkileşerek hücre adhezyonu, migrasyonu, matriks ve hücre iskeleti organizasyonunu düzenleyen sinyal transdüksiyonunu gerçekleştirmektedir (Kabir-Salmani ve ark 2004, Kim ve ark 2000, Miyamoto ve ark 1995). Bu kompleksin dışında p130Cas proteinin tirozin fosforilasyonunun motilite, proliferasyon ve sağkalım gibi hücre davranışlarının integrin kontrolünde anahtar bir sinyalizasyon basamağı olduğu, FAK/Src kompleksi ile olan ilişkisi gösterilmiştir (Ruest ve ark 2001). FAK ile etkileşime giren bir diğer protein olan Paxillin, integrin sinyalizasyonunun anahtar bileşenlerinden birisidir ve tirozin fosforilasyonu integrin-aracılı hücre iskeleti organizasyonu için gereklidir (Turner 2000). Src/FAK/Fosfoinozotid 3-kinaz (PI3K)/AKT yolağı çeşitli büyüme faktörleri, integrinler gibi faktörler tarafından tetiklenerek hücre büyümesi, hücre siklusuna girişi, hücre migrasyonu ve sağkalımını koordine eden önemli bir yolaktır (Cantley 2002). Bu yolağın aktivasyonu ile prostatik metastaz, kolon kanser hücre invazyonu ve postoperatif tümör büyümesinin korele olduğu, yumurtalık ve kolon kanserini içeren çeşitli insan kanserlerinde de bu yolağın aşırı ekspresyonu gözlenmektedir (Cooper ve ark 2002, Kermorgant ve ark 2001, Coffey ve ark 2005, Shayesteh ve ark 1999, Phillips ve ark 1998). PI3K'nin integrin aktivasyonu, aktin organizasyonunun düzenlenmesi ve hücre adhezyonu için anahtar bir sinyalizasyon molekülü olduğu ifade edilmektedir (Vanhaesebroeck ve ark 2001). Ayrıca EF2K'nin de

invazyon/metastaz ilişkili bu yollar üzerine düzenleyici etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Tekedereli ve ark 2012, Ashour ve ark 2014).

Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak Nav1.5 kanalının spesifik olarak susturulmasının meme kanseri hücre hatlarında metastaz, invazyon ve migrasyon kapasitesini hangi mekanizmalar üzerinden etkileyebileceği incelendi. Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının spesifik siRNA'lar ile MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında downregülasyonunun Src proteinin fosforilasyonunu ciddi anlamda azalttığı, buna karşılık total Src düzeyinde herhangi bir değişime neden olmadığı gözlemlendi. Src ile kompleks oluşturan FAK proteininin fosforile formunda da önemli bir azalma gözlenirken, total FAK düzeyinde ise herhangi bir değişim tespit edilmedi. Yine bu kompleks ile ilişkili Integrin $\beta 1$ ile Integrin $\alpha 5$ düzeylerinde de kontrole göre önemli düzeyde downregülasyon izlendi. Integrin/Src/FAK kompleksi ve invazyon/metastaz üzerine etkilere sahip pCas130, P-Paxillin, P-PI3K ile bu kompleksler üzerine önemli etkilere sahip olduğu bilinen EF2K düzeylerinde de Nav1.5 kanalının susturulmasının ardından yüksek düzeyde düşüş gözlemlendi. Bu bulgulara bakıldığında Nav1.5 kanalının *in vitro* ve *in vivo* olarak meme kanseri metastazı üzerine görülen etkilerini bu yollar üzerinden gerçekleştirdiğini ve spesifik siRNA ile hedeflenmesinin terapötik anlamda önemli bir potansiyele sahip olduğunu söylemek mümkün olacaktır. Elde edilen bulgular kanalın etki mekanizmaları konusunda literatüre katkı sağlayacak ve daha detaylı analizler ile net bir regülasyon mekanizmasını ortaya koyabilmek mümkün olabilecektir.

Çalışmamızda, Nav1.5 kanalının hedeflenmesinin ardından meme kanseri hücre proliferasyonunda görülen azalmaya hem hücre siklusu arrestinin hem de belli oranda apoptozun katkısı olduğu gösterildi. Bunun altında yatabilecek mekanizmaları irdelemek adına öncelikle hücre siklusu regülasyonu ile ilişkili proteinlerin ekspresyonları değerlendirildi. Cyclin D1 kanser hücrelerinin hücre siklusunun G1 fazından S fazına girmelerini tetikleyerek, proliferasyonu indüklemekte ve malign transformasyona neden olabilmektedir (Tekedereli ve ark 2012). Cyclin D1 ekspresyonu ve stabilitesi büyüme faktörü reseptörleri (Graham ve Asthagiri 2004, Yano ve ark 2003) ve fokal adhezyon ilişkili sinyalizasyon yolları tarafından kontrol edilmektedir (Parsons 2003, Cary ve Guan 1999). Cyclin D1'in ekspresyonu MAPK-ERK kaskadı ya da AKT/NF-KB yolu üzerinden aktive olabilmektedir (Shie ve ark 2000, Albanese ve ark 1995, Guttridge ve ark 1999). CDK-inhibitörü p27, G1-S geçişinin anahtar düzenleyicisidir ve kanser hücrelerinde

metabolik yeniden programlama ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediği de bilinen c-Myc tarafından inhibe edilmektedir (Alkarain ve ark 2004, Liao ve ark 2007, Dang ve ark 2008). Cyclin E1'in aşırı ekspresyonu tumorigenez ile korelasyon göstermektedir ve meme, kolon, sidik kesesi, deri ve akciğer kanserini içeren çeşitli tip kanserler ile ilişkilidir (Donnellan ve Chetty 1999). Cyclin E1 meme kanserinde prognostik bir belirteçtir ve tümörün derecesi ile safhası arttıkça ekspresyonu da artış göstermektedir (Keyomarsi ve ark 1994). Cyclin B1'in hücre siklusu düzenlenmesi üzerine etkileri yanısıra Cyclin B1 ekspresyonunun meme kanseri dokularında önemli derecede arttığı ve meme kanseri lenf nodu metastazında artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Winters ve ark 2001, Kawamoto ve ark 1997). c-Myc'nin de MDA-MB-231 hücrelerinde eksprese olduğu ve Cyclin D1'i düzenlediği bilinmektedir (Daksis ve ark 1994). Çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının spesifik siRNA'lar ile susturulmasının Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin B1 ve c-Myc protein ekspresyonu düzeylerinde kontrol siRNA'ya göre önemli düzeyde azalmaya neden olduğu görüldü ve bu bulgular flow sitometride tespit edilen G1 arestini doğruladı. Bu tedavi gruplarında p27 ekspresyon düzeylerinde ise önemli bir artış gözlenmedi. Benzer bulgular MDA-MB-468 hücre hattında da elde edildi. EF2K'nın da bu protein düzeylerinde benzer etkilere sahip olduğu gösterildiğinden kanalın hedeflenmesinin bu etkileri EF2K downregülasyonu üzerinden meydana getirebileceği düşünülmüştür (Tekedereli ve ark 2012). Çalışmamız Nav1.5 kanalının hedeflenmesinin meme kanseri hücre proliferasyonunu hücre siklusu arresti üzerinden azaltabildiğini altında yatan mekanizmalar ile destekleyerek ortaya koymaktadır.

Apoptoz çeşitli genler tarafından düzenlenen ve bunların çoğunun insan tümörlerinde mutant ya da disfonksiyonel olarak regüle olduğu fizyolojik programlı bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Apoptoz uyarısı alan hücre membranı büzüşür, çıkıntılar gösterir, kromatini yoğunlaşır piknotik bir görünüm alır. DNA'sı nükleozomlarından kesilir ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır (Brown ve Attardi 2005). Apoptoz kanser hücre ölümü açısından özellikle arzu edilen tiptedir çünkü inflamasyona neden olmamakta ve tümörün çevre dokulara zarar vermeden kendi içinde yok olmasına sebep olabilmektedir (Maioli ve ark 2012). Kaspazlar hücrede normalde inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Hücre

iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar (Adams ve Cory 2001, Adrain ve Martin 2001, Spierings ve ark 2004).

Apoptoz intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik olmak üzere iki yolla gerçekleşir (Maioli ve ark 2012). Hücre içi sinyaller aracılığı ile apoptotik uyarı alındıktan sonra proapoptotik proteinlerden Bid; antiapoptotik protein Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ile Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında zar potansiyelini değiştirerek por oluşumunu indükler (Spierings ve ark 2004). Sitokrom-c mitokondriyal porlardan salınarak Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılımıyla sitozolde Apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur (Adams ve Cory 2001, Adrain ve Martin 2001, Strasser ve ark 2000). Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Ekstrinsik yolda ise hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, DR5 gibi) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL gibi) bağlanmasıyla aktiflenen reseptörler bazı kompleksler üzerinden inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kollarını keserek aktif kaspaz-8'i meydana getirirler. Aktif kaspaz-8 direkt ve dolaylı olacak şekilde 2 ayrı yolla kaspaz-3'ü aktive eder. İlkinde direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive etmekte, diğerinde ise Bid'i kesip dolaylı olarak intrinsik mekanizma üzerinden kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Her 2 şekilde de aktive olan kaspaz-3 CAD (Kaspaz ile aktive DNAz) aktivasyonu yoluyla DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (Adams ve Cory 2001, Spierings ve ark 2004, Curtin ve Cotter 2003).

Çalışmamızda, flow sitometriden elde ettiğimiz bulguları doğrulamak için Nav1.5 kanalının hedeflenmesinin apoptotik kaskadlar üzerine olan etkileri Western blot analizi ile incelendi. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA uygulanan gruplarda kontrol siRNA grubuna göre öncelikle kaspaz-9'da aktivasyon artışı (kaspaz-9 klevajında artış), bunu izleyen efektör kaspaz-3'de benzer artış ve son olarak PARP klevajında indüksiyon tespit edildi. Özellikle bu etkiler Adult Nav1.5 kanalına spesifik siRNA tedavi grubunda daha belirgin olarak görüldü.

TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL), TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5) reseptörlerine bağlanarak birçok tümör hücresinde apoptozu indükleyen TNF reseptör ailesinin bir üyesidir (Kim ve Gupta 2000). TRAIL-indüklemeli apoptoz yolağı ligand reseptör bağlanması, bununla birlikte ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'in stimülasyonu, ekstrinsik yolağın başlatıcısı kaspaz-8'in aktivasyonu ve bunu takip eden

şekilde apoptozom formasyonu ile efektör kaspaz-3'ün aktivasyonu gibi birçok basamağı içermektedir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA uygulanan gruplarda kontrol siRNA grubuna göre DR4, DR5 ekspresyonu ve kaspaz-8 klevajında herhangi önemli bir değişim gözlenmedi. Benzer bulguların bazıları MDA-MB-468 hücre hattında da elde edildi. Böylece Nav1.5 kanalının özellikle Adult tipinin hedeflenmesinin meme kanseri hücre hatlarında proliferasyonu azaltıcı etkisine hücre siklusu arresti kadar meydana getirdiği apoptozunda katkısı olduğu ortaya konuldu ve bunun da intrinsik yolak üzerinden gerçekleştiğine dair bulgular elde edildi.

PI3K/Akt yolağı kanser hücrelerinde hücre sağkalımı, hücre siklusu progresyonu ve hücre büyümesi gibi düzenlemelere katılan çeşitli substratların fonksiyonlarını modüle etmektedir (Testa ve Bellacosa 2001, Blume-Jensen ve Hunter 2001). PI3K ve Akt gen amplifikasyonları meme, yumurtalık, pankreas ve serviks gibi kanser türlerinde tespit edilmiştir (Shayesteh ve ark 1999, Ma ve ark 2000, Bellacosa ve ark 1995, Cheng ve ark 1996). Çeşitli reseptörler tarafından indüklenen sağkalım sinyallerine PI3K/Akt yolağı aracılık etmektedir, dolayısıyla bu yolağın son yapılan çalışmalar ile kemoterapötik ilaç ve radyasyon tedavisine dirençliliğinin gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Başka bir çalışmada PI3K/Akt yolağının aktivasyonunun insan meme kanseri hücrelerinde çoklu-ilaç dirençliliğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle Akt'nin meme kanseri hastalarının tedavi sonuçlarını iyileştirebilecek yeni bir moleküler hedef olabileceği ileri sürülmektedir (Knuefermann ve ark 2003).

Çalışmamızda da MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavi gruplarında kontrol siRNA'ya göre P-PI3K ve P-Akt ekspresyon düzeylerinde önemli düzeyde azalma tespit edildi. Meme kanseri hücrelerinde EF2k siRNA ile hedeflendiğinde Src downregülasyonu üzerinden Akt ekspresyonunda azalma gerçekleştiği gösterilmiştir (Tekedereli ve ark 2012). Çalışmamızda yine benzer şekilde Nav1.5 downregülasyonu sonucunda EF2k ekspresyonunda da azalmanın tespit edilmesi MDA-MB-231 hücrelerinde böyle bir yolağın normalde aktive olduğunu ve ilerleyen çalışmalarda Nav1.5-EF2k ilişkisinin incelenmesi gerektiğini gösterdi.

Hücre tipine bağlı olarak PKC δ , bir tümör supresör ve proapoptotik faktör olarak fonksiyon görebilmekte ve hücre proliferasyonu ile hücre sağkalım fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir (Jackson ve Foster 2004). PKC δ akciğer kanseri hücrelerinde hücre

sağkalımını ve kemoterapötik ilaç karşıtı direnci artırmaktadır (Clark ve ark 2003). PKC δ anti-sens oligonükleotidi MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sağkalımı azaltmaktadır (McCracken ve ark 2003). Ayrıca PKC δ 'da artış meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyeli ile de ilişkilendirilmiştir (Kiley ve ark 1999). Elde edilen bulgularda da her iki tip Nav1.5 kanalının spesifik siRNA ile downregülasyonunda PKC δ ekspresyonunda azalma görüldü.

NF- κ B DNA transkripsiyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir. NF- κ B sinyalizasyonu CD44 upregülasyonu ve EMT aktivasyonuna neden olarak kanser hücre invazyon kapasitesinin artışına ve peritoneal yayılımına katkıda bulunmaktadır (Yakubov ve ark 2013). NF- κ B'nin yine meme kanseri hücrelerinde Integrin β 1'in promotor bölgesine bağlanarak ekspresyonunu önemli düzeyde artırdığı ve böylece motiliteye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Ahmed ve ark 2013). NF- κ B'nin blokajı tümör hücrelerinin proliferasyonu durdurmasına, apoptoz şekillenmesine ya da bu hücrelerin anti-tümör ajanlara daha duyarlı hale gelmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle NF- κ B ilaç firmaları tarafından kanser tedavisine yönelik bir hedef olarak yoğun şekilde araştırılmaktadır (Escarcega ve ark 2007). Bu anlamda Nav1.5 kanalının her iki tipine spesifik siRNA tedavi gruplarında kontrol siRNA grubuna göre NF- κ B ekspresyonunda ciddi anlamda azalma tespit edildi. Bu bulgu, kanalın çok yönlü etkilerine daha da detaylı incelenmek üzere ışık tutmaktadır.

