



T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**DOKSORUBİSİN DİRENÇLİ ER+ MEME KANSERİNDE LNCRNA
UCA1'İN PI3K/AKT/mTOR SİNYALİZASYONUNA ETKİSİ**

Doktora Tezi

Gamze NAMALIR

Çorum - 2025

**DOKSORUBİSİN DİRENÇLİ ER+ MEME KANSERİNDE LNCRNA UCA1'İN
PI3K/AKT/mTOR SİNYALİZASYONUNA ETKİSİ**

Gamze NAMALIR

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Menderes SUIÇMEZ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Metin KONUŞ

Çorum 2025

Gamze NAMALIR tarafından hazırlanan “Doksorubisin Dirençli ER+ Meme Kanserinde lncRNA UCA1’in PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyonuna Etkisi” adlı tez çalışması 30/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

.....

Başkan

Prof. Dr. Menderes SUIÇMEZ

.....

Danışman

Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ

.....

Üye

Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Orçun AVŞAR

.....

Üye

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05/02/2025 tarih ve 2025/382 sayılı kararı ile Gamze NAMALIR’ın Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalında Doktora derecesi alması onanmıştır.

(İmza)

Prof. Dr. Osman ÇUBUK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

(İmza)

Gamze NAMALIR



DOKSORUBİSİN DİRENÇLİ ER+ MEME KANSERİNDE LNCRNA UCA1'İN PI3K/AKT/mTOR SİNYALİZASYONUNA ETKİSİ

Gamze NAMALIR

ORCID: 0000-0001-6588-8504

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Doktora Tezi

2025

ÖZET

Tez çalışmasında, meme kanserinde (BC) doksorubisin (Dox) direncinin gelişiminde uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Öncelikle, MCF-7 hücrelerinde doksorubisin direnci indüklenmiş, hücrelerde direnç 0,64 µM seviyesine ulaşılmıştır. Dirençli hücrelerde (MCF-7/Dox) direnç oluşumu; hücre morfolojisinin incelenmesi, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1) gen ekspresyonunun değerlendirilmesi ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun regülasyonu ile doğrulanmıştır. Hücrelerin iğsi şekil aldığı, uzunluklarının arttığı ve sitoplazmalarında birden fazla vezikül bulunduğu gözlemlenmiştir. İlaça direncin, MRP1 gen ekspresyon seviyesinin transkript düzeyinde 4 kat artmasıyla oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca, direnç geliştiren hücrelerin mezenkimal özellik kazandığını desteklemek amacıyla epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) sürecine ilişkin genlerin (E-kaderin, Okludin, Klaudin-1, N-kaderin, Twist-1, Vimentin) ekspresyon seviyeleri kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle analiz edilmiştir. MCF-7/Dox hücrelerinde E-kaderin, Okludin ve Klaudin-1 gen ekspresyon seviyelerinin azalırken, N-kaderin, Twist-1 ve Vimentin gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular, direnç geliştiren hücrelerin mezenkimal özellik kazandığını ortaya koymaktadır. MCF-7/Dox hücrelerinde doksorubisinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla MTT testi yapılmış ve MCF-7/S ile MCF-7/Dox hücrelerinin inhibitör konsantrasyonu 50 (IC₅₀) değerleri sırasıyla 1,65 µM ve 128,5 µM olarak belirlenmiştir. MCF-7/Dox hücrelerinin, MCF-7/S hücrelerine kıyasla doksorubisine karşı 78 kat daha yüksek direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Dox direnci gelişen hücrelerde UCA1 gen ekspresyonunun arttığı ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun upregüle olduğu, bu sinyal yolunda görev alan Akt1, Akt2, mTOR ve PTEN genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artışa bağlı olarak gösterilmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamasında, lipofektamin yöntemi

kullanılarak siUCA1 hücrelere transfekte edilmiştir. qPCR analizleri, siUCA1 transfeksiyonu sonrasında UCA1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (%50) azaldığını göstermiştir. siUCA1 transfeksiyonu, hem MCF-7/Dox hem de MCF-7/S hücrelerinde IC₅₀ değerlerini anlamlı şekilde azaltmıştır. Bu sonuç, UCA1'in doksorubisin direncini tersine çevirmede potansiyel bir aday olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, UCA1'in susturulmasının PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu baskıladığı ve hücrelerin motilite yeteneğini anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Sonuç olarak, lncRNA UCA1'in meme kanserinde doksorubisin direncinin tersine çevrilmesinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu ile ilişkili olabileceği, literatürde ilk kez bu tez çalışması ile tanımlanmıştır.

Anahtar Kavramlar: Meme Kanseri, Doksorubisin Direnci, lncRNA, PI3K/AKT/mTOR

Bilim Kodu: 20610

**THE EFFECT OF LNCRNA UCA1 ON PI3K/AKT/MTOR SIGNALING IN
DOXORUBICIN-RESISTANT ER+ BREAST CANCER**

Gamze NAMALIR

ORCID: 0000-0001-6588-8504

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL

Doctor of Philosophy Thesis

2025

ABSTRACT

This thesis study aimed to investigate the effect of the long non-coding RNA (lncRNA) UCA1 on PI3K/AKT/mTOR signaling in the development of doxorubicin (Dox) resistance in breast cancer (BC). Initially, doxorubicin resistance was induced in MCF-7 cells, and the resistance level reached 0.64 μM . The development of resistance in resistant cells (MCF-7/Dox) was validated through the examination of cell morphology, the evaluation of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene expression, and the regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Resistant cells were observed to adopt a spindle-like shape, exhibit increased length, and contain multiple vesicles in their cytoplasm. Dox resistance was demonstrated by a 4-fold increase in MRP1 gene expression at the transcript level. Additionally, to support the acquisition of mesenchymal features in resistant cells, the expression levels of genes associated with the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process (E-cadherin, Occludin, Claudin-1, N-cadherin, Twist-1, Vimentin) were analyzed using quantitative PCR (qPCR). In MCF-7/Dox cells, the expression levels of E-cadherin, Occludin, and Claudin-1 genes were decreased, whereas the expression levels of N-cadherin, Twist-1, and Vimentin genes were significantly increased. These findings indicate that resistant cells acquired mesenchymal characteristics. To examine the effect of doxorubicin on cell viability in MCF-7/Dox cells, an MTT assay was performed, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of MCF-7/S and MCF-7/Dox cells were determined as 1.65 μM and 128.5 μM , respectively. MCF-7/Dox cells exhibited 78-fold higher resistance to doxorubicin compared to MCF-7/S cells. Furthermore, it was shown that UCA1 gene expression and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway was upregulated in Dox-resistant cells, as evidenced by increased expression levels of genes involved in this pathway, including Akt1, Akt2, mTOR, and

PTEN. In the next step of the study, siUCA1 was transfected into the cells using the lipofectamine method. qPCR analyses revealed that UCA1 gene expression was statistically significantly reduced by 50% in transfected cells compared to the control group. siUCA1 transfection significantly decreased IC₅₀ values in both MCF-7/Dox and MCF-7/S cells. This result suggests that UCA1 could be a potential candidate for reversing doxorubicin resistance. Additionally, it was observed that UCA1 silencing suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling and significantly reduced the motility of cells. In conclusion, this thesis study is the first in the literature to identify that lncRNA UCA1 may be associated with the reversal of doxorubicin resistance in breast cancer through its regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key Terms: Breast Cancer, Doxorubicin Resistance, lncRNA, PI3K/AKT/mTOR

Science Code: 20610



TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana rehberlik eden, değerli tavsiyeleri, desteği ve yönlendirmeleriyle yolumu aydınlatan danışmanım Prof. Dr. Menderes SUIÇMEZ'e,

Araştırmamın bir çok aşamasında sağladığı katkılar, destek ve teşvikleriyle beni motive eden eş-danışmanım Doç. Dr. Metin KONUŞ'a,

Çalışmada kullandığım materyallerden biri olan MCF-7 hücre hattı temini için Prof. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Senem NOYAN'a,

Çalışma sürecindeki bilimsel katkı ve destekleri ile yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ ve Dr. Öğr. Üyesi Orçun AVŞAR'a,

Çalışmalarımın bir kısmında hücre kültürü deneylerinde destek olan Hilal ÖZDİL'e,

Yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Tuğba UYSAL KILIÇ, Arş. Gör. Kadir ULUSOY, Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZÇELİK ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı KARA'ya,

Bu süreçte her zaman yanımda hissettiğim, her ihtiyacım olduğunda desteklerini hissettiğim dostlarım Fatma DÜGENCİLİ, Merve KURT ve Tuğba UYSAL KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Bu yolculukta beni her daim destekleyen aileme—sevgili annem, babam ve kardeşlerime- ve yanımda olan kıymetli dostlarıma içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde gösterdiği anlayış ve sabır için eşime, bu sürecin en değerli kazanımları arasında yer alan sevgili çocuklarıma, dünyaya gelerek hayatımı daha anlamlı kıldıkları ve bana ilham verdikleri için teşekkür ederim.

Gamze NAMALIR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
GİRİŞ.....	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Meme Kanseri	5
1.1.1. Meme kanserinin moleküler alttipleri	5
1.1.2. Östrojen ve östrojen reseptörü pozitif meme kanseri	6
1.1.3. MCF-7 hücre hattı.....	8
1.1.4. Tedavi yöntemleri	9
1.2. Meme Kanserinde Doksorubisin Kullanımı.....	20
1.2.1. Doksorubisin	21
1.2.2. Doksorubisin dirençliliği	24
1.2.3. Doksorubisin direnç mekanizmaları	27
1.3. PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyonu	30
1.4. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMD)	33
1.5. Kodlanmayan RNA (ncRNA).....	35
1.6. Uzun Kodlanmayan RNA'lar (Long Non-coding RNAs, lncRNA).....	36

1.7. LncRNA'ların Gen Ekspresyonunu Düzenleme Yöntemleri.....	39
1.7.1. Epigenetik regülasyon.....	39
1.7.2. Transkripsiyonel regülasyon.....	40
1.7.3. Post transkripsiyonel regülasyon.....	40
1.7.4. Translasyonel regülasyon.....	42
1.7.5. Post-translasyonel regülasyon.....	42
1.8. Uzun Kodlanmayan RNA'ların Meme Kanserinde Rolü	43
1.8.1. Hücre proliferasyonunda rol alan lncRNA'lar	43
1.8.2. İnvazyon ve Metastaz'da rol alan lncRNA'lar.....	44
1.8.3. Meme kanseri kemorezistansında rol Alan LncRNA'lar.....	45
1.8.4. Urothelial cancer associated 1 (UCA1).....	46

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmanın Tipi.....	49
2.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	49
2.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	49
2.4. Çalışma Materyali.....	49
2.5. Malzeme ve Cihazlar	49
2.5.1. Hücre kültüründe kullanılan reaktifler	49
2.5.2. RNA izolasyon, komplementar DNA (cDNA) sentezi, kantitatif Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve RT-PCR reaktifleri.....	50
2.5.3. Cihazlar	50
2.6. Besiyeri ve Hazırlanan Solüsyonlar	51
2.7. Yöntemler	51
2.7.1. Hücre kültürü ve hücrelerin pasajlanması.....	51
2.7.2. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi.....	52
2.7.3. Hücre sayımı.....	52

2.7.4. Doksorubisin ilacının hazırlanması	54
2.7.5. Doksorubisin dirençli MCF-7 hücre hattının geliştirilmesi.....	54
2.7.6. Hücrelerin doksorubisin dirençliliği geliştirmesinin doğrulanması.....	54
2.7.7. RT-PCR yöntemi.....	58
2.7.8. siRNA teknolojisi ile UCA1 lncRNA'nın susturulması.....	58
2.7.9. Yara iyileşmesi (wound healing) yöntemi	59
2.7.10. Verilerin istatistiksel analizi.....	59

3. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. MCF-7 Hücrelerinde Doksorubisin Direncinin Geliştirilmesi.....	60
3.1.1. Hücrelerin morfolojik görünümünün incelenmesi.....	60
3.1.2. MRP1 geninin ekspresyon seviyelerinin araştırılması	62
3.1.3. Hücre canlılık testi	63
3.1.4. Doksorubisin dirençli hücrelerde epitelyal-mezenkimal dönüşüm sürecindeki bazı genlerin ekspresyon değişimleri.....	64
3.2. Doksorubisin Dirençli Hücrelerde PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyonunun Araştırılması	68
3.3. Doksorubisin Dirençli Hücrelerde lncRNA UCA1'in Transkript Düzeylerinin Araştırılması	69
3.4. siRNA Teknolojisi ile lncRNA UCA1'in Susturulması.....	69
3.4.1. UCA1'in susturulması ile mRNA seviyesinin qPCR ile analizi.....	70
3.4.2. UCA1 susturulmasının hücre canlılığına etkisi	71
3.4.3. UCA1 susturulması sonrası AKT1, AKT2, PTEN ve mTOR genlerinin hücre düzeyinde ekspresyon analizi.....	72
3.5. UCA1'in Motilite Üzerine Etkisi	74

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

SONUÇ/SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKÇA.....	90

EKLER	122
EK-1. RNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve temsili agaroz jel görüntüsü	123
EK-2. Erime eğrisi analiz sonuçları.....	124



TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1.1. Meme kanseri alt tiplerinin özellikleri	6
Tablo 1.2. Monoterapilerde yaygın olarak kullanılan seçilmiş ilaçlar	10
Tablo 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri	50
Tablo 2.2. Kullanılan cihaz listesi	50
Tablo 2.3. Besiyeri hazırlanış protokolü.....	51
Tablo 2.4. Hücre sayım solüsyonu.....	51
Tablo 2.5. Hücre dondurma solüsyonu.....	51
Tablo 2.6. cDNA sentez reaksiyonu	56
Tablo 2.7. Kantitatif Eş-zamanlı PCR reaksiyonu (qPCR).....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Hanahan, (2022)'dan modifiye edilen kanser hücrelerinin genel özellikleri.....	4
Şekil 1.2. Estradiol yapısı, İki boyutlu (sol), üç boyutlu (sağ) (Pubchem).....	6
Şekil 1.3. Anand vd., (2023)'den modifiye edilen kemoterapinin temel prensiplerini ve farklı kemoterapötik ajan/sınıflarını gösteren şematik diyagram.....	17
Şekil 1.4. Mattioli vd. (2023)'den modifiye edilen Dox-DNA kompleksinin yapısı.....	22
Şekil 1.5. Ortega vd. (2020)'den modifiye edilen östrojen ve tirozin reseptörleri tarafından PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu.....	31
Şekil 1.6. Lo vd., (2017)'den modifiye edilen epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) ile ilişkili düzenleyici genler.....	34
Şekil 1.7. Tao vd. (2023)'den modifiye edilen farklı lncRNA türlerinin sınıflandırılmasını gösteren şematik diyagram.....	37
Şekil 1.8. Sweta vd. (2019)'den modifiye edilen lncRNA'nın etki mekanizmaları.....	38
Şekil 1.9. Sebastian-delaCruz vd. (2021)'den modifiye edilen lncRNA aracılı mRNA stabilite düzenlemesinin etki mekanizmaları.....	41
Şekil 2.1. Thoma sayım lamının görünümü.....	53
Şekil 2.2. Gen susturma protokolünün şematize edilmiş görüntüsü.....	59
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanmış MCF-7 hücrelerinin morfolojileri (Doksorubisin konsantrasyonları a: 10 nM b:20 nM c:40 nM d:80 nM e: 100 nM f:160 nM).....	61
Şekil 3.2. MCF-7/S ve MCF7/Dox'un morfolojisinin karşılaştırılması. MCF-7/S hücreleri, tek çekirdekli, iğ şeklindeki hücreler olarak görünür. MCF-7/Dox hücreleri düzensiz çok sayıda veziküllü (mavi dairelerle vurgulanan) ve çok çekirdekli (kırmızı dairelerle vurgulanan) ve uzantıları olan hücreler düzensiz görünür.....	62
Şekil 3.3. MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinin MRP1 ve GAPDH genlerinin qPCR yöntemi ile mRNA ekspresyon seviyeleri. GAPDH geninden elde edilen CT ile normalizasyon yapıldı *p < 0,05.....	63
Şekil 3.4. MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücreleri, 48 saat boyunca farklı oranlarda doksorubisine maruz bırakıldı. Hücre canlılığı MTT sitotoksitesite deneyi kullanılarak değerlendirildi. Veriler, hücre canlılığının %100 olduğu varsayılan negatif kontrol ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının yüzdesi olarak ifade edildi (*p < 0,05).....	64

Şekil 3.5. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki E-kaderin karşılaştırılması (sol) E-kaderin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi.....	65
Şekil 3.6. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Okludin karşılaştırılması. (sol) Okludin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ)RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi	65
Şekil 3.7. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Klaudin-1 karşılaştırılması. (sol) Klaudin-1'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ)RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi	66
Şekil 3.8. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki N-kaderin karşılaştırılması (sol) N-Kaderin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ)RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi.....	66
Şekil 3.9. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Twist-1 karşılaştırılması (sol) Twist-1'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi	67
Şekil 3.10. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Vimentin karşılaştırılması (sol) Vimentin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi	67
Şekil 3.11. MCF/S ve MCF7/Dox hücrelerde AKT1, AKT2, PTEN ve mTOR genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri *p < 0,05.....	68
Şekil 3.12. qPCR ile saptanan MCF7/S ve MCF7/Dox hücrelerde UCA1'in ekspresyon seviyeleri (p<0.01)	69
Şekil 3.13. 10 pmol siUCA1 ile transfeksiyon sonrası MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinde UCA1'in ekspresyon seviyesinin qPCR ile gösterimi (p < 0.001).....	70
Şekil 3.14. UCA1'in susturulmasının hücre canlılık üzerine etkisi % Canlılık grafiği.....	71
Şekil 3.15. Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu AKT1 gen ekspresyon değişimleri (AKT1 geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05).....	72
Şekil 3.16. Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu AKT2 gen ekspresyon değişimleri (AKT2 geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05).....	73
Şekil 3.17. Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu mTOR gen ekspresyon değişimleri (mTOR geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05).....	73

- Şekil 3.18.** Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu PTEN gen ekspresyon değişimleri (PTEN geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05)..... 74
- Şekil 3.19.** MCF-7/S hücrelerde siUCA1'in transfeksiyonunun hücre göçü üzerine etkisi..... 75
- Şekil 3.20.** MCF-7/Dox hücrelerde siUCA1'in transfeksiyonunun hücre göçü üzerine etkisi. 76



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Hücrelerin trypan blue ile karıştırılıp lama yüklenme görüntüsü Thoma sayım lamının görünümü.....	53



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde ifadesi
μ M	Mikro molar
IC ₅₀	İnhibiitör konsantrasyon 50
R	Direnç indeksi

Kısaltmalar

ACS	Amerikan Kanser Derneği
AKT	Protein Kinaz B
AP1	Aktivatör protein 1
BC	Meme Kanseri
BRCA1	Meme kanseri 1
BRCA2	Meme Kanseri 2
cAMP	Siklin adenzin monofosfat
DOX	Doksorubisin
DSB	Çift iplik kırıkları
EMD	Epitelyal mezenkimal dönüşüm
ER	Östrojen reseptörü
ERE	Östrojene duyarlı element
GPER	G protein eşleniği östrojen reseptörü
Her2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
LncRNA	Uzun kodlanmayan RNA (long non coding RNA)
MCF-7/Dox	Doksorubisin direnci gelişmiş MCF-7 hücre hattı
MCF-7/S	Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattı
MRP1	Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1

Mtor	Memeli rapamisin hedefi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PI3K	Fosfoinositid- 3 kinaz
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RTK	Reseptör tirozin kinaz
TF	Transkripsiyon faktör
SERD	Seçici östrojen reseptör yıkıcısı
SERM	Selektif östrojen reseptör modülatörü
siUCA1	Silencer UCA1 (susturucu RNA)
SP1	Spesifik protein 1
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
UCA1	Urothelial carcinoma associated 1

GİRİŞ

Meme kanseri (BC), meme dokusundaki hücrelerin değiştiği ve kontrolsüz bölündüğu, genellikle bir yumru veya kitleye neden olan heterojenik bir kanserdir. Bu kanser, dünya genelinde kadın sağlığını tehdit eden en yaygın malign tümörlerden biri olarak bilinmektedir (Siegel vd., 2017). Meme kanseri, cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedavi gibi bir dizi multidisipliner yaklaşım ile tedavi edilmektedir. Kemoterapi, meme kanserinin tedavisinde hala temel bir rol oynamaktadır (Prihantono & Faruk, 2021).

Doksorubisin (DOX), erken evrede teşhis edilen ya da metastatik BC tümörlerinin tedavisinde sıklıkla tercih edilen etkili kemoterapide kullanılmaktadır (Nicolini vd., 2006). Bununla birlikte, kemoterapi ilaçlarının sürekli kullanımıyla bazı hastalarda kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişmekte, bu da zayıf kemoterapi etkisine ve kötü prognoza yol açmaktadır. Bu durum, kanser kemoterapisi alanında oldukça zorlu bir bilimsel problem haline gelmiştir (Wijdeven vd., 2015). Kemoterapi öncesinde veya tedavi sırasında, özellikle başlangıçta duyarlılık gösteren tümörler, intrinsik olarak dirençli olabilirler. Bu nedenle, kemoterapi direncinin mekanizmalarını anlamak, kanser tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde çok önemlidir (Abdullah & Chow, 2013).

Kemoterapi direncinin olası moleküler mekanizmaları arasında, ilaç metabolizması, ilaç taşıyıcıları, ilaç metabolize eden enzimler, sinyal yolları, epitelyal mezenkimal geçiş kodlanmayan RNA'lar, DNA tamiri ve apoptozdan kaçınma yer almaktadır (Simstein vd., 2003). Son yıllarda, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi amacıyla kemorezistans mekanizmalarının aydınlatılması ile ilgili kodlanmayan RNA'ların rolü ve fonksiyonlarının araştırılan çalışmalara yoğunlaşmıştır (Chang vd., 2018; X.-L. Hu vd., 2018; Z. Li, Qian, vd., 2019; M. Zhang vd., 2020).

LncRNA'lar, tek sarmallı, çift sarmallı ve dairesel gibi çeşitli karmaşık ikincil yapılarla sahiptir. DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime geçerek sırasıyla yem molekülü, kılavuz molekül, sinyal molekülü ve iskele molekülü olarak görev yapar ve bu etkileşimler aracılığıyla kanserin oluşumu ve ilerlemesini düzenler. Artan bilimsel kanıtlar, lncRNA'ların kemoterapi direncinde önemli ve çok yönlü roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. LncRNA'lar (MALAT1, HOTAIR, GAS5, NEAT1, UCA1), apoptozun baskılanması, kanser kök hücre özelliklerinin desteklenmesi, hücrelerin epitelyal formdan mezenkimal forma dönüşmesi (EMD), hücre metabolizmasının modifiye edilmesi, otofajinin indüklenmesi, hücre döngüsü düzenlemesinin değiştirilmesi, DNA onarım mekanizmalarının yeniden yapılandırılması ve ilaç metabolizması ile taşınımının etkilenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla kemoterapi direncine katkıda bulunabildiği bildirilmiştir (Connerty vd., 2020; Khalili-Tanha & Moghbeli, 2021)

Urothelial carcinoma associated 1 (UCA1), ilk kez mesane kanserinde tanımlanmış bir kodlanmayan RNA türüdür. İnsan endojen retrovirüs H gen ailesine ait olan UCA1, malign mesane kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir. UCA1'in aşırı ekspresyonunun, sisplatin tedavisi sırasında mesane kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir (Y. Fan vd., 2014a). UCA1'in yüksek ekspresyonu, düşük hücre farklılaşması, yüksek tümör derecesi ve kötü genel sağkalım ile ilişkilidir. UCA1'in susturulması, tümör hücresi proliferasyonunu engelleyebilmektedir. Ayrıca, DOX'un, SGC7901/DOX hücrelerinde UCA1'in ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indüklediği, PARP proteininin parçalanmasına ve BCL-2 seviyelerinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, UCA1'in mide kanserinde hücre proliferasyonu ve DOX direnci mekanizmalarını düzenleyerek onkojenik bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur (Shang vd., 2016). Bildiğimiz kadarıyla literatürde meme kanserinde UCA1'in doksorubisin direncini artırdığı ile ilgili şuna kadar sadece bir araştırma sonucu yayınlanmıştır (Wo vd., 2022). Burada meme kanseri hücrelerin, kısa süreli TGF-beta uygulaması sonucunda doksorubisin direnci kazandığı tespit edilmiştir.

İnsanda görülen kanserlerde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı en düzensiz sinyal iletim sistemlerinden biridir. PI3K/AKT/mTOR yolak, hücrelerin hayatta kalma, büyüme, çoğalma ve hareketliliğini kontrol eden kritik mekanizmalardan biridir. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), fosfoinositlerin 3-hidroksil grubunu fosforile eden, daha geniş bir lipid kinaz ailesine ait heterodimerik bir molekül olarak tanımlanmaktadır. PI3K, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatı (PIP3) düzenleyerek AKT kinazının aktivasyonunu sağlar. AKT'nin aktivasyonu, memeli rapamisin hedefi (mTOR) proteininin fosforilasyonunu tetikleyerek protein sentezini ve hücre büyümesini artırır; bu durum, malign hücrelere önemli bir avantaj sunmaktadır. PAM aktivitesi, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından negatif olarak düzenlenir. PTEN kaybı ve yüksek AKT ekspresyonu nedeniyle PAM yolu genellikle agresif tümörler, kötü prognoz ve meme kanserinde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilir. Bu yolağının aktivitesi, PTEN aracılığıyla negatif yönde düzenlenmektedir. Ancak, PTEN kaybı ve yüksek AKT ekspresyonu, bu yolakta düzensizliklere yol açarak, bu yolağının agresif tümörler, kötü prognoz ve meme kanserinde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmesine neden olmaktadır (McKenna vd., 2018; Nedeljković & Damjanović, 2019; P. Xia & Xu, 2015). Bu bağlamda, uzun kodlanmayan RNA'ların PI3K/AKT/mTOR yolağını hedefleyen yeni tedavi stratejileri, özellikle doksorubisin direnci gelişmiş durumlarda, geliştirilmesi umut vadetmektedir. Bu tez çalışmasında amacımız, meme kanserinde doksorubisin direnci geliştirdiğimiz meme kanserini altında yatan mekanizmalardan biri olan PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunda UCA1'in etkisinin anlaşılmasına çalışılmasıdır. Ayrıca doksorubisin dirençli meme kanseri hücreleri ile epitelyal mezenkimal dönüşüm süreci arasındaki etkileşim ve UCA1'in meme kanseri hücrelerinin göç etme yeteneğine etkisinin araştırılması bir diğer amacımızdır.

Tezin amacı doğrultusunda, öncelikle laboratuvarında in-vitro kanser modeli insan MCF-7 hücre hatları kullanılarak bu hücrelere doksorubisin direnci geliştirilmiştir. Literatürde kemoterapi direnci geliştiren kanser hücrelerinin epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçirdiği ve invaziv özellikler kazandığı bilindiği için bir başka ifadeyle EMD süreci, AKT/mTOR yolu da dahil olmak üzere çoklu sinyal yolları aracılığıyla düzenlendiği rapor edildiğinden , laboratuvarında geliştirilen MCF-7/Dox hücrelerinin mezenkimal forma dönüşüp/dönüşmediği bu süreçte görevli bazı genlerin ekspresyon düzeylerine bakılarak tespit edilmiştir. Bir sonraki aşamada bu hücrelerde lncRNA UCA1gen susturma işleminin ardından PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunda görev alan bazı moleküllerin (PTEN, Akt1, Akt2, mTOR) etkileşimlerine ekspresyon analizleri ile bakılarak aralarındaki ilişki tanımlanmıştır. Ayrıca, UCA1'in baskılanmasının, meme kanseri hücrelerinin DOX'a duyarlılığını nasıl etkilediği ve bu etkinin moleküler mekanizmaları incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, ve tez çalışmasından sonra daha detaylı bir şekilde bu konudaki araştırmalar arttığında UCA1'in, meme kanseri hastalarında direnç gelişimi tedavi etmek için PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunu hedef alan anahtar bir molekül olabileceği, alternatif terapötik yaklaşımlar gelişmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Meme kanserinde UCA1 susturulması ile eğer doksorubisin direnci kırılırsa, bu ilacın direnç mekanizmasını anlamak için önemli olacaktır. UCA1'in susturulması, endokrin direnci oluşmuş meme kanseri hücrelerinin doksorubisine direncini tersine çevrilmesi durumunda yeni bir terapötik hedef oluşturabileceği düşünülmektedir. Böylece, hedef tedavi etkinliği artırılması, daha güvenli, etkin ve tedavi seçeneği oluşturulmasında tez araştırması sonuçlarının önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Kanser, vücudun normal hücresel düzenini bozan ve kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize olan bir hastalıktır. Bu hastalık, normal hücrelerin genetik yapısında meydana gelen değişiklikler sonucunda ortaya çıkar. Kanser genellikle multifaktöriyel bir hastalıktır. Kanser oluşumunda etkili faktörler: genetik yatkınlık, çevresel faktörler (örneğin, sigara içme, radyasyona maruz kalma, zararlı kimyasallara maruz kalma), kronik enfeksiyonlar (örneğin, HPV, Helicobacter pylori), hormonal faktörler, ve yaşam tarzı alışkanlıklarıdır (örneğin, sağlıksız beslenme, hareketsiz yaşam tarzı) (Hanahan & Weinberg, 2000). Kanser hastalığının tedavisinde cerrahi operasyon, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik ilaçlar gibi seçenekler mevcuttur. Kanser çeşidine ve evresine göre bu tedavi seçeneklerinden bir veya bir kaç tercih edilmektedir (Siegel vd., 2020).

Hanahan ve Weinberg'in makalelerinde (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011) tüm kanser hücrelerinin hücresel fenotip düzeyinde birleştiren ortak özelliklerin neler olduğunu Şekil 1.1.'deki gibi gösterilmiştir. Şekil 1.1.'de sekiz temel ayırt edici özellik, kanser hücrelerinin kazanılmış biyolojik yeteneklerini ifade etmektedir. Bu yetenekler arasında aralıksız proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, hücre ölümüne direnç geliştirilmesi, sınırsız çoğalma potansiyelinin olması, yeni damar yapısı oluşumu veya indüklenmesi, invazyon ve metastazın aktive edilmesi, hücresel metabolizmanın yeniden programlanması ve bağışıklık sisteminden kaçış (immün aracılı yok edimden kurtulma) yer almaktadır (Hanahan, 2022).



Şekil 1.1. Hanahan, (2022)'dan modifiye edilen kanser hücrelerinin genel özellikleri

1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser türüdür ve kansere bağlı kadınların birincil ölüm sebebidir. Amerikan Kanser Derneği'ne (ACS) göre 2023 itibarıyla, her 8 kadından birine (%13) yaşamlarının bir döneminde meme kanseri teşhisi konacağı rapor edilmiştir (*Breast Cancer Facts&Figures*, t.y.). Erkekler için ise meme kanseri geliştirme olasılığı 833 erkekten biri (%0,12) olarak belirlenmiştir (American Cancer Society Facts & Figures 2022-2024, 2022).

Türkiye'de de her sekiz kadından birinin hayatları boyunca meme kanserine yakalanma riski taşıdığı ve bu süreci etkileyen birçok faktörün bulunduğu belirtilmiştir. Ülkemizin batısında doğuya göre iki kat daha fazla meme kanseri tanısı alan hasta tespit edilmiştir (Akyolcu vd., 2013). Meme kanserinin etiyojisi tam olarak anlaşılammakla birlikte, çevresel faktörler, sigara ve alkol kullanımı, hormon replasman tedavisi, genetik yatkınlık, aile öyküsü gibi faktörlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Azizi, 2022).

Meme kanseri, süt üreten bezler ve bu bezleri meme başına bağlayan kanallardan oluşan meme dokusunda ortaya çıkar. Meme dokusunun geri kalanı, yağ, bağ dokusu ve lenfatik doku içerir. Her ne kadar meme dokusundaki herhangi bir hücre kanser oluşturabilse de, tümör oluşumu genellikle kanallardan (duktal karsinom) veya bezlerden (lobüler karsinom) kaynak alır (Darcansoy İşeri, 2009) ve bu kısımlardan invaziv özellik kazanır. İnvaziv meme kanseri hücreleri farklı histolojik görünüm oluşturabilirken, moleküler altıpi olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Sert & Tüylü Küçükkilinç, 2022).

1.1.1. Meme kanserinin moleküler alttıpleri

Luminal A: Bu alt tip, en sık görülen (%50-60) tip olmakla beraber, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, ancak insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif olan kanserleri içerir. Düşük hücre çoğalma oranına ve genellikle daha iyi bir prognoza sahiptirler.

Luminal B: Luminal A'dan farklı olarak, bu alt tipte ER ve/veya PR pozitif ve HER2 pozitif veya HER2 negatif, ayrıca Ki-67 ekspresyon seviyeleri yüksektir. Luminal B kanserlerinin genellikle daha yüksek hücre çoğalma oranı ve daha kötü bir prognoza sahiptir.

HER2-pozitif: Bu alt tip, HER2 proteinini aşırı miktarda ifade eden kanserleri kapsar. Bu tür kanserler genellikle agresif bir seyir gösterir ve hedefe yönelik tedavilerle kontrol altına alınmaya çalışılır (Sert & Tüylü Küçükkilinç, 2022).

Üçlü negatif (Bazal benzeri) meme kanseri: Bu alt tip, ER, PR ve HER2'nin hiçbirini ifade etmeyen kanserleri içerir. Meme kanserinin %15-20'si bu alt tipte görülmektedir. Hormon tedavisi ve hedefe yönelik ilaçlar bu meme kanseri alt tipinde kullanılamamaktadır. Meme kanseri tipleri arasında en agresif seyre sahiptir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon

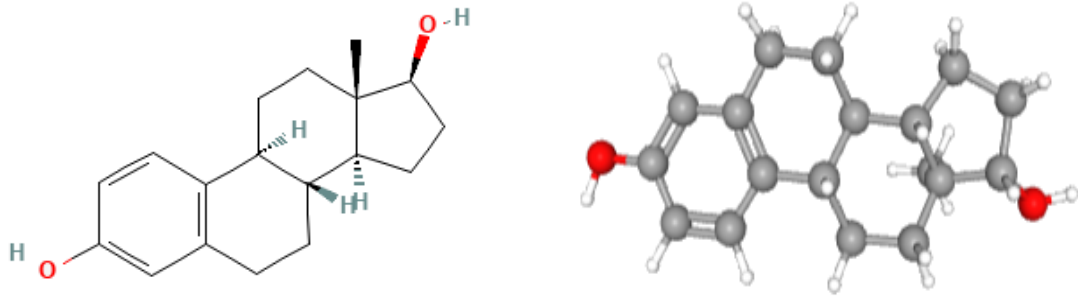
görülen, 40 yaş altındaki kadınlarda daha sık karşılaşılmaktadır (Dass vd., 2021). Bu moleküler alt tiplerin genel özellikleri ve birbirinden farklılıkları Tablo 1.1’de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Meme kanseri alt tiplerinin özellikleri. ER α : östrojen reseptörü alfa; HER2: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PR: progesteron reseptörü (Clusan vd., 2023). Meme kanseri alt tiplerinin özellikleri. ER α : östrojen reseptörü alfa; HER2: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PR: progesteron reseptörü (Clusan vd., 2023)

	Luminal A	Luminal B	Her2-pozitif	Üçlü Negatif
Vaka Oranı	60%	10%	20%	10%
ER α ekspresyonu	++	+	-	-
PR ekspresyonu	++	+	-	-
HER2 ekspresyonu	-	+/-	+	-
Proliferasyon (Ki67)	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Prognoz Tedavi	İyi Endokrin	Orta Endokrin	Orta Anti-Her2	Kötü Kemoterapi

1.1.2. Östrojen ve östrojen reseptörü pozitif meme kanseri

Östrojen, kolesterolden sentezlenen bir steroid hormondur. Premenopozal kadınlarda yumurtalıkların ürettiği bu hormonun, meme bezinin büyümesi, farklılaşması ve işlevini etkilediği uzun süredir bilinmektedir. Östrojen çeşitli yapılarda bulunabilse de, estradiol (E2) olarak da adlandırılan 17 β -estradiol, meme bezlerinde en bol bulunan östrojen formudur (Carroll vd., 2017).



Şekil 1.2. Estradiol yapısı, İki boyutlu (sol), üç boyutlu (sağ) (Pubchem)

Hormon bağımlı meme kanseri vakalarının yaklaşık %70'i, luminal A ve B olarak sınıflandırılan, östrojen reseptörü (ER) eksprese eden tümör hücrelerinden oluşur. Bu tip kanserlerde, östrojenler tümör hücrelerinin büyüme ve gelişmesinde merkezi rol oynayan başlıca sinyallerdir. Östrojenlerin hücreSEL etkisi, esas olarak nükleer östrojen reseptörleri ER α , ER β ve membrana bağı G-protein eşlenik östrojen reseptörü (GPER, aynı zamanda GPR30 olarak da bilinir) aracılığıyla gerçekleşir. Östrojen, östrojen reseptörlerine (ER α ve ER β) bağlanarak etkilerini gösterir. Meme dokusunda ilk tanımlanan reseptör alt tipi ER- α olmuştur, bu yüzden araştırmaların çoğu meme bezindeki ER- α 'nın biyolojik rolüne odaklanmıştır (Roger vd., 2001).

ER α 'nın etki mekanizması östrojen (E2)'nin ER α 'ya bağlanması ile başlar. Reseptör konformasyonel değişime uğrar, dimerize olur, çekirdeğe gider ve transkripsiyonel koaktivatorlarla birlikte çalışır. Ligand tarafından aktive edilen ER α , hedef genlerin promoterlerindeki östrojene duyarlı elementlere (ERE) bağlanır ve aynı zamanda aktivatör protein 1 (AP1) ve spesifik protein 1 (SP1) gibi transkripsiyon faktörleriyle de etkileşime girerek, ERE'si olmayan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde de rol alır. Bu genomik mekanizma, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi ilgili yüzlerce genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Clusan vd., 2023). Bu yüzden ER α , biyolojik süreçleri düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. Kanserleşmede, ER α 'nın aktive olması, onkogenik potansiyele sahip MYC, BCL ve Cyclin D1 gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu indükler. Bu genlerin ekspresyonu, östrojen uyarısına yanıt olarak kanser hücrelerinin hızlı çoğalmasına ve DNA hasarının artmasında neden olur. Böylece ER α , meme kanseri gibi östrojen reseptörü (ER)-pozitif tümörlerde hücre çoğalması ve tümör gelişiminde kritik bir rol oynar. ER α , hücre zarında G proteinleri (Ga) veya büyüme faktörü (GF) reseptörleri ile etkileşime girebilir. Bu durumda, ER α 'nın aktivasyonu, ikinci haberci moleküller olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) gibi sinyallerin üretilmesine ve PI3K/AKT ya da Ras/MAPK sinyal yollarının aktive olmasına neden olur. Bu non-genomik etki, hücrelerin çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin (TFs) aktivasyonunu tetikleyerek, hücreSEL süreçlerde önemli rol oynar (Harbeck vd., 2019).

ER α -pozitif metastatik meme kanseri vakalarında birinci basamak tedavi olarak endokrin tedavi uygulanır. Endokrin tedavi, ilaçların etki mekanizmalarına göre üç gruba ayrılır. İlk grup, ER α fonksiyonunu antagonize eden tamoksifen ve raloksifen gibi seçici ER modülatörleri (SERM'ler) içerir. Östrojenin aksine, tamoksifen gibi antagonist moleküller ER α 'yı inaktif konformasyonuna neden olur. İkinci grup, aromataz enzimini bloke ederek periferik dokularda östrojen üretimini baskılayan letrozol, anastrozol ve eksemestan gibi aromataz inhibitörlerini (AI'lar) içerir. Üçüncü grup olarak ER α 'nın ifadesini azaltmak için anti-östrojen olan fulvestrant gibi seçici ER düzenleyiciler (SERD'ler) yer alır (Traphagen vd., 2021). Östrojen bağımlı sinyal yolunun ER+ meme tümörlerinin büyümesi için kritik olduğu, dolayısıyla terapötik müdahalede önemli bir hedef olduğu belirtilmiştir (Xue vd., 2019). Ancak, endokrin tedaviler başlangıçta etkili olsa da, bu tedavilere direnç gelişmesi ciddi bir sorun olarak

karşımıza çıkmaktadır. Direnç, tedavi başlangıcında de novo olarak veya tedavi sürecinde kazanılmış olarak gelişebilir (H. Yang vd., 2021). Bu direncin ortaya çıkmasında, ESR1 geninde mutasyonlar ve ER α sinyalini etkileyen ko-regülatör proteinlerdeki değişiklikler gibi faktörler rol oynamaktadır (Nath vd., 2022; Spoerke vd., 2016). Son çalışmalar, endokrin direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır. Örneğin, ESR1 mutasyonlarının, daha agresif bir hastalık fenotipi ve standart endokrin tedavilere daha zayıf yanıtlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Spoerke vd., 2016). Direnç sorununu çözmek için, araştırmacılar, endokrin tedavisini CDK4/6 inhibitörleri ve mTOR inhibitörleri gibi diğer tedavi yöntemleriyle birleştiren kombinasyon terapileri üzerine yoğunlaşmıştır (A vd., 2021). Bu kombinasyonlar, tümör büyümesi ve hayatta kalması ile ilgili birden fazla yolu hedefleyerek endokrin tedavisinin etkinliğini artırmayı amaçlamaktadır. Örneğin, CDK4/6 inhibitörlerinin, ER+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyerek direnci aşmada umut verici olduğu görülmüştür (A vd., 2021). Bunlara ek olarak, endokrin direncin diğer sinyal yollarıyla, özellikle insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) yollarıyla etkileşime girerek, bu yollarda meydana gelen çapraz etkileşimin sonucunda oluşabileceği belirlenmiştir (H. Yang vd., 2021).

Çalışmalar, ER α sinyali ile ilişkili genlerin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin dirençli kanser hücre fenotiplerinin ortaya çıkmasına neden olabileceğini göstermektedir (Fillmore vd., 2010). Örneğin, fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyal yolunun yukarı regülasyonu, östrojen bulunmamasına rağmen daha agresif bir kanser fenotipine geçişle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca tümör davranışını ve tedaviye yanıtları kolektif olarak etkileyen sinyal yolları, düzenleyici proteinler ve post-translasyonel modifikasyonlar da dirençli kanser hücre fenotip gözlenmesinde önemli rollere sahiptir. ER α aktivitesinin düzenlenmesi, fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla regüle edilmektedir. Bu modifikasyonlar, ER α sinyalini güçlendirebilir veya zayıflatabilir ve böylece tamoksifen gibi endokrin tedavilere karşı meme kanseri hücrelerinin yanıtını etkiler (H. Yang vd., 2018, 2021). Örneğin, ubiquitin ligaz TRIM3, ER α sinyalini kolaylaştırırken, SMURF1 gibi bazı proteinler tümör baskılayıcı yolları baskılayarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekler (H. Yang vd., 2018). Ayrıca, FOXA1 gibi ko-regülatörlerin ekspresyonu, ER α 'nın kromatine bağlanmasında önemli rol oynar ve transkripsiyonel aktivitesinin etkili bir şekilde düzenlenmesi için gereklidir (M. Zhu vd., 2013). Bu mekanizmaların anlaşılması, özellikle tedavi direnci bağlamında, ER α -pozitif meme kanseri için daha etkili tedavilerin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

1.1.3. MCF-7 hücre hattı

MCF-7 hücre hattı, 1973 yılında Dr. Soule ve çalışma arkadaşları tarafından Michigan Kanser Vakfı'nda, metastatik hastalığı bulunan 69 yaşındaki bir kadının plevral sıvısından izole edilmiştir. Bu hücreler, ileri evre meme kanseri araştırmaları için önemli bir model teşkil

etmekte olup, özellikle östrojen reseptör pozitifliği ile tanınmaktadır (Soule vd., 1973). Bu hücre hattı, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif luminal A moleküler alt tipi meme kanseri hücre hattıdır (Done, 2011). MCF-7, düşük metastatik potansiyele sahip, düşük saldırganlık ve invazyon gösterir (Gest vd., 2013; H. vd., 2011). MCF-7 hücreleri, normal meme epitelyal hücrelerinin birçok özelliğini göstermektedir. Bu hücreler, özellikle çok hücreli 3D agregatlar oluşturabilme ve bu agregatların zamanla lümen içeren sferoidlere dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak MCF-7 hücrelerine ait sferoidler, genellikle düzensiz çekirdek yapısına sahip, hücreler arası güçlü bağlantılar sergileyen ve lümen oluşumu gözlenmeyen hücre kütleleri olarak tanımlanmaktadır.

1.1.4. Tedavi yöntemleri

Meme kanseri hastaları için tedavi stratejisi belirlerken, tümörün boyutu, tümörün yeri, kanserin evresi, hastanın yaşı, menopoz durumu, hormon reseptör durumu, belirli genlerin ekspresyonu, mutasyonu ve gen amplifikasyonu gibi kişisel değişkenler göz önünde bulundurulur. Bu faktörlerin değerlendirilmesine göre, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immunoterapi yaklaşımlarından biri veya bunların kombinasyonları seçilir. Primer bu tedavilere ek olarak, kalan kanser hücrelerini yok etmek, kanserin yayılmasını veya tekrarını önlemek amacıyla kemoterapi ilaçları, radyoterapi ve hormon tedavisinin kombinasyonu ile yapılan adjuvan tedavi şekli uygulanır.

Meme kanserinde geniş bir tedavi yelpazesi geliştirilmiş olmasına rağmen, genel sağkalım oranı düşük kalmaya devam etmektedir. Örneğin üçlü negatif meme kanseri gibi bazı meme kanseri türleri özellikle tedavi edilmesi zor olan türlerdir. Tekli tedaviler (hedefe yönelik tedavi, hormon tedavisi, immunoterapi veya kemoterapi gibi) bazı meme kanseri hastalarının tedavisinde etkili olsa da, bu tedavilerin etkinliği zamanla azalabilmektedir ve bazı hastalar tedaviye karşı direnç geliştirebilmektedir. Özellikle metastatik meme kanseri olan hastalar bu tedavilere iyi yanıt vermemektedir (Y. Liang vd., 2020). Meme kanseri ölümlerinin yaklaşık %75'i metastazlar nedeniyle gerçekleşmekte olup, bu oran son yıllarda değişmemiştir. Önemli monoterapilerinin bazıları Tablo 1.2' de verilmiştir (Greenwalt vd., 2020). Monoterapi tedavisine olumlu yanıt veren hastalar arasında bile, birçok hastada sonunda tümör nüks etmektedir (Tan vd., 2021; D. Wu vd., 2021). Bu nedenle, meme kanseri için daha etkili ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımları araştırılmaya devam etmektedir.

Geleneksel tedavi olarak kullanılan monoterapiler dışında, klinikte ve klinik deneylerde çeşitli kombinasyon terapileri kullanılmaktadır. Kombinasyon terapilerinde ilaç direncini önleme, toksisite, ilaç-ilac etkileşimi riskleri ve yetersiz sağkalım analizi gibi zorluklar mevcuttur. Bu yüzden hastaya yönelik en iyi yaklaşımı geliştirmek amacıyla klinik ve preklinik çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (Bianchini vd., 2022; Fares vd., 2020).