Kanserdeki öneminden dolayı ERK yolağı (Ras-Raf-MEK-ERK Yolağı) ilaç geliştirme çalışmaları için bir hedef potansiyeli taşımakta ve ilgi çekmektedir (Downward 2003, Kohno ve Pouyssegur 2006). Aktif ERK kinazlar, fosfatazlar, transkripsiyon faktörleri ve hücre iskeleti proteinleri gibi çeşitli sayıda sitoplazmik ve nükleer hedefleri fosforile etmektedir (Yoon ve Seger 2006). ERK sinyalizasyonu belirli bir hücre tipine bağlı olarak proliferasyon, diferensiyasyon, sağkalım, migrasyon, anjiyogenez ve kromatin yeniden modelleme gibi çeşitli işlemleri düzenleyebilmektedir (Dunn ve ark 2005, Yoon ve Seger 2006). Uzun süreli ERK sinyalizasyonu artışı sadece Cyclin D1 gibi hücre siklusu girişi için gerekli genlerin akümüülasyonunu tetiklemekle kalmayıp aynı zamanda proliferasyonu inhibe eden genlerin ekspresyonunu da baskılayabilmektedir (Yamamoto ve ark 2006). ERK yolağı bazal membran degradasyonunda görevli proteazların ekspresyonunu düzenlemesi yanı sıra FAK ve Paxillin gibi hücre migrasyonu ile ilişkili bir dizi proteini de fosforilleyebilmektedir (Reddy ve ark 2003). Çalışmamızda da MDA-MB-

231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavi gruplarında kontrol siRNA'ya göre P-ERK ekspresyon düzeylerinde önemli düzeyde azalma tespit edildi.

eIF2 α (elongasyon inisiyasyon faktör 2 alfa)'nın aktivite artışı translasyonun başlamasında hız sınırlandırıcı bir basamaktır ve IF2 α 'nın fosforilasyonu translasyonun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Clemens ve Bommer 1999, Dever 2002, Sudhakar ve ark 2000, Datta ve ark 1999, Leroux ve London 1982). Ancak IF2 α ile hücreler transfekte edildiğinde normal hücrelerin malign transformasyona uğradıkları, bu nedenle IF2 α 'nın hücre proliferasyonunu kontrol eden hücreyel yolaklarda kritik bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (Clemens 2004, Donze ve ark 1995, Lazaris-Karatzas ve ark 1990, Eberle ve ark 1997). Son yıllarda tümör büyümesi ve sağkalımında önemli bir yere sahip olan eIF2 α kanser tedavileri için yeni bir hedef olarak görülmektedir (Ozpolat ve ark 2012). Tez çalışmamızda da meme kanseri hücre hatlarında Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavi gruplarında kontrol siRNA grubuna göre P-IF2 α düzeylerinde belirgin bir azalma gözlemlendi ancak total IF2 α düzeyine bakıldığında da kontrole göre spesifik siRNA tedavi gruplarında azalma tespit edildi. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda Nav1.5 kanalının IF2 α -ER (Endoplazmik Retikulum) stresi-hücre ölümü bağlantısının incelenmesi yeni bakış açıları geliştirilebilmesi anlamında yarar sağlayabilecektir.

MMP aktivite düzeylerindeki ve ekspresyonlarındaki değişimler çeşitli formdaki kanserlerin progresyonu ve metastazı ile güçlü bir biçimde ilişkilendirilmiştir. MMP-2 aktivitesinin artışı kolorektal, melanom, meme, akciğer, yumurtalık ve prostat gibi farklı tiplerdeki kanserlerde kötü prognoz ile korelasyon göstermektedir (Björklund ve Koivunen 2005). MMP'lerin kanser progresyonundaki temel etkilerinden birisi bunların ekstraselüler matriks degradasyonundaki rolüdür. Bu degradasyon kanser hücrelerine primer tümör alanından kurtulup başka bir bölgeye metastaz yapabilme olanağı sağlamaktadır. Daha belirgin olarak MMP-2 tip 4 kollajeni degrade edebilme kapasitesine sahiptir ve bu tip kollajen bazal membranın en çok bulunan bileşenidir. Bazal membran doku organizasyonunun sağlanması, hücreler için yapısal destek sağlama ve hücre sinyalizasyonu ile polarizasyonunu etkilemede oldukça önemlidir. Çoğu kanser tipinde bazal membranın degradasyonu metastatik progresyon için esansiyel bir basamağı oluşturmaktadır (Mook ve ark 2004) MMP-2, metastatik pankreas kanserinde diğer MMP'lere göre daha fazla aktivedir, normalde inaktif olarak sekrete olmakta ve belli

aktivasyon işlemlerine gereksinim duymaktadır (He ve ark 2007). Benzer şekilde *in vivo* olarak bazı tümörlerde Caveolin-1'in aşırı ekspresyonu tümör agresifliğinin artması, metastatik potansiyel ve apoptozun baskılanması ile ilişkilendirilmiştir (Williams ve Lisanti 2005). Bu çalışmalardan birinde yüksek düzeyde Caveolin-1 eksprese eden akciğer kanseri hücre hatlarında Caveolin-1'in siRNA ile hedeflenmesinin her iki metastatik hattın da proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Pancotti ve ark 2012). Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) de kanser invazyonunu ve progresyonunu tetikleyen önemli bir mekanizmadır (Barr ve ark 2008). EMT esnasında meydana gelen morfolojik değişimler bir seri moleküler değişimler üzerinden yürütülmektedir, örneğin; epitelyal belirteçler azalırken (Claudin, E-cadherin gibi), mezenkimal belirteçler ise (Vimentin, N-cadherin gibi) yeniden eksprese olmaktadır (Thiery ve ark 2009). Vimentin'in aşırı ekspresyonu metastaz ile ilişkilendirilen EMT belirteçlerinden birisidir (Cowling ve Cole 2007). Çalışmamızda yine Adult ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavi gruplarında kontrol siRNA grubuna göre MMP-2, Caveolin-1 ve Vimentin ekspresyonlarında önemli düzeyde azalmalar tespit edildi. Bu bulgularla kanalın meme kanseri metastazı üzerine olan etkisi ve güçlü terapötik potansiyeli bir kez daha ortaya konuldu.

Gen sustarmayı düzenleyen miRNA ve siRNA'yı kapsayan RNA interferansın keşfi son yıllarda biyolojideki en önemli ilerleme olarak görülmektedir (Fire ve ark 1998, Hammond ve ark 2000, Elbashir ve ark 2001). Spesifik olarak dizayn edilmiş bir siRNA hedef gen mRNA'sına sekansa spesifik bir biçimde bağlanabilir ve mRNA translasyonunun degradasyonunu indükleyebilir (Elbashir ve ark 2001). siRNA tabanlı tedavilerin sistemik olarak kullanımındaki temel kısıtlayıcı faktörler nükleazlar tarafından hızlı degrades edilmesi (serumda yarı ömrü 15 dk) ve sistemik uygulama sonrası renal atılımı kapsamaktadır (Tabernero ve ark 2013). Bu nedenle daha önceleri yapılmış siRNA tabanlı tedavi araştırmaları klinik denemelere intravitreal ve intranazal gibi lokal uygulamalar üzerinden giriş yapmıştır (Burnett ve Rossi 2012, Tabernero ve ark 2013). siRNA tabanlı tedavilerin başarılı klinik uygulamalara dönüşebilmesi için güvenilir, stabil, efektif ve tümör-spesifik taşıyıcı sistemlerin kullanılabilir hale getirilmesi gerekmektedir. Nanoteknoloji bu anlamda siRNA tabanlı tedavilerin geniş çaplı klinik uygulamaları için umut vadetmektedir. Nanotaşıyıcılar normal dokularda siRNA ilişkili toksisiteyi azaltmada ve istenmeyen, hedef-dışı etkilerin önlenmesinde büyük potansiyele de sahiptir (Jackson ve Linsley 2010). Çapı 200 nm'den küçük olan nanopartiküller pasif olarak tümör dokularında akümüle olmaktadır (Ozpolat ve ark 2010). Bu akümülyasyon normal doku

damarları ile karşılaştırıldığında tümör damarlarının anormal yapısı, endotel hücreleri arasındaki genişliklerin ve fenestrasyonların daha geniş olmasından dolayı meydana gelen permeabilite artışı ve retensiyon etkisi (EPR etkisi) ile ilişkilendirilmektedir (Greish 2007). Tümör damarlanmasının bu sızıntı yapan doğası 200-1200 nm arasında değişen endotel açıklıklarından (normal endotel arası 10-50 nm) kaynaklanmaktadır ve pasif olarak nanopartiküllerin akümülyasyonuna neden olmaktadır. Bunun dışında partikülün fiziksel özellikleri, elektriksel yükü ve şekli nanopartikülün dolaşımdaki kaderini belirlemektedir, bu yüzden uygun şekilde ve hedefe yönelik olarak dizayn edilmek zorundadır (Tabernero ve ark 2013).

Çeşitli tipte nanotaşıyıcılar bulunmaktadır ancak herbirinin farklı avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Tez çalışmamızın gerçekleştirildiği bölümdeki araştırmacılar tarafından dizayn edilen nötral 1,2-dioleoyl-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DOPC)-tabanlı nanolipozomlar farklı siRNA'lar ile birçok farklı kanserin ortotopik ve subkutanöz hayvan modellerinde denenmiş ve önemli düzeyde anti-tümör etkileri ortaya konulmuştur (Ozpolat ve ark 2014). Bu tipteki nanolipozomlar, hedef siRNA'yı *in vivo* tümör hücrelerine katyonik lipozomlar ve çıplak siRNA'ya göre 10-30 kat daha efektif olarak taşıyabilmektedir ve tek bir doz uygulandıktan sonra tümördeki hedef protein ekspresyonunu 3 günden daha fazla süreyle inhibe edebilmektedir (Landen ve ark 2005, Halder ve ark 2006).

Nav1.5 ile ilgili yapılmış çalışmalarda herhangi bir *in vivo* tümör modeli oluşturulmamış, ayrıca Nav1.5'in *in vivo* sistemik olarak hedeflenmesi gerçekleştirilmemiştir. Yine Nav1.5'e spesifik, güçlü, yan etkileri olmayan ve sistemik olarak uygulanabilecek herhangi bir ilaç uygulaması bulunmadığından dolayı çalışmamızda siRNA tabanlı tedavi yöntemi tercih edildi. *In vitro* deneylerden elde edilen önemli ve umut verici verilerin ardından, literatürdeki eksikliği gidermek ve *in vitro* sonuçlara destek olmak adına çalışmamızın *in vivo* kısmı iki farklı hayvan modeli ile gerçekleştirildi. Bu modellerde de yukarıda bahsedilen avantajları ve olası toksisite ile olumsuz etkileri minimuma indirmesi nedeniyle nötral lipid tabanlı nanolipozomlardan DMPC-tabanlı nanolipozomal formülasyon hayvanlara haftada iki kez çift doz olarak kuyruk veninden uygulandı. Böylece DOPC'den farklı olarak bu formülasyonun da siRNA dağıtım etkinliği değerlendirilmiş oldu. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatları ile oluşturulmuş Ksenograft ortotopik meme kanseri modellerinde kontrol

siRNA alan gruba göre, Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda ilk haftalardan başlayarak deney sonuna kadar tümör büyüklüğünde ve tümör ağırlığında önemli düzeyde azalma görüldü. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulmuş Ksenograft akciğer metastaz modelinde de hem hücrelerin enjeksiyonundan 24 saat sonrasındaki dönemde hem de deneyin sonunda alınan BLI görüntülerine bakıldığında yine kontrol siRNA alan gruba göre, Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda akciğerlerdeki tümör büyüklüğünde ve birim alan başına düşen foton sayısında önemli düzeyde azalma tespit edildi. Böylece *in vivo* deneylerden elde edilen veriler, *in vitro* bulgular ile uyumlu bulundu.

Tüm bu bulgulara bakıldığında Nav1.5 kanalının meme kanseri metastazında, gelişimi ve progresyonunda önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. siRNA ve nanolipozom tabanlı bu sistemik girişim ile kanalın hedeflenmesinin güçlü terapötik, anti-metastatik ve anti-tümör etkiler ortaya koyduğu, dolayısıyla klinik çalışmaların yapılmasına yönelik umut verici bilgiler sunduğu görülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* olarak elde edilen bu veriler bir ilk olması ve hem mekanizma hem de pre-klinik anlamda birçok soruya ışık tutması açısından büyük önem ve değer taşımaktadır.

5. SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde kanser vakalarının sayısı her geçen gün artmaktadır. Kanser, tüm dünyada toplam ölümlerin en önemli nedenidir. Yapılan tahminler, kanser insidansının önümüzdeki yıllarda da yüksek olacağını göstermektedir. Bunun sonuçları; insan ömründe ve yaşam kalitesindeki azalmanın yanı sıra bu hastalık nedeniyle sağlık sektörünün ve ülkelerin karşı karşıya kalacağı ekonomik yükün de artmasıdır. Bu nedenlerle kansere karşı açılan savaşta terapötik amaçla potansiyel gücü ve popülaritesi artan yeni girişimlerin etkinliğinin, kullandığı mekanizmaların ve gizli olan yönlerinin incelenmesi hem dünya hem de ülkemiz için büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışma daha önce yapılan çalışmalarda öne sürülen Nav1.5 kanalı ile metastatik meme kanseri ilişkisini ayrıntılı biçimde incelemek amacıyla planlandı. *In vitro* ve farede *in vivo* meme kanseri modellerinde Nav1.5 kanalı inhibisyonunun invazyon ve metastaz üzerine nasıl bir etkide bulunduğu, standart tedavilerin etkilerindeki olası rolleri, ayrıca bu kanalın siRNA ile inhibisyonuna yanıt olarak hücrede rol alan sinyalizasyon yolları ve moleküler mekanizmalar tanımlanmaya çalışıldı.

Çalışmamızda öncelikle Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 kanallarının yüksek derecede metastatik MDA-MB-231 ve göreceli olarak daha az düzeyde metastatik kapasiteye sahip MCF7 meme kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon düzeylerine bakıldı ve her iki tip kanalın mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin MDA-MB-231 hattında daha yüksek düzeyde olduğu tespit edildi. MDA-MB-231 hücre hattında Adult Nav1.5 siRNA'sının spesifik olarak sadece Adult Nav1.5 mRNA ekspresyon düzeyini azalttığı ancak Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyonu üzerine herhangi bir etkide bulunmadığı, yine Neonatal Nav1.5 siRNA'sının da benzer şekilde kanal tipine spesifik olarak etki ettiği gözlemlendi ve çalışmaya bu spesifik siRNA sekansları ile devam edildi. Ardından Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA'lar ile MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki tedavinin kanser hücrelerindeki proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlendi. Bununla birlikte siRNA'lar ile spesifik olarak Nav1.5'in hedeflenmesinin normal meme epiteli üzerinde proliferasyonu inhibe edici ve sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı, böylece yukarıda bahsedildiği üzere nanolipozomal formülasyon ile olası diğer etkileri en aza indirgeyerek klinik anlamda denenebilecek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Deney sonuçlarımıza göre yine spesifik Nav1.5 siRNA'larının meme kanseri hücre hatlarında koloni şekillendirme kapasitesini önemli

ölçüde azalttığı belirlendi ve bu sonuç da proliferasyon üzerine olan etkiyi destekledi.

Çalışmamızın ana hipotezini oluşturan Nav1.5-meme kanseri metastazı ilişkisine dair yaptığımız deneylerde Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarına spesifik siRNA'ların uygulanmasının meme kanseri hücre hatlarının invazyon, migrasyon ve yara iyileşmesi kapasitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bundan ayrı olarak da yine aynı hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının hedeflenmesinin standart kemoterapötiklerden biri olan paklitaksel ile kombinasyonu sonucunda ilacın etkinliğinin arttığı ve ilaç dirençliliğini azaltıcı yönde etkisi olabileceği belirlendi. Hücre proliferasyonunda olan azalmanın üzerine yapılan flow sitometri değerlendirmelerinde MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Adult ve Neonatal Nav1.5 kanallarının spesifik siRNA'lar ile downregülasyonunun kontrol siRNA'ya göre karşılaştırıldığında önemli düzeyde apoptoz ve hücre siklusu arresti (G1 arresti) şekillendirdiği, apoptozun özellikle adult tipin hedeflenmesi üzerine daha yüksek oranda meydana geldiği de ortaya konulmuştur.