Tablo 1.2. Monoterapilerde yaygın olarak kullanılan seçilmiş ilaçlar (Y. Wang & Minden, 2022a)

No	Monoterapiler Hedefe Yönelik Terapi	İlaç Açıklaması	Mekanizması
1	Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib	CDK 4/6 İnhibitörü	Rb fosforilasyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolü
2	Capivasertib	AKT İnhibitörü	PI3K/AKT/mTOR sinyalinin inhibisyonu, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi
3	Everolimus	mTOR İnhibitörü	
4	Pilaralisib, Alpelisib	PI3K İnhibitörü	
5	Voxtalisib	PI3K ve mTOR İnhibitörü	
6	Bevacizumab	VEGF İnhibitörü	Anti-VEGF monoklonal antikor, kan damarı büyümesinin inhibisyonu
7	Olaparib, Talazoparib, Niraparib	PARP İnhibitörü	PARP inhibisyonu, DNA onarım sürecinin bozulması, artmış kanser hücresi ölümü
No	Hormon Terapi	İlaç Açıklaması	Mekanizması
1	Letrozole, Anastrozole, Exemestane	AIs	Aromataz enziminin inhibisyonu, böylece östrojen üretiminin engellenmesi
2	Tamoxifen	SERM	Östrojen/ER etkileşiminin inhibisyonu
3	Fulvestrant	SERD	Meme kanseri hücrelerinde ER'nin yıkımı
No	İmmün Terapi	İlaç Açıklaması	Mekanizması
1	Durvalumab, Pembrolizumab, Atezolizumab	PD-1/PD-L1 inhibitor	Bağışıklık düzenleyici kontrol noktalarının inhibisyonu, böylece T hücreleri ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimin engellenmesi
2	Pertuzumab, Trastuzumab	HER2 hedefli immünoterapi	HER2 sinyal yolunun inhibisyonu ve HER2 aşırı ekspresyonuna karşı bağışıklıkla ilgili tepkilerin aktivasyonu
No	Kemoterapi	İlaç Açıklaması	Mekanizması
1	Paklitaksel, Doksetaksel	Taksanlar	Hücre bölünmesinin önlenmesi
2	Doksorubisin, Epirubisin	Antrasiklinler	DNA hasarının tetiklenmesi
3	Sisplatin, Karboplatin	Platin ajanlar	DNA sentezini müdahale ederek hücre bölünmesini engellemek

AIs: aromataz inhibitörleri, mTOR: rapamisininin memelilerdeki hedefi, SERD: selektif östrojen reseptörü düşürücü, SERM: selektif östrojen reseptörü modülatörü, ER: östrojen reseptörü, CDK 4/6: siklin bağımlı kinaz 4 ve 6, PD-1/PD-L1: programlanmış hücre ölümü-1/programlanmış ölüm ligandı-1, PARP: Poli ADP-Riboz Polimeraz, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü, HER2: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2, PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaz.

1.1.4.1. Radyoterapi

Son 20 yılda radyasyon biyolojisinde büyük bir paradigma değişimi yaşanmış ve hücrel radyasyon tepkilerinin biyolojik ve moleküler belirleyicilerini anlamada büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Radyoterapi veya ışın tedavisi, kanser tedavisinde son derece etkili bir terapi yöntemi olup, kanser tedavisinde önemli yollardan biridir ve hayatta kalma ve palyatif faydalar

sağlar (Guadagnolo vd., 2013; Liauw vd., 2013). Ameliyat edilemeyen tümörlere sahip hastalar için radyoterapi tek seçenektir (Durante & Loeffler, 2010). Ayrıca, ameliyat sonrası tam olarak çıkarılamayan veya nüks eden tümörlere sahip hastalar da genellikle radyoterapi ile tedavi edilir. Kansere hastalarının yaklaşık %50'si hastalıkları süresince ya tedavi amacıyla ya da kanserin neden olduğu ağrı gibi semptomları hafifletmek için palyatif tedavi olarak (Delaney vd., 2005) radyoterapi alır (Begg vd., 2011).

Radyoterapi, kanser hücreleri üzerinde yüksek fiziksel enerji biriktirerek kanseri yok eder. Kansere tedavisinde radyasyonun ilk klinik kullanımı, Roentgen'in 1895'te X-ışınlarını keşfetmesinden kısa bir süre sonra, 19. yüzyılın sonlarında kaydedilmiştir ve yıllar içinde geliştirilen radyasyonun etkinliği büyük faydalar göstermiştir. İyonlaştırıcı radyasyon, DNA hasar yanıtı açısından hızla çoğalan kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha duyarlı olduğu mantığına dayanarak kanseri tedavi etmek için kullanılır. Özet olarak lokalize malign tümörleri olan hastalar, hastalıklarının seyri boyunca bir aşamada radyoterapi ile tedavi edilmektedir (Moding vd., 2013; Baskar vd., 2012; Bentzen, 2006).

Radyoterapi normal hücre toksisitesini azaltmak amacıyla, genellikle birkaç hafta süresince çoklu fraksiyonlar halinde uygulanır ve yaklaşık %40 oranında küratif tedavi sağladığı tahmin edilmektedir (Barnett vd., 2009). Radyoterapi ayrıca oldukça uygun maliyetli bir tedavi yöntemidir ve tek bir radyoterapinin kanser bakımının toplam maliyetinin yalnızca %5'ini oluşturduğu belirtilmektedir (Ringborg vd., 2003). Radyoterapi, tümör hücrelerini etkili bir şekilde yok etmek için düşük ve yüksek lineer enerji transferi (LET) radyasyonları kullanır ve bu sırada normal dokulara verilen biyolojik etkili dozu en aza indirerek toksisiteyi önlemeyi amaçlar. ET, radyasyonun canlı hücreler veya dokular boyunca ilerlerken birim mesafe başına neden olduğu iyonizasyon sayısını ifade eden bir ölçüm olarak tanımlanır. Kansere tedavisinde en yaygın kullanılan radyasyon türleri arasında X-ışınları, gamma ışınları ve yüklü parçacıklar yer alır. Radyasyon onkolojisinde, radyasyon vücut dışındaki bir makineden (harici ışın radyoterapisi) veya kanser hücrelerine/dokularına yakın vücuda yerleştirilen radyoaktif materyalden (iç radyasyon tedavisi) uygulanabilir. Ayrıca, sistemik radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek için kanda dolaşan radyoaktif iyot gibi radyoaktif maddeleri kullanır (Niemantsverdriet vd., 2012).

İyonlaştırıcı radyasyona maruz kaldıktan sonra bir hücrenin genom bakımında seçebileceği birçok yol bulunmaktadır. p53, kanserde en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olan bir transkripsiyon faktörüdür (Brosh&Rotter, 2009). İyonlaştırıcı radyasyona yanıt olarak, hücre döngüsünün durdurulması, senescence, apoptozis ve DNA hasarı onarımını başlatarak tepki verir (Stiewe, 2007). Ancak, p53'ün DNA hasarı onarımı için apoptozis mi yoksa hücre döngüsünün durdurulması mı başlattığı karmaşık bir süreçtir ve kısmen p53 proteininin bolluğuna bağlıdır (düşük protein seviyeleri hücre döngüsünün durmasına ve yüksek protein seviyeleri apoptoza yol açar) (Lai vd., 2007). Bununla birlikte, tümör hücrelerinin çeşitli DNA onarım mekanizmaları ile radyasyonla indüklenen hasarı engelleyebildiği ve kanser

hücrelerinin radyo direncini daha da artırdığı bilinmektedir (Jorgensen, 2009). Ayrıca, ATM veya DNA bağımlı protein kinazı (DNA-PK) gibi DNA onarım proteinlerinin inhibisyonunun kanser hücrelerini radyasyon tedavisine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Hickson vd., 2004; Rainey vd., 2008; Veuger vd., 2003).

DNA tamir yollarının yanı sıra, iyonlaştırıcı radyasyon aynı zamanda kanser hücrelerinde adaptif hücresel tepkilere neden olur. Farklı tedavilere dirençli sinyal iletim yolları aktive edilir ve direnç, fraksiyonlu radyasyon tedavisi sırasında hem içsel hem de sonradan edinilmiş olabilir (Toulany&Rodemann, 2013). Kanser hücrelerine bir proliferatif avantaj sağlayan veya hücre ölümünden kaçınmalarına izin veren sinyal iletim yolları, önemli bir klinik problem olarak kalır. Tümörlerin radyo dirençli hale gelebileceği moleküler olaylardan biri, hücre membranına bağlı reseptör tirozin kinazları (RTK'lar) tarafından düzenlenen sinyal iletim yollarının ligand bağımsız aktivasyonu ile gerçekleşir. Bu bağlamda, radyoterapi epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve AKT ve mammalian target of rapamycin (mTOR) gibi downstream kinazlar, sinyal transdüktör ve aktivatörü olan transkripsiyon (STAT) yolu ve Ras-mitogen-aktive edici protein kinaz (MAPK) yolu gibi çeşitli downstream sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Rodemann & Blaese, 2007). Bu yollar, hücre döngüsü, hayatta kalma, metabolizma, invazyon, anjiyogenez ve genomik istikrarsızlık gibi kanserin ana özelliklerini kontrol eder (Nyati vd., 2006).

Sonuç olarak radyasyon tedavisinin genel etkisi, DNA'ya doğrudan zarar vererek hücre ölümünü ve ardından hücre popülasyonlarının azalmasını, sonrasında da işlevsel eksikliği içerir. Radyasyonla indüklenen iyonizasyonlar, hücresel moleküllere doğrudan etki edebilir ve hasara yol açabilir. Ayrıca, hücrelerin su bileşeni (bir hücrenin %80'ini oluşturan) üzerindeki iyonizasyon veya uyarılma sonucunda serbest radikaller üreterek dolaylı olarak etki edebilirler. Radyasyonla indüklenen çift iplik kırıkları (DSB'ler), onarılmazsa hücre ölümüne neden olan en ölümcül DNA hasar türlerini temsil eder. Bununla birlikte, DNA hasar yanıt mekanizmaları, radyasyon tarafından neden olan dış ve iç hasara karşı hayati bir savunma hattını oluşturur ve hayatta kalma ile genomik kararlılığın korunması gibi iki farklı sonuçtan birini tetikler (Hausmann vd., 2020).

1.1.4.2. Cerrahi Yaklaşım

Meme koruyucu cerrahi tanımlamak için kullanılan, kadrantektomi, lumpektomi veya kısmi mastektomi dahil olmak üzere çeşitli terimler vardır. Bu terimler teknik olarak biraz farklılık gösterse de cerrahi yaklaşımda memenin korunması amacını korur. Kadranektomi, tümörün 2 ila 3 cm'lik bir kenar boşluğu, pektoralis fasyası ve üstteki deri dahil olmak üzere eksizyonunu içerir. Erken evre tümörlerin çoğunluğu kadrantektomiyi gerektirmez. Öte yandan lumpektomi, 1 cm'lik bir marjla daha az bir doku eksizyonu anlamına gelir. Lumpektomi genellikle lenf düğümü çıkarımı ile veya Evre 0, Evre I veya Evre II (bazen Evre III) meme

kanserlerinde uygulanır. Ayrıca, biyopsi meme kanserinin süt kanalının dışına yayıldığını gösteriyorsa, lumpektomi ve mastektomi sırasında lenf düğümlerinin çıkarılması veya aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılabilmektedir (Czajka & Pfeifer, 2024; Darcansoy İşeri, 2009).

Mastektomi teknikleri, yüksek morbidite ve önemli kozmetik deformitelerle ilişkilidir. Mastektomi, etkilenen memenin cerrahi olarak çıkarılması işlemidir. Basit bir mastektomide tam bir koltuk altı lenf bezi diseksiyonunu gerektirmeden tüm meme dokusunu çıkarılır. Mastektomi, Evre 0, Evre I, Evre II veya Evre III (bazen Evre IV) meme kanseri olan kadınlar için yaygın bir tedavi yöntemidir. Mastektomi genellikle eliptik bir kesi ve tekdüze fleplerin kaldırılmasını içerir. Bu flepler tipik olarak kalınlık bakımından farklılık gösterir ancak genellikle 5 mm ile 1,0 cm arasında değişir. Mastektominin iki ek şekli de mevcuttur. Bunlar cilt koruyucu ve meme ucu koruyucu mastektomilerdir (Freeman vd., 2018).

1.1.4.3. Hormon/Endokrin Tedavisi

ABD'de meme kanseri hastalarının %70'inden fazlasında östrojen reseptör-alfa (ER α) yüksek düzeyde ifade edilmektedir (Márquez-Garbán vd., 2019). Hormon tedavisi, diğer adıyla endokrin tedavi, hormon reseptörü (HR) pozitif meme kanseri olan hastaların yaşam sürelerini artırmaktadır. Bu tedavi yaklaşımı, antiöstrojenler ve aromataz inhibitörlerinin kullanımını içerir. Antiöstrojenler genellikle östrojen reseptörlerini modüle ederek etki göstermektedir. Antiöstrojenlerin başlıca türleri "selektif östrojen reseptör modülatörleri" (SERM'ler) ve "selektif östrojen reseptör azaltıcıları" (SERD'ler) olarak bilinir (Maximov vd., 2013). Günümüzde, SERM'ler ve SERD'ler (örneğin, Tamoksifen, Toremifen, Raloksifen, Fulvestrant) özellikle postmenopozal kadınlarda meme kanseri tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pinkerton & Thomas, 2014). Aromataz inhibitörleri (AI'lar) ise östrojen üretimini bloke etmek için tasarlanmış başka bir inhibitör grubunu oluşturmaktadır. AI'lar, periferik dokularda androjenlerin östrojene dönüşümünü engelleyerek ER-pozitif meme kanserini tedavi etmekte de kullanılmaktadır (Loibl vd., 2021). Bazı hormon reseptörü pozitif meme kanserleri aynı zamanda progesteron hormonu için de pozitiftir. Birçok ER-pozitif meme kanseri aynı zamanda PR-pozitif olduğundan, ER'yi bloke eden tedaviler genellikle ER+/PR+ meme kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır (Fowler vd., 2020; Kharb vd., 2020; Y. Liang vd., 2020). Hormon tedavisi birçok meme kanseri hastasında yararlı etkiler gösterse de, uzun süreli östrojen stimülasyonu nedeniyle bazı dokulara (örneğin, kemik, kalp ve beyin) bu tedavi şekli zarar verebilmektedir (Maximov vd., 2013). Bu nedenle, hormon tedavisinin yan etkileri bu terapinin kullanımını sınırlayabilmektedir. Bu sorunları çözmek için yeni kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi ve araştırılması hala devam etmektedir (Loibl vd., 2021).

1.1.4.4. İmmünoterapi

Bağışıklık sistemimizi güçlendirmeye yönelik immünoterapi stratejileri geliştirmek, geç evre kanser tedavilerinde oldukça spesifik ve ümit verici bir yaklaşımdır. Son on yılda, hastaların bağışıklık sistemini değiştirip eğitmeye yönelik birçok yeni yöntem ortaya çıkmıştır (Marra vd., 2019). Bu yöntemler, bağışıklık sisteminin vücut içindeki anormal hücreleri tespit edip tanınmasına ve çeşitli hücre yüzeyi belirteçlerini kullanarak bu hücreleri hedef almasına olanak tanır. Örneğin, tedavi rejimlerine immünoterapi eklenmesi, birçok kanser türünde, özellikle üçlü negatif meme kanserlerinde kemoterapi ilaçlarının başarı oranını önemli ölçüde artırmıştır (Sambi vd., 2019).

TNBC, tüm meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. TNBC, ER, PR ve Her2'nin ifadesine sahip olmadığından, TNBC hastaları endokrin tedavisi veya HER2-hedefli tedaviden fayda görmezken, immünoterapi bu tip hastalar için tercih edilmektedir. Diğer tedavilerin aksine, immünoterapi, hastanın kendi bağışıklık sistemi aracılığıyla anormal hücreleri yok etme stratejisidir, bu da tümör büyümesinin baskılanmasına yol açar. İmmünoterapide bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, T-hücre transfer tedavisi, monoklonal antikolar, tedavi aşılı ve bağışıklık sistemi modülatörleri kullanılabilir (Emens vd., 2021).

Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, kontrol noktası proteinlerinin partner proteinleriyle bağlanmasını engelleyerek T-hücre yanıtının aktivasyonuna ve ardından kanser hücrelerinin öldürülmesine yol açmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri arasında programlanmış hücre ölümü-1/programlanmış ölüm ligand-1 (PD-1/PD-L1) antagonistleri (Avelumab, Atezolizumab, Tezolizumab ve Pembrolizumab gibi) ve sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) antagonistleri (Tremelimumab ve İpilimumab gibi) bulunur. PD1, PD-L1 ve CTLA-4 inhibitörleri genellikle metastatik TNBC, HR-pozitif (HR+) ve HER2-negatif (HER2-) meme kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Emens vd., 2021; Márquez-Garbán vd., 2019).

Özellikle Her2+ meme kanseri tedavisinde Trastuzumab (Herceptin), Trastuzumab-DM1 (T-DM1) ve Pertuzumab gibi Her2'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar kullanılmaktadır (Schneble vd., 2015). Trastuzumab, HER2+ metastatik meme kanserinin birinci basamak tedavisinde, FDA tarafından onaylanmış monoterapi olarak ya da kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılan bir monoklonal antikordur. Trastuzumab gibi monoklonal antikolar T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajların aktive ederek bağışıklığı uyarmaktadır. Ayrıca, Trastuzumab HER2'yi down regüle ederek kanser hücrelerinin büyümesini engellemektedir. İmmünoterapi ilaçları, daha iyi klinik sonuçlar elde etmek amacıyla tek başına veya kemoterapi ile birlikte kullanılabilir (Rimawi vd., 2018).

1.1.4.5. Kişiselleştirilmiş Hedefe Yönelik Tedavi

Bir hastanın kanseri bir diğer hastaya göre kanserli hücrelerin heterojen özellik göstermeleri, hastadan hastaya değişen genetik anormallikler, hastalığın hızı ve ilerlemesi, tedaviye yanıtı ve uygulanan ilaçlara karşı direnç geliştirme olasılığı açısından farklılık göstermektedir (Caon vd., 2020). Kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında bu heterojenliği anlayarak moleküler düzeydeki farklılıklara göre her bir hastaya özgü tedavi şekli uygulanmaktadır. Bu tedaviler arasında PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri ve mTOR yolunu inhibe eden AMPK aktivatörleri (Metformin ve Demetoksikurkumin), PARP inhibitörleri (Olaparib, Talazoparib, Veliparib, Iniparib), mTOR inhibitörleri (Everolimus), pan-PI3K inhibitörleri (örneğin, Buparlisib, Alpelisib, Pictilisib, Taselisib), CDK4/6 inhibitörleri (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) ve diğer tümör-spesifik moleküler hedef ilaçlar (örneğin, Deubikuitinazlar) ve mikroRNA'lar (örneğin, miRNA-200c, miRNA-21, miR-185-5p) bulunmaktadır (Cao vd., 2019; Perez, 2016). Örneğin, BRCA1 ve BRCA2 (meme kanseri duyarlılık genleri) mutasyonlarına sahip ve HER2-negatif metastatik meme kanseri olan hastalar, monoterapi ilacı Olaparib (oral PARP inhibitörü) ile tedavi edildiklerinde hastaların progresyonsuz sağkalım süresi, kemoterapi ile tedavi edilenlere göre 2.8 ay daha uzun olduğu ve hastalığın ilerleme veya ölüm riskinin kemoterapiye göre %42 daha düşük olduğu saptanmıştır (Robson vd., 2017).

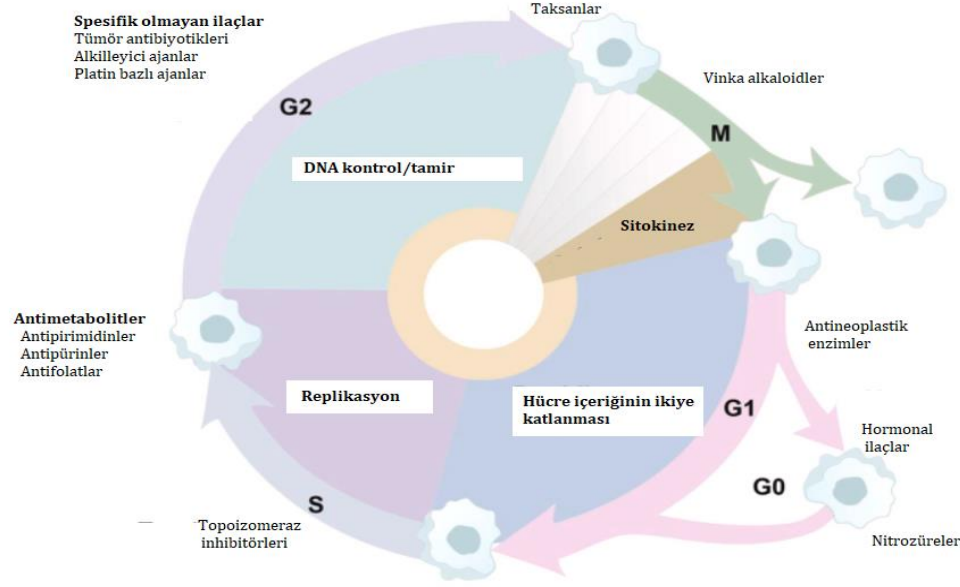
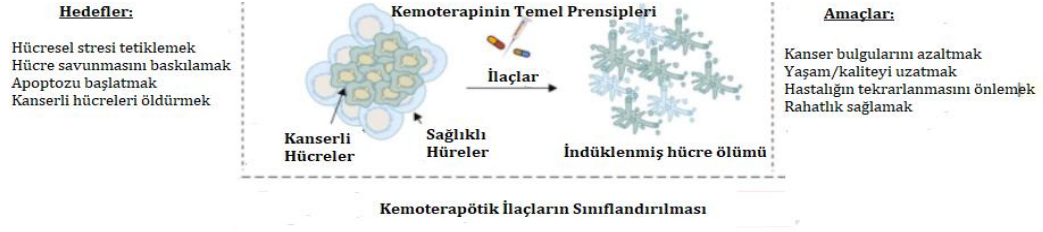
1.1.4.6. Kemoterapi

Kemoterapi fikri (toksik bileşikler ve ilaçlar kullanarak kanserli hücreleri yok etme) lenfatik dokuların ve kemik iliğinin hardal gazı tarafından yok edildiğine dair raporların ardından ortaya çıktı. Bu etkinin, gazın etkili bir türevi (nitrojen hardalı) kullanılarak fareler üzerinde doğrulanması, lenfoma dokularının etkili bir şekilde gerileme gösterdiğini ortaya koydu (Y. Chen vd., 2018; Ghanei, 2004). Nitrojen hardalı alan ilk hasta, lenfosarkoma hastası olan kırk sekiz yaşındaki bir hastaydı ve hastalığın seyri başlangıçta yavaşladı ve sonrasında hastalık temizlendi. Daha sonra hastalık nüks etti ve hasta öldü, ancak Yale Üniversitesi'nde yapılan bu gizli askeri deneme, kimyasalların kanser tedavisinde kullanılmasının ve çeşitli kanserlerin tedavisinde kanser kemoterapisi alanının gelişmesinin yolunu açtı (Christakis, 2011).

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelere kıyasla çok daha hızlı büyür ve bölünürler ve bu da onları fizyolojik olarak yüksek düzeyde stres altında bırakır. Bu nedenle, kemoterapide genellikle hücrelerin büyüme yeteneğini etkileyen ilaçlar kullanılır. Böylece kanserli hücreler diğer sağlıklı hücrelere göre daha hızlı ve etkili bir şekilde yok edilebilmektedir. Kemoterapinin hedefi, birincil tümörleri küçültmek, tümör büyümesinin ilerlemesini yavaşlatmak, birincil tümör bölgesinden vücudun diğer bölgelerine yayılmış olan (metastaz yapmış) kanser hücrelerini yok etmektir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar doğal, sentetik veya yarı sentetik olmalarına bağlı olarak doğalarına göre sınıflandırılabilirler (Darcansoy İşeri, 2009).

Kemoterapi önleyici ilaçların veya ilaç kombinasyonlarının seçimi genellikle kanserin türüne ve evresine bağlıdır. Bu ilaçların birincil amacı, kanser hücrelerini etkisiz hale getirmek ve tümörün büyümesinin neden olduğu stresi hafifletmektir. Tedavinin dozu ve süresi dikkate alınması gereken önemli iki noktadır. İlaçların çok yüksek dozlarda verildiği ve bu nedenle birçok yan etkiye ve diğer sağlıklı hücrelere zarar verdiği gözlemlenmiştir (Torino vd., 2013). Hastalığın nüksetmesi büyük bir zorluktur. Tekrarlama durumunda, kanser hücrelerinin uzun süreli ilaç maruziyeti sonrasında ilaç direnci kazandığı yaygın olarak gözlemlenmektedir. Kemoterapi çoğunlukla hastanın hayatta kalma süresini uzatmak ve rahatlatmak için verilir, bu nedenle palyatif kemoterapi olarak adlandırılır. Bu ilaçlara uzun süre maruz kalmak, hastanın fiziksel ve zihinsel sağlığı üzerinde aşırı olumsuz etkiler bırakabilmektedir ve devam eden tedaviyi zorlaştırabilmektedir. Onkologlar genellikle bu ilaçları belirli zaman aralıklarıyla vererek, kansere dönüşmemiş hücrelere iyileşme şansı verir (Mahner vd., 2013).

Birincil tedavinin yanı sıra, hastalığa karşı destekleyici stratejilerle ekstra mücadele sağlamak için hastalara adjuvan tedavi de verilir. Cerrahi ve radyasyon, kemoterapötik bir planı desteklemek ve aksi takdirde hedef alınamayan gizli kanser hücrelerini yok ederek hastalığı kontrol altına almak için hastalara verilebilir. Bazen, nüks etme olasılığını azaltmak için ameliyat veya radyasyon veya her ikisinden sonra hastalara mikrometastazları yok etmek için adjuvan kemoterapi verilmektedir. Adjuvan kemoterapi genellikle bir tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonraki üç ila beş hafta içinde başlar ve hastalığa bağlı olarak farklı tedavi sürelerine sahiptir. Kemoterapi genel sağkalımı önemli ölçüde iyileştirmiş olmasına rağmen, hastalar yaşam kalitelerini etkileyen geniş bir yelpazede fiziksel ve psikolojik semptomlar yaşamaktadır. Semptomlar nadiren tek başına ortaya çıkar. Kanser ve kemoterapi saç dökülmesi, iştah kaybı, tat değişiklikleri, ağız yaraları, mide bulantısı ve kusma, artmış tokluk hissi, ağrı, yorgunluk, depresif ruh hali ve anksiye neden olan yan etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Kemoterapi ilaçları, etki mekanizmaları, kimyasal yapıları ve başka bir ilaçla ilişkileri gibi faktörlere göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Bazı ilaçlar birden fazla şekilde etki etmektedir ve birden fazla gruba dahil olabilmektedir. Alkilyeyici ajanlar, topoisomeraaz inhibitörleri, antimetabolitler, mitotik inhibitörler (vinka alkaloidler, taksanlar), anjiyogenez inhibitörleri, hormonal ilaçlar, hedefe yönelik terapi ilaçları ve immünsüpresanlar, kemoterapötik olarak kullanılan türlerdir (Anand vd., 2023). Şekil 1'de kemoterapi prensibi, etki mekanizmaları şematize edilmiştir.



Şekil 1.3. Anand vd., (2023)'den modifiye edilen kemoterapinin temel prensiplerini ve farklı kemoterapötik ajan/sınıflarını gösteren şematik diyagram

1.1.4.7. Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyici ajanlar, nükleik asitlerdeki guanidin bazının 7. Azot atomuna irreversibl bağlanarak alkillenmesine neden olurlar. Bu şekilde DNA çift sarmalının oluşumunu/bağlanmasını engellerler ve DNA replike ve transkribe olmasını bozarlar. Bunlar, çoğu kanser türüne karşı verilen birinci basamak kemoterapötik ajanlardır, ancak terapötik değerlerinin yavaş büyüyen kanserlerde bilindiği bilinmektedir (Kondo vd., 2010; Qui & Wang, 2009). Bu ilaçlar lösemi, lenfoma, Hodgkin hastalığı, multipl miyelom ve sarkomun yanı sıra akciğer, meme ve yumurtalık kanserleri gibi birçok farklı kanseri tedavi etmek için kullanılır. Bunlar DNA'ya zarar verdikleri için kemik iliğinde uzun vadeli hasara neden olabilirler ve nadir durumlarda bu, akut lösemiye yol açabilir. Alkilleyici ajanlar, farklı sınıflara ayrılır; Azot hardalları: mechlorethamine (azot hardalı), chlorambucil, cyclophosphamide (Cytoxan®), ifosfamide ve melphalan gibi, Nitrozürelere: streptozocin, carmustine (BCNU) ve lomustine gibi, Alkil sülfonatlar: busulfan gibi, Triazinler: dacarbazine (DTIC) ve temozolomide (Temodar) gibi, Etileniminler: thiotepa ve altretamine (hexamethylmelamine) gibi (Pereg vd., 2008).

1.1.4.8. Antimetabolitler

Antimetabolitler, hücre içindeki bazı spesifik metabolitlerle rekabet edebilen, onların yerine geçebilen veya onları inhibe edebilen ve böylece hücrenel metabolizmaya müdahale eden - madde sınıfıdır. Bu moleküller genellikle bir hücrenel metabolit veya enzim-substratına benzer bir yapıya sahiptir, genellikle hücrenel ihtiyaçları karşılamak için bir enzim tarafından tanınmaktadır ve işlenmektedir. Tetrahidrofolatlar, dihidrofolat redüktaz enzimi tarafından indirgenmemiş diyet folatlarından oluşur. Örneğin, aminopterin, metotreksat (amethopterin), pirimetamin, trimetoprim ve triamteren gibi çeşitli ilaçlar bu metabolitlerin üretimi üzerinde doğrudan etkili olup, enzimin folat üretimini engelleyerek folat yetersizliğine yol açar. Metotreksat, bir antifolat ilaç olarak, dihidrofolat redüktazı (DHFR) baskılayarak dihidrofolik asidin (DHFA) tetrahidrofolik aside (THFA) dönüşümünü engelleyen son derece başarılı antikanser ilaçlarından biridir. (Mehrmohamadi vd., 2017; Raimondi vd., 2019). Metotreksat, anti-enflamatuar bir molekül olup, birçok kanser türünün yanı sıra romatoid artrit ve aşırı sedef hastalığı gibi birçok enflamatuar hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan antimetabolitler arasında 5-fluorourasil (5-FU), 6-merkaptopurin (6-MP), capecitabine, cytarabine, floxuridine, fludarabine, gemcitabine, hidroksiüre, methotrexate ve pemetrexed bulunmaktadır (Azim & Peccatori, 2011).

1.1.4.9. Mitotik İnhibitörler

Mitotik iğ ipliği inhibitörleri, hücrelerde mikrotübül dengesini bozarak etki gösterir. Mitotik inhibitörler genellikle bitki alkaloidleri ve diğer doğal ürünlerden türetilen bileşiklerdir. Bu ilaçlar, hücre döngüsünün M fazında mitozu durdurarak çalışır, Bu, ya mitotik iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek destabilizasyona neden olur ya da mitotik iğ ipliklerinin geri dönüşümsüz stabilizasyonuna neden olur. Mitotik inhibitörlere örnek olarak Estramustin, paklitaksel ve dosetaksel gibi taksanlar, iksabepilon gibi epotilonlar, vinblastin, vinkristin ve vinorelbin gibi vinka alkaloidleri verilebilir. Bu ilaçlar, meme, akciğer, miyelomlar, lenfomalar ve lösemiler dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünün tedavisinde kullanılır (Pereg vd., 2008).

1.1.4.10. Diğer Antineoplastik İlaçlar/Ajanlar

Kanser kemoterapisinde klinik uygulamalarda kullanılan alkileleme özelliğine sahip DNA'yı hedef alan birkaç diğer antineoplastik ajan da bulunmaktadır. Karboplatin, busülfan, bendamustin ve altretamin antineoplastik ilaçlara örnektir (Tournilhac vd., 2004).

1.1.4.11. Hormonal İlaçlar/ Anjiyogenez İnhibitörler/ İmmünoşüpresif Antikanser İlaçlar

Cinsiyet hormonları veya hormon benzeri ilaçlar, kadın veya erkek hormonlarının etkisini veya üretimini değiştiren hormon tedavisinde kullanılır. Bunlar, anti-östrojenler (örneğin, tamoksifen ve toremifen), aromataz inhibitörleri (örneğin, anastrozol ve exemestan), progesterinler, östrojenler ve anti-androjenlerdir. Anjiyogenez inhibitörleri, pre-angiyojenik faktörlerin ekspresyonu ve tümör vaskülarizasyonunun artması üzerinde etki gösterir, örneğin, talidomid (TNF α 'nın azaltılması) ve bevasizumab (vasküler endotel büyüme faktörüne karşı monoklonal antikor). İmmünoşüpresif antikanser ilaçlar, hematolojik malignitelerde kanserli beyaz kan hücrelerinin aşırı büyümesini bastırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kortikosteroidler (örneğin, prednizon), siklofosfamid ve merkaptopurin immünoşüpresif antikanser ilaçlara örnektir (Anand vd., 2023).

1.1.4.12. Topoizomeraz İnhibitörleri

Bu ilaçlar, S fazı sırasında DNA ipliklerinin ayrılmasına yardımcı olan topoizomeraz adlı enzimlere kovalent bağlar oluşturarak protein-DNA kompleksinin kalıcı olarak stabil hale gelmesini ve DNA ipliklerinin ayrılmasının engellenmesini neden olur. Topoizomeraz inhibitörleri, belirli lösemi türlerinin yanı sıra akciğer, meme, yumurtalık, gastrointestinal ve diğer kanserlerin tedavisinde kullanılır. Topoizomeraz inhibitörleri, etkiledikleri enzim türüne göre sınıflandırılır: Topoizomeraz I inhibitörleri Topotekan ve İrinotekan (CPT-11) içerirken, Topoizomeraz II inhibitörleri antrasiklinler (Doksorubisin), Etoposid (VP-16), Teniposid ve Mitoksantron (aynı zamanda bir anti-tümör antibiyotiği olarak da işlev görür) içerir (Missailidis, 2008).

1.1.4.13. Anti-Tümör Antibiyotikleri

Antibiyotikler, mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar, aktinomisetler) veya daha yüksek hayvanlar ve bitkiler tarafından yaşam sürecinde üretilen, anti-patojen veya diğer aktiviteleri olan ve diğer canlı hücrelerin gelişimini engelleyebilen ikincil metabolitlerdir (Barrios-González & Mejía, 2008). Araştırma bulgularına göre, antibiyotikler kanser hücrelerinin apoptozunu tetiklerken, kanser büyümesini engelleyebildiği ve kanser metastazını önleyebildiğini göstermiştir. Bu nedenlerle, antibiyotiklerin kullanımı kanser tedavisinde giderek daha fazla artmaktadır (D. Xia vd., 2017). Ancak, antibiyotiklerin uygulanması, patojenik bakterilerin yanı sıra Lactobacillus ve Bifidobacterium gibi yararlı bakteri gruplarını da ayırım gözetmeksizin ölümüne sebep olmaktadır (Reuter, 2001). Bağırsak mikrobiyomu, kanser tedavisinde çok önemli bir rol oynar. Dolayısıyla, antibiyotik kullanımı mikrobiyomun bozulmasına, vücudun bağışıklık kapasitesinin azalmasına ve enflamasyonun artmasına yol açar, bu da nihayetinde kanser tedavisinin etkisini azaltabilmektedir (Hernández, 2016).

Antikanser antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve antikanser aktiviteye sahip kimyasallardır. Bunlar başlıca peptidler ve antrakinonlar olup, malign kanserlerin kontrolsüz çoğalması, agresif büyümesi ve metastazı üzerinde belirgin ve etkili bir inhibitör etkiye sahiptirler. Antikanser antibiyotiklerin sınıflandırması başlıca antrasiklinler, mitomisin, bleomisin, aktinomisin, guanorisin ve endiyinleri içerir. Ayrıca, antikanser etkileri de oldukça karmaşık ve etkilidir (Saeidnia, 2015). Antrasiklin antikanser antibiyotikleri arasında başlıca daunorubisin, doksorubisin, epirubisin ve mitoksantron bulunur. Doksorubisin geniş klinik antikanser spektrumuna sahiptir. Genellikle solid kanserler için kullanılır ve malign lenfoma, meme kanseri, akciğer kanseri, karaciğer kanseri, mide kanseri ve yumuşak doku sarkomuna karşı etkilidir (M. Cheng vd., 2017; Miladiyah vd., 2020). Hem daunorubisin hem de doksorubisin, DNA baz çiftleri arasına girip DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanabilen antrasiklik bir düzleme sahiptir, bu da DNA'nın uzaysal yapısına bir engel oluşturur, böylece DNA ve DNA'ya bağımlı RNA sentezini inhibe eder ve pürin nükleozitler üzerinde seçici olarak etkili olabilmektedir. Aynı zamanda, sitotoksikite etkileri ile birlikte, daunorubisin ve doksorubisin nükleer topoizomeraaz aktivitesini de inhibe eder, topoizomeraazın neden olduğu DNA kırılma-bağlanma reaksiyonuna etki eder, bu da DNA çift sarmal kırılmasına ve DNA tek sarmal kırılmasına yol açar (Al-Aamri vd., 2019; Y. Wang vd., 2019).

1.2. Meme Kanserinde Doksorubisin Kullanımı

Kemoterapi, lenf nodu pozitif, tümörü 1 cm'den büyük olan kadınlar için standart tedavi yöntemidir. Doksorubisin hidroklorür (HCl) liposomal enjeksiyonu, klinik onay alan ilk liposomal kaplı antikanser ilacı olup, katı tümörler, nakledilebilir lösemiler ve lenfomalar dahil olmak üzere birçok kötü huylu tümöre karşı etkilidir (Slingerland vd., 2012). Doksorubisin şu anda meme kanserini tedavi etmek için kullanılan en etkili kemoterapötik ilaç olmasına karşın yan etkilerinden dolayı kullanımında sınırlamalar mevcuttur. Bu sınırlamalardan biri kanserli olmayan hücreler üzerindeki toksisite diğeri ise ilaç direnci gelişmesidir. Toksik etkileri çok yönlüdür ve kardiyotoksikite en iyi bilinen ve en kapsamlı çalışılan yan etkilerden biridir (Y. Shi vd., 2018). Konvansiyonel doksorubisinin kümülatif dozları 450 mg/m²'nin altında kardiyomiyopati nadiren gözlemlenmiştir; ancak, çalışmalar, doksorubisin kaynaklı konjestif kalp yetmezliğinin (CHF) daha önce belirtilenden daha düşük dozlarda ve daha sık meydana gelebileceğini göstermiştir. Kümülatif dozun ilacın vücut yüzey alanına göre 400 mg/m² olduğu durumlarda konvansiyonel doksorubisin kaynaklı CHF insidansının yaklaşık %5 olduğunu, bu oranın 550 mg/m²'de %26'ya, 700 mg/m²'de %48'e yükseldiğini rapor etmiştir (Swain vd., 2003; Von Hoff vd., 1979). Doksorubisin ile tedavi edilen hasta popülasyonunun %9'unda doksorubisine bağlı kardiyotoksikite meydana geldiği ve alınan kümülatif doza bağlı olarak bu oranın değiştiği bildirilmiştir. Bu kardiyotoksikitenin altında yatan mekanizmalar yoğun bir şekilde araştırılmış olsa da, kesin kanıtlar bulunamamıştır (van der Zanden vd., 2021). Kardiyotoksikitenin altında yatan mekanizmaların apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon,

kalsiyum dzensizliği, inflamasyon ve oksidatif stres olabileceği rapor edilmiştir (Linders vd., 2023).

1.2.1. Doksorubisin

1950'lerin başlarında antikanser bileşik olara toprak kaynaklı bir mikroorganizma olan *Streptomyces peucetius* suşundan üretilen bir antibiyotik, fare tümörleri üzerinde iyi aktivite gösterdiği bulundu. Bu yeni bileşik daunorubisin olarak adlandırıldı ve akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarıyla kullanıldı (Brockmann, 1963). Ancak, 1967'de daunorubisinin ölümcül kardiyak toksisiteye neden olabileceği anlaşıldı. Araştırmacılar, 1969 yılında daunorubisinin modifiye edilmiş türevi antrasiklin yapısında Adriamisin adı verilen bir antibiyotik ürettiler daha sonra bu bileşik doksorubisin olarak adlandırıldı (Arcamone vd., 1969). Doksorubisin kemik sarkomları, solid tümörler, lösemi, lenfoma, yumurtalık ve meme kanseri tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan bir kemoterapötik ajandır (Johnson-Arbor & Dubey, 2024). Bu antikanser bileşiğin FDA tarafından bir çok kanser (karsinom, sarkom, hematolojik malignite ve meme kanseri) tedavisinde onaylanmış en etkili kemoterapi ilaçlarından biri olarak kabul edildiği gösterilmiştir (Carvalho vd., 2009).

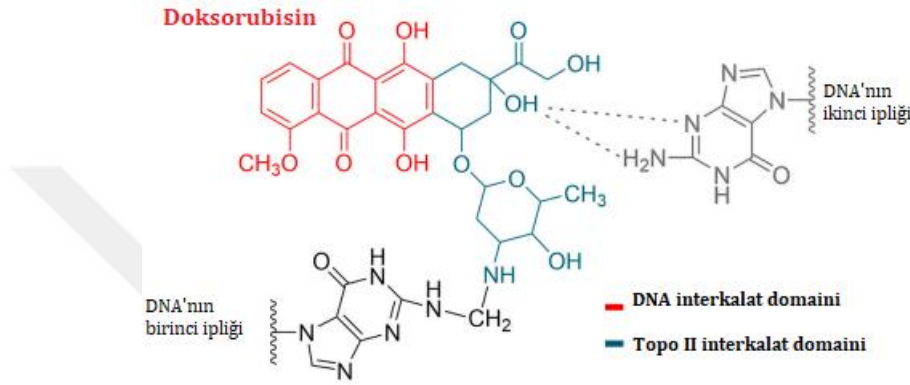
Doksorubisinin etki mekanizması olduk karmaşıktır ve hücre içine alındıktan sonra birden fazla yolla etki gösterir (Kciuk vd., 2023). Doksorubisinin etki mekanizması olduk karmaşıktır ve hücre içine alındıktan sonra birden fazla yolla etki gösterir (Mattioli vd., 2023). Bunun yanı sıra, son çalışmalar doksorubisinin DNA hasarına neden olma, reaktif oksijen türleri (ROS) retimi, apoptozu tetikleme, mitokondri işlevini bozma, otofaji indükleme ve oksidatif stresi artırma gibi çeşitli antikanser mekanizmalara etki ettiğini ortaya koymuştur (Linders vd., 2024). Aşağıda, bu antikanser mekanizmaların bazıları ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

1.2.1.1. DNA İnterkalasyonu

Antrasiklinler çoğunlukla düzlemsel, aromatik moleküllerdir ve aglikon grupları DNA 'da GC baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlanır, böylece komşu baz çiftlerini birbirinden ayırırlar ve bir veya daha fazla şekerle DNA'nın küçük oluğuna yerleşirler. Antrasiklinler, DNA'ya yüksek afinite ile bağlanır. Bir Dox molekülünün bağlanması, çift sarmalın bkmn -27° kadar gevşetir ve DNA heliksinde pozitif spersallanmaya yol açar. Bu gevşeme ile DNA topoizomeraz II enzimi çalışamaz bu olay DNA replikasyonu ve transkripsiyon inhibe olmasına neden olur (Salerno vd., 2010; F. Yang vd., 2013).

Antrasiklin interkalasyonu, DNA'ya bağlı süreçleri etkileyen burulma stresine neden olur ve nükleozomların yapısını ve dinamiklerini değiştirir. Bu, nükleozomların artan şekilde serbest bırakılmasına (nükleozom uzaklaştırılması olarak da adlandırılır) ve nükleozomların

kendilerinde yapısal değişikliklere neden olarak H2A/H2B dimerlerinin tetramerik histon çekirdeğinden ayrılmasını artırır (Martins-Teixeira & Carvalho, 2020). Dox, DNA'nın bir ipliğindeki guanin ile formaldehit aracılığıyla kovalent bir bağ oluşturur ve karşı iplikteki guanin ile hidrojen bağları oluşturur. Antrasiklin gruplarının bağlanma bölgeleri "DNA interkalat domain" kırmızı renkte gösterilmiş, topoisomerez II interkalat domaini ise yeşil renkte gösterilerek Şekil 1.4'te belirtilmiştir.



Şekil 1.4. Mattioli vd. (2023)'den modifiye edilen Dox-DNA kompleksinin yapısı

1.2.1.2. DNA-Antrasiklin Kompleks Oluşumu

Antrasiklinler, DNA ile kovalent ve hidrojen bağları aracılığıyla kompleks oluşturur. Bir iplik antrasiklinle kovalent bağlar oluştururken, bu etkileşim diğer iplikte hidrojen bağlarının oluşumuyla stabil hale gelir (Bilardi vd., 2012). Yapısal olarak, antrasiklinler öncelikle GC baz çiftlerinde interkalasyon oluşturur. Bu, guanin bazının diğer DNA bazlarından daha büyük bir yüzey alanına sahip olmasından dolayıdır, bu da antrasiklin molekülü ile etkileşim olasılığını artırır (Chaires vd., 1987).

Antrasiklinlerin döngüye girmeleri ve enzimatik olarak yıkımı DNA-ilaç addüktleri tarafından engellenir, bu şekilde ROS ve toksik metabolitler üretilir (Rephaeli vd., 2007). DNA-ilaç addüktleri, transkripsiyon ve replikasyonun inhibe olması, çift sarmallı kırıkların (DSB) oluşumu ve apoptozun indüklenmesi gibi farklı etkilere sahiptir. İn vitro transkripsiyon deneyleri, Dox'un (formaldehit ile önceden aktive edilmiş) transkripsiyon sürecine bloklar oluşturarak transkripsiyonu engellediğini göstermiştir. Bu blokların, muhtemelen ilaç ile guanin (G) arasındaki etkileşim ve bir zincirler arası G-Dox-G çapraz bağı oluşumu nedeniyle, GpC bölgelerine yakın yerlerde daha büyük olduğu bulunmuştur (Cullinane & Phillips, 1990).

Bilardi vd., (2012) fare meme kanseri hücrelerine Dox uygulaması sonrası, doksorubisinin [8H]-timidin inkorporasyonunu engelleyerek DNA replikasyonunu bozduğu ve hücre

döngüsünü durdurarak Dox'un hücrenin replikatif süreçlerine müdahale etme yeteneğinin olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, bu ekip DNA replikasyonu esnasında, replikasyon makineleri addükt oluşumu noktalarında duraklayabileceğini ve bunun da DSB'lerin (çift sarmallı kırıklar) ve DNA hasarının olasılığını artırarak replikasyon çatalının çökmesine neden olabileceğini savunmuştur.

1.2.1.3. Topoisomerez II İnhibisyonu

Memelilerde DNA'da tek iplikli kırıklar oluşturan monomerik tip I topoisomerez ve çift iplikli kırıklar oluşturan dimerik tip II topoisomerez enzimleri bulunmaktadır. Bu enzimler, DNA süper sarmallarına bağlanır, DNA'da kırıklar oluşturur, burulma stresini azaltır ve kırıkları yeniden birleştirerek DNA transkripsiyonu, replikasyonu, onarımı ve diğer süreçlere yardım eder. Antrasiklinler ise topoisomerez II enzim fonksiyonunu engelleyerek abortif antrasiklin-topoisomerez-DNA üçlü kompleksi oluşturur ve geri dönüşü olmayan DNA hasarı indükler. Bu kompleks, DNA-topoisomerez II kompleksini stabilize eder, muhtemelen enzimi kırılma bölgesinde hapsederek topoisomerezin kırılmış fosfodiester bağlarını düzgün bir şekilde yeniden oluşturmasını engeller. Dolayısıyla, antrasiklinler topoisomerez II'nin fizyolojik fonksiyonunu bozarak onu DNA'yı kıran bir nükleaz haline dönüştürülür, bu da genomik instabiliteye yol açar ve bu da hücreyi apoptotik yola sürükler (Visone vd., 2020).

1.2.1.4. ROS Oluşumu ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Doksorubisinin mitokondride sitozolden 100 kat daha fazla biriktiği bilinmektedir. Bu birikme mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun yan ürünü olan ROS üretiminin artmasına neden olmaktadır. ROS, bazı aerobik metabolizma reaksiyonlarında üretilen moleküllerdir; bunlar çoğunlukla mitokondrinin iç zarında oksidatif fosforilasyon sırasında elektron taşıma zincirinde oluşur. ROS seviyesi hücre içerisinde çok arttığı zaman hücre zarında ve hücre yapıları üzerinde hasara yol açarak hücre disfonksiyon ve apoptoza neden olabilmektedirler (S. Zhang vd., 2012). Doroshov (2019) tarafından Ehrlich kanser hücreleri ile yaptıkları araştırmada Dox dozuna bağlı bir şekilde süperoksit anyonunun üretiminin de arttığını saptandı. Bu, elektronların NADPH'den Dox'a geçtiği ve NADPH: sitokrom P-450 redüktaz tarafından Dox yarı-kinonuna (SQ-Dox) dönüştürüldüğü, ardından bir oksijen molekülüne (O₂) geçtiği, süperoksit anyonu (O₂⁻) ürettiği ve tekrar bir Dox molekülü elde ettiği döngüsel olarak gerçekleştiği görülmüştür. Bu mekanizma ile Dox, Dau ve bleomisin gibi antrasiklinler, elektron taşıma zinciri komplekslerine doğrudan müdahale ederek ROS üretimini artırmaktadır. Dox, ayrıca kardiyomiyositlerde topoisomerez IIβ enzimini inhibe ederek mitokondriyal fonksiyonu bozabilirler, bu da nükleer hasara, p53 aktivasyonuna ve mitokondriyal fonksiyonun ve bozuk mitokondriyal biyogenezin aşağı yönlü inhibisyonuna yol açar (S. Zhang vd., 2012).