Western blot ile yapılan analizlerde ise *in vitro* deneylerimizi doğrular şekilde bulgular saptandı. Özellikle Nav1.5'in metastaz, invazyon ve migrasyon üzerine olan etkilerine ilişkin olarak incelenen yolaklardaki proteinlere bakıldığında, Adult ve Neonatal Nav1.5 kanalının siRNA ile hedeflendiği gruplarda P-Src ve P-FAK'in fosforile formlarının ekspresyonlarında azalma görüldüğü ancak total düzeylerinde değişimin olmadığı, bunun yanı sıra Integrin β 1, Integrin α 5, P-Paxillin, pCas130 ve P-PI3K ekspresyon düzeylerinde de azalma gerçekleştiği belirlendi. Hücre proliferasyonu ve kanser progresyonu ile ilişkili olarak yine her iki spesifik siRNA tedavisini alan gruplarda P-PI3K/P-AKT, P-ERK, P-IF2 α , PKC δ ve NF- κ B ekspresyonları önemli düzeyde azaldı. Bu yollar üzerine olan önemli etkileri gösterilmiş olan EF2K'nin ekspresyonu Nav1.5 alt tiplerinin hedeflendiği gruplarda ciddi azalma gösterdi. Metastaz üzerine etkilere destek olacak şekilde invazyon ve migrasyon da etkili olan MMP-2 ve Caveolin-1 ile Epitelyal-Mezenkimal Geçişte (EMT) yine invazif özellikleri destekleyen belirteçlerden Vimentin ekspresyon düzeylerinde de önemli azalmalar tespit edildi. Flow sitometri sonuçlarından elde ettiğimiz apoptoz ve G1 arrestini doğrular şekilde Nav1.5'in hedeflendiği gruplarda kaspaz-9, kaspaz-3 ve PARP klevajında artış ile Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin B1 ve c-Myc ekspresyon düzeylerinde azalma ortaya konuldu.

Tez çalışmamızda *in vivo* analizler 2 farklı hayvan modelinde gerçekleştirildi. Ksenograft ortotopik meme kanseri modellerinde Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5

siRNA tedavisi alan gruplarda ilk haftalardan başlayarak deney sonuna kadar tümör büyüklüğünde ve tümör ağırlığında önemli düzeyde azalma şekillendi. Meme kanseri metastazına ilişkin hipotezimiz doğrultusunda gerçekleştirdiğimiz Ksenograft akciğer metastaz modelinde ise Adult Nav1.5 ve Neonatal Nav1.5 siRNA tedavisi alan gruplarda akciğerlerdeki tümör büyüklüğünde ve birim alan başına düşen foton sayısında önemli düzeyde azalma tespit edildi. Böylece *in vivo* elde ettiğimiz verilerin, *in vitro* bulgularımız ile uyumlu olduğu gösterildi.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile Nav1.5 kanalının meme kanseri gelişimi ve metastazındaki önemi detaylı bir şekilde ortaya konuldu. Metastaz odaklı çalışmamızda kullanılan diğer yöntemler ile bu kanalın meme kanseri üzerine olan metastaz dışındaki diğer etkileri de açığa çıkarıldı. İnvazyon, migrasyon ve motilite dışında hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre siklusu arresti gibi diğer etkiler birlikte gözlemlendi. siRNA tabanlı tedavi ile kanalın etkilerinden sorumlu hücre içi sinyalizasyon yolları mümkün olduğunca açığa kavuşturuldu ve böylece daha detaylı inceleme için araştırmacılara ışık tutulmaya çalışıldı. *In vitro* çalışmalara ek olarak *in vivo* fare meme kanseri modellerinde; bu kanalın nanolipozomal-siRNA tabanlı bir tedavi ile hedeflenmesinin hücrelerin invazyon ve metastaz yetenekleri üzerine ciddi etkilerde bulunduğu, tümör gelişimini ve metastaz kapasitesini azalttığı bilgilerimiz dahilinde ilk kez çalışmamızda gösterildi. Ayrıca standart kemoterapötiklerden Paklitakselin Nav1.5 spesifik siRNA ile kombinasyonunun ilacın etkinliği üzerine ve meme kanseri hücrelerinin ilaca olan dirençliliğine karşı önemli etkiler gösterdiği ve klinik anlamda bu kombinasyonun da denenebileceği ortaya konuldu. Nanolipozomal-siRNA tabanlı tedavi yönteminin sağladığı avantajlar sayesinde bu yöntemin ileride klinik anlamda da kullanılabilecek değere sahip olduğu görüldü. Bu nedenlerle çalışmamız birçok konuda ortaya koyduğu veriler ile literatürde ilk olması bakımından önem arz etmektedir. Çalışmamızın sonunda elde edilen verilerin, uygulanan sağaltım modelinin meme kanserinin organizmadaki yayılımını ve iletişimini keserek onu kronik bir hastalık haline dönüştürebilecek, rutin tedavilerin etkinliğini artıracak, hatta meme kanserini tamamen yenilemek için yapılacak yeni çalışmalara temel teşkil edebilecek potansiyele sahip olduğu kanısına varıldı.

ÖZET

ERDOĞAN MA. Yeni Bir Tedavi Olarak *In vitro* ve Farede *In Vivo* Metastatik Meme Kanseri Modellerinde Nav1.5 Kanalının Hedeflenmesi.

Kansere karşı açılan savaşta terapötik amaçla potansiyel gücü ve popülaritesi artan yeni tedavi girişimlerin geliştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesi hem dünya hem de ülkemiz için büyük önem arz etmektedir. İyon kanalları kanser hücresinde proliferasyon, apoptozis, migrasyon, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle Nav1.5 kanalının *in vitro* yüksek metastatik potansiyel ve *in vivo* olarak meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri gelişiminde ve metastatik yollar ile ilişkili hücre içi olayları etkilemede Nav1.5 kanalının özellikle neonatal izoformundaki ekspresyon ve aktivite artışının önem taşıdığı belirtilmiştir. Ancak bu konuda kanalın meme kanserine olan etkilerine ilişkin detaylı bir mekanizma ve hücre içi protein değişimlerini değerlendiren ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez çalışmamızda meme kanseri gelişimi ve metastazı üzerinde Nav1.5 kanalının Adult ve Neonatal alt tiplerinin olası rolleri ve etkileri değerlendirildi. Bu amaçla kanala spesifik siRNA ile gen susturma yöntemi kullanıldı. *In vitro* deneyler olarak hücre proliferasyonu testi, koloni oluşturma kapasitesi, invazyon ve migrasyon yeteneği ile ilişkili testler, flow sitometri ile apoptoz ve hücre siklusu analizi, kemoterapötik dirençliliğine olan etkiler, tüm bunlar ile ilişkili protein yolların değerlendirilmesi için Western blot analizi ve kanal tiplerinin mRNA ekspresyonları için Real-Time ve RT-PCR deneyleri gerçekleştirildi. *In vivo* ksenograft ortotopik meme kanseri modeli ve ksenograft akciğer metastaz modeli gerçekleştirilerek nanolipozomal taşıyıcılar içindeki Nav1.5 siRNA tedavilerinin hem meme kanseri tümör büyümesi hem de metastaz kapasitesi üzerine olan etkileri değerlendirildi.

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında MCF7'a göre Adult ve Neonatal Nav1.5 mRNA ekspresyonunun daha yüksek düzeyde olduğu ayrıca bu iki tipe spesifik siRNA'ların kanalı etkin bir şekilde downregüle ettiği PCR ve Western blot yöntemleri ile tespit edildi. MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarında Spesifik Nav1.5 siRNA tedavilerinin meme kanseri hücrelerinin proliferasyon düzeyleri ve koloni oluşturabilme yeteneklerinde önemli düzeyde azalma gerçekleştirdiği belirlendi. Ancak Nav1.5 siRNA'larının normal meme epiteli hücre hattı MCF10A üzerinde hücre

proliferasyonunu azaltıcı ve sitotoksik etkilere sahip olmadıkları tespit edildi. MDA-MB-231 hücre hattında spesifik Nav1.5 siRNA tedavilerinin standart bir kemoterapötik olan paklitaksel ile kombinasyonlarının ilacın etkinliğini artırdığı ve ilaç dirençliliğini azalttığına ilişkin bulgular tespit edildi. Bu sonuçların yanısıra Nav1.5 siRNA'larının metastatik meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve MDA-MB-468'de meme kanseri hücrelerinin invazyon, migrasyon ve yara iyileşmesi migrasyonu kapasitelerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattında bu siRNA'ların hücrelerde apoptoz düzeylerinde artış şekillendirdiği ve hücre siklusunda G1 arrestine neden olduğu flow sitometri yöntemi ile belirlendi. *In vitro* MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Nav1.5 siRNA'larının tüm bu etkilerine ilişkin hücre içi mekanizmalarda görev alan proteinlerin ekspresyon düzeylerinde önemli azalmalar gözlemlendi. *In vivo* olarak da MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 Ksenograft ortotopik meme kanseri modellerinde spesifik Nav1.5 siRNA tedavilerini alan gruplarda tümör büyüklüğünde ve tümör ağırlığında önemli düzeyde azalma görüldü. Bunun yanısıra MDA-MB-231 Ksenograft akciğer metastaz modelinde de aynı tedavi gruplarında akciğerlerdeki tümör metastazı büyüklüğünde ve birim alan başına düşen foton sayısında önemli düzeyde azalma tespit edildi.

Tüm bu sonuçlar ile Nav1.5 kanalının meme kanseri metastazında, gelişimi ve progresyonunda önemli bir role sahip olduğu ortaya konuldu. Çalışmamız birçok konuda ortaya koyduğu veriler ile literatürde ilk olması bakımından önem arz etmektedir. Böylece kansere karşı savaşta bu yeni tedavi yaklaşımının etkinliğinin ve ayrıntılarının ortaya çıkmasıyla meme kanserinin organizmadaki yayılımını ve iletişimini keserek onu kronik bir hastalık haline dönüştürebilmek, rutin tedavilerin etkinliğini artırabilmek, yapılacak yeni çalışmalar ile meme kanserini tamamen yenebilmek mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Nav1.5, Nanolipozom, Meme kanseri, Metastaz/İnvazyon, siRNA.

SUMMARY

ERDOGAN MA. Targeting of Nav1.5 channel in metastatic breast cancer models *in vitro* and *in vivo* mice as a novel therapy.

Development and examination of the effectiveness of new therapeutic interventions which the potential strength and popularity are growing for therapeutic purposes in the fight against cancer have great importance for both our country and the world. Ion channels are associated with proliferation, apoptosis, migration, angiogenesis and metastasis in cancer cell. It has been found that especially Nav1.5 is associated with high metastatic potential *in vitro* and the development of breast cancer *in vivo*. The importance of an increase in Nav1.5 channel especially the neonatal isoform expression and activity for influencing the intracellular events that are associated with breast cancer development and metastatic pathways was mentioned. Nevertheless, there is not a detailed study that evaluates intracellular protein changes and elaborative mechanism about the effects of the channel protein on breast cancer.

Possible roles and effects of neonatal and adult subtypes of the Nav1.5 channel on breast cancer development and metastasis were evaluated in our study. In this study, gene silencing method by channel-specific siRNA was used. As *in vitro* experiments, cell proliferation test, colony formation capacity, tests associated with invasion and migration ability, apoptosis and cell cycle analysis by flow cytometry, the effects on chemotherapeutic resistance, western blot analysis for the evaluation of protein pathways that are associated with all these effects and Real-Time/RT-PCR experiments for mRNA expression of channel types were performed. Effects of Nav1.5 siRNA treatments in nanoliposomal carriers on both tumor growth and metastasis capacity of breast cancer were evaluated by performing xenograft orthotopic breast cancer model and xenograft lung metastasis model *in vivo*.

In our study, expression of Adult and Neonatal Nav1.5 mRNAs are higher levels in MDA-MB-231 cell line compared to MCF7 and siRNAs that are specific to these two types downregulates the channel effectively were detected by PCR and Western blot methods. Specific Nav1.5 siRNA treatments realize a significant reduction in proliferation levels and colony formation abilities of breast cancer cells in MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF7 breast cancer cell lines were determined. However Nav1.5 siRNAs have not effects that are reducing cell proliferation and cytotoxic on normal breast epithelium cell

line MCF10A were identified. Findings in relation with combinations of specific Nav1.5 siRNA treatments with a standard chemotherapeutic drug Paclitaxel increase the efficacy of the drug and reduce the drug resistance in MDA-MB-231 cell line were found. In addition to these results, it was observed that specific Nav1.5 siRNAs reduce significantly invasion, migration and wound-healing capacities of breast cancer cells in metastatic breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468. In MDA-MB-231 cell line, these siRNAs increase the level of apoptosis and cause G1 arrest in cell cycle on cells were determined by flow cytometry method. *In vitro* in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines, significant reductions in the level of expression of the proteins that are involved in intracellular mechanisms regarding to all these effects of Nav1.5 siRNAs were observed. As *in vivo* experiments in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 xenograft orthotopic breast cancer models, significant decrease in tumor size and tumor weight was seen in specific Nav1.5 treatment groups. On the other hand also in MDA-MB-231 xenograft lung metastasis model, significant decrease in size of tumor metastasis and photon counts per area in the lungs was found in same treatment groups.

It was revealed with all these results that Nav1.5 channel has an important role in the metastasis, development and progression of breast cancer. Our study is of great importance in terms of being the first in the literature with the data that has revealed on many issues. Thus, with the appearance of effectiveness and details of this new treatment approach in the battle against cancer, it will be possible to transform it into a chronic disease by cutting off propagation and communication of breast cancer in organism, to increase the effectiveness of routine treatments and to completely defeat breast cancer by new studies to be made.

Key Words: Breast cancer, Nanoliposome, Nav1.5, Metastasis/Invasion, siRNA.

KAYNAKLAR

Abdul M, Hoosein N. "Expression and Activity of Potassium Ion Channels in Human Prostate Cancer", *Cancer Letters*, 2002b, Vol. 186, pp. 99-105.

Abdul M, Hoosein N. "Voltage-Gated Potassium Ion Channels in Colon Cancer", *Oncology Reports*, 2002a, Vol.:9(5), pp. 961-964.

Abdul M, Hoosein N. Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. *Anticancer Res*, 2002, 22(3):1727–1730

Abdul M, Santo A, Hoosein N. "Activity of Potassium Channel-Blockers in Breast Cancer", *Anti Cancer Research*, 2003, Vol. 23, pp. 3347-3351.

Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci*, 2001, 26:61-6.

Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26:390-7.

Ahmed KM, Zhang H, Park CC. NF-kappaB regulates radioresistance mediated by beta1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2013, 73: 3737–3748.

Akınoğlu A. Meme Kanserinde Yeni Tanı ve Tedavi Seçenekleri. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2002, 11, 215-224.

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. "A Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel Expressed by C-Fibre-Associated Sensory Neurons", *Nature*, 1996, Vol. 379, pp. 257-262.

Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(40), 23589-23597.

Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2004, 9: 67–80.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta, American Cancer Society, 2011.

Anderson JD, Hansen TP, Lenkowski PW, Walls AM, Choudhury IM, Schenck HA, Friehling M, Höll GM, Patel MK, Sikes RA, Brown ML. Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Molecular cancer therapeutics*, 2003, 2(11), 1149-1154.

Anderson TJ, Lamb J, Donnan P, Alexander FE, Huggins A, Muir BB, Kirkpatrick AE, Chetty U, Hepburn W, Smith A. "Comparative Pathology of Breast Cancer in a Randomized Trial of Screening", *British Journal of Cancer*, 1991, Vol. 64, pp. 108-113.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, ... & Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 2003, 72(5), 1117-1130.

Arcangeli A, Becchetti A. New trends in cancer therapy: targeting ion channels and transporters. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(4), 1202-1224.

Ashour AA, Gurbuz N, Alpay SN, Abdel-Aziz AAH, Mansour AM, Huo L, Ozpolat B. Elongation factor-2 kinase regulates TG2/ β 1 integrin/Src/uPAR pathway and epithelial-mesenchymal transition mediating pancreatic cancer cells invasion. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2014, 18(11), 2235-2251.