1.2.1.5. Apoptozun İndüklenmesi

Doksozobisin, otofaji, ferroptoz, nefroptoz, piroptoz ve apoptoz gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla kontrollü hücre ölümünü indükleyebilmektedir (Christidi & Brunham, 2021). J. Chen vd., (2011), H9c2 sıçan miyokard hücrelerinde Dox uygulaması sonrası hücrelerde oksidatif stres oluştuğu ve ROS üretiminin arttığını saptamıştır. Bu olayın sonucunda AMPK proteininin aktive olduğu, bu aktivasyonun p53'ün fosforilasyonuna ve sonuç olarak apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Apoptozun gerçekleşme sürecinde p53'ün aktivasyonu, Bax'ın sitoplazmadan mitokondriyal yüzeye taşınmasına neden olur ve Bcl-2 ile kompleks oluşturur. Ardından sitokrom c salınımını gerçekleştirir, sonrasında sitokrom c, ve Apaf-1 procaspase-9 ile kompleks oluşturur, bu da caspase-9 ve caspase-3'ün ve ardından caspase-6 ve caspase-7'nin aktivasyonuna yol açar, bu da apoptoza neden olur. Dox ayrıca NFAT/Fas/FasL yolunu aktive ederek apoptozu indükleyebilmektedir. Wistar sıçanlarında yapılan bir çalışmada Dox'un kardiyomiyositler üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirilmiştir. Bu çalışmada Dox uygulaması sonrası, sitokrom c, Bax ve kaspaz-3 protein seviyelerinin değiştiği, mTOR aktivitesinin azaldığı ve Bcl-2 seviyelerini azalırken, ERK1/2, MAPK ve JNK seviyelerini arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, Dox'un nükleer faktör-aktive T hücresi 2/3/4 (NFAT 2/3/4)'ü modüle ettiği Fas/FasL seviyelerini arttırdığı saptanmıştır. Fas/FasL seviyelerinin artmasının kaspaz-8 aracılığıyla programlanmış hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Shati, 2020).

1.2.1.6. Hücre Zarı Değişiklikleri ve Lipid Disfonksiyonu

Antrasiklinler, özellikle Dox, hücre zarlarına zarar vermesi ve hücre zarlarının akışkanlığını ve lipid organizasyonunu azaltması (Murphree vd., 1981) ve hücre zarının bileşimini ve işlevini değiştirmesi ile ilişkilendirilmiştir. Dox, fosfatidiletanolaminin (PE) fosfatidilserinden (PS) sentezini katalize eden fosfatidilserin dekarboksilaz enzimini inhibe ederek mitokondri zarında PS/PE oranında bir azalmaya yol açmaktadır. Bu oranın azalması mitokondriyal zarı hasara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Bellance vd., 2020).

1.2.2. Doksozobisin dirençliliği

DOX, çoğunlukla meme kanseri, multipl miyelom, yumuşak doku sarkomu, non-Hodgkin lenfoması, çocukluk çağı solid tümörü, akciğer kanseri ve akut lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Guo vd., 2011; Marina vd., 2002; Ruggiero vd., 2013). DOX, hızla bölünen hücreleri öldürmede ve solid ve sıvı tümörlerin ilerlemesini geciktirmede büyük bir etkinlik göstermektedir, ancak DOX tedavi süresince ilaç direnci ve çeşitli yan etkiler gözlenmesi tedavinin etkinliği önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (Varela-López vd., 2019).

Meme kanserinde sınıflarından agresif seyirli ilerleyen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) tedavisinde rutin olarak kullanılan DOX beklenen etkiyi tam olarak sağlayamamakta ve

Topoizomeraz II inhibitörleri ile ilişkili direnç mekanizmaları nedeniyle istenen terapötik sonuçlar elde edilememektedir. Bu sebepten dolayı, DOX'un etkinliği sınırlı kalmaktadır. Kanserde ilaç direnci, tedaviden önce mevcut olan (intrinsik direnç) veya kemoterapi ile indüklenen (kazanılmış direnç) olabilmektedir. DOX'un ilaç direnci geliştirmesi ile kanserli hücrelerin daha da çoğalmasının indüklenebileceği ve bu şekilde hastalarda kötü prognoz ve düşük sağkalımlara yol açabileceği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Lee vd., 2006; X. Li vd., 2005; Shukla vd., 2010). DOX direncine neden olan birçok mekanizma araştırılmış olmasına rağmen, DOX direnci kanser hastalarının tedavisinde hala büyük çözülememiş bir sorun olmaya devam etmektedir (Smith vd., 2006). Yapılan çalışmaların bir kısmı, sinyal yolları arasındaki etkileşimin, proliferasyonun indüklenmesi, ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) ilaç taşıyıcılarının regülasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptozun inhibe olması ile DOX direncinin oluşabileceğini bildirmiştir (Abrams vd., 2010; Christowitz, Davis, Isaacs, van Niekerk, vd., 2019; Mohammad vd., 2015).

Tercih edilen kemoterapi ilaçlarından biri bir çok kanser türünde de kullanılan doksorubisindir. Ancak doksorubisinin klinik kullanımı genellikle meme kanserinin tedavisinde önemli bir zorluk oluşturan ilaç direncinin gelişmesiyle sınırlıdır. Terapötik sonuçları iyileştirmek için genellikle siklofosamid ve taksanlar gibi diğer ajanlarla birlikte uygulanır (Sokolosky vd., 2011). Klinik çalışmalar, doksorubisinin hem erken evre hem de metastatik meme kanseri olan hastalarda sağ kalım oranlarını önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermiştir. Ancak direnç mekanizmalarının ortaya çıkması kullanımını zorlaştırmaktadır. Direnç mekanizmalarında en çok çalışılan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan P-glikoprotein (P-gp) ekspresyonunun artışı, doksorubisini kanser hücrelerinin dışına aktif olarak pompalandığı ve hücre içi konsantrasyonunu ve etkinliğini azalttığı saptanmıştır. P-gp'nin hedeflenmesi ile direnci aşmak potansiyel bir strateji oluşturulabilecek ancak kemoterapi direncinin ER+ meme kanseri terapilerinde önemli bir zorluk olmaya devam edecektir (Bao vd., 2011; J.-F. Huang vd., 2018).

Doksorubisin direncinin oluşmasında diğer moleküler yollarında etkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu hücre sağ kalımı ve kemoterapiye direncin artırılmasında rol oynamaktadır. Doksorubisin tedavisinin, NF- κ B transkripsiyonel aktivitesini artırarak BCL-XL gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu indüklediği ve bu sayede kanser hücrelerini doksorubisin kaynaklı apoptoza karşı koruduğu gösterilmiştir (Dalmases vd., 2014). Bunlara ilave olarak, Akt sinyal yolunun aktivasyonunun, östrojen reseptörü pozitif meme kanserlerinde kemoterapiye karşı direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu yolun inhibisyonu, doksorubisin gibi kemoterapötik ajanların etkinliğini artırmada potansiyel bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Hem PI3K hem de Akt'in eşzamanlı inhibisyonunun dirençli meme kanseri modellerinde kemoterapiye duyarlılığı artırabildiği çeşitli araştırma grupları tarafından ortaya konmuştur (Wallin vd., 2010; Yndestad vd., 2017). Bu bulgular, PI3K/Akt yolunu hedefleyen tedavi yaklaşımlarının, doksorubisin gibi standart kemoterapilerle kombinasyon halinde kullanılarak daha etkin

tedavi sonuçları elde edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca, mikroRNA'lar (miRNA'lar) doksorubisin duyarlılığının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, miR-145'in çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinleri hedefleyerek meme kanseri hücrelerinin doksorubisin duyarlılığını artırdığı tespit edilmiştir (M. Gao vd., 2016). Bu bulgular, miRNA bazlı tedavi stratejilerinin doksorubisin etkinliğini artırmada potansiyel bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için kritik öneme sahiptir; bu sinyal yolunun aktivasyonu, kemoterapi ilaçlarına karşı artan direnç ile ilişkilendirilmiştir. HOTAIR'in susturulmasının, meme kanseri hücrelerinde ilaç direncini azalttığı ve doksorubisin direncini aşmak için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir (Z. Li vd., 2019). Doksorubisin direncinde etkili olan bir diğer uzun kodlanmayan RNA H19'dur. Yapılan araştırmalar, H19'un DNA onarım mekanizmalarında kritik rol oynayan poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) proteinini düzenlediğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, H19'un, PARP1 ekspresyonunu artırarak meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği ve doksorubisine karşı direnç geliştirmesine yol açtığı gösterilmiştir (Y. Wang vd., 2020). Uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) LINP1, meme kanserinde kemoterapiye direnç gelişimine katkıda bulunan bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, LINP1'in doksorubisin tedavisine karşılık olarak hücre çoğalmasını artırdığını ve apoptozu baskıladığını göstermektedir. Bu lncRNA'nın yüksek düzeyde eksprese edilmesinin kötü klinik sonuçlarla ilişkili olabileceği ve kemoterapi direncinde önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymuştur (X. Liang vd., 2018). Ayrıca, lncRNA CRLA meme kanserinde doksorubisin direnciyle ilişkili önemli bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalar, CRLA'nın inhibisyonunun çeşitli hücresel süreçleri ve sinyal yollarını etkileyerek doksorubisin dirençli meme kanseri hücre hatlarında kemoterapi direncini tersine çevirdiğini ortaya koymuştur (Y. Li vd., 2017). Orre vd. (2021) tarafından doksorubisine dirençli MCF-7/Dox meme kanseri hücre hattında lncRNA SAMMSON'un metabolizma ve kemorezistans üzerindeki rolü araştırılmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, bu çalışmada, SAMMSON'un doksorubisine duyarlı MCF-7 hücrelerine kıyasla MCF-7/Dox hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. SAMMSON'un susturulmasının, MCF-7/Dox hücrelerinin doksorubisine karşı direncini azalttığı ve doksorubisin tedavisinden sonra MCF-7 hücrelerinde görülen yaşlanma kaçışını önlediği gösterilmiştir. Bu bulgular, SAMMSON'un doksorubisin direnci ve yaşlanma süreçlerinde kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak bu bulgulardan lncRNA'ların meme kanserinde doksorubisin direncinin oluşumuna çeşitli mekanizmalar aracılığıyla rol oynadığı sonucuna varılmaktadır.

1.2.3. Doksorubisin direnç mekanizmaları

1.2.3.1. Topoizomeraz II Değişiklikleri/Mutasyonları

Daha önceki kısımlarda ifade edildiği üzere DOX'un etki mekanizması DNA'ya kovalent bağlanarak DNA aduktları oluşturması ve TOP II'nin fonksiyonunu değiştirmesi ile gerçekleşmektedir. Bu iki etki mekanizması da sonunda direnç oluşumuna yol açabilmektedir. Bu nedenle, DNA hasar onarımı ilaç direncine önemli bir katkı sağlar. Ancak, eğer hücrelerde DNA onarım yollarında yer alan proteinler eksikse, hücreler mevcut hasarı onaramaz. Nükleotid Eksizyon Onarımının (NER) ve Homolog Rekombinasyonunun (HR), antrasiklin-DNA aduktlarının onarımında önemli bir rol oynayabileceğini rapor eden çalışmada DOX'un neden olduğu hücre hasarının üstesinden bu iki DNA hasar onarım sisteminin gelebileceğini (Spencer vd., 2008). Topoizomeraz II α enziminde oluşan mutasyonlar veya bu enzimin ekspresyon regülasyonunun bozulması, antrasiklinlerin düzgün çalışmasını etkilemektedir. Topoizomeraz II'nin aşırı ekspresyonu sonucunda hücrelerin DOX'a duyarlı hale geldiği, gerekenden az ekspresyon halinde ise hücrelerin topoizomeraz II zehirlerine karşı direnç kazandığı saptanmıştır (Nitiss & Beck, 1996). RNA interferans ile topoizomeraz II α 'nın baskılanması sonucu, kanserli hücrelerin Dox'a direnç kazandığı hem in vitro hem de in vivo deneylerde gösterilmiştir. Topoizomeraz II ekspresyonu azaltıldığında, topoizomeraz-DNA kesme komplekslerinde azalma DNA hasar sinyali ve yanıtında bir azalmaya neden olarak daha az DNA hasarıyla sonuçlandığı bildirilmiştir. Ayrıca çekirdek yerine sitoplazmadaki Topoizomeraz II α 'nın apoptotik yolağı aktive ettiği DOX direncine sebep olduğu rapor edilmiştir (Burgess vd., 2008).

Antrasiklin duyarlılığı ile topoizomeraz II arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizma(lar) hala tam olarak anlaşılammıştır. Cox ve Weinman çalışmalarında Topoizomeraz II'nin yüksek ekspresyonun DNA zincir kırılmalarının tetikleyerek apoptozun downregülasyonuna neden olduğunu bildirmiştir (Cox & Weinman, 2016). Başka bir çalışma, topoizomeraz II'nin yüksek eksprese olması, bu enzimin katalitik olarak aktif mutasyonlarının (etoposide de dirence neden olan K798L ve K798P mutasyonları) gelişimi ile ilişkili olduğunu ve bunun da Dox duyarlılığında azalmaya yol açtığını göstermiştir (Okada vd., 2001). Ayrıca, topoizomeraz II'nin β -izozomunun ekspresyon seviyesindeki artışın da Dox duyarlılığını azalttığı raporlanmıştır (Cox ve Weinman, 2016). Ancak, bazı çalışmalar, kanserin çeşidine bağlı olarak Dox- Top II ilişkisinin farklı etkilerinin olabileceğini göstermektedir: doksorubisine dirençli hepatosellüler karsinom hücre hatlarında topoizomeraz II α ekspresyonu yüksek iken, düşük topoizomeraz II α ekspresyonuna sahip meme kanserlerinde Dox'a karşı direncin arttığı saptanmıştır (Pang vd., 2005; Press vd., 2011).

1.2.3.2. Hücre İçi İlaç Konsantrasyonunda Değişiklikler

Kemoterapinin temeli, ilaçların hücrel hedeflere etkili bir şekilde ulaşma kapasitesine dayanmaktadır. Ancak, hücre içi ilaç konsantrasyonunu sınırlayabilecek ve ilacın etkisinin azalmasına ve/veya antrasiklinlere karşı direnç gelişmesine yol açabilecek belirgin mekanizmalar bulunmaktadır.

1.2.3.2.1. Dışa atım pompaları

Kanser hücrelerindeki ATP bağımlı dışa atım taşıyıcıları, ATP hidrolizinden gelen enerji ile çeşitli substratları hücre zarının dışına aktif olarak taşınmasında rol alırken, bu durum MDR (çoklu ilaç direnci) fenomeni olarak bilinmektedir (Fruci vd., 2016; Perez, 2016). MDR; ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, MDR ile ilişkili proteinler, P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP), ABCC alt ailesi ve meme kanseri direnç proteini (meme kanseri direnç proteini (BCRP), ABCG alt ailesi) gibi proteinleri içermektedir (Kort vd., 2015).

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, hücre zarları boyunca çok çeşitli moleküllerin taşınmasında rol oynayan bir protein süper ailesidir (Mattioli vd., 2023). Bu taşıyıcılar tüm canlı hücrelerde bulunur ve hücreleri toksik maddelerden korumada önemli bir role sahiptirler. Bu taşıyıcı protein ailesi, fosfat bağlayıcı döngü (P-döngüsü) ve "lösin-serin-glisin-glisin-glutamin (LSGGQ)" dizisinden oluşan yüksek derecede korunmuş ATP bağlama bölgeleri içermektedir (Higgins vd., 1986). Bilinen 48 ABC taşıyıcı proteininden P-glikoprotein (P-gp) ve MRP1, dox direnci ile ilişkili olarak geniş çapta tanımlanmıştır. P-gp veya çoklu ilaç direnci proteini 1 (MDR1), ABCB1 geni tarafından kodlanan 170 kDa transmembran proteini olup, düşük moleküler ağırlıklı, hidrofobik veya amfipatik ve iyonik olmayan molekülleri taşımaktadır (Y. Zhou vd., 1999). Öte yandan, MRP1 (190 kDa), ABCC1 geni tarafından kodlanır ve faz II metabolize edici enzimler tarafından glutatyon, glukuronat, fosfat/sülfat ile konjuge edilmiş ilaçları taşır (Grant vd., 2008).

MDR1 (P-gp veya ABCB1) pompası, birçok farklı hücrenin apikal membranında yer alır ve vitaminler, amino asitler, peptitler, lipidler, şekerler, metal kümeleri, nükleozitler, polisakkaritler ve oligonükleotidler gibi küçük organik ve inorganik moleküllerin hücre dışına atılmasında görev alan geniş substrat özgülüğüne sahip taşıyıcı proteinlerdir. Doksorubisin de bu taşıyıcı proteinler tarafından hücre dışına atılmaktadır (Higgins vd., 1986). Meme kanseri, adrenokortikal, kolon, böbrek, over, AML, osteosarkom, mesane tümörü, hepatosellüler tümörler, merkezi sinir sistemi kanserleri ve birçok diğer tümörlü hücrelerde ABC taşıyıcı pompalarının ekspresyonunun arttığı, bu artışın antrasiklinlerin hücre dışına daha yüksek oranda atılmasına neden olduğu bildirilmiştir (J. Fan vd., 2023). Bu durum, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltabilmektedir ve kanser hücrelerini antrasiklin tedavisine karşı daha dirençli hale getirebilmektedir. P-gp'nin çoklu ilaç direnci mekanizmaları;

- P-170 ve P-150 glikoproteinlerinin miktar artışı ilacın dışa atılımı
- Glutatyon ve glutatyon metabolizma enzimlerindeki artış
- DNA onarım mekanizmasının artması
- DNA topoizomeraz azalması
- O5-guanin alkiltransferaz yolağının aktif hale gelmesi ile olmaktadır (Ji vd., 2019).

ABCC1 (MRP1) epitelyal hücre katmanlarının bazolateral membranında bulunmaktadır (Young vd., 2003) ve substratlarını bu nedenle epitelyanın bazolateral tarafına taşıdığı bilinmektedir. Özellikle, fetüsü yabancı maddelerden korumak için insan plasentasında, kan-beyin bariyerinde, bağırsakta ve böbrekte yüksek oranda eksprese olduğu saptanmıştır (Eisenblätter vd., 2003; Schinkel & Jonker, 2003). MRP1'in meme, mesane, kolorektal ve prostat kanserleri ile akut lenfoblastik lösemide de DOX direncine neden olduğu gösterilmiştir (Du vd., 2018; Hanssen vd., 2021; Jaramillo vd., 2019; Tada vd., 2002; Zalcborg vd., 2000).

1.2.3.2.2. İçerme alım pompaları

Geçmiş yıllarda antrasiklinlerin hücre içine girişinin sadece pasif difüzyonla gerçekleştiği bilinmekteydi (Dalmark & Storm, 1981). Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, Dox ve diğer antrasiklinlerin hücre içine alınımının organik katyon (OCT) OCT1, OCT2, OCT3, OCT6, OCTN1 ve anyon polipeptid (OATP) OATP1A2 taşıyıcıları ile yapıldığını ortaya koymuştur. Ayrıca, OCT1, OCT3 ve OATP1A2'nin insan kalbi ve meme kanseri dokularında bulunduğu gösterilmiştir. OCT taşıyıcıları inhibe edildiğinde, Dox'un sitotoksik etkisini azaltarak kanser hücrelerinde ilaç direncinin arttığı belirlenmiştir (K. M. Huang vd., 2021; Otter vd., 2021).

1.2.3.3. İlacın Hücre içine Dağılımı, Emilimi, Metabolizması ve Atılımındaki Değişim

Doksorubisin gibi antrasiklinler, intravenöz olarak uygulanmakta olup oral yolla iyi emilmedikleri için intravenöz infüzyon yapılmaktadır. Dox hızla enjekte edilebilmektedir yarı ömrü 30 saattir ;bu yüzden kalp, böbrekler, akciğerler, karaciğer ve dalağa alınmasını azaltmak için plazmadan hızla uzaklaştırılmaktadır. Antrasiklinler vücutta eşit şekilde dağılmazlar. Sağlıklı dokularda, özellikle kalp, karaciğer, dalak ve böbreklerde birikirler. Bu birikim, antrasiklinlerin çoğu yan etkisinden sorumludur (Nicoletto & Ofner, 2022; Patel vd., 2013). İnsanlarda, Dox'un yaklaşık %50'si değişmeden vücuttan atılır. Kalan %50'si üç ana yoldan üzerinden metabolize edilmektedir: hidroksilasyon, semikuinon oluşumu ve deoksiaglikon oluşumu (Edwardson vd., 2015).

Bir ilacın hücre içine emilimi ve hedef bölgeye dağılımı ilacın etkinliği ve insan vücudundaki yanıtı açısından önemlidir. İlacın dağılımı, emilim, metabolizmaya katılması ve atılımında görev alan en önemli proteinler ABC taşıyıcılarıdır. Bu proteinler ilaçların lizozom gibi organeller ile taşınabilmesine yardımcı olmaktadır. İlaç bu şekilde taşındığında etkinliği

hem azalmakta hem de savunma hücreleri tarafından nötraliz edilebilmektedirler (Fletcher vd., 2016; Noack vd., 2018).

Tümör hücrelerinde detoksifikasyonun bozulması, ilaca karşı direnç gelişimine yol açar ve tedaviye karşı etkisiz bir yanıt oluşmasına neden olur. Hücre detoksifiye edici enzimler, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok hücrel süreçte rol alarak kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinin (MDR) oluşumunda etkili olmaktadır. Bu enzimlerden en çok çalışılanları aldehit dehidrogenaz (ALDH), DNA topoisomera, protein kinaz C, dihidrofolat redüktaz, glutatyon ve glutatyon S-transferazlar (GST)'dir (Estrela vd., 2006; Ji vd., 2019). Al-Harras vd. (2016) tarafından Glutatyon S-transferaz π (GST- π)'nin, doksorubisin gibi ilaçların dönüşümünü ve metabolizmasını artırabildiği, ilaçların hücrelerdeki etkin konsantrasyon süresini kısaltabildiği, ilaçların hedef bölgelerdeki etkili birikimini azaltabildiği ve böylece ilaç etkinliğinin azalmasına yol açabildiği bildirilmiştir.

1.2.3.4. Sinyalizasyon Yolaklarının Regülasyonunun Bozulması

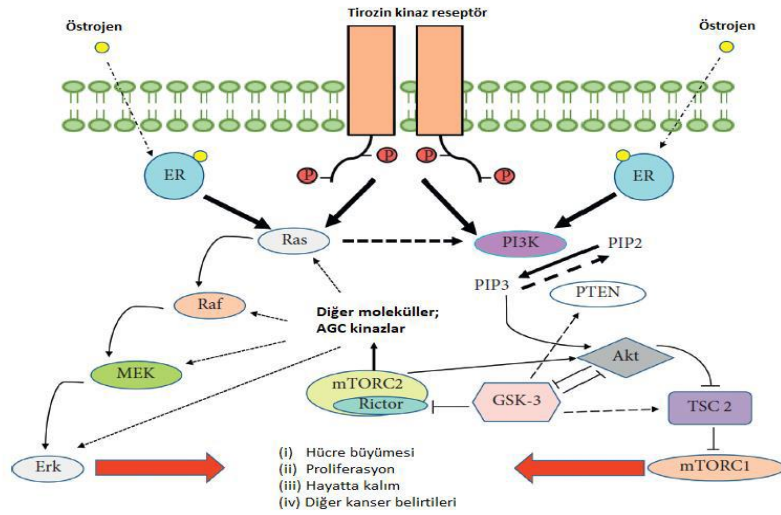
Kanserli bireylerde genellikle hücrenin yaşamsal faaliyetlerini yöneten bazı sinyal yolaklarının regülasyonu değişmektedir. Onkogenik mutasyonlar veya sinyal bileşenlerinin anormal ifadesi, hücre işlevini yöneten düzenleyici ağları bozarak tedavide kullanılan ilaçlara direnç göstermesine neden olmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -katenin, Notch, TGF- β sinyalizasyonunun hepsi, çeşitli kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır (Sriharan & Sivalingam, 2021). Örneğin, tamoksifen direncine EGFR, HER-2/nue ve PI3K gibi büyüme faktörü sinyal yollarının regülasyon bozukluğunun ya da bu yollarda görev alan proteinlerdeki bir mutasyonun neden olduğu rapor edilmiştir (Ziauddin vd., 2014). PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı, en çok düzensizlik gösteren sinyal iletim mekanizmalarından biri olarak dikkat çekmektedir. Bu yolaktaki değişikliklerin, kanser hücrelerinin hayatta kalması, büyümesi ve metastaz yapmasını desteklediği; ayrıca metabolizma, hücre hareketliliği, büyüme ve proliferasyon gibi temel hücrel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Ortega vd., 2020).