Avila G, Monjaraz E, Espinosa JL, Cota G. "Downregulation of Voltagegated Sodium Channels by Dexamethasone in Clonal Rat Pituitary Cells", *Neuroscience Letters*, 2003, Vol. 339, pp. 21-24.

Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. *Sted*, 2004, 13(6), 226-229.

Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB. "Methylation-Associated Silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene Suggest A Suppressor Role in Kidney, Brain, and other Human Cancers", *Cancer Research*, 1999, Vol. 59, pp. 798-802.

Bakhramov A, Boriskin YK, Booth JC, Bolton TB. "Activation and Deactivation of Membrane Currents in Human Fibroblasts Following Infection with Human Cytomegalovirus", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, Vol. 1265, pp. 143-151.

Barr S, Thomson S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujka-Kwok I, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Gibson NW, Miglares M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clinical & experimental metastasis*, 2008, 25(6), 685-693.

Bartsch H, Nair J, Owen RW. "Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Cancers of the Breast and Colorectum: Emerging Evidence for Their Role as Risk Modifiers", *Carcinogenesis*, 1999, Vol. 20, pp. 2209-2218.

Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. "Novel Role for Na,K-ATPase in Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling and Suppression of Cell Motility", *Molecular Biology of the Cell*, 2005, Vol. 16, pp. 1082-1094.

Becchetti A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011, 301(2), C255-C265.

Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. "Dissecting Tumor Cell Invasion: Epithelial Cells Acquire Invasive Properties After the Loss of Uvomorulin-Mediated Cell-Cell Adhesion", *The Journal of Cell Biology*, 1989, Vol. 108, pp. 2435-2447.

Belcher SM, Zerillo CA, Levenson R, Ritchie JM, Howe JR. "Cloning of a Sodium-Channel Alpha-Subunit from Rabbit Schwann-Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, Vol. 92, pp. 11034-11038.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shanonon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FPI, Garber JE, Haber DA. "Heterozygous Germline hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome", *Science*, 1999, Vol. 286, pp. 2528-2531.

Bellacosa A, De Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti PP, Mancuso S, Neri G, Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International journal of cancer*, 1995, 64(4), 280-285.

Bennett ES. "Isoform-Specific Effects of Sialic Acid on Voltage-Dependent Na⁺ Channel Gating: Functional Sialic Acids are Localized to the S5-S6 Loop of Domain I", *Journal of Physiology*, 2002, Vol. 538, pp. 675-690.

Bernards R, Weinberg RA. "A Progression Puzzle", *Nature*, 2002, Vol. 418, pp. 823.

Beroud C, Soussi T. "p53 Gene Mutation: Software and Database", *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, pp. 200-204.

Berry DA, Parmigiani G, Sanchez J, Schildkraut J, Winer E. "Probability of Carrying a Mutation of Breast-Ovarian Cancer Gene BRCA1 Based on Family History", *Journal of National Cancer Institute*, 1997, Vol. 89, pp. 227-238.

Biscardi JS, Belsches AP, Parsons SJ. Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. *Mol Carcinog*, 1998, 21: 261–272.

Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2005, 1755(1), 37-69.

Black JA, Langworthy K, Hinson AW, Dib-Hajj SD, Waxman SG. "NGF has Opposing Effects on Na⁺ Channel and SNS Gene Expression in Spinal Sensory Neurons", *Neuroreport*", 1997, Vol. 8, pp. 2331-2335.

Black JA, Waxman SG. "Sodium Channel Expression: A Dynamic Process in Neurons and Non-Neuronal Cells", *Developmental Neuroscience*, 1996, Vol. 18, pp. 139-152.

Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett*. 2010, 584: 1923–30.

Bloom HJG, Richardson WW. "Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer", *British Journal of Cancer*, 1957, Vol. 11, pp. 359-377.

- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001, 411:355–65.
- Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M, Wallisch S, Henke G, Brinkmeier H, Cohen P, Pieske B, Lang F. “Serum and Glucocorticoid Inducible Kinases in the Regulation of the Cardiac Sodium Channel SCN5A”, *Cardiovascular Research*, 2003, Vol. 57, pp. 1079-1084.
- Bogenrieder T, Herlyn M. “Axis of Evil: Molecular Mechanisms of Cancer Metastasis”, *Oncogene*, 2003, Vol. 22, pp. 6524-6536.
- Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G. “Compact Myelin Dictates the Differential Targeting of Two Sodium Channel Isoforms in the Same Axon”, *Neuron*, 2001, Vol. 30, pp. 91-104.
- Bosanquet N, Silora K. “The Economics of Cancer in the UK” *Lancet Oncology*, 2004, 5.
- Boyle P, Levin B. (Eds.). *Dünya kanser raporu 2008*. Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu, 2008.
- Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JKJ, Djamgoz MBA. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 2007, 101(2), 149-160.
- Brackenbury WJ, Djamgoz MB. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *J Physiol*. 2006, 573:343–56.
- Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Hepp DRF. “Comparative Analysis of Micrometastasis to the Bone Marrow and Lymph Nodes of Node-Negative Breast Cancer Patients Receiving No Adjuvant Therapy”, *Journal of Clinical Oncology*, 2001, Vol. 19, pp. 1468-1475.
- Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S, Reshkin SJ, Gore J, Roger S. Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J. Cell Sci*. 2013, 126, 4835–4842.

Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S, Gore J. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene*. 2011, 30:2070–6.

Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5:231–237.

Budhu AS, Zipser B, Forgues M, Ye QH, Sun Z, Wang XW. “The Molecular Signature of Metastases of Human Hepatocellular Carcinoma”, *Oncology*, 2005, Vol. 1, pp. 23-27.

Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects, *Chem. Biol*, 2012, 19 (1), 60–71.

Caldwell JH. “Clustering of Sodium Channels at the Neuromuscular Junction”, *Microscopy Research and Technique*, 2000, Vol. 49, pp. 84-89.

Camacho J, Sanchez A, Stuhmer W, Pardo LA. “Cytoskeletal Interactions Determine the Electrophysiological Properties of Human EAG Potassium Channels”, *Pflügers Archive*, 2000, Vol. 441, pp. 167-174.

Cancer: Meta-Analysis and Review”, *Cancer Causes Control*, 1994, Vol. 5, pp. 73-82.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296(5573), 1655-1657.

Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Laner WS, Haber DA, Livingston DM. “BACH1, a Novel Helicase-Like Protein, Interacts Directly with BRCA1 and Contributes to its DNA Repair Function”, *Cell*, 2001, Vol. 105, pp. 149-160.

Cantrell AR, Tibbs VC, Yu FH, Murphy BJ, Sharp EM, Qu Y, Catterall WA, Scheuer T. “Molecular Mechanism of Convergent Regulation of Brain Na(+) Channels by Protein Kinase C and Protein Kinase A Anchored to AKAP-15, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 2002, Vol. 21, pp. 63-80.

Carrier E, Dargent B, De Waard M, Couraud F. “Na(+) Channel Regulation by Calmodulin Kinase II in Rat Cerebellar Granule Cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, Vol. 274, pp. 394-399.

Carrithers MD, Chatterjee G, Carrithers LM, Offoha R, Iheagwara U, Rahner C, Graham M, Waxman SG. Regulation of podosome formation in macrophages by a novel splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem.* 2009, 284:8114–26.

Carter CL, Corle DK, Micozzi MS, Schatzkin A, Taylor PR. “A Prospective Study of the Development of Breast Cancer in 16692 Women with Benign Breast Disease”, *American Journal of Epidemiology*, 1988, Vol. 128, pp. 467-477.

Cary LA, Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci*, 1999, 4(15), D102-D113.

Chahine M, Ziane R, Vijayaragavan K, Okamura Y. “Regulation of Nav Channels in Sensory Neurons”, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, Vol. 26, pp. 496-502.

Chan BM, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. “In vitro and in vivo Consequences of VLA-2 Expression on Rhabdomyosarcoma Cells”, *Science*, 1991, Vol. 251, pp. 1600-1602.

CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium 2004, “CHEK2* 1100delC and Susceptibility to Breast Cancer: A Collaborative Analysis Involving 10,680 Breast Cancer Cases and 9065 Controls from 10 Studies”, *American Journal of Human Genetics*, Vol. 74, pp. 1175-1182.

Chen JQ, Contreras RG, Wang R, Fernandez SV, Shoshani L, Russo IH, Cerejido M, Russo J. “Sodium/Potassium ATPase (Na(+), K(+)-Atpase) and Ouabain/Related Cardiac Glycosides: A New Paradigm for Development of Anti-Breast Cancer Drugs?”, *Breast Cancer Research Treatment*, 2006, Vol. 96, pp. 1-15.

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(8), 3636-3641.

Chioni AM, Brackenbury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MB. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2009, 41:1216–27.

Chioni AM, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin GP, Diss JK, Djamgoz MB. "A Novel Polyclonal Antibody Specific for the Na(v)1.5 Voltage-Gated Na(+) Channel 'Neonatal' Splice Form", *The Journal of Neuroscience Methods*, 2005, Vol. 147, pp. 88-98.

Chioni AM, Shao D, Grose R, Djamgoz MBA. Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity dependent positive feedback and cellular migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, 42, 346–358.

Chiu SY, Schrager P, Ritchie JM. "Neuronal-Type Na⁺ and K⁺ Channels in Rabbit Cultured Schwann Cells", *Nature*, 1984, Vol. 311, pp. 156–157.

Chung YH, Shin CM, Kim MJ, Cha CI. "Immunohistochemical Study on the Distribution of the Type I and Type II Voltage-Gated Sodium Channels in the Gerbil Cerebellum", *Neuroscience Letters*, 2000, Vol. 293, pp. 25-28.

Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in nonsmall cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res.* 2003, 63, 780–786.

Clemens MJ, Bommer UA. "Translational control: the cancer connection," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1999, vol. 31, no. 1, pp. 1–23.

Clemens MJ. "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation," *Oncogene*, 2004, vol. 23, no. 18, pp. 3180–3188.

Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Laing A, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP. Phosphoinositide 3-kinase accelerates postoperative tumor growth by inhibiting apoptosis and enhancing resistance to chemotherapy-induced apoptosis. Novel role for an old enemy. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 20968–20977.

Cohen SA. "Immunocytochemical Localization of rH1 Sodium Channel in Adult Rat Heart Atria and Ventricle. Presence in Terminal intercalated Disks", *Circulation*, 1996, Vol. 94, pp. 3083-3086.

Contreras RG, Lazaro A, Bolivar JJ, Flores-Maldonado C, Sanchez SH, Gonzalez-Mariscal L, Garcia-Villegas MR, Valdes J, Cerejido M. "Novel Type of Cell-Cell Cooperation Between Epithelial Cells", *Journal of Membrane Biology*, 1995, Vol. 145, pp. 305-310.

Cooper CR, Chay CH, Pienta KJ. The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia*, 2002, 4, 191–194.

Cortez CC, Jones PA. Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008, 647.1: 44-51.

Couch FJ, Deshano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. “BRCA1 Mutations in Women at Tending Clinics that Evaluate the Risk of Breast Cancer”, *New England Journal of Medicine*, 1997, Vol. 336, pp. 1409-1415.

Cowling VH, Cole MD. E-cadherin repression contributes to c-Myc-induced epithelial cell transformation. *Oncogene*. 2007, 26: 3582– 3586.

Cummins TR, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG. “Glial-Derived Neurotrophic Factor Upregulates Expression of Functional SNS and Nav Sodium Channels and Their Currents in Axotomized Dorsal Root Ganglion Neurons”, *The Journal of Neuroscience*, 2000, Vol. 20, pp. 8754–8761.

Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG. “A Novel Persistent Tetrodotoxin-Resistant Sodium Current in SNS-Null and Wild Type Small Primary Sensory Neurons”, *The Journal of Neuroscience*, 1999, Vol. 19, RC. 43.

Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*, 2003, 15:983-92.

Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ. Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene*, 1994, 9: 3635–3645.

Dalva K. Hematoloji’de Akım Sitometri Kullanımı. *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu Ders Notları*, 2012, 73-86.

Damjanov I. *Anderson's Pathology*, 1996, CV-Mosby, USA.

Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 51–56.

Datta B, Datta R, Mukherjee S, Zhang Z. "Increased phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α at the G2/M boundary in human osteosarcoma cells correlates with deglycosylation of p67 and a decreased rate of protein synthesis," *Experimental Cell Research*, 1999, vol. 250, no. 1, pp. 223–230.

Day ML, Winston N, McConnell JL, Cook D, Johnson MH. "tiK+ toK+: An Embryonic clock?", *Reproduction, Fertility, and Development*, 2001, Vol. 13, pp. 69-79.

Deschenes I, Neyroud N, Disilvestre D, Marban E, Yue DT, Tomaselli GF. "Isoform-Specific Modulation of Voltage-Gated Na(+) Channels by Calmodulin, *Circulation Research*, 2002, Vol. 90, pp. 49-57.

Dever TE. "Gene-specific regulation by general translation factors," *Cell*, 2002, vol. 108, no. 4, pp. 545–556.

Diaz D, Delgadillo DM, Hernández-Gallegos E, Ramírez-Domínguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, Berumen J, Camacho J, Gomora JC. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J. Cell Physiol.* 2007, 210, 469–478.

Diss JK, Archer SN, Hirano J, Fraser SP, Djamgoz MB. "Expression Profiles of Voltage-Gated Na(+) Channel Alpha-Subunit Genes in Rat and Human Prostate Cancer Cell Lines", *Prostate*, 2001, Vol. 48, pp. 165-178.

Diss JK, Archer SN, Hirano J, Fraser SP, Djamgoz MB. "Expression Profiles of Voltage-Gated Na(+) Channel Alpha-Subunit Genes in Rat and Human Prostate Cancer Cell Lines", *Prostate*, 2001, Vol. 48, pp. 165-178.

Diss JK, Fraser SP, Djamgoz MB. "Voltage-Gated Na⁺ Channels: Multiplicity of Expression, Plasticity, Functional Implications and Pathophysiological Aspects", *European Biophysics Journal*, 2004, Vol. 33, pp. 180-193.

Diss JK, Stewart D, Pani F, Foster CS, Walker MM, Patel A, Djamgoz MBA. "Potential Novel Marker for Human Prostate Cancer: Voltage-Gated Sodium Channel Expression in vivo", *Prostate Cancer Prostatic Disease*, 2005, Vol. 8, pp. 266-273.

Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, Fraser SP, Korohoda W. "Directional Movement of Rat Prostatic Cancer Cells in Direct-Current Electric Field: Involvement of Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity", *Journal of Cell Science*, 2001, Vol. 114, pp. 2697-2705.

Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, Fraser SP, Korohoda W. "Directional Movement of Rat Prostatic Cancer Cells in Direct-Current Electric Field: Involvement of Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity", *Journal of Cell Science*, 2001, Vol. 114, pp. 2697-2705.

Dobrovic A, Simpfendorfer D. "Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer", *Cancer Research*, 1997, Vol. 57, pp. 3347-3350.

Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT. "KAI1, a Metastasis Suppressor Gene for Prostate Cancer on Human Chromosome", *Science*, 1995, Vol. 268, pp. 884-886.

Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *The FASEB Journal*, 1999, 13(8), 773-780.

Donze O, Jagus R, Koromilas AE, Hershey JWB, Sonenberg N. "Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells," *The EMBO Journal*, 1995, vol. 14, no. 15, pp. 3828-3834.

Downward J. "Mechanisms and Consequences of Activation of Protein Kinase B/Akt", *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, Vol. 10, pp. 262-267.

Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 11-22.

Dravid SM, Baden DG, Murray TF. Brevetoxin activation of voltage-gated sodium channels regulates Ca dynamics and ERK1/2 phosphorylation in murine neocortical neurons. *J Neurochem*. 2004, 89:739-49.

Dunn KL, Espino PS, Drobic B, He S, Davie JR. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83: 1-14.

Duursma AM, Agami R. Ras interference as cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, 2003, 13, 267-273 p.

Eberle J, Krasagakis K, Orfanos CE. "Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro," *International Journal of Cancer*, 1997, vol. 71, no. 3, pp. 396–401.

Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, Negrin RS, Contag CH. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *European journal of cancer*, 2002, 38(16), 2128-2136.

Egan SE, Wright JA, Jarolim L, Yanagihara K, Bassin RH, Greenberg AH. "Transformation by Oncogenes Encoding Protein Kinases Induces the Metastatic Phenotype", *Science*, 1987, Vol. 238, pp. 202-205.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836), 494-498.

Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clinical oncology*, 2007, 19(2), 154-161.

Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J. "Loss of Cyclin D2 Expression in the Majority of Breast Cancers is Associated with Promoter Hypermethylation", *Cancer Research*, 2001, Vol. 61, pp. 2782-2787.

Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, Sukumar S, Argani P. "DNA Methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-Beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and Invasive Lobular Breast Carcinoma", *International Journal of Cancer*, 2003, Vol. 107, pp. 970-975.

Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auborn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. "BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Signaling in Transfected Cells", *Science*, 1999, Vol. 284, pp. 1354-1356.

Fawcett DW., "Mammary Gland" in *A Textbook of Histology*, Saunders, Philadelphia, 1976, pp. 125- 135.

Fekete A, Franklin L, Ikemoto T, Rozsa B, Lendvai B, Sylvester Vizi E, Zelles T. Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca elevation: implication for epilepsy. *J Neurochem.* 2009, 111:745–56.

Ferguson CM, Powell RW. “Breast Masses in Young Women”, *Archives of Surgery*, 1989, Vol. 124, pp. 1338-1341.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 18/12/2013.

Fidler IJ. “The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The ‘Seed and Soil’ Hypothesis Revisited”, *Nature Reviews of Cancer*, 2003, Vol. 3, 453-458.

Finn RS. Targeting Src in breast cancer. *Ann Oncol*, 2008, 19: 1379–1386.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669):806-11.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 1998, 391, 806–811.

Fisher ER, Palekar AS, Redmond C, Barton B, Fisher B. “Pathologic Findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). VI. Invasive Papillary Cancer”, *American Journal of Clinical Pathology*, 1980, Vol. 73, pp. 313-322.

Fitzgerald EM, Okuse K, Wood JD, Dolphin AC, Moss SJ. “cAMP-Dependent Phosphorylation of the Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Dependent Sodium Channel SNS”, *The Journal of Physiology*, 1999, Vol. 516, pp. 433-446.

Fjell J, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Fried K, Black JA, Waxman SG. “Differential Role of GDNF and NGF in the Maintenance of Two TTX-Resistant Sodium Channels in Adult DRG Neurons”, *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1999, Vol. 67, pp. 267-282.

Folkman J. "Tumor Angiogenesis", *Advanced Cancer Research*, 1974, Vol. 19, pp. 331-358.

Foote FW, Stewart FW. "Comparative Studies of Cancerous versus Noncancerous Breasts", *Annals of Surgery*, 1945, Vol. 121, pp. 6-9.

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G. "Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families the Breast Cancer Linkage Consortium", *American Journal of Human Genetics*, 1998, Vol. 62, pp. 676-689.

Fotia AB, Ekberg J, Adams DJ, Cook DI, Poronnik P, Kumar S. "Regulation of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by the Ubiquitin-Protein Ligases Nedd4 and Nedd4-2" *Journal of Biological Chemistry*, 2004, Vol. 279, pp. 28930-28935.

Fraser S, Grimes J, Djamgoz MBA. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate*, 2000, 44: 61-76.

Fraser SP, Ding Y, Liu A, Foster CS, Djamgoz MBA. "Tetrodotoxin Suppresses Morphological Enhancement of the Metastatic MAT-Lyly Rat Prostate Cancer Cell Line", *Cell and Tissue Research*, 1999, Vol. 295, pp. 505-512.

Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyuturk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC, Djamgoz MB. "Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis", *Clinical Cancer Research*, 2005, Vol. 11, pp. 5381-5389.

Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyuturk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC, Djamgoz MB. "Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis", *Clinical Cancer Research*, 2005, Vol. 11, pp. 5381-5389.

Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyuturk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC, Djamgoz MB. "Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis", *Clinical Cancer Research*, 2005, Vol. 11, pp. 5381-5389.

Fraser SP, Diss JKJ, Lloyd LJ, Pani F, Chioni AM, George A, Djamgoz MBA. "T-Lymphocyte Invasiveness: Control by Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity", *FEBS Letters*, 2004, Vol. 569, pp. 191-194.

Fraser SP, Diss JKJ, Lloyd LJ, Pani F, Chioni AM, George A, Djamgoz MBA. "T-Lymphocyte Invasiveness: Control by Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity", *FEBS Letters*, 2004, Vol. 569, pp. 191-194.

Fraser SP, Diss JKJ, Mycielska ME, Coombes RC, Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel expression in human breast cancer cells: possible functional role in metastasis. *Breast Cancer Res Trends*, 2002, 76: S142.

Fraser SP, Salvador V, Djamgoz MBA. "Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity Contributes to Rodent Prostate Cancer Cell Migration in vitro", *Journal of Physiology*, 1998, Vol. 513, pp. 131.

Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M, Berridge RJ, Djamgoz MB. "Contribution of Functional Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression to Cell Behaviors Involved in the Metastatic Cascade in Rat Prostate Cancer: I. Lateral Motility", *The Journal of Physiology*, 2003, Vol. 195, pp. 479-487.

Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M, Berridge RJ, Djamgoz MB. "Contribution of Functional Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression to Cell Behaviors Involved in the Metastatic Cascade in Rat Prostate Cancer: I. Lateral Motility", *The Journal of Physiology*, 2003, Vol. 195, pp. 479-487.

Freireich EJ, Kurzrock R, Estrov Z. "Metastasis an Alternative Hypothesis", *Cancer*, 2005, Vol. 103, pp. 1537-1539.

Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z. “Effects of Raf Kinase Inhibitor Protein Expression on Suppression of Prostate Cancer Metastasis”, *Journal of National Cancer Institute*, 2003, Vol. 95, pp. 878-889.

Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M, Soldovieri MV, Miceli F, Amoroso S, Annunziato L, Procopio A, Tagliatela M. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006, 38, 1146–1159.

Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003, 22: 359–74.

Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American cancer society 1.3, 2007: 52.

Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer, *Biomolecular Engineering*, 2006, 23, 17-34 p.

Gauthier N, Lohm S, Touzery C, Chantome A, Perette B, Reveneau S, Brunotte F, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF. “Tumor-Derived and Host-Derived Nitric Oxide Differentially Regulate Breast Carcinoma Metastasis to the Lungs. *Carcinogenesis*, 2004, Vol. 25, pp. 1559-1565.

Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL. “Influence of TP53 Gene Alterations and C-ErbB-2 Expression on the Response to Treatment with Doxorubicin in Locally Advanced Breast Cancer”, *Cancer Research*, 2001, Vol. 61, pp. 2505-2012.

Gerald K. *Cell and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, Florida, 2002, 4th Edition, 451-455 p.

Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2003, 19: 173–206.

Gildea JJ, Seraj MJ, Oxford G, Harding MA, Hampton GM, Moskaluk CA. “Rhogd2 is an Invasion and Metastasis Suppressor Gene in Human Cancer”, *Cancer Research*, 2002, Vol. 62, pp. 6418-6423.

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(13), 8680-8691.

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2009, 284:8680–91.

Gold MS, Levine JD, Correa AM. “Modulation of TTX-R I by PKC and Their Role in PGE Induced Sensitization of Rat Sensory Neurons in vitro”, *The Journal of Neuroscience*, 1998, Vol. 18, pp. 10345-10355.

Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP. “Melanoma Metastasis Suppression by Chromosome 6: Evidence for a Pathway Regulated by CRSP3 and TXNIP”, *Cancer Research*, 2003, Vol. 63, pp. 432-440.

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 2000, 28: 365-68.

Goldin AL, Snutch T, Lubbert H, Dowsett A, Marshall J, Auld V, Downey W, Fritz LC, Lester HA, Dunn R. “Messenger RNA Coding for only the Alpha Subunit of the Rat Brain Na Channel is Sufficient for Expression of Functional Channels in *Xenopus* Oocytes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, Vol. 83, pp. 7503-7507.

Goldin AL. “Resurgence of Sodium Channel Research”, *Annual Reviews of Physiology*, 2001, Vol. 63, pp. 871-894.

Gosling M, Harley SL, Turner RJ, Carey N, Powell JT. “Human Saphenous Vein Endothelial Cells Express a Tetrodotoxin-Resistant, Voltage-Gated Sodium Current”, *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, Vol. 273, pp. 21084-21090.

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. "Methylation Patterns of the E-Cadherin 5' CpG Island are Unstable and Reflect the Dynamic, Heterogeneous Loss of E-Cadherin Expression During Metastatic Progression", *Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, pp. 2727-2732.

Graham NA, Asthagiri AR. Epidermal growth factor-mediated T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional activity is essential but not sufficient for cell cycle progression in nontransformed mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(22), 23517-23524.

Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of drug targeting*, 2007, 15(7-8), 457-464.

Grimes JA, Fraser SP, Stepes GJ, Downing JEG, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MBA. "Differential Expression of Voltage-Activated Na⁺ Currents in Two Prostatic Tumour Cell Lines: Contribution to Invasiveness in vitro", *FEBS Letters*, 1995, Vol. 369, pp. 290-294.

Grimes JA, Fraser SP, Stepes GJ, Downing JEG, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MBA. "Differential Expression of Voltage-Activated Na⁺ Currents in Two Prostatic Tumour Cell Lines: Contribution to Invasiveness in vitro", *FEBS Letters*, 1995, Vol. 369, pp. 290-294.

Grimes MM. "Cystosarcoma Phyllodes of the Breast: Histologic Features, Flow Cytometric Analysis, and Clinical Correlations", *Modern Pathology*, 1992, Vol. 5, pp. 232-239.

Grobhans H, Filipowicz W. *Molecular Biology: The expanding world of small RNAs*, Nature. 2008, 24(451), 414-416 p.

Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. "Drg-1 as a Differentiation-Related, Putative Metastatic Suppressor Gene in Human Colon Cancer", *Cancer Research*, 2000, Vol. 60, pp. 749-755.

Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, Rabbani SA. "Regulation of DNA Methylation in Human Breast Cancer: Effect on the Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene Production and Tumor Invasion", *Journal of Biological Chemistry*, 2002, Vol. 277, pp. 41571-41579.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS. NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology*, 1999, 19(8), 5785-5799.

Gündoğdu R, Çelik V. RNA İnterferans (RNAi), *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2009, 25(1-2), 34-47 s.

Halder J, Kamat AA, Jr Landen CN, Han LY, Lutgendorf SK, Lin YG, Merritt WM, Jennings NB, Chavez-Reyes A, Coleman RL, Gershenson DM, Schmandt R, Cole SW, Lopez-Berestein G, Sood AK. Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy, *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 4916–4924.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, *Nature*, 2000, 404, 293–296.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100.1: 57-70.

Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. "Towards an Integrated Model for Breast Cancer Etiology: The Lifelong Interplay of Genes, Lifestyle, and Hormones", *Breast Cancer Research*, 2004, Vol. 6, pp. 213-218.

He J, Kargacin ME, Kargacin GJ, Ward CA. Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricularmyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003, 285(2):H661-668.

He Y, Liu XD, Chen ZY, Zhu J, Xiong Y, Li K, Dong JH, Li X. Interaction between cancer cells and stromal fibroblasts is required for activation of the uPAR-uPA-MMP-2 cascade in pancreatic cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(11), 3115-3124.

Heinemann SH, Terlau H, Imoto K. “Molecular Basis for Pharmacological Differences Between Brain and Cardiac Sodium Channels”, *Pflugers Archive*, 1992, Vol. 422, pp. 90-92.

Henderson BE. *Hormones, Genes and Cancer*, 2003, Oxford University Press, New York.

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin B. “Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 Gene is Frequently Associated with Aberrant DNA Methylation in all Common Human Cancers”, *Cancer Research*, 1995, Vol. 55, pp. 4525-4530.

Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, Rivera M, Gomora JC. Overexpression of Nav1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 2012, 130, 2013–2023.

Herranz M, Esteller M. DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol.* 2007; 361:25-62.

Hill AD, Doyle JM, Mcdermott EW, O’Higgins NJ. “Hereditary Breast Cancer”, *British Journal of Surgery*, 1997, Vol. 84, pp. 1334-1339.

Hoffmann EK, Lambert IH. Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 369(1638), 20130109.

Hollas W, Blasi F, Boyd D. “Role of the Urokinase Receptor in Facilitating Extracellular Matrix Invasion by Cultured Colon Cancer”, *Cancer Research*, 1991, Vol. 51, pp. 3690-3695.

Holleran JL, Miller CJ, Edgehouse NL, Pretlow TP, Culp LA. “Differential Experimental Micrometastasis to Lung, Liver, and Bone with LacZTagged CWR22R Prostate Carcinoma Cells”, *Clinical and Experimental Metastasis*, 2002, Vol. 19, pp. 17-24.

Holmgren L, O’Reilly MS, Folkman J. “Dormancy of Micrometastases: Balanced Proliferation and Apoptosis in the Presence of Angiogenesis Suppression”, *Nature Medicine*, 1995, Vol. 2, pp.149-153.

Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2: 91–100.

Horton J. “Trastuzumab Use in Breast Cancer: Clinical Issues”, *Cancer Control*, 2002, Vol. 9, pp. 499-507.

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM, Lee NH. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer research*, 2010, 70(17), 6957-6967.

Hu XC, Wong IH, Chow LW. “Tumor-Derived Aberrant Methylation in Plasma of Invasive Ductal Breast Cancer Patients: Clinical Implications”, *Oncology Reports*, 2003, Vol. 10, pp. 1811-1815.

Huang K, El-Husseini A. “Modulation of Neuronal Protein Trafficking and Function by Palmitoylation”, *Current Opinion in Neurobiology*, 2005, Vol. 15, pp. 527-535.

Huang Y, Rane SG. “Potassium Channel Induction by the Ras/Raf Signal Transduction Cascade”, *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, Vol. 269, pp. 31183-31189.

Hunter DJ, Willett WC. “Diet, Body Build and Breast Cancer”, *Annual Review of Nutrition*, 1994, Vol. 14, pp. 393-418.

Hutson SW, Cowen PN, Bird CC. “Morphometric Studies of Age Related Changes in Normal Human Breast and Their Significance for Evolution of Mammary Cancer”, *American Journal of Clinical Pathology*, 1985, Vol. 38, pp. 281-287.

International Agency for Research on Cancer. IARC Tp53 mutation database. Database Downloads: Data set of Mutation. [Erişim Tarihi: 14 Kasım 2008] Erişim: <http://www-p53.iarc.fr/>

Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H. “CXCR4 Expression is Associated with Lymph-Node Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma”, *International Journal of Oncology*, 2006, Vol. 28, pp. 61-66.

Isom LL. “Sodium Channel Beta Subunits: Anything but Auxiliary”, *Neuroscientist*, 2001, Vol. 7, pp. 42-54.

Isom LL. "The Role of Sodium Channels in Cell Adhesion", *Frontiers in Bioscience*, 2002, Vol. 7, pp. 12-23.

İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi, 2006, (54), 65-71.

Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature reviews Drug discovery*, 2010, 9(1), 57-67.

Jackson DN, Foster DA. "The enigmatic protein kinase C δ : complex roles in cell proliferation and survival," *FASEB Journal*, 2004, vol. 18, no. 6, pp. 627–636.

Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S. "Blockage of Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Inhibit Human Pancreatic Cancer Cell Growth in vitro", *Molecular Pharmacology*, 2004, Vol. 65, pp. 630-638.

Jin S, Zhao H, An FF, Blanck P, Fan W, Colchagie AB, Fornace AJ, Zhan Q. "BRCA1 Activation of the GADD45 Promoter", *Oncogene*, 2000, Vol. 19, pp. 4050-4057.

Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M. The role of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation. *Molecular human reproduction*, 2004, 10(2), 91-97.

Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, Heinecke A, Pantel K, Izbicki JR. "Tumor-Cell Homing to Lymph Nodes and Bone Marrow and CXCR4 Expression in Esophageal Cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, Vol. 97, pp. 1840-1847.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. "A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone", *Cancer Cell*, 2003, Vol. 3, pp. 537-549.

Karagüzel A, Kalay E, Celep F. RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2007, 33(1), 41-44 s.

Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *The American journal of pathology*, 1997, 150(1), 15.

Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 1035–1042.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Research*, 1994, 54(2), 380-385.

Kiley SC, Clark KJ, Goodnough M, Welch DR, Jaken S. Protein kinase C delta involvement in mammary tumor cell metastasis. *Cancer Res.* 1999, 59, 3230–3238.

Kim CH, Gupta S. Expression of TRAIL (Apo2L), DR4 (TRAIL receptor 1), DR5 (TRAIL receptor 2) and TRID (TRAIL receptor 3) genes in multidrug resistant human acute myeloid leukemia cell lines that overexpress MDR 1 (HL60/Tax) or MRP (HL60/AR). *Int J Oncol*, 2000, 16:1137–1139.

Kim CJ, Cho YG, Jeong SW, Kim YK, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. “Altered Expression of KCNK9 in Colorectal Cancers”, *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 2004, Vol. 112, pp. 588-594.

Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin $\alpha\beta3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin $\alpha5\beta1$ and protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(43), 33920-33928.

King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations of BRCA1 and BRCA2. *Science*, 2003, 302(5645), 643-646.

Kita Y, Tseng J, Horan T, Wen J, Philo J, Chang D, Ratzkin B, Pacifici R, Brankow D, Hu S, Luo Y, Wen D, Arakawa T, Nicolson M. “ErbB Receptor Activation, Cell Morphology Changes, and Apoptosis Induced by Anti- Her2 Monoclonal Antibodies”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, Vol. 226, pp. 59-69.

Klugbauer N, Lacinova L, Flockerzi V, Hofmann F. "Structure and Functional Expression of a New Member of the Tetrodotoxin-Sensitive Voltage-Activated Sodium-Channel Family from Human Neuroendocrine Cells", *EMBO Journal*, 1995, Vol. 14, pp. 1084-1090.

Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 2003, 22(21), 3205-3212.

Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, De Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 1998, 152 (4), 885.

Koçak S. "Kimler Meme Kanseri Olur?" *Klinik Bilimler ve Doktor*, 2000, Ocak, 6 (1), s:68-72.

Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med*, 2006, 38: 200–211.

Kraner SD, Chong JA, Tsay HJ, Mandel G. "Silencing the Type II Sodium Channel Gene: A Model for Neural-Specific Gene Regulation", *Neuron*, 1992, Vol. 9, pp. 37-44.

Krasowska M, Grzywna ZJ, Mycielska ME, Djamgoz MBA. "Patterning of Endocytic Vesicles and its Control by Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity in Rat Prostate Cancer Cells: Fractal Analyses," *European Biophysics Journal*, 2004, Vol. 33, pp. 535-542.

Krop IE, SgROI D, Porter DA, Lunetta KL, Levangie R, Seth P, Kaelin CM, Rhei E, Bosenberg M, Schnitt S, Marks JR, Pagon Z, Belina D, Razumovic J, Polyak K. "HIN-1, a Putative Cytokine Highly Expressed in Normal but not Cancerous Mammary Epithelial Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, Vol. 98, pp. 9796-9801.

Kunisue H, Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, Kurosumi M, Amamoto YS, Tanaka K, Doihara H, Shimizu N, Sonoo H. "Anti-HER2 Antibody Enhances the Growth Inhibitory Effect of Anti-Oestrogen on Breast Cancer Cells Expressing Both Oestrogen Receptors and HER2", *British Journal of Cancer*, 2000, Vol. 82, pp. 46-51.

Land CE, Tokunaga M, Koyama K, Soda M, Preston DL, Nishimori I, Tokuoka S. "Incidence of Female Breast Cancer Among Atomic Bomb Survivors 1950-1985", *Radiation Research*, 1994, Vol. 138, pp. 209-223.

Landen CN, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer research*, 2005, 65(15), 6910-6918.

Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Bohmer C, Vallon V. "Regulation of Channels by the Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase - Implications for Transport, Excitability and Cell Proliferation", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2003, Vol. 13, pp. 41-50.

Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MBA, Abel PD. "Expression and Functional Analysis of Voltage-Activated Na⁺ Channels in Human Prostate Cancer Cell Lines and their Contribution to Invasion in vitro", *American Journal of Pathology*, 1997, Vol. 150, pp. 1213-1221.

Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, Davidson NE. "Methylation of Estrogen and Progesterone Receptor Gene 5' CpG Islands Correlates with Lack of Estrogen and Progesterone Receptor Gene Expression in Breast Tumors", *Clinical Cancer Research*, 1996, Vol. 2, pp. 805-810.

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A. "A Herg1 Gene and HERG1 Protein are Overexpressed in Colorectal Cancers and Regulate Cell Invasion of Tumor Cells", *Cancer Research*, 2004, Vol. 64, pp. 606-611.

Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5'cap," *Nature*, 1990, vol. 345, no. 6275, pp. 544-547.

Lee BJ, Adair F. "Traumatic Fat Necrosis of the Female Breast and its Differentiation from Carcinoma", *Annals of Surgery*, 1920, Vol. 72, pp. 188-190.

Lee DY, Chai YG, Lee EB, Kim KW, Nah SY, Oh TH, Rhim H. “17 B-Estradiol Inhibits High-Voltage-Activated Calcium Channel Currents in Rat Sensory Neurons via a Non-Genomic Mechanism”, *Life Sciences*, 2002, Vol. 70, pp. 2047-2059.

Lee GY, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends in biotechnology*, 2007, 25(3), 111-118.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE. “Kiss-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene”, *Journal of National Cancer Institute*, 1996, Vol. 88, pp. 1731-1737.

Lee JH, Park JW, Byun JK, Kim HK, Ryu PD, Lee SY, Kim DY. Silencing of voltage-gated potassium channel KV9. 3 inhibits proliferation in human colon and lung carcinoma cells. *Oncotarget*, 2015, 6(10), 8132-8143.

Lehen'kyi VY, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N. Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011, 301(6), C1281-C1289.

Leroux A, London IM. “Regulation of protein synthesis by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α in intact reticulocytes and reticulocyte lysates,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, vol. 79, no. 7 I, pp. 2147–2151.

Li J, Chen L, Du L, Li M. Cage the firefly luciferin!—a strategy for developing bioluminescent probes. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(2), 662-676.

Liao DJ, Thakur A, Wu J, Biliran H, Sarkar FH. Perspectives on c-Myc, Cyclin D1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to chemotherapy. *Crit Rev Oncog*, 2007, 13: 93–158.

Lichtenberg F. Yeni İlaçların Ekonomik Yararları. Hacettepe Üniversitesi Sağlık İdaresi Yüksekokulu tarafından düzenlenen toplantıda yapılan sunum, 2002.

Liu CJ, Dib-Hajj SD, Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. “Modulation of the Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Fibroblast Growth Factor 1B”, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol. 278, pp. 1029-1036.

Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer research*, 2008, 68.10: 3551-3557.

Longnecker M. "Alcoholic Beverage Consumption in Relation to Risk of Breast

Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SKG, Lopatin AN, Isom LL. Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol*. 2007, 43:636-47.

Ma YX, Tomita Y, Fan S, Wu K, Tong Y, Zhao Z, Song LN, Goldberg ID, Rosen EM. "Structural Determinants of the BRCA1: Estrogen Receptor Interaction", *Oncogene*, 2005, Vol. 24, pp. 1831-1846.

Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*, 2000, 19(23), 2739-2744.

Maioli E, Torricelli C, Valacchi G. Rottlerin and cancer: novel evidence and mechanisms. *Scientific World Journal*, 2012, 2012:350826.

Malik-Hall M, Poon WYL, Baker MD, Wood JN, Okuse K. "Sensory Neuron Proteins Interact with the Intracellular Domains of Sodium Channel Na(v)1.8", *Molecular Brain Research*, 2003, Vol. 110, pp. 298-304.

Maltsev VA, Undrovinas AI. "Cytoskeleton Modulates Coupling Between Availability and Activation of Cardiac Sodium Channel", *American Journal of Physiology*, 1997, Vol. 273, pp. 1832-1840.

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. "Structure and Function of Voltage- Gated Sodium Channels", *The Journal of Physiology*, 1998, Vol. 508, pp. 647-657.

Marcus JN, Watson P, Pate DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, Linder- Stephenson L, Salerno G, Conway TA, Lynch HT. "Hereditary Breast Cancer: Pathobiology, Prognosis, and BRCA1 and BRCA2 Gene Linkage", *Cancer*, 1996, Vol. 77, pp. 697-709.

Marx A, Siara J, Ruedel R. "Sodium and Potassium Channels in Epithelial Cells from Thymus Glands and Thymomas of Myasthenia Gravis Patients", *Phlùgers Archive*, 1991, Vol. 471, pp. 537-539.

Mason JB, Levesque T. "Folate: Effects on Carcinogenesis and the Potential for Cancer Chemoprevention", *Oncology*, 1996, Vol. 10, pp. 1727-1736.

Mathers C, Fat DM, Boerma JT. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization, 2008.

McCracken MA, Miraglia LJ, McKay RA, Strobl JS. Protein kinase C delta is a prosurvival factor in human breast tumor cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2003, 2, 273–281.

Merino MJ, LiVolsi VA. "Signet Ring Carcinoma of the Female Breast: A Clinicopathologic Analysis of 24 Cases", *Cancer*, 1981, Vol. 48, pp. 1830-1837.

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:924–935.

Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer, *N. Engl. J. Med.* 2008, 359 (25), (18) 2641–2650.

Meyer JS. "Cell Kinetics of Histologic Variants of in situ Breast Carcinoma", *Breast Cancer Research and Treatment*, 1986, Vol. 7, pp. 171-180.

Meyer R, Schonherr R, Gavrilova-Ruch O, Wohlrab W, Heinemann SH. "Identification of Ether a go-go and Calcium-Activated Potassium Channels in Human Melanoma Cells", *The Journal of Membrane Biology*, 1999, Vol. 171, pp. 107-115.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. "A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1," *Science*, 1994, Vol. 266, pp. 66-71.

Miller AB, Howe GR, Sherman GJ, Lindsay JP, Yaffe MJ, Dinner PJ, Risch HA, Preston DL. "Mortality from Breast Cancer After Irradiation During Fluoroscopic Examinations in Patients Being Treated for Tuberculosis", *The New England Journal of Medicine*, 1989, Vol. 321, pp. 1285-1289.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. "Genes that Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung", *Nature*, 2005, Vol. 436, p. 518-524.

Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006, 18: 516–23.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *The Journal of cell biology*, 1995, 131(3), 791-805.

Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7, 519–530.

Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2004, 1705(2), 69-89.

Moon C, Soria JC, Jang SJ, Lee J, Hoque MO, Sibony M, Trink B, Chang YS, Sidransky D, Mao L. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, 2003, 22, 6699–6703.

Mori N, Schoenherr C, Vandenberg DJ, Anderson DJ. "A Common Silencer Element in the SCG10 and Type II Na⁺ Channel Genes Binds a Factor Present in Nonneuronal Cells but not in Neuronal Cells", *Neuron*, 1992, Vol. 9, pp. 45-54.

Mu D, Chen L, Zhang X, See LH, Koch CM, Yen C, Tong JJ, Spiegel L, Nguyen KC, Servoss A, Peng Y, Pei L, Marks JR, Lowe S, Hoey T, Jan LY, McCombie WR, Wigler MH, Powers S. "Genomic Amplification and Oncogenic Properties of the KCNK9 Potassium Channel Gene", *Cancer Cell*, 2003, Vol. 3, pp. 297-302.

Muir CS. "Cancer Incidence in Five Continents. Classification", IARC Scientific Publications, 1992, Vol. 120, pp.25-30.

Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B, Hoffmann TK. "Chemokine Receptors in Head and Neck Cancer: Association with Metastatic Spread and Regulation During Chemotherapy", *International Journal of Cancer*, 2006, Vol. 118, pp. 2147-2157.

Murad TM, Contesso G, Mouriesse H. "Papillary Tumors of Large Lactiferous Ducts", *Cancer*, 1981, Vol. 48, pp. 122-133.

Murata H, Hattar KNH, Kang Y, Gu L, Li GM. "Genetic and Epigenetic Modification of Mismatch Repair Genes Hmsh2 and Hmlh1 in Sporadic Breast Cancer with Microsatellite Instability", *Oncogene*, 2002, Vol. 21, pp. 5696-5703.

Murphy BJ, Rossie S, DeJongh KS, Catterall WA. "Identification of the Sites of Selective Phosphorylation and Dephosphorylation of the Rat Brain Sodium Channel, Subunit by cAMP Dependent Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatases", *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, Vol. 268, pp. 27355-27362.

Mycielska ME, Djamgoz MBA. "Cellular Mechanisms of Direct-Current Electric Field Effects: Galvanotaxis and Metastatic Disease", *Journal of Cell Science*, 2004, Vol. 117, pp. 1631-1639.

Mycielska ME, Djamgoz MBA. "Cellular Mechanisms of Direct-Current Electric Field Effects: Galvanotaxis and Metastatic Disease", *Journal of Cell Science*, 2004, Vol. 117, pp. 1631-1639.

Mycielska ME, Fraser SP, Szatkowski M, Djamgoz MBA. "Contribution of Functional Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression to Cell Behaviours Involved in the Metastatic Cascade in Rat Prostate Cancer: II. Secretory Membrane Activity", *Journal of Cellular Physiology*, 2003, Vol. 195, pp. 461-469.

Mycielska ME, Fraser SP, Szatkowski M, Djamgoz MBA. "Contribution of Functional Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression to Cell Behaviours Involved in the Metastatic Cascade in Rat Prostate Cancer: II. Secretory Membrane Activity", *Journal of Cellular Physiology*, 2003, Vol. 195, pp. 461-469.

Mycielska ME, Palmer CP, Brackenbury WJ, Djamgoz MB. Expression of Na⁺-dependent citrate transport in a strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Physiol.* 2005, 563:393–408.

Nagase H, Woessner JF. “Matrix Metalloproteinases”, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274, pp. 21491-21494.

Niwa Y, Oyama T, Nakajima T. “BRCA1 Expression Status in Relation to DNA Methylation of the BRCA1 Promoter Region in Sporadic Breast Cancers”, *Japanese Journal of Cancer Research*, 2000, Vol. 91, pp. 519-526.

Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Kuroda J, Sato K, Segawa H, Yokota A, Maekawa T. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer letters*, 2005, 217(2), 243-253.

Norberg T, Lennerstrand J, Inganas M, Bergh J. “Comparison Between P53 Protein Measurements Using the Luminometric Immunoassay and Immunohistochemistry with Detection of P53 Gene Mutations Using cDNA Sequencing in Human Breast Tumors”, *International Journal of Cancer*, 1998, Vol. 79, pp. 376-383.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976, 194.4260: 23-28.

Numann R, Catterall WA, Scheuer T. “Functional Modulation of Brain Sodium Channels by Protein Kinase C Phosphorylation”, *Science*, 1991, Vol. 254, pp. 115-118.

Ogata K, Jeong SY, Murakami H, Hashida H, Suzuki T, Masuda N, Hirai M, Isahara K, Uchiyama Y, Goto J, Kanazawa I. “Cloning and Expression Study of the Mouse Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Sodium Channel Alpha Subunit Nat/Scn11a”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, Vol.267, pp. 271-277.

O'Hara MF, Page DL. Adenomas of the breast and ectopic breast under lactational influences. *Human pathology*, 1985, 16(7), 707-712.

Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, Fromentel de CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer gene therapy*, 2009: 16(1), 1-12.