1.3. PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyonu

Hücre zarı reseptörleri ve iyon kanalları, hücre sinyalizasyonunu etkileyen nörotransmitterler, antikörler, sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre dışı bölgeden gelen iyonlar gibi uyarıcıları alırlar (Nooren ve Thornton, 2003). Bunlar arasındaki etkileşim meme kanserinde çeşitli sinyalizasyon yolaklarını etkilemekte, bu yollarda ve alt sinyalizasyonda çok fazla değişiklikler meydana getirmektedir. Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz B (PI3K / AKT) ve hücre içi olarak Ca²⁺ + sinyalleme

yolakları, NF-KB, TGF-beta, Notch sinyal yolları meme kanserinde bozulan yollar olup, iyi çalışmış ve tanımlanmış yollardır (Booy vd., 2011; de Kruijf vd., 2013; W. Kim vd., 2016; Krishna vd., 2019).

PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu, meme kanseri de dahil çeşitli kanser türlerinde en sık aktive edilen yollardan biridir (Alzahrani, 2019). Bu yolda sinyalizasyonun bozulması, meme kanserinde tümörün büyümesi/ilerlemesi ve ilaç dirençliliği ile ilişkilidir (Dong vd., 2021). Meme kanseri gelişiminde önemli rol oynayan bu sinyal yolunun onkojenik aktivasyonu, çeşitli moleküler değişimlerle ilişkilendirilmektedir. Bu değişiklikler arasında reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu (örneğin EGFR, HER2, HER3), PIK3CA genindeki mutasyonlar, tümör baskılayıcı PTEN geninin fonksiyon kaybı ve Akt ile mTOR sinyal yollarının aşırı aktivasyonu yer almaktadır. Bu bozukluklar, hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerini düzenleyen bu yolda dengesizliklere neden olarak kanser gelişimini hızlandırmaktadır (Hernandez-Aya & Gonzalez-Angulo, 2011; Vivanco & Sawyers, 2002). Bu sinyalizasyon, hormonlar, büyüme faktörleri (fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R) ve transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleri) ve hücre dışı matris bileşenleri gibi çeşitli uyarılara maruz kalan hücrelerde aktive edilir (Wysocki, 2009). Şekil 1.5'te PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu kısaca özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Ortega vd. (2020)'den modifiye edilen östrojen ve tirozin reseptörleri tarafından PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu

Tirozin reseptörleri uygun ligandlar bağlandıktan sonra PI3K aktivasyonu gerçekleşir. Tirozin kinaz reseptörleri aktive edildiğinde, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfata (PIP2) fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfata (PIP3) dönüştürülen bir fosfat grubu eklenir böylece PI3K/AKT/mTOR

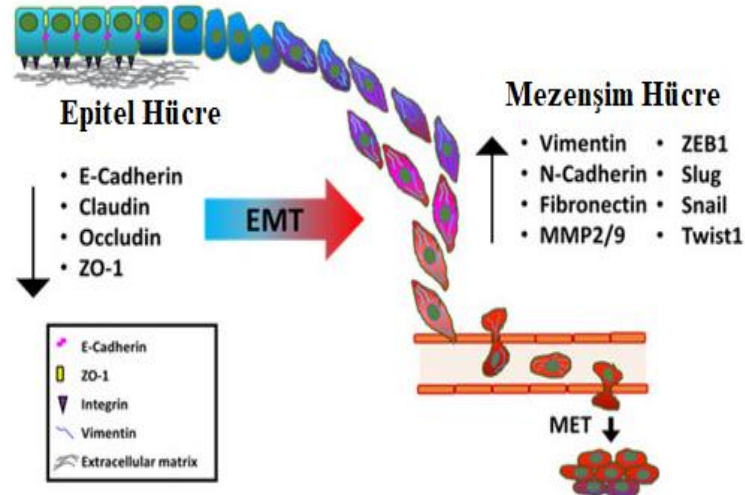
sinyalizasyonu aktive olur (Alzahrani, 2019). Bu yolaktaki sinyalizasyonun bozulması, meme kanserinde tümörün büyümesi/ilerlemesi ve ilaç dirençliliği ile ilişkilidir (Dong vd., 2021). Bu sinyalizasyonun çalışmasını yavaşlatan fosfatazlar vardır; inositol polifosfat-4-fosfataz tip II B (INPP4B) ve fosfataz ve tensin homologu (PTEN). INPP4B ve PTEN, PIP3'ün fosforilasyonunu geri çevirerek AKT/mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonunu önler ve böylece hücrelerde kontrollü büyüme sinyalinin devamlılığı sağlanmış olur. AKT, mTORC2 ile Ser473'te ve başka bir serin-treonine kinaz PDK1 (Fosfosinositite bağımlı Kinaz 1) tarafından Thr308'i fosforile ederek aktive olur. Fosforile edilmiş AKT, pro-apoptotik genleri (BAD ve BAX) inhibe ederek hücre sağkalımını artırır. Daha sonra AKT, tüberoskleroz kompleksi 2 (TSC2)' yi fosforile ederek, TSC2 ve TSC1 kombinasyonunun bloke olmasına neden olur, TSC1/TSC2 heterodimerleri de mTOR aktivitesini inhibe eder. Serin / treonin protein kinaz olan mTOR, PI3K ve Akt'ın aşağı akış efektörüdür. Yapısal olarak benzer ancak fonksiyonel olarak farklı olan bu iki farklı kompleks, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) içerir. mTORC1, everolimus gibi rapamisin ve rapamisin analoglarının hedefidir ve mRNA translokasyonunu ve protein sentezini indükleyerek hücrenin anabolik şekilde büyümesine yol açar ve ayrıca glikoz metabolizması ve lipit sentezinde rolleri vardır. Ayrıca, mTORC1'in downstream substratı S6 kinaz 1, ligandtan bağımsız reseptör aktivasyonundan sorumlu olan östrojen reseptörünü fosforile eder. mTORC2 ise hücrel aktin hücre iskeletini ve AKT fosforilasyonunu düzenler. PTEN, PIP3'ten PIP2'ye defosforilasyonu (dönüşümü) sağlayan tümör baskılayıcı olarak görev alan bir proteindir. PTEN'in görevi Akt ve PDK1 proteinlerinin plazma membranına toplanmasını engelleyip sinyal yolunu baskılamaktır (Ortega vd., 2020).

Bu yolağın kanser patogeneğinde hem fazla aktive olduğu hem de bu aktivasyonun ilaç direncinin oluşumuna neden olacağını gösteren literatür çalışmaları rapor edilmiştir. Fosforilenmiş mTOR'un miktarının artması, meme kanseri hastalarında metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Meric-Bernstam & Gonzalez-Angulo, 2009). Bu sinyalizasyonda PI3K geninin aktivasyonunun PTEN'in ekspresyonunun baskılanmasına ve AKT ekspresyonunda artışına sebep olarak ilaç direnci geliştirmesine yol açtığını bildiren farklı çalışmalar literatürde bildirilmiştir (Campbell vd., 2004; Liedtke vd., 2008; Pérez-Tenorio vd., 2007). Klinik öncesi çalışmalar ise hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefleme ajanlarının kanser hücre dizilerinde PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonun bir yanıt oluşturduğunu göstermiştir (Berns vd., 2007; X. Zhou vd., 2004). L. Zhang vd. (2020) tarafından PI3K/AKT sinyalizasyon yolağının çoklu ilaç direnci ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu ve hücrelerin proliferasyonunu artırarak hücrelerde kemoterapi direnci gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise AKT'nin fosforillenmesi sonucu mTORC1 proteininin ekspresyonu indüklenmiş olup hücrelerin doksorubisine direnç geliştirdiği gösterilmiştir (C. Gao vd., 2019). PI3K/AKT yolunun, ATP-bağlayan kaset (ABC) taşıyıcı süper ailesi aracılığıyla kemoterapötik ilaçların hücre dışına atılımını artırarak, tümör hücrelerinin çoklu ilaç direncine neden olduğu bildirilmiştir (Kathawala vd., 2015). Başka bir çalışmada, PI3K inhibitörü wortmannin, MCF-7/ADR (ADR: Adriyamin direnci) meme kanseri hücrelerinde

hücre proliferasyonunu ve doksorubisin direncini neredeyse tamamen engellediği saptanmıştır (Tsou vd., 2015). Dong vd. (2021) tarafında yapılan çalışmada PI3K'nin ekonazol ile inhibisyonunun, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerini hem in vitro hem de in vivo olarak doksorubisine karşı belirgin şekilde duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Bu sinyalizasyonda ilaç dirençliliğinde rolü olduğu düşünülen bir diğer molekül PTEN'dir. Bununla ilgili bir çalışmada miRNA-29'un PTEN ekspresyonu indüklenmesi sonucunda DOX duyarlılığını arttığı saptanmıştır (Mirzaei vd., 2021). Başka bir çalışmada ise PTEN'in aktive olması sonucu, kolon kanseri hücrelerinde P-gp (P-glikoprotein) ekspresyonu ve aktivitesinin azalarak apoptozun tetiklendiği ve hücrelerin DOX duyarlılığını geri kazandığı bildirilmiştir (X. Shi vd., 2020). Lei vd. (2020) tarafından PTEN'in aşağı akış hedeflerinden biri olan PI3K/Akt sinyal yolunun DOX kemoterapisindeki rolü de gösterilmiştir. Bu yolun östrojen reseptör β tarafından inhibe edilmesi, meme kanseri hücrelerinde DOX duyarlılığını artırdığı raporlanmıştır.

1.4. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMD)

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD), normalde embriyogenez (Tip 1 EMD), yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi (Tip 2 EMD) gibi süreçlerde önemli bir rol oynayan, ancak tümör metastazı sırasında patolojik bir nitelik kazanan karmaşık ve dinamik bir biyolojik süreçtir (Lamouille vd., 2014). Bu süreç boyunca, epitelyal hücrelerde hücreler arası yapışkanlık azalır, bu da hücre iskeletinin kendini yeniden düzenlemesine ve hücrelerin daha hareketli hale gelmesine yol açar, böylece hücreler mezenkimal bir fenotipe doğru dönüşüm gösterirler ve bazal membranı geçebilmektedirler (Voulgari & Pintzas, 2009). EMD, SNAI1/2, TWIST1/2 ve ZEB1/2 gibi temel EMD transkripsiyon faktörler (TF'ler) tarafından indüklenmektedir. Bu faktörler, epitelyal genlerin (örneğin, CDH1 (E-kaderin), OCL (Okludin) ve TJP1 (ZO-1)) ifadesini doğrudan veya dolaylı olarak baskılamak ve mezenkimal genlerin (örneğin, VIM (vimentin), FN1 (fibronektin), CDH2 (N-kaderin) ve FSP1) ifadesini artırmaktadır (Dongre & Weinberg, 2019; Nieto vd., 2016). EMD'nin uyarılması sonucu karsinoma hücreleri apikal-bazal polaritesini ve epitelyal bağlantılarını kaybetmekte ve bu hücreler invazif özelliklere, apoptoze dirence ve yayılım kapasitesine sahip mezenkimal türevlerine dönüşmektedir (Pachmayr vd., 2017).



Şekil 1.6. Lo vd., (2017)'den modifiye edilen epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) ile ilişkili düzenleyici genler

Son araştırmalar, bireysel karsinoma hücrelerinin EMD'yi farklı derecelerde aktive ederek, hibrit veya kısmi E/M durumlarına girdiğini ortaya koymuştur. Bu tür tümör hücreleri genellikle hem E hem de M belirteçlerini aynı anda farklı seviyelerde ifade ettiğini ve hem epitelyal hem de mezenkimal hücrelerin fenotipik, transkripsiyonel ve epigenetik özelliklerini sergilediğini göstermektedir. Bu özelliklerin her ikisine de sahip olma durumu epitelyal-mezenkimal plastisite (EMP) olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, EMP'nin kanser kök hücre benzeri özelliklerin kazanılması, metastaz, tümör dormansı ve kanser tedavisine direnç üzerinde kritik rollerinin olduğu bilinmektedir (Garg, 2022; Lytle vd., 2018; Pastushenko & Blanpain, 2019).

EMD'nin kanser hücrelerinin malignite ve agresif davranışlarının artmasına neden olduğu böylece kemorezistansı indüklediği bilinmektedir. Kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişmesinin altında yatan moleküler yollardan birinin de EMD olduğunun bilinmesi, bu süreçte farklı kanser türlerinde bu mekanizmanın araştırılmasına yönelik bir ilgi oluşturmuştur (Mirzaei vd., 2021). Özellikle kolorektal, gastrik, meme ve karaciğer kanserleri olmak üzere birçok kanser türünde EMD'nin regülasyonunun DOX direncinin ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (S.-H. Hu vd., 2016). Dudas vd., (2020) çalışmalarında hücrelerin bu süreç boyunca geçirdiği değişikliklerin, özellikle E-kaderin ekspresyonunun azalmasının ve Vimentin ile N-kaderin'in yanı sıra diğer belirteçlerin artmasının, DOX (doksorubisin) kemorezistansına sebep olabileceğini bildirmiştir.

J.-X. Pan vd. (2016) karaciğer kanser hücrelerini doksorubisine maruz bıraktıklarında, EMD'nin vimentin ve SEMA4A gibi ilgili proteinlerin ekspresyonlarındaki artışla indüklendiğini rapor etmiştir. DOX direncinin elde edilmesinin zaman bağımlı olduğu ve

moleküler düzeyde EMD indüksiyonunun bu süreçte önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Ponnusamy vd., 2017). Kubiliüté vd. (2016) tarafından kolorektal kanser hücrelerinein kültür ortamında besiyeri içerisindeki kademeli olarak doksorubisin konsantrasyonunu artırılması ile yapılan çalışmada DOX'a maruz kalma sonrasında kanser hücrelerinde EMD'nin bir diğer ifade ile hücrelerin göç, hareketlilik ve agresif davranışlarını arttırdığını ve doksorubisin direncinin geliştiğini rapor edilmiştir. Osteosarkoma hücrelerinin doksorubisine (DOX) maruz bırakılmasının sonucunda Notch sinyalizasyonunun aktive olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca EMD mekanizmasının indüklenmesi sonucu bu hücrelerin göç yeteneğinin ve mezenkimal fenotipinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (J. Yang vd., 2017). Daha önceki çalışmalar, düşük konsantrasyonda DOX'un da osteosarkoma hücrelerinde EMD'yi indükleyerek direnç sağladığını ortaya koymuştur. DOX kemoterapisinde konsantrasyon kadar zaman da önemlidir. Kanser hücrelerine 48 saat boyunca DOX uygulandığında, hücrelerin çoğu ölürken, kalan hücreler koloniler oluşturmuştur. Hayatta kalan bu hücrelerin EMD sürecinde olduğu vimentin, Twist ve β -katenin gibi ilgili moleküllerin indüklenmesi ve mezenkimal fenotip sergilemesi ile gösterilmiştir (Y. Han vd., 2014). Özet olarak, kanser tedavisinde DOX kullanımı sırasında, EMD ile olan ilişkisi ve olası direnç göz önünde bulundurularak bir tedavi yaklaşımı geliştirilmelidir.

1.5. Kodlanmayan RNA (ncRNA)

Son yıllarda gerçekleştirilen transkriptom analizlere göre, insan genomunun çoğunun transkripte edildiği ancak bu transkriptlerin çoğunun protein kodlama kapasitesine sahip olmadığı gösterilmiştir (W. Wang vd., 2021). Proteinlere dönüştürülmeyen ve kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) olarak adlandırılan RNA moleküllerinin, ökaryotlarda genom boyutunun, kromatin yapısının ve sıkıştırmanın düzenlenmesi süreçlerinde, genom bütünlüğünde ve DNA onarımının etkinliğinde, gen susturma ve protein sinyal yollarının düzenlenmesi gibi hücrel süreçlerde rol aldığı tespit edilmiştir (Kovalchuk & Kovalchuk, 2021). Memeli genomu, 20 nükleotid uzunluğundaki mikroRNA'lar (miRNA) ile kilobazlar boyutundaki uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) arasında değişen boyutlarda binlerce kodlanmayan RNA içermektedir. Diğer kodlanmayan RNA molekülleri; snoRNA'lar, tRNA'lar, spliceozom regülatörleri, telomer RNA'sı ve çok daha büyük ribozomal RNA'lar, büyük çoklu protein komplekslerinin yapısal iskelelerini oluşturan önemli RNA molekülleridir. Bu RNA türleri, genellikle karmaşık biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve hücrel işlevlerin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, snoRNA'lar ribozomal RNA'nın (rRNA) kimyasal modifikasyonunda görev alırken, tRNA'lar protein sentezi sırasında amino asitlerin ribozoma taşınmasını sağlamaktadır. Spliceozom regülatörleri, pre-mRNA'nın olgun mRNA'ya dönüşümünü sağlarken, telomer RNA'sı kromozom uçlarının korunmasında yer alır. Ribozomal RNA'lar ise ribozomun yapısal ve fonksiyonel temelini oluşturur. Bu RNA molekülleri, hücrel makromoleküler komplekslerin stabilitesini ve işlevselliğini sağlamak

için birer yapı taşı olarak hareket etmektedir (Q. Chen vd., 2016). Kodlanmayan en küçük RNA mikroRNA'lar, olarak bilinmektedir ve bu RNA'lar belirli dokularda üretilmektedir. MikroRNA'lar RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) olarak bilinen çok proteinli bir komplekse bağlanarak bu kompleksi hedef mRNA moleküllerine yönlendirmektedirler. Bu sayede, ilgili proteinlerin üretimini baskılayarak hücredeki protein dengesini düzenlemektedirler. Bu yönleriyle, mikroRNA'lar hücredeki protein yapısını şekillendirme açısından, gen ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerine benzemektedirler (Gebert & MacRae, 2019). Kodlanmayan RNA'ların yapılarının stabil bir şekilde kalması zorken, genomda düşük seviyede eksprese olmaktadır ve zamana bağlı olarak ekspresyon paternleri değişmektedir. Bilim insanları bu kodlanmayan RNA'ların davranış üzerinde etkili olabileceğini düşünmektedir. ncRNA'lar için, protein kodlayan genlerin sayısında bir değişiklik olmaksızın, gen düzenlemesinde ek bir katman oluşturarak fenotipik çeşitliliğin evrimini açıklamaya yardımcı olabileceği de düşünülmektedir (Dayal vd., 2024).

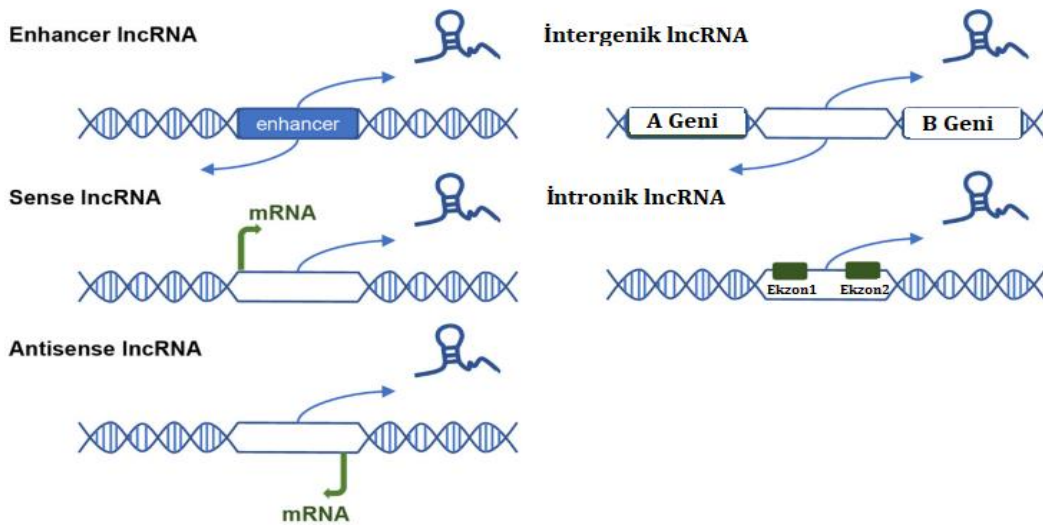
1.6. Uzun Kodlanmayan RNA'lar (Long Non-coding RNAs, lncRNA)

Kodlanmayan RNA'ların en heterojen ve işlevsel olarak çeşitli alt sınıfını uzun kodlanmayan RNA'lar (LncRNA'lar) oluşturmaktadır. LncRNA'lar, proteinler gibi, karmaşık yapılar oluşturacak şekilde katlanabilme ve dizilimleri sayesinde DNA ve RNA gibi diğer nükleik asitlerle etkileşime girebilme yeteneklerine sahiptir (Statello vd., 2021). Memeli genomunun sadece küçük bir kısmı protein kodlayan mRNA'lara transkribe edilirken büyük çoğunluğu çok sayıda uzun kodlanmayan RNA (lncRNA'lar) üretmektedir. Uzun kodlanmayan RNA'lar 200 nükleotitten daha uzun olan RNA'lar (lncRNA) olarak bilinmektedir ve proteinlere çevrilmemektedir (R.-W. Yao vd., 2019).

Mesajcı RNA'lara (mRNA) benzer şekilde, lncRNA'lar da RNA polimeraz II tarafından transkripte edilmektedir, 5' uçlarına kap takılmaktadır, splicing sürecinden geçmektedir ve genellikle poliadenilasyona uğramaktadır. Mesajcı RNA'dan farklı olarak lncRNA'lar daha hücrede çok daha düşük seviyelerde ifade edilmektedir ve evrimsel olarak korunmamıştır (Achour & Aguilo, 2018). LncRNA'lar bir zamanlar "transkripsiyonel gürültü" olarak düşünülmüşse de, promotörlerdeki arındırıcı seçim, örneğin yer değiştirmeler, eklemeler, silinmeler ve splicing gibi süreçler, bu moleküllerin işlevsel olduğunu ortaya koymuştur. Bazı lncRNA'ların küçük açık okuma çerçevelerine (sORF'ler/smORF'ler) sahip olduğunu ve ribozomlarla ilişkili olduklarını, bu durumun da protein kodlama potansiyellerini işaret ettiğini gösteren çalışmalar literatürde raporlanmıştır (Aspden vd., 2014; Mackowiak vd., 2015). Son yapılan çalışmalarda az sayıda lncRNA'nın çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığı ve 100 amino asitten daha az uzunluğa sahip mikropeptitler adı verilen küçük proteinleri kodlayabildiğini ortaya koymuştur (Yeasmin vd., 2018). Başlangıçtaki çalışmalar, lncRNA'ların kararsız transkriptler olduğunu düşündürmekteydi. Ancak, daha sonraki araştırmalar, 800'den fazla lncRNA'nın çoğunluğunun yarı ömrünün 16 saatin üzerinde

olduğunu ve oldukça stabil olduklarını, sadece az sayıda lncRNA'nın ise yarı ömrünün 2 saatin altında olduğunu göstermiştir (Clark vd., 2012). Hücredeki konumlarına bağlı olarak, lncRNA'lar farklı moleküler süreçlerde rol oynamaktadır. Nükleer lncRNA'lar, kromatin yapılarıyla yakından ilişkilidir ve belirli genlerin transkripsiyonel ve epigenetik düzenlenmesi ile pre-mRNA işlenmesi gibi çeşitli mekanizmaları etkileyerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Buna karşılık, sitoplazmik lncRNA'lar, mRNA'ların stabilitesi ve çevirisi üzerinde baskın olarak kontrol sağlarlar (Noh vd., 2018). Örneğin, MALAT1 ve NEAT1 gibi lncRNA'lar ağırlıklı olarak çekirdekte bulunurken; DANCR ve OIP5-AS1 daha çok sitoplazmada yer alır; TUG1, CasC7 ve HOTAIR ise hem nükleer hem de sitoplazmik dağılıma sahiptir (Lennox & Behlke, 2016). Bu kodlanmayan RNA'lar, genomun geniş, keşfedilmemiş ve fonksiyonel bir bileşeni olduklarından, bu alanın incelenmesi insan biyolojisi ve hastalıkları açısından büyük öneme sahiptir (Carninci vd., 2005; ENCODE Project Consortium vd., 2007).