Onat H. Meme Kanseri Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi, Ed., Topuz E, 3. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Servisleri Yayınları, 1997.

Onganer PU, Djamgoz MBA. "Small-Cell Lung Cancer (Human): Potentiation of Endocytic Membrane Activity by Voltage-Gated Na Channel Expression in vitro", The Journal of Membrane Biology, 2005, Vol. 204, pp. 67-75.

Onganer PU, Djamgoz MBA. "Small-Cell Lung Cancer (Human): Potentiation of Endocytic Membrane Activity by Voltage-Gated Na Channel Expression in vitro", The Journal of Membrane Biology, 2005, Vol. 204, pp. 67-75.

Onkal R, Djamgoz MB. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. Eur J Pharmacol. 2009, 625:206–19.

Ou SW, Kameyama A, Hao LY, Horiuchi M, Minobe E, Wang WY, Makita N, Kameyama M. "Tetrodotoxin-Resistant Na⁺ Channels in Human Neuroblastoma Cells are Encoded by New Variants of Nav1.5/SCN5A", European Journal of Neuroscience, 2005, Vol. 4, pp. 793-801.

Ou Y, Gibbons SJ, Miller SM, Strege PR, Rich A, Distad MA, Ackerman MJ, Rae JL, Szurszewski JH, Farrugia G. "SCN5A is Expressed in Human Jejunal Circular Smooth Muscle Cells", Neurogastroenterology Motility, 2002, Vol. 5, pp. 477-486.

Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis, 1998, 3 (2), 115-121.

Ozpolat B, Akar U, Tekedereli I, Alpay SN, Barria M, Gezgen B, Zhang N, Coombes K, Kornblau S, Lopez-Berestein G. PKC δ regulates translation initiation through PKR and eIF2 α in response to retinoic acid in acute myeloid leukemia cells. Leukemia research and treatment, 2012, 17, doi: 10.1155/2012/482905.

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. Advanced drug delivery reviews, 2014, 66, 110-116.

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer, *J. Intern. Med*, 2010, 267 (1), 44–53.

Özkan S, Keskinç B. Türkiye Kanser İstatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2015.

Özmen V. Dünya'da ve Türkiye'de meme kanseri. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2008, 4(2): 7-9.

Özmen V. Meme Hastalıkları Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2012.

Page DL, Vander Zwaag R, Rogers LW, Williams LT, Walker WE, Hartmann WH. “Relation Between Component Parts of Fibrocystic Disease Complex and Breast Cancer”, *Journal of the National Cancer Institute*, 1978, Vol. 61, pp.1055-1063.

Page DL. “Prognosis and Breast Cancer: Recognition of Lethal and Favorable Prognostic Types”, *The American Journal of Surgical Pathology*, 1991, Vol. 15, pp. 334-349.

Paget S. “The Distribution of Secondary Growths in Cancer of The Breast”, *Cancer Metastasis Reviews*, 1889, Vol. 2, pp. 98-101.

Palmer CP, Mycielska ME, Burcu H, Osman K, Collins T, Beckerman R, Perrett R, Aydar E, Djamgoz MBA. A micro-pressure system for measuring single cell adhesion: application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *Eur Biophys J*, 2007, Vol. 37: 359-68.

Palmer CP, Mycielska ME, Burcu H, Osman K, Collins T, Beckerman R, Perrett R, Johnson H, Aydar E, Djamgoz MBA. Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *Eur. Biophys. J.* 2008, 37, 359–368.

Pan Q, Cai R, Liu X, Qian C. A novel strategy for cancer gene therapy: RNAi, *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(10), 1145-1151 p.

Pancotti F, Roncuzzi L, Maggiolini M, Gasperi-Campani A. Caveolin-1 silencing arrests the proliferation of metastatic lung cancer cells through the inhibition of STAT3 signaling. *Cellular signalling*, 2012, 24(7), 1390-1397.

Pancrazio JJ, Viglione MP, Tabbara IA, Kim YI. "Voltage-Dependent Ion Channels in Small-Cell Lung Cancer Cells", *Cancer Research*, 1989, Vol. 9, pp. 5901-5906.

Panner A, Wurster RD. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium*, 2006, 40, 253–259.

Pappalardo LW, Samad OA, Black JA, Waxman SG. Voltage-gated sodium channel Nav1.5 contributes to astrogliosis in an in vitro model of glial injury via reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Glia*, 2014, 62(7), 1162-1175.

Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *The Journal of membrane biology*, 2005, 205(3), 115-124.

Pardo LA, Del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W. "Oncogenic Potential of EAG K(+) Channels", *The EMBO Journal*, 1999, Vol. 18, pp. 5540-5547.

Park JJ, Irvine RA, Buchanan G, Koh SS, Park JM, Tilley WD, Stallcup MR, Press MF, Coetzee GA. "Breast Cancer Susceptibility Gene 1 (BRCA1) is a Coactivator of the Androgen Receptor", *Cancer Research*, 2000, Vol. 60, pp. 5946-5949.

Park YG, Zhao X, Lesueur F, Lowy DR, Lancaster M, Pharoah P, Qian X, Hunter KW. "Sipa1 is a Candidate for Underlying the Metastasis Efficiency Modifier Locus Mtes1", *Nature Genetics*, 2005, Vol. 37, pp. 1055-1062.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J, Bray F. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2002, 55:74–108.

Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science*, 2003, 116(8), 1409-1416.

Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics*, 2005, Oxford University Press, New York.

Pehlivan S, Durmaz B, Aykur A, Özkınay F. Küçük RNA'ların etki mekanizmaları ve önemi, *ARŞİV Kaynak Tarama Dergisi*, 2006, 15, 320-330 s.

Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR. "CaT1 Expression Correlates with Tumor Grade in Prostate Cancer", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, Vol. 282, pp. 729-734.

Phillips WA, St Clair F, Munday AD, Thomas RJ, Mitchell CA. Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer*, 1998, 83, 41–47.

Piros ET, Shen L, Huang XY. "Purification of an EH Domain-Binding Protein from Rat Brain that Modulates the Gating of the Rat Ether-a-Go-Go Channel", *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274, pp. 33677-33683.

Piva R, Rimondi AP, Hanau S, Maestri I, Alvisi A, Kumar VL, Del Senno L. "Different Methylation of Oestrogen Receptor DNA in Human Breast Carcinomas with and without Oestrogen Receptor", *British Journal of Cancer*, 1990, Vol. 61, pp. 270-275.

Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*. 2004, 23: 7928–46.

Poller DN, Snead DRJ, Roberts EC. "Oestrogen Receptor Expression in Ductal Carcinoma in situ of the Breast: Relationship to Flow Cytometric Analysis of DNA and Expression of the C-erbB-2 Oncoprotein", *British Journal of Cancer*, 1993, Vol. 68, pp. 156-161.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 2010, Vol.16, No.3, 107-121.

Qiu TH, Chandramouli GV, Hunter KW, Alkharouf NW, Green JE, Liu ET. "Global Expression Profiling Identifies Signatures of Tumor Virulence in MMTV-PyMT-Transgenic Mice: Correlation to Human Disease", *Cancer Research*, 2004, Vol. 64, pp. 5973-5981.

Quadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, Delcourt P, Prevarskaya N. "Changes in the K⁺ Current-Density of MCF-7 Cells During Progression Through the Cell Cycle: Possible Involvement of a H-Ether A-Gogo K⁺ Channel", *Receptors Channels*, 2001, Vol. 7, pp. 345-356.

Quadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Ahidouch A, Delcourt P, Prevarskaya N. “Cell-Cycle-Dependent Expression of the Large Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Breast Cancer Cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004a, Vol. 316, pp. 244-251.

Quadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N. “Functional and Molecular identification of Intermediate-Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channels in Breast Cancer Cells: Association with Cell Cycle Progression”, *American Journal of Physiology. Cell physiology*, 2004b, Vol. 287, pp. 125-134.

Rajasekaran SA, Gopal J, Rajasekaran AK. “Expression of Na,K-ATPase Beta-Subunit in Transformed MDCK Cells Increases the Translation of The Na,K-ATPase Alpha-Subunit”, *Annals of New York Academy Sciences*, 2003, Vol. 986, pp. 652-654.

Rane SG. “The Growth Regulatory Fibroblast IK Channel is the Prominent Electrophysiological Feature of Rat Prostatic Cancer Cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, Vol. 269, pp. 457-463.

Ratcliffe CF, Qu YS, McCormick KA, Tibbs VC, Dixon JE, Scheuer T, Catterall WA. “A Sodium Channel Signaling Complex: Modulation by Associated Receptor Protein Tyrosine Phosphatase”, *Nature Neuroscience*, 2000, Vol. 3, pp. 437-444.

Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22: 395–403.

Reddy LS, Sarojamma V, Ramakrishna V. Future of RNAi in Medicine: A review, *World Journal of Medical Sciences*, 2007, 2(1), 1-14p.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5:897–907.

Roderick C, Reinach PS, Wang L, Lu L. “Modulation of Rabbit Corneal Epithelial Cell Proliferation by Growth Factor-Regulated K(+) Channel Activity”, *The Journal of Membrane Biology*, 2003, Vol. 196, pp. 41-50.

Roger S, Besson P, Le Guennec JY. "Involvement of a Novel Fast Inward Sodium Current in the Invasion Capacity of a Breast Cancer Cell Line", *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2003, Vol. 1616, pp. 107-111.

Roger S, Besson P, Le Guennec JY. "Involvement of a Novel Fast Inward Sodium Current in the Invasion Capacity of a Breast Cancer Cell Line", *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2003, Vol. 1616, pp. 107-111.

Roger S, Besson P, Le Guennec JY. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta*; 2003, 1616: 107-111.

Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Iochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, 39(4), 774-786.

Rogers K. "Breast Abscesses and Problems with Lactation in Smallwood" in J. A., Taylor (eds), *Benign Breast Disease*, 1990, Urban and Schwarzenberg Baltimore, pp. 125-129.

Roselli F, Livrea P, Jirillo E. Voltage-gated sodium channel blockers as immunomodulators. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2006, 1: 83-91.

Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW. "Breast Carcinoma at the Extremes of Age: A Comparison of Patients Younger than 35 Years and Older than 75 Years", *Journal of Surgical Oncology*, 1985, Vol. 28, pp. 90-96.

Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 1155-1164.

Ruest PJ, Shin NY, Polte TR, Zhang X, Hanks SK. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Molecular and cellular biology*, 2001, 21(22), 7641-7652.

Russo J, Russo IH. "Development of the Human Mammary Gland" in *The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function*, Plenum Press, New York and London, 1987, pp. 111-131.

Russo J, Russo IH. "Differentiation and Breast Cancer", *Medicina*, 1997, Vol. 57, pp. 81-91.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br. J. Cancer*, 2002, 87, 621–623.

Sağlık Bakanlığı, Ulusal Hastalık Yüku ve Maliyet Etkililik Çalışması, Ankara. 2004
Erişim: www.hm.saglik.gov.tr [Erişim Tarihi: Mayıs 2007]

Sangameswaran L, Fish LM, Koch BD, Rabert DK, Delgado SG, Ilnicka M, Jakeman LB, Novakovic S, Wong K, Sze P, Tzoumaka E, Stewart GR, Herman RC, Chan H, Eglen RM, Hunter JC. "Novel Tetrodotoxin-Sensitive, Voltage-Gated Sodium Channel Expressed in Rat and Human Dorsal Root Ganglia", *Journal of Biological Chemistry*, 1997, Vol. 272, pp. 14805-14809.

Satin J, Kyle JW, Chen M, Bell P, Cribbs LL, Fozzard HA, Rogart RB. "A Mutant of TTX-Resistant Cardiac Sodium Channels with TTX-Sensitive Properties", *Science*, 1992, Vol. 256, pp. 1202-1205.

Saur D, Seidler B, Schneider G, Algul H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Schmid RM. "CXCR4 Expression Increases Liver and Lung Metastasis in a Mouse Model of Pancreatic Cancer", *Gastroenterology*, 2005, Vol. 129, pp. 1237-1250.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 1680–1688.

Schatzkin A, Longnecker M. "Alcohol and Breast Cancer: Where are We Now and Where Do We Go from Here?", *Cancer*, 1994, Vol. 74, pp. 1101-1110.

Schedin P, Elias A. "Multistep Tumorigenesis and the Microenvironment", *Breast Cancer Research*, 2004, Vol. 2, pp. 93-101.

Scholefield JH, Duncan JL, Rogers K. "Review of a Hospital Experience of Breast Abscesses", *The British Journal of Surgery*, 1987, Vol. 74, pp. 469-470.

Scholzova E, Malik R, Sevcik J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development, *Cancer Letters*, 2007, 246, 12-23 p.

Schreibmayer W, Dascal N, Lotan I, Walner M, Weigl L. "Molecular Mechanisms of Protein Kinase C Modulation of Sodium Channel α -Subunits Expressed in *Xenopus* Oocytes", *FEBS Letters*, 1991, Vol. 291, pp. 341-344.

Schwab A, Reinhardt J, Schneider SW, Gassner B, Schuricht B. "K(+) Channel-Dependent Migration of Fibroblasts and Human Melanoma Cells", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1999, Vol. 9, pp. 126-132.

Semiglazov VF, Sagaidak VN, Moiseyenko VM, Mikhailov EA. Study of the role of breast self-examination in the reduction of mortality from breast cancer. *Eur J Cancer*, 1993, 29A(14):2039-2046.

Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. "Functional Evidence for a Novel Human Breast Carcinoma Metastasis Suppressor, BRMS1, Encoded at Chromosome", *Cancer Research*, 2000, Vol. 60, pp. 2764-2769.

Shao XD, Wu KC, Hao ZM, Hong L, Zhang J, Fan DM. "The Potent Inhibitory Effects of Cisapride, a Specific Blocker for Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (HERG) Channel, on Gastric Cancer Cells", *Cancer Biology and Therapy*, 2005, Vol. 4, pp. 295-301.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* 1999, 21, 99-102.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics*, 1999, 21(1), 99-102.

Shepherd RD, Rinker KD. Bioluminescence-based ATP assays using a charge-coupled device imaging system. *Biotechniques*, 2004, 37(2), 208-210.

Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Krüppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic acids research*, 2000, 28(15), 2969-2976.

Shrager P. "Sodium Channels in Single Demyelinated Mammalian Axons", *Brain Research*, 1989, Vol. 483, pp.149-154.

Shteper PJ, Zcharia E, Ashhab Y, Peretz T, Vlodaysky I, Ben-Yehuda D. "Role of Promoter Methylation in Regulation of the Mammalian Heparanase Gene", *Oncogene*, 2003, Vol. 22, pp, 7737-7749.

Silva J, Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Cantos B, Rodriguez R, Larrondo FJ, Provencio M, Espana P, Bonilla F. "Concomitant Expression of P16INK4a and P14arf in Primary Breast Cancer and Analysis of Inactivation Mechanisms", *Journal of Pathology*, 2003, Vol. 199, pp. 289-297.

Silverstein MJ, Cohlman BF, Gierson ED, Furmanski M, Gamagami P, Colburn WJ, Lewinsky BS, Waisman JR. "Duct Carcinoma in situ: 227 Cases without Microinvasion", *European Journal of Cancer*, 1992, Vol. 28, pp. 630-634.

Simpson JF, Page DL. "Prognostic Value of Histopathology of the Breast", *Seminars in Oncology*, 1992, Vol. 19, pp. 254-262.

Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, Subramanyan S, Orlandi R, Sukumar S, Sacchi N. "Evidence of Epigenetic Changes Affecting the Chromatin State of the Retinoic Acid Receptor Beta2 Promoter in Breast Cancer Cells", *Oncogene*, 2000, Vol. 19, pp. 1556-1563.

Skou JC, Esmann M. "The Na,K-ATPase", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1992, Vol. 24, pp. 249-261.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mcguire WL. "Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene", *Science*, 1987, Vol. 235, pp. 177-182.