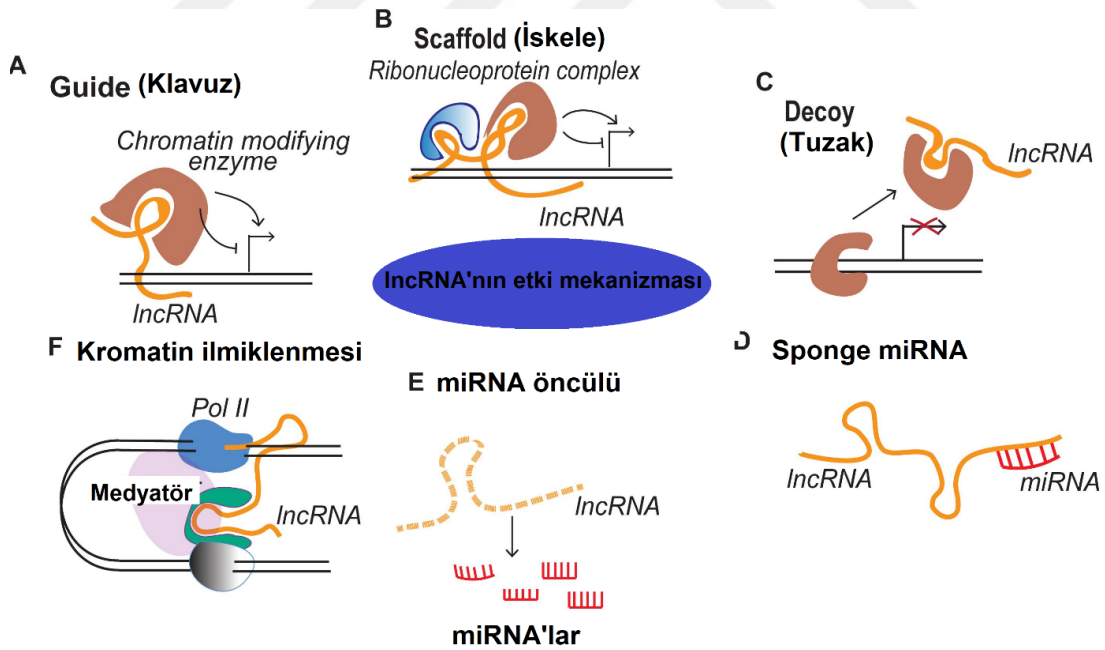
lncRNA'lar, genetik bilginin iletiminde çeşitli düzeylerde rol oynamaktadır. Bu roller arasında kromatinin yeniden programlanması, transkripsiyonel kontrol (örneğin, enhanser bölgelerde cis-regülasyon), posttranskripsiyonel kontrol (örneğin, mRNA işlenmesi) ve translasyonel düzenleme bulunmaktadır. lncRNA'ların bu geniş kapsamlı fonksiyonları, onları biyomarker olarak kullanımı ve terapötik hedef olarak değerlendirilmesi açısından umut verici kılmaktadır (Tao vd., 2023). lncRNA'ların birincil sınıflandırma şemalarından biri, protein kodlayan genlere göre genomik konumlarına dayanmaktadır. Protein kodlayan genler arasında yer alanlara intergenik lncRNA'lar (lincRNA'lar), protein kodlayan genlerin intronlarından türeyenlere intronik lncRNA'lar, enhanser dizilerinden transkripte edilenlere enhanser lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin ters ipliğinden transkripte edilenlere ise antisense lncRNA'lar olarak bir sınıflandırma önermiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Tao vd. (2023)'den modifiye edilen farklı lncRNA türlerinin sınıflandırılmasını gösteren şematik diyagram

Son dönem genomik çalışmalar, memeli genomunun önemli bir kısmının transkripte edilebileceğini göstermiştir, bu da çok daha fazla sayıda kodlanmayan transkriptin varlığını işaret etmektedir (Carninci vd., 2005; Harrow vd., 2006). Bu amaçla, tiling mikroarray verileri ifade edilen sekans etiketlerinin (EST'ler) ve klonlanmış cDNA'ların shotgun dizilimi ve histon modifikasyon desenlerinin haritaları gibi yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle, son çalışmalar, protein kodlayan bölgelerle örtüşmeyen büyük intergenik kodlanmayan RNA'lar (lincRNA'lar) üzerinde yoğunlaşmıştır, çünkü bu lincRNA'lar deneysel manipülasyon ve hesaplamalı analizleri kolaylaştırmaktadır (Cabili vd., 2011).

LincRNA'lar doğrudan DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime girerek hücrelerin moleküler düzeydeki düzenlenmesinde etkili olmaktadır. Bu etkileşimler, lincRNA'ların enhanser, kılavuz (guide), tuzak (decoy) ve iskele (scaffold) olarak sınıflandırılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin büyük intergenik kodlanmayan RNA'lar, gen ekspresyon analizlerinde çeşitli hücresel süreçlerin önemli düzenleyicileri olarak ve kılavuzluk (guide) yaparak görev almaktadır. Ayrıca, lincRNA'lar, genomun üç boyutlu organizasyonunu yeniden şekillendirme, kromatin modifiye edici proteinlerin bağlanmasını kolaylaştırma ve düzenleyici faktörleri ya da mikroRNA'ları moleküler tuzaklar (decoy) veya süngerler (sponge) gibi tutarak da gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Şekil 1.8)(Sweta vd., 2019).



Şekil 1.8. Sweta vd. (2019)'den modifiye edilen lincRNA'nın etki mekanizmaları

1.7. LncRNA'ların Gen Ekspresyonunu Düzenleme Yöntemleri

1.7.1. Epigenetik regülasyon

LncRNA'lar, epigenetik mekanizmalar üzerinde karmaşık ve çok yönlü etkiler sergilemektedir. Kromatin yapısının düzenlenmesi, histon modifikasyonlarının yönlendirilmesi ve DNA metilasyonunun kontrolü gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gen ekspresyonunu etkilemektedir (Guh vd., 2020). LncRNA'lar, kromatinin açık veya kapalı hale gelmesine yardımcı olarak gen ekspresyonunu düzenler. 1975 yılında Paul ve Duerksen, biyokimyasal olarak saflaştırılan kromatinin DNA'nın iki katı kadar RNA içerdiğini saptayarak, RNA'nın kromatin yapısı ve gen düzenlemesi üzerindeki potansiyel etkisini gündeme getirmişlerdir (Paul & Duerksen, 1975). Zamanla yapılan araştırmalar, RNA'nın kromatinin doğru yapısının korunması ve kromatin modifiye edici komplekslerin DNA'ya yönlendirilmesinde kilit bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Heterokromatin oluşumu ve gen baskılanması gibi süreçlerle ilişkili olarak Xist, Air, H19 lncRNA'ları saptanmıştır (Bernstein & Allis, 2005; Brown vd., 1991). LncRNA aracılığıyla gerçekleştirilen kromatin düzenlemesine örnek, memelilerde X kromozomu inaktivasyonunda gözlenmektedir. X kromozomu inaktivasyonu, dişi hücrelerdeki iki X kromozomunun gen ekspresyon düzeyinin, erkek hücrelerde bulunan tek X kromozomu ile dengelenmesi sürecidir. Dişi hücrelerde, iki X kromozomundan birinden lncRNA Xist sentezlenir ve lncRNA Xist genlerin büyük çoğunluğunun transkripsiyonel olarak susturulmasında rol oynamaktadır (Wutz, 2011; J. Zhao vd., 2008). LncRNA MANTIS'in, kromatin yeniden şekillendirme komplekslerinin aktivitesini modüle ederek endotelial anjiyogenik fonksiyonu artırdığı gösterilmiştir (Leisegang vd., 2017). Benzer şekilde, HOTAIR gibi lncRNA'lar da kromatin dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynamakta, protein komplekslerini genomun belirli bölgelerine yönlendirerek transkripsiyonel susturma ve gen ekspresyonunu etkilemektedir (Bhan & Mandal, 2015; Y. Tang vd., 2017).

LncRNA'lar, histon modifikasyonlarını düzenleyen enzimleri belirli kromatin bölgelerine yönlendirerek histon asetilasyonu ve metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerde kritik bir rol oynamaktadır (Calanca vd., 2020; Y. Zhao vd., 2016). Örneğin, lncRNA TARID'in, belirli gen bölgelerinde demetilasyon süreçlerini yönlendirerek tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Arab vd., 2014). Ayrıca, lncRNA'lar, histon proteinlerinin modifikasyonu ve gen ekspresyonunun kontrolünde kritik bir rol oynar. LncRNA'ların histon metilasyonu, asetilasyonu gibi modifikasyonları düzenlediği gösterilmiştir. Örneğin, HOTAIR (HOX transcript antisense RNA), PRC2 kompleksini genomun belirli bölgelerine yönlendirerek histon H3 lizin 27'nin trimetilasyonunu (H3K27me3) indüklemektedir. Bu modifikasyon, gen susturulmasını indükler ve kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. LncRNA'lar, gen ekspresyonunu etkileyen bir diğer kritik epigenetik modifikasyon olan DNA metilasyonunun düzenlenmesinde de rol oynar. DNA metiltransferaz veya demetilazlara kılavuzluk ederek, belirli genlerin metilasyon durumunu yönlendirmektedir (Y. Zhao vd., 2016). LncRNA'lar ile DNA metilasyonu arasındaki etkileşim,

kanser biyolojisinde özellikle önemlidir; çünkü kanserlerde sıklıkla anormal metilasyon kalıpları gözlemlenmektedir. Örneğin, NEAT1 gibi lncRNA'ların, kemoterapiye direnci artıran belirli kromatin modifikasyonlarını indükleyerek, kolorektal kanser hücrelerinde kök hücre benzeri özellikleri koruduğu gösterilmiştir (Y. Zhu vd., 2020).

1.7.2. Transkripsiyonel regülasyon

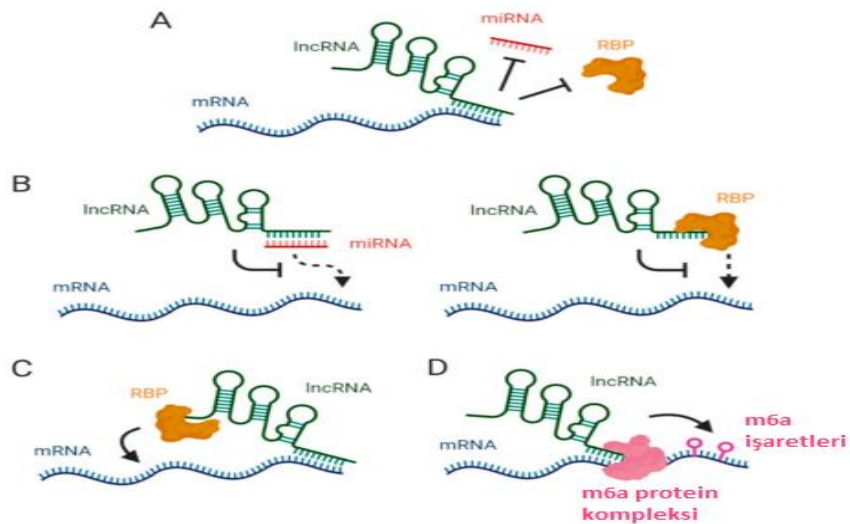
Uzun kodlanmayan RNA'lar, gen ekspresyonunu çeşitli mekanizmalarla düzenleyerek transkripsiyonel süreçlerde kilit rol oynayan önemli moleküllerdir. Örneğin, lncRNA'lar belirli genomik bölgelerde protein komplekslerinin bir araya gelmesini sağlayan iskeleler olarak görev yapabilmektedir. İskele olarak, lncRNA'lar transkripsiyon faktörlerini ve kromatin düzenleyici proteinleri bir araya getirir ve bunları hedef genlere yönlendirerek genlerin transkripsiyonel regülasyonunu sağlarlar. Akerman vd. (2017) pankreatik β hücrelerinde, belirli lncRNA'ların adacık hücresi transkripsiyonel programları için kritik olan enhancer kümelerini düzenlendiğini saptamıştır bu da hücreye özgü düzenleyici ağların oluşturulmasındaki rollerini ortaya koymaktadır. HOTAIR gibi lncRNA'ların kromatin yeniden şekillendirme ve gen susturma süreçlerinde rol oynadığı, hücrel proliferasyon ve farklılaşma gibi süreçleri etkilediği bildirilmiştir (J.-X. Pan vd., 2016). Başka bir çalışmada GAS5 lncRNA'sının aktifleşmiş glukokortikoid reseptörünün DNA'ya bağlanma bölgesi ile etkileşime girerek bu reseptörün glukokortikoid yanıt elemanları ile olan etkileşimini engellediği ve böylece glukokortikoid-duyarlı genlerin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Kino vd., 2010). Radhakrishnan & Kowluru (2021) yaptıkları çalışmada MALAT1'in birçok transkripsiyonel düzenleyici ile etkileşime girerek bu düzenleyicilerin gen ekspresyonunu kontrol etme yeteneği ve aktivitelerini etkilediği gösterilmiştir.

1.7.3. Post transkripsiyonel regülasyon

Ökaryotik hücrelerde, bir genin transkripsiyonu sonucunda ortaya çıkan ilk ürün, genellikle pre-mRNA'dır. Bu pre-mRNA, çoğu durumda intronların çıkarılması yoluyla olgun mRNA'ya dönüşür ve bu işleme "alternatif kırpm" (splicing) adı verilir. mRNA'lar çekirdekte transkribe edildikten sonra 5' ucuna 7-metilguanozin kapağı eklenir, poliadenilasyon (3' ucuna poli(A) kuyruğu eklenir) gerçekleştirilir ve son olarak olgun mRNA'lar, ilgili polipeptitlere çevrilmek üzere sitoplazmaya taşınır. Bu post-transkripsiyonel düzenleme, transkriptlerin stabilitesi ve hücre içindeki dağılımını etkileyen süreçleri kapsar. Bu süreçler arasında alternatif ekleme, nükleer bozunma (örneğin ekzom yoluyla), RNA işlenmesi ve nükleer taşınma yer alır. Genellikle RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), bu mekanizmalarda önemli bir rol oynar. Bu süreçler aynı zamanda protein modifikasyonları ve proteinin hücre içindeki yerleşimini sağlamaktadır. RBP'ler, transkriptlerin 5' ve 3' UTR (çevrilmeyen bölge) dahil olmak üzere belirli bir dizisini veya ikincil yapısını bağlayan bir RNA tanıma motifi (RRM) aracılığıyla bu

olayları gerçekleştirir. Post-transkripsiyonel düzeyde, lncRNA'ların, mRNA stabilitesi, ekleme, protein stabilitesi ve hücre içi yerleşimi gibi değişikliklere yol açarak çeşitli RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler) ile etkileşime girebildiği ve hedef genlerin tamamlayıcı RNA dizilerine bağlanarak post-transkripsiyonel düzenleyiciler olarak işlev görebildiği rapor edilmiştir (He vd., 2019).

Yoon vd. (2013) çalışmalarında lncRNA'ların splayzing faktörleri ile etkileşime girerek bu süreci modüle edebildiğini ve böylece farklı mRNA izoformlarının sentezlenmesini indükleyebildiğini bildirmiştir. Ayrıca, lncRNA'ların RNA-bağlayıcı proteinlerle etkileşime girerek mRNA stabilitesini etkileyebildiği gösterilmiştir; bu etkileşimler mRNA transkriptinin stabilizasyonu regüle etmektedir (Szcześniak & Makałowska, 2016; F.-J. Yu vd., 2015). MALAT1 adlı lncRNA, splayzing faktörleriyle etkileşerek, diğer bir lncRNA olan Gomafu/MIAT ise, spliceozom oluşumunu engelleyerek ve ekleme faktörü 1 (SF1) ile etkileşerek alternatif splayzingi regüle ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Pandey vd., 2008). Ayrıca, bazı lncRNA'ların miRNA'lar ile rekabet ederek miRNA'ların hedef bölgelere bağlanmasını engelleyerek hedef mRNA'ların stabilitesini ve transkripsiyonunu artırdığı rapor edilmiştir (X. Jiang vd., 2022). Sonuç olarak, lncRNA'lar, farklı mekanizmalar aracılığıyla mRNA stabilitesini modüle etmektedir (Şekil 1.9). Şekil 1.9'da, lncRNA'ların hedef mRNA'daki miRNA veya RBP bağlanma bölgeleri ile doğrudan etkileşerek (A), miRNA veya RBP'lerin sekestrasyonu (tutulması) yoluyla bu moleküllerin mRNA ile etkileşiminin baskılayarak (B); RBP-mRNA etkileşimlerini artırmak için iskele görevi görerek (C); hedef mRNA'ların m6A seviyelerini modüle ederek (D) mRNA stabilitesinin düzenlediği şematik olarak gösterilmiştir (Sebastian-delaCruz vd., 2021).



Şekil 1.9. Sebastian-delaCruz vd. (2021)'den modifiye edilen lncRNA aracılı mRNA stabilite düzenlemesinin etki mekanizmaları

1.7.4. Translasyonel regülasyon

LncRNA'ların translasyonel makineye bağlanarak gen tranlasyonunu modüle edebildiği bilinmektedir. Yoon vd. (2012) uzun kodlanmayan lincRNA-21, CTUNNB1 ve JUNB mRNA'ları ile eşleşerek ribozomun düşüşüne yol açan bir mekanizma ile translasyonu inhibe ettiğini bildirmiştir. LncRNA'ların ayrıca translasyon faktörlerinin düzenlenmesi yoluyla translasyon üzerindeki inhibitör rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada, lncRNA GAS5, apoptoz ve hücre çoğalmasının düzenlenmesine görev aldığı rapor edilmiştir. Lenfoma hücreleriyle yapılan bu çalışmada, GAS5'in doğrudan eIF4E'ye bağlanarak translasyon başlatma kompleksi eIF4F ile etkileşime girdiği ve c-Myc'in translasyonunu azalttığı gösterilmiştir (G. Hu vd., 2014). Benzer şekilde, lncRNA RP1-506.5'in eIF4E ile etkileşime girdiği ve eIF4E'nin eIF4G'ye bağlanmasını engelleyerek, meme kanseri hücrelerinde p27kip1'in translasyonunu inhibe ettiği ve bu şekilde Snail seviyelerini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Jia vd., 2019). Diğer bir litüratür çalışmasında, lncRNA treRNA'nın ribonükleoproteinler (RNP'ler) ile etkileşime girerek treRNA-RNP kompleksi oluşturduğu ve eIF4G1'e bağlanarak E-kaderin'in translasyon verimliliğini baskıladığı gösterilmiştir (Gumireddy vd., 2013). Beyine özgü bir lncRNA olan BC1'in, eIF4A ve poli(A)-bağlayıcı protein (PABP) ile etkileşime girerek translasyon sürecini negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir (H. Wang vd., 2002). LncRNA GAPLINC'in, küçük hücre dışı akciğer kanseri hücrelerinde aşırı eksprese olduğu ve miR-661 için bir sünger görevi görerek eEF2'nin negatif düzenleyicisi olan eEF2K ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Gu vd., 2018). Diğer bir çalışmada, lncRNA FOXD1-AS1'in eIF5A'ya bağlandığı, ancak mRNA ekspresyon seviyelerini değiştirmediği ve bunun da FOXD1-AS1'in post-translasyonel düzenleme süreçlerinde rol alabileceğini düşündürdüğü gösterilmiştir (Y.-F. Gao vd., 2020). Genel olarak, bu çalışmalar lncRNA'ların translasyon faktörlerini düzenleyerek mRNA translasyonu üzerinde önemli inhibitör roller olabileceğini göstermektedir.

1.7.5. Post-translasyonel regülasyon

Post-translasyonel modifikasyon, proteinlerin biyosentezlerinin ardından kovalent ve genellikle enzimatik olarak modifiye edilmesini kapsar ve hücre sinyal iletiminde yaygın olarak gerçekleşir. Örneğin, bir proteinin fosforilasyonu aktivasyon durumunu düzenlerken, ubiquitinasyonu proteinin spesifik bozunma sinyallerini içermektedir (Vu vd., 2018). Bu bağlamda, lncRNA'ların, proteinler ile protein-modifiye edici enzimler arasındaki etkileşimi bozarak post-translasyonel modifikasyonları engelleyebildiği ve böylece kritik sinyal yollarını etkileyebildiği bildirilmiştir. Özellikle geleneksel dendritik hücrelerde ifade edilen transkriptler olan lnc-DC'yi içeren çalışmalar, bu lncRNA'nın sitoplazmada sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu çalışmada, lnc-DC, STAT3'ü bir SH2 domain içerikli protein tirozin fosfat 1'den ayırarak STAT3'ün tirozin 705 üzerinde fosforilasyonunu indüklediği ve STAT3 sinyalizasyonunun aktifleştiği raporlanmıştır

(P. Wang vd., 2014). Başka bir çalışmada, NF- κ B tarafından indüklenen bir lncRNA olan NKILA, sitoplazmada doğrudan NF- κ B/I κ B ile etkileşime girerek kararlı bir NKILA: NF- κ B: I κ B α üçlü kompleksi oluşturabildiği ve IfARrKK fosforilasyon bölgelerini maskeliyerek I κ B fosforilasyonunu engellediği, bunun da NF- κ B'nin inaktif hale gelmesine yol açtığı gösterilmiştir (B. Liu vd., 2015).

1.8. Uzun Kodlanmayan RNA'ların Meme Kanserinde Rolü

LncRNA'ların biyolojik işlevlerinin büyük bir kısmı henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, bunlar, normal gelişim ve tümör oluşumu süreçlerinde önemli rollere sahip bir kodlanmayan RNA grubudur. Güncel çalışmalar meme kanserinde bazı lncRNA'ların anormal şekilde ifade edildiği bu genlerin işlevleri ve tümör dokularındaki ekspresyon modellerine göre tümör baskılayıcı genler veya onkogenler olarak sınıflandırılabilceğini göstermektedir. Ayrıca, lncRNA'ların anormal ekspresyonunun, özellikle meme kanseri başta olmak üzere çeşitli kanserlerde hücre proliferasyonu, invazyon, göç, apoptoz, epitel-mezenkimal dönüşüm (EMD) sürecinde rol almaktadır (Saranya vd., 2024).

1.8.1. Hücre proliferasyonunda rol alan lncRNA'lar

Hücre proliferasyonu, kanserin ilerlemesi açısından temel bir süreç olup genellikle hücre içi büyüme sinyal yollarının anormal aktivasyonu ile desteklenmektedir. Yapılan güncel araştırmalar, lncRNA'ların meme kanserinde spesifik sinyal yollarını aktive ederek veya inhibe ederek hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Özellikle, SPRY4 intron transcript 1 (SPRY4-IT1), DANCR, PVT1, CCAT1 ve KCNQ10T1 gibi lncRNA'ların meme kanseri hücre proliferasyonunu pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir (C. Han vd., 2019; Y. Shi vd., 2015; J. Tang vd., 2018; L. Xu vd., 2018). Bununla birlikte, bu lncRNA'ların hücre proliferasyonunu artırma mekanizmalarının birbirinden farklı işleyişe sahip olduğu görülmektedir. Kromozom 5 üzerinde yer alan ve 708 bp uzunluğunda bir lncRNA olan SPRY4-IT1, meme kanseri hastalarında daha büyük tümör boyutları ve ileri patolojik evrelerle pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. SPRY4-IT1, luminal B meme tümörlerinde 8p12 amplifikasyonunun genetik bir sürücüsü olarak tanımlanan zinc finger 703 (ZNF703) geninin ekspresyonunu düzenleyerek tümör hücrelerinin büyümesini indüklediği raporlanmıştır (Y. Shi vd., 2015). Diğer taraftan, DANCR ve PVT1 gibi lncRNA'ların belirli "aracılar" ile etkileşim kurarak spesifik sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Örneğin, DANCR, RXRA proteini ile bağlanır, bu proteinin glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) tarafından serin fosforilasyonunu artırarak PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonunu sağladığı; bu da tümör oluşumunu tetiklediği raporlanmıştır (J. Tang vd., 2018). Buna karşın, bazı lncRNA'ların meme kanseri hücre proliferasyonunda tümör baskılayıcı etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Ai vd. (2019) yaptıkları çalışmada, LINC01355 lncRNA'sının FOXO3 proteini ile etkileşime girerek

bu proteinin stabilitesini artırdığını ve bunun sonucunda CCND1 transkripsiyonunun inhibe olduğunu göstermiştir. Ancak, CCND1'in aşırı ekspresyonu ya da FOXO3 proteininin seviyesinin düşürülmesi, LINC01355'in meme kanseri hücre büyümesini baskılama etkisini tersine çevirebildiği raporlanmıştır.