Smith GA, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FW, Schlichter LC. "Functional Upregulation of HERG K⁺ Channels in Neoplastic Hematopoietic Cells", *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, Vol. 277, pp. 18528-18534.

Smith P, Rhodes NP, Shortland AP, Fraser SP, Djamgoz MBA, Ke Y, Foster CS. "Sodium Channel Protein Expression Enhances the Invasiveness of Rat and Human Prostate Cancer Cells", *FEBS Letters*, 1998, Vol. 423, pp. 19-24.

Smith P, Rhodes NP, Shortland AP, Fraser SP, Djamgoz MBA, Ke Y, Foster CS. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 1998, 423, 19–24.

Smith RD, Goldin AL. “Phosphorylation of Brain Sodium Channels in the III Linker Modulates Channel Function in *Xenopus* Oocytes”, *Journal of Neuroscience*, 1996, Vol. 16, pp. 1965-1974.

Smithermann KA, Sontheimer H. Inhibition of glial Na⁺ and K⁺ currents by tamoxifen. *J Membr Biol.* 2001, 181:125-135.

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. “Alcohol and Breast Cancer in Women: A Pooled Analysis of Cohort Studies”, *The Journal of the American Medical Association*, 1998, Vol. 179, pp. 535-540.

Sobko A, Peretz A, Attali B. “Constitutive Activation of Delayed-Rectifier Potassium Channels by a Src Family Tyrosine Kinase in Schwann Cells”, *The Embo Journal*, 1998, Vol. 17, pp. 4723-4734.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS. “Arrest of the Cell Cycle by the Tumour Suppressor BRCA1 Requires the CDK-Inhibitor P21waf1/Cip1”, *Nature*, 1997, Vol. 389, pp. 187-190.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity, *Science*, 2004, 305, 1434–1437 p.

Soussi T. “The p53 Tumor Suppressor Gene: From Molecular Biology to Clinical Investigation”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, Vol. 910, pp. 121-137.

Söling A, Rainov NG. Bioluminescence imaging in vivo-application to cancer research. *Expert opinion on biological therapy*, 2003, 3(7), 1163-1172.

Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E, Van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, De Jong S. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2004, 52(6), 821-831.

Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA. "Interaction of Voltage-Gated Sodium Channels with the Extracellular Matrix Molecules Tenascin-C and Tenascin-R", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, Vol. 95, pp. 15753-15757.

Steege PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. "Altered Expression of nm23, a Gene Associated with Low Tumor Metastatic Potential, During Adenovirus 2 Ela Inhibition of Experimental Metastasis", *Cancer Research*, 1988, Vol. 48, pp. 6550-6554.

Steege PS. "Metastasis Suppressors Alter the Signal Transduction of Cancer Cells", *Nature Reviews Cancer*, 2003, Vol. 3, pp. 55-63.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*, IARC, 2014.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69:217-45.

Stratton MR, Wooster R. "Breast Cancer Susceptibility: A Complex Disease Unravels", *Trends in Genetics*, 1995, Vol. 11, pp. 3-5.

Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KVA. "Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 α (eIF2 α) promotes complex formation between eIF2 α (P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B," *Biochemistry*, 2000, vol. 39, no. 42, pp. 12929–12938.

Summy JM, Gallick GE. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 1398–1401.

Sunpaweravong S, Sunpaweravong P. "Recent Developments in Critical Genes in the Molecular Biology of Breast Cancer", *Asian Journal of Surgery*, 2005, Vol. 28, pp. 71-75.

Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, Gounder MM, Falzone R, Harrop J, White ACS, Toudjarska I, Bumcrot D, Meyers RE, Hinkle G, Svzrikapa N, Hutabarat RM, Clausen VA, Cehelsky J, Nochur SV, Gamba-Vitalo C, Vaishnaw AK, Sah DWY, Gollob JA, Burris HA. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer discovery*, 2013, 3(4), 406-417.

Takanami I, Inoue Y, Gika M. “G-protein Inwardly Rectifying Potassium Channel 1 (GIRK 1) Gene Expression Correlates with Tumor Progression in Non-Small Cell Lung Cancer”, *BMC Cancer*, 2004, Vol. 4, pp. 79-85.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. “Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN”, *Science*, 1998, Vol. 280, pp. 1614-1617.

Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, Sood AK, Lopez-Berestein G, Dalby KN, Ozpolat B. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One*, 2012, 7:e41171.

Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:10983–5.

Tetu B, Brisson J. “Prognostic Significance of HER-2/Neu Oncoprotein Expression in Node-Positive Breast Cancer: The Influence of the Pattern of Immunostaining and Adjuvant therapy”, *Cancer*, 1994, Vol. 73, pp. 2359-2365.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139(5), 871-890.

Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1997, 13: 513–609.

Thompson D, Easton D. “The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes”, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2004, Vol. 9, pp. 221-236.

Tolon RM, Sanchez-Franco F, Lopez Fernandez J, Lorenzo MJ, Vazquez GF, Cacicedo L. Regulation of somatostatin gene expression by veratridine-induced depolarization in cultured fetal cerebrocortical cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996, 35:103–10.

Traub O, Ishida T, Ishida M, Tupper JC, Berk BC. “Shear Stress-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation is Regulated by Sodium in Endothelial Cells: Potential Role for a Voltage-Dependent Sodium Channel”, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274, pp. 20144-20150.

Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. “Trp-p8, a Novel Prostate- Specific Gene, is Upregulated in Prostate Cancer and Other Malignancies and Shares High Homology with Transient Receptor Potential Calcium Channel Proteins”, *Cancer Research*, 2001, Vol. 61, pp. 3760-3679.

Tuncer S. “Jinekolojik Kanserlerde Tarama” *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2000, 31 (2), s:113-120.

Turner CE. Paxillin interactions. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(23), 4139-4140.

Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Breast cancer in Europe. *ENCR Cancer Fact Sheets*, 2002, 2.

Tyrrell L, Renganathan M, Dib-Hajj SD, Waxman SG. “Glycosylation Alters Steady-State Inactivation of Sodium Channel Na(v)1.9/Nan in Dorsal Root Ganglion Neurons and is Developmentally Regulated”, *Journal of Neuroscience*, 2001, Vol. 21, pp. 9629-9637.

Uehara H, Kim SJ, Karashima T, Shepherd DL, Fan D, Tsan R, Killion JJ, Logothetis C, Mathew P, Fidler IJ. “Effects of Blocking Platelet-Derived Growth Factor-Receptor Signaling in a Mouse Model of Prostate Cancer Bone Metastasis”, *Journal of the National Cancer Institute*, 2003, Vol. 95, pp. 458-470.

Undrovinas AI, Shander GS, Makielski JC. “Cytoskeleton Modulates Gating of Voltage-Dependent Sodium-Channel in Heart”, *American Journal of Physiology*, 1995, Vol. 269, pp. 203-214.

Urbano FJ, Sierra F, Colombo JA, Velasco JM, Buno W. "Different Voltage-Gated Sodium Currents are Expressed by Human Neuroblastoma NB69 Cells When Cultured in Defined Serum-Free and in Astroglial-Conditioned Media", *Glia*, 1997, Vol. 19, pp. 161-170.

Vacca A, Frigeri A, Ribatti D, Nicchia GP, Nico B, Ria R, Svelto M, Dammacco F. Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2001, 113, 415–421.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 70, 535–602.

Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415 (6871), 530-536.

Venable JG, Schwarts AM, Silverbeg SG. "Infiltrating Cribriform Carcinoma of the Breast: A Distinctive Clinicopathologic Entity", *Human Pathology*, 1990, Vol. 21, pp. 333-338.

Venkitaraman AR. "Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2", *Cell*, 2002, Vol. 180, pp. 171-182.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods*, 1995, 184:39–51.

Vijayaragavan K, Boutjdir M, Chahine M. "Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 Peripheral Nerve Sodium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C", *Journal of Neurophysiology*, 2004, Vol. 91, pp. 1556-1569.

Vilain A, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. "DNA Methylation and Chromosome Instability in Breast Cancer Cell Lines", *FEBS Letters*, 1999, Vol. 460, pp. 231-234.

- Vogel T, Blake DA, Whikehart DR, Guo NH, Zabrenetzky VS, Roberts DD. "Specific Simple Sugars Promote Chemotaxis and Chemokinesis of Corneal Endothelial Cells", *Journal of Cellular Physiology*, 1993, Vol. 157, pp. 359-366.
- Walsh KB, Wolf MB, Fan J. "Voltage-Gated Sodium Channels in Cardiac Microvascular Endothelial Cells", *American Journal Physiology*, 1998, Vol. 274, pp. 506-512.
- Wang Q, Zhang H, Kajino K, Greene MI. "BRCA1 Binds c-Myc and Inhibits its Transcriptional and Transforming Activity in Cells", *Oncogene*, 1998, Vol. 17, pp. 1939-1948.
- Wang S, Jiao BH. The inhibition of tamoxifen on sodium channel in SHG-44 glioma cell-line. *Chin. J. Appl. Physiol.* 2009, 25, 207–210.
- Wang XT, Nagaba S, Nagaba Y, Leung SW, Wang J, Qiu W, Zhao PL, Guggino SE. "Cardiac L-type Calcium Channel Alpha 1-Subunit is Increased by Cyclic Adenosine Monophosphate: Messenger RNA and Protein Expression in Intact Bone", *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, Vol. 15, pp. 1275-1285.
- Wargotz ES, Norris HJ. "Metaplastic Carcinomas of the Breast. IV. Squamous Cell Carcinoma of Ductal Origin", *Cancer*, 1990, Vol. 65, pp. 272-276.
- Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. "Sodium Channels and Their Genes: Dynamic Expression in the Normal Nervous System, Dysregulation in Disease States", *Brain Research*, 2000, Vol. 886, pp. 5-14.
- Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, Van't Veer LJ. "Gene Expression Profiles of Primary Breast Tumours Maintained in Distant Metastasis", *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 2003, Vol. 110, pp. 15901-15905.
- Weiss L. "Metastatic Inefficiency", *Advanced Cancer Research*, 1990, Vol. 54, pp. 159-211.
- West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. "A Phosphorylation Site in the Sodium Channels Required for Modulation by Protein Kinase C", *Science*, 1991, Vol. 254, pp. 866-868.

Wetterwald A, Van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, Lowik CW, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *The American journal of pathology*, 2002, 160(3), 1143-1153.

Whitaker WR, Faull RL, Waldvogel HJ, Plumpton CJ, Emson PC, Clare JJ. "Comparative Distribution of Voltage-Gated Sodium Channel Proteins in Human Brain", *Brain Research and Molecular Brain Research*, 2001, Vol. 88, pp. 37-53.

Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller HM, Amberger A, Zeschnigk M, Idschwendter WA, Abendstein B, Zeimet AG, Daxenbichler G, Marth C. "Methylation and Silencing of the Retinoic Acid Receptor-Beta2 Gene in Breast Cancer", *Journal of National Cancer Institute*, 2000, Vol. 92, pp.826-832.

Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005, 288(3), C494-C506.

Williamson EA, Dadmanesh F, Koeffler HP, "BRCA1 Transactivates the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P27(Kip1)", *Oncogene*, 2002, Vol. 21, pp. 3199-3206.

Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, Norbury CJ. Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21 WAF1/CIP1 in breast cancer: association with prognosis. *European Journal of Cancer*, 2001, 37(18), 2405-2412.

Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. "Expression of CaT-like, a Novel Calcium-Selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer", *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, Vol. 276, pp. 19461-19468.

Wittmack EK, Rush AM, Craner MJ, Goldfarb M, Waxman SG, Dib- Hajj SD. "Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 2B: Association with Nav1.6 and Selective Colocalization at Nodes of Ranvier of Dorsal Root Axons", *Journal of Neuroscience*, 2004, Vol. 24, pp. 6765-6775.

Woo AL, James PF, Lingrel JB. "Sperm Motility is Dependent on a Unique Isoform of the Na,K-ATPase", *Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, pp. 20693-26699.

Xia UP, Miller L, Nelson J, Gelman IH. "The Src-Suppressed C Kinase Substrate, Ssecks, is a Potential Metastasis Inhibitor in Prostate Cancer", *Cancer Research*, 2001, Vol. 61, pp. 5644-5651.

Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD, Mattei LN, Braun PE, Schachner M, Isom LL. "Tenascin-R is a Functional Modulator of Sodium Channel Beta Subunits", *Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274, pp. 26511-26517.

Xing D, Wang J, Ou S, Wang Y, Qiu B, Ding D, Guo F, Gao Q. Expression of neonatal Nav1. 5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells. *Oncology reports*, 2014, 31(6), 2692-2700.

Yakubov B, Chelladurai B, Schmitt J, Emerson R, Turchi JJ, Matei D. Extracellular tissue transglutaminase activates noncanonical NF- κ B signaling and promotes metastasis in ovarian cancer. *Neoplasia*, 2013, 15(6), 609–619, IN7–IN8.

Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*, 2006, 16: 1171–1182.

Yano S, Yamaguchi M, Dong RP. EGFR tyrosine kinase inhibitor" gefitinib (Iressa)" for cancer therapy. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 2003, 122(6), 491-497.

Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ, Kang HY, Chang C. "Increase of Androgen-Induced Cell Death and Androgen Receptor Transactivation by BRCA1 in Prostate Cancer Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, Vol. 97, pp. 11256-11261.

Yokota J. "Tumor Progression and Metastasis", *Carcinogenesis*, 2000, Vol. 21, pp. 497-503.

Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 2006, 24: 21–44.

Yu FH, Catterall WA. "Overview of the Voltage-Gated Sodium Channel Family", *Genome Biology*, 2003, Vol. 4, pp. 207.

Yu H. "Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk", *The Journal of the American Medical Association*, 1998, Vol. 280, pp. 1138-1139.

Zhang R, Fidler I, Price J. Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis*, 1991, 11(4): 204-215.

Zhang XL, Peng XQ, Jing YL, Xie WR, Xie YK. "Sialic Acid Contributes to Generation of Ectopic Spontaneous Discharges in Rats with Neuropathic Pain", *Neuroscience Letters*, 2003, Vol. 346, pp. 65-68.

Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, Folsom AR. "Well-Done Meat Intake and the Risk of Breast Cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, Vol. 90, pp. 1724-1729.

Zhou J, Yi J, Hu NN, George AL, Murray KT. "Activation of Protein Kinase A Modulates Trafficking of the Human Cardiac Sodium Channel in *Xenopus* Oocytes", *Circulation Research*, 2000, Vol. 87, pp. 33-38.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Aydın'da doğdum. İlkokul ve orta öğrenimimi Yahya Kemal Beyatlı İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Ardından 2004 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 2009 yılında fakülte birincisi olarak mezun olup aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimime başladım. Aynı yıl içerisinde Tübitak-Bideb 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programına bursiyer olarak seçildim. 2012 yılında doktora tez çalışmamı Tübitak-Bideb 2214 Yurtdışı Araştırma Burs Programı kapsamında bursiyer olarak UT MD Anderson Cancer Center Experimental Therapeutics departmanında Yard. Doç. Dr. Bülent Özpolat'ın yanında gerçekleştirdim. 2013 yılında ÖYP Araştırma Görevlisi olarak İzmir Katip Çelebi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalına atandım ve ardından doktora eğitimim için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalına görevlendirildim. Halen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Ferda BELGE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Her konuda katkılarını esirgemeyen, tez çalışmamı UT MD Anderson Cancer Center'daki Experimental Therapeutics Departmanı'nda gerçekleştirmeme olanak tanıyan, tüm tez boyunca maddi manevi çalışmaya destek olan Sayın Yard. Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu zorlu süreçte bana fazlasıyla destek olan ve sabır gösteren canım anneannem ve dedeme, sevgisi, anlayışı, sabrı ve desteğiyle bu süreci başarı ile tamamlamamdaki en büyük destekçim, biricik eşim Dr. Arife Erdoğan'a sevgi ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca bu tezin yürütülmesi için sağladığı BİDEB-2211 ve BİDEB-2214 kodlu burs programları nedeniyle TÜBİTAK'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.