1.8.2. İnvazyon ve Metastaz'da rol alan lncRNA'lar

Tümör invazyonu ve metastazı, diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanseri hastalarında da en belirgin biyolojik özellikler olup, hastalığın ilerlemesinin başlıca nedenlerindedir. Meme kanseri hücrelerinde lncRNA'ların anormal ekspresyonu, bir dizi moleküler mekanizma aracılığıyla invazyon ve metastaz gibi agresif fenotiplerin ortaya çıkmasını ya da ilerlemesini tetiklemektedir (L. Liu vd., 2020). Epitelyel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşmesi olarak tanımlanan epitel-mezenkimal dönüşüm, belirli fizyolojik ve patolojik koşullar altında hücrelere invazyon ve migrasyon yeteneklerini kazandıran önemli bir süreçtir. EMD'nin karakteristik özellikleri arasında, mezenkimal belirteçlerin (vimentin, fibronektin, N-kadherin, Twist1 ve ZEB1 gibi) artan ekspresyonu ve epitel hücrelerine ait bağlantı proteinlerinin (E-kadherin, kludinler ve α -katenin gibi) azalan ekspresyonu yer alır. lncRNA'ların miRNA'larla etkileşime girerek meme kanseri hücrelerinin metastaz ve invazyon süreçlerini düzenleyebileceğini rapor edilmiştir (Goodall & Wickramasinghe, 2021; O'Brien vd., 2018; S. Zhou vd., 2018). X. Jiang vd. (2018) çalışmalarında, lncRNA NEAT1'in, meme kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon potansiyelini artırdığını rapor etmiştir. NEAT1, miR-448'e bağlanarak ZEB1 transkripsiyon faktörünün ifadenmesini artırarak ve miR-218'in ekspresyonunu baskılayarak meme kanseri hücre invazyonunu desteklemektedir (X. Jiang vd., 2018).

Son çalışmalar, lncRNA'ların EMD ile ilişkili transkripsiyon faktörleri (EMD-TF'ler) ve bazı sinyal yolları (NF- κ B, Notch, Wnt, Hedgehog, AKT-mTOR ve MAPK/ERK) ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Ye vd., 2022). lncRNA'ların EMD sürecindeki işlevleri, kemorezistans gelişen meme kanserinde (BC) kritik bir rol oynamaktadır. X. Sun vd., (2019), lncRNA küçük nükleolar RNA taşıyıcı gen 7'nin (SNHG7) meme kanserinde miR-34a'nın moleküler süngeri olarak işlev gören bir onkojenik lncRNA olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, sh-NC grubuyla karşılaştırıldığında, sh-SNHG7 grubunda EMD ile ilişkili proteinler olan vimentin ve Snail'in azaldığını, buna karşın E-kadherin'in arttığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuç, SNHG7 ekspresyonunun EMD-TF'lerin ekspresyonunu artırdığını, EMD sürecini indüklediği ve tümör progresyonuna neden olduğunu göstermektedir (Ye vd., 2022). Meme kanserinin ilerlemesini kontrol eden diğer lncRNA'lar arasında HOX transkript antisens intergenik RNA (HOTAIR), metastazla ilişkili akciğer transkripti 1 (MALAT-1), çinko parmak antisens 1 (ZFAS1), büyüme durma-özümlü 5 (GAS5), uzun stres kaynaklı kodlama yapmayan transkript 5 (LSINCT5), steroid reseptör RNA aktivatörü 1 (SRA1), X-inaktif spesifik transkript (XIST), H19 ve BC200 bulunmaktadır (Juracek vd., 2014; Serviss vd., 2014). Ayrıca, LINC00520 adlı uzun kodlanmayan RNA'nın

(lncRNA), src, PI3K ve STAT3 gibi onkojenik sinyal yollarının etkisi altında meme kanseri hücre invazyonu ve göçü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (X. Li vd., 2016). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, lncRNA'ların östrojen reseptörü (ER) ile etkileşim halinde tümör progresyonunu artırdığı vurgulanmıştır. Bu çalışma kapsamında özellikle DSCAM-AS1'in, ER-pozitif meme kanserinde yüksek düzeyde upregüle olduğu ve tümör invazivliğini belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Niknafs vd., 2016).

1.8.3. Meme kanseri kemorezistansında rol Alan LncRNA'lar

Kemoterapi, neredeyse tüm meme kanseri alt tiplerinde uygulanmakta olup, cerrahi sonrasında meme kanserinin tekrarlamasını ve metastazını etkili bir şekilde önlemektedir. Antrasiklinler, taksanlar ve platin bazlı ilaçlar, meme kanseri için standart birinci basamak kemoterapi ilaçlarıdır. Antrasiklin ailesinin bir üyesi olan Doksorubisin/Adriamisin (DOX/ADR), meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türü için birinci basamak kemoterapi ilacı olarak kullanılmaktadır. DOX/ADR, DNA replikasyonunu durdurur, serbest radikal oluşumunu indükler ve topoizomeraz II aktivitesini inhibe ederek DNA hasarına, bağlanmaya, alkilasyona ve çapraz bağlanmaya neden olur. Bu süreç, kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemesine rağmen birçok hasta kısa bir süre içinde ilaç direnci geliştirerek nüks yaşamaktadır (Jasra & Anampa, 2018; Kalyanaraman, 2020). Güncel bilimsel çalışmalar, uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) meme kanserinde (BC) kemoterapi direncinin (kemorezistans) gelişiminde önemli roller oynadığını ortaya koymaktadır (Chang vd., 2018; Y. Wang & Minden, 2022b; Xing vd., 2021; M. Zhang vd., 2021; L. Zhu vd., 2021). Özellikle, MALAT-1, HOTAIR ve H19 gibi lncRNA'ların, apoptoz mekanizmaları ve taşıyıcı proteinlerin (efflux transporters) aktivitesini değiştirerek meme kanserinde hem kanserli hücrelerin çoğalması, invazyonu, metastazı gibi süreçlerle hem de kemorezistans ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (J. Yu vd., 2020). Bu tümörijenik süreçlerde rol alan lncRNA'lar ve özellikle kemoterapi direnci üzerindeki etkilerine odaklanılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Collette vd. (2017), lncRNA H19'un yaklaşık %70 oranında meme kanseri (BC) hastasında aşırı eksprese edildiğini ve onkojenik bir lncRNA olduğunu ortaya koymuştur. 60 hastadan alınan dokular karşılaştırılarak yapılan bir çalışmada H19'un özellikle üçlü negatif meme kanseri (TNBC) dokularında anlamlı şekilde yukarı regüle olduğunu göstermiştir (Y. Li vd., 2020). Paklitaksel dirençli TNBC ile paklitaksel duyarlı TNBC arasındaki H19 ekspresyon seviyesini karşılaştırmış ve H19'un dirençli grupta yukarı regüle olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, H19'un Akt sinyal yolu dahilindeki kilit proteinlerin (p-Akt (Ser473), Akt, Bax, Bcl-2 ve kesilmiş kaspaz-3) ekspresyonunu düzenleyerek Akt'ın fosforilasyonunu anlamlı ölçüde artırdığını doğrulamışlardır (J. Han vd., 2018). İlâveten, paklitaksel dirençli ER α pozitif meme kanseri hücre dizilerinde H19'un, Bcl-2 ailesine ait üyeler olan BIK ve NOXA'nın transkripsiyonunu baskılayarak hücre apoptozunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, H19'un ER α 'nın aşağı akış hedef molekülü olduğunu belirlemiş ve ER α 'nın meme kanseri ilerlemesinde düzenleyici

bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Bu bulgular sonucunda, ER α pozitif meme kanserinde H19'un yüksek düzeydeki ekspresyonunun, paklitaksel tedavisinin klinik etkinliğini olumsuz yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Si vd., 2016).

Gooding vd. (2019) yaptıkları çalışmada, lncRNA BORG'un, NF-kB sinyal yolunu aktive ederek DNA hasarını azalttığı ve böylece TNBC'lerde DOX direncini artırdığını bildirmiştir. Ayrıca Qian vd., (2020) çalışmalarında lncRNA LINC00668'in , meme kanseri hücrelerinde upregüle olduğu ve stafilkokal nükleaz domeni içeren 1 (SND1) hedef olarak DOX direncini artırdığı bildirilmiştir. Antrasikline dirençli meme kanserinde yukarıda bahsedilen lncRNA'ların pozitif düzenleyici etkilerinin aksine, bazı lncRNA'lar ilaç direncini azaltabilmektedir. lncRNA PTENP1, meme kanseri hücrelerinde ve dokularında düşük ekspresyon gösterir. PTENP1, miR-20a'nın endojen bir süngeri gibi davranarak PTEN ekspresyonunu artırdığı ve bu yolla PI3K/AKT yolunu inhibe ettiği; PTENP1'in aşırı ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinde ADR direncini önemli ölçüde tersine çevirdiği bildirilmiştir ((C. Gao vd., 2019). Benzer bir çalışmada, lncRNA MEG3'ün düşük düzeydeki ekspresyonu, Bax/Bcl-2 eksenini üzerinden apoptozun baskılanmasına yol açarak DOX direncinin artmasına katkı sağladığı raporlanmıştır (Deocesano-Pereira vd., 2019).

1.8.4. Urothelial cancer associated 1 (UCA1)

Urothelial cancer associated 1 (UCA1), uzun kodlanmayan bir RNA (lncRNA) olup, ilk olarak mesane geçiş hücreli karsinomunda tanımlanmıştır. Dizi analizleri, bu RNA'nın insan endojen retrovirüs H ailesi ile homolojisini göstermiştir (X.-S. Wang vd., 2006). UCA1 geni, insan kromozomu 19p13.12 üzerinde pozitif iplikte yer almakta olup üç ekzon ve iki intron içermektedir. UCA1 dizisi, herhangi bir koruyucu uzun açık okuma çerçevesi (ORF) içermeyen birçok sonlandırma dizisi barındırmaktadır (F. Yao vd., 2019). UCA1'in, 5' ucunda bir TATA kutusu ve 3' ucunda bir poliA kuyruğu bulunduğu tespit edilmiştir. Son çalışmalar UCA1'in üç farklı izoformu olduğunu ortaya koymuştur (1.4, 2.2 ve 2.7 kb)(Xue vd., 2016). En çok incelenen izoform, lncRNA UCA1 olarak adlandırılan ve en küçük boyutta olan varyanttır (H. Wang vd., 2017). Doku ekspresyon profiline göre, UCA1 embriyonik dokularda yaygın olarak ifade edilirken, yetişkinlerin çoğu normal dokularında (kalp ve dalak hariç) ifade edilmemektedir. UCA1, ilk olarak mesane kanserinde incelenmiş ve çoğunlukla sitoplazmada lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu durum, aşağı akış genlerinde protein sentezi sürecinin düzenlenmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir (F. Yao vd., 2019).

Ürotelyal kanserle ilişkili 1 (UCA1) ilk olarak mesane kanserinde, hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, invazyon kemorezistansını ve metabolizmasını düzenlediği bildirilen bir onkojenik lncRNA'dır (F. Wang vd., 2008). Mesane kanserinin yanı sıra, lncRNA UCA1'in onkojenik fonksiyonları meme kanseri, kolorektal kanser, özofagus yassı epitel hücreli

karsinom, mide kanseri, hepatosellüler karsinom, melanom, yumurtalık kanseri ve dil skuamöz hücreli karsinom gibi diğer kanserlerde de tanımlanmıştır (H. Wang vd., 2017; Xue vd., 2016).

Onkojenik fonksiyonun yanı sıra, lncRNA UCA1'in birçok malign tümör tipinde ilaç direncini düzenlediği bulunmuştur; örneğin, meme kanserinde, UCA1'in yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda tamoksifene karşı ilaç direncini indüklediği gösterilmiştir (X. Li vd., 2016; C.-G. Xu vd., 2016). UCA1'in, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde miR-193a (Nieto vd., 2016), hepatosellüler kanserde miR216b (F. Wang vd., 2015), meme kanseri hücrelerinde miR-18a içeren çeşitli kanser hücrelerinde birkaç miRNA'ya bağlandığı bildirilmiştir. LncRNA-UCA1'in p27'nin baskılanması ve koleraktal kanser hücrelerinin hücre proliferasyonu, apoptozu ve hücre döngüsü dağılımını etkileyerek meme kanserinde de onkojenik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Y. Han vd., 2014). C. Wu & Luo, (2016) dirençli LLC2 ve LLC9 meme kanseri hücrelerinde UCA1'in MCF7 hücrelerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ekspresyon seviyelerine (~ 20 kat) sahip olduğunu bulmuştur. Ayrıca UCA1 geninin susturulması ile meme kanseri hücrelerinin tamoksifene karşı duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda UCA1'in regülasyonunun artmasının, meme kanserinde tamoksifen direnci ile ilişkili olduğu ve UCA1'in kısmi olarak mTOR sinyalizasyonunu aktive ederek meme kanseri hücrelerine tamoksifen direnci kazandırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, başka bir çalışmada UCA1'in tamoksifene karşı ilaç direncini indüklediği gösterilmiştir (C.-G. Xu vd., 2016).

lncRNA UCA1'in ekspresyonunun artırılmasının, sisplatine dirençli mesane kanseri hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde artırdığı, UCA1 geninin susturulmasının ise hücre canlılığını azalttığını rapor edilmiştir (Y. Fan vd., 2014a). UCA1 ekspresyonunun artışının, p27'nin baskılanması yoluyla meme tümörü büyümesini desteklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, shRNA kullanılarak UCA1'in inhibe edilmesinin, meme kanseri hücrelerinin invazivliğini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (S. Chen vd., 2015). UCA1'in aynı zamanda meme kanseri hücrelerinin büyümesini desteklediği, tümör baskılayıcı miR-143'ün ifadenmesi baskıladığı böylece hücrelerin apoptoza gitmesini azalttığı gösterilmiştir (Tuo vd., 2015). UCA1'in onkojenik etkisinin yanı sıra, önceki çalışmalarda, AKT / mTOR yolunu aktive ederek EGFR-mutant küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR-TKI'lara karşı direnç gelişimini indükleyebildiği bildirilmiştir (S. Chen vd., 2015). Bu çalışmalara ek olarak, Liu ve arkadaşlarının çalışma raporu, UCA1 ile tamoksifen direnci arasında güçlü bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. UCA1'in inhibisyonunun, tamoksifen dirençli MCF-7-R ve T47D-R hücrelerinde proliferasyonu, migrasyonu ve kemoterapi direncini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Son olarak, UCA1'in ekspresyonu pozitif yönde regüle olduğunda, zeste homolog 2 (EZH2)'ye bağlandığı ve p21 ekspresyonunu inhibe ettiği böylece tamoksifen duyarlı hücrelerin ilaca direnci artırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışma ekibi, UCA1'in PI3K / AKT sinyalizasyonunu da modüle ettiğini göstermiştir (Z. Li, Yu, vd., 2019a). Bu sonuçlardan, lncRNA UCA1'in meme kanseri hücrelerinde tamoksifen direncini indüklediği ve bunu kısmen mTOR sinyal yolunun aktivasyonu ile yaptığı ortaya çıkmaktadır. Özetlenirse de, literatür bulguları UCA1'in meme

kanseri hücrelerinin kemoterapi direncini düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir.



2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma , laboratuvarında yapılan deneysel bir çalışmadır.

2.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Hitit Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında 13 Nisan 2021-01 Mart 2024 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın ön verilerinin elde edilmesi, malzeme temini ve ön hazırlık bölümü 5.10.2020-13.04.2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırma toplamda yedi tez izleme döneminde 28.11.2019-13.05.2024 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

2.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada insan üzerinde bir çalışma yapılmamıştır. Araştırmada insan meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır.

2.4. Çalışma Materyali

Araştırmada Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu tarafından sağlanmış olan MCF-7 hücre hatları (RRID:CVCL_0031) laboratuvarında kademeli olarak doksorubisin uygulaması ile doksoubisine dirençli MCF-7 hücre hattına dönüştürülmüştür. Bu hücre hattı MCF-Dox isimlendirilmiştir. Kontrol hücre grubu (MCF-7/S) ve MCF-DOX hücreleri ile hücre kültürü laboratuvarında elde edilen hücresel verilerle (RNA vb.) çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.5. Malzeme ve Cihazlar

2.5.1. Hücre kültüründe kullanılan reaktifler

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri (glutaminsiz, phenollü) (Capricorn, , RPMI besiyeri (glutaminsiz, phenollü) (Capricorn) Fetal Sığır Serum (Capricorn), Penisillin/Stretomisin, 10,000 units/ml (Capricorn), L-glutamin (Capricorn), Trypsin-EDTA(0.25%) (Capricorn), Dimethyl sulfoxyde (DMSO) (Capricorn), Phosphate Buffered Saline(PBS) (Capricorn) ,10X Trypan Mavisi 0.5% Solüsyonu (Capricorn), Doksurubisin hidroklorür (Sigma), Silencer Select siRNA (UCA1 ve negatif kontrol, Ambion), OptiMEM I

reduced serum besiyeri (İnvitrogen, 1985-070), Lipofect Max (İnvitrogen, 18324012), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Sigma), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) malzemeleri kullanılmıştır.

2.5.2. RNA izolasyon, komplementar DNA (cDNA) sentezi, kantitatif Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve RT-PCR reaktifleri

RNA izolasyon kiti (GeneAll), one-step cDNA sentez kiti (A.B.T., C03-05-25), sybergreen master mix (A.B.T. Company Brand, Turkey), Supreme NZYTaQ 2X green Master mix (NZY, M805-403), agaroz (NZY, MB502), 6X gel loading dye, Etidyum bromür, etanol, TAE buffer (A.B.T. B04-10-01), 100 bp DNA Marker, sentetik primer dizileri kullanılmıştır. Bu diziler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri

Primer	Forward 5'----->3'	Reverse 5'----->3'	A _{TC}
MRP1	GGATCATGCTCACTTTCTGG	AAGTGATGTCACGAAACAGGTC	51
UCA1	TTTGCCAGCCTCAGCTTAAT	TTGTCCCATTTTCCATCAT	50
E-Kaderin	GAAGTCAAAGCACCTGTGA	TTTGAATCGGGTGTGAGGG	60
Vimentin	GGACCAGCTAACCAACGACA	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	55
Twist	ACCATCCTCACACCTCTGCATTCT	GTGATGCCTTTTCCTTTCAGTGGCT	55
Okludin	GAA GCC AAA CCT CTG TGA GC	GAA GAC ATC GTC TGG GGT GT	60
Klaudin-1	CGGGTTGCTTGCAATGTGC	CCGGCGACAACATCGTGAC	55
N-Kaderin	GCGTCTGTAGAGGCTTCTGG	GCCACTTGCCACTTTTCCTG	60
PTEN	AAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCT	ACTGAGGATTGCAAGTTGCCA	58
AKT1	GAAGGACGGGAGCAGGCGGC	CCTCCTCCAGGCAGCCCCTT	57
AKT2	CCGGTGACAGACTGTGCCCTGT	CCCAATGAAGGAGCCGTCGCT	63
mTOR	AGTGGACCAGTGAAACAGG	TTCAGCGATGTCTTGTGAGG	56
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT	55

2.5.3. Cihazlar

Araştırmada kullanılan cihaz listesi Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Kullanılan cihaz listesi

Cihaz Adı	Firma
CO2 İnkübatörü	ESCO
Sınıf 2 Biyogüvenlikli Hava Kabini	Esco-ClassII-BSC Laminar Kabin
Inverted Mikroskop	Zeiss

Hemositometri, Neubauer lamı Transillüminatör	Hausser Scientic, DNR-Bioimaging Sistem-Min- Bis
Jel Elektroforez Sistemi	Biorad
Chemidoc Görüntüleme Sistemi	Biorad
Hassas terazi	Radwag
Mikrosantrifüj	Eppendorf
Nanodrop	ThermoScientific
Isıtıcılı Manyetik karıştırıcı	Stuart
Vorteks	Nüve
Thermal Cycler	Biorad
Gerçek zamanlı PCR sistemi	Applied Biosystems
ELISA okuyucu	Biochrom Anthos 2020

2.6. Besiyeri ve Hazırlanan Solüsyonlar

Tablo 2.3. Besiyeri hazırlanış protokolü

Tam Besiyeri	500 ml	Son Konsantrasyon
DMEM /RPMI	440 ml	1x
FBS	50 ml	%10
Penisilin/Streptomisin	5 ml	%1
L glutamin	5 ml	%1

Tablo 2.4. Hücre sayım solüsyonu

Hücre saymak için hazırlanan solüsyon	Son Hacim
Trypan mavisi (2x)	1x
Hücre	1x

Tablo 2.5. Hücre dondurma solüsyonu

Hücre dondurulurken hazırlanan solüsyon	Son Konsantrasyon
FBS	%90
DMSO	%10

2.7. Yöntemler

2.7.1. Hücre kültürü ve hücrelerin pasajlanması

MCF-7 hücre hatları Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU tarafından çalışmada kullanılmak üzere hediye edildi. İnsan meme karsinomu için bir model hücre hattı olan MCF-7, farklılaşmış meme epiteli özelliklerini yansıtmaktadır (Bacus vd., 1990). Hücreler, DMEM besiyerinde %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), %1 glutamin ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin eklenerek kültüre edildi. Yapışık monolayer kültür olarak büyütülen hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren %95 nemlendirilmiş atmosferde, inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminar akış kabini içerisinde yapılırken, 25 cm² veya 75

cm² büyüklüğünde filtre kapaklı kültür flasklarında kültüre edildi. Hücreler flask yüzeyindeki hücre yoğunluğu %70'den fazla doluluğa ulaştığında, hücreler tripsin-EDTA (Biochrom AG) ile tripsinize edildi. Öncelikle, flask içindeki büyüme ortamı boşaltıldı ve flask yüzeyine yapışık hücreler 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra, tripsin-EDTA (25 cm² flasklar için 1 mL, 75 cm² flasklar için 3 mL) eklendi ve hemen ardından 37 büyük kısmı uzaklaştırılarak flasklarda az miktarda tripsin-EDTA bırakıldı (25 cm² flasklar için yaklaşık 0,5 mL, 75 cm² flasklar için yaklaşık 1 mL). Hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben, eklenen Tripsin/EDTA miktarının en az üç katı kadar FBS ilave edilerek tripsin aktivitesi durduruldu. Ardından, hücreler istenilen yoğunlukta pasajlanarak yeni plâtelere transfer edildi. Bir kısmı ise deneyler için ayrılmış ya da dondurularak saklandı.

2.7.2. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi

Tripsinize edilmiş ve yüzeyden ayrılmış hücreler, 15 mL'lik Falcon tüplerinde 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, 1 mL soğuk dondurma ortamında (FBS'nin %90 (v/v) ve DMSO'nun %10 (v/v)), süspansiyon edildi. Dondurmak için hazırlanan solüsyon ve hücre karışımı kriyoviyallere aktarılmış 24 saat boyunca -20°C'de bir derin dondurucuda tutulmuş ve ardından -80°C dondurucuya aktarıldı. Kriyoviyaller, -80°C dondurucudan çıkarılmış ve hemen 37°C'lik bir su banyosuna aktarıldı. Tamamen çözüldüklerinde, uygun hacimdeki alikotlar 15 mL'lik Falcon tüplerine alınmış ve hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, kültür flaskının türüne uygun bir hacimde tam besiyeri içerisinde süspansiyon edildi. Hücreler, uygun büyüme koşullarında kültüre alındı.

2.7.3. Hücre sayımı

Tripan Mavisi boyanın reaktivitesi, kromoporanın negatif yüklü olmasına ve zar hasar görmedikçe hücre ile etkileşime girmemesine dayanır (Freshney, 1988). Bu nedenle, canlı hücreler boyayı dışarıda bırakır ve ölü hücreler maviye boyanır. Sonuç olarak, metodun temel prensibi, canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücrelerin almasıdır. Hücre süspansiyonu tripan mavisini ile seyreltiğinde canlı hücreler küçük, yuvarlak olarak görünürler. Ölü hücreler ise, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Bu protokol, tripan mavisini dışlama yöntemi kullanılarak hücrelerin canlılık oranını belirlemek ve hücre yoğunluğunu hesaplamak için hazırlandı. Hücreler pasajlama işlemi sonrası tripsinize edilerek yüzeyden ayrıldı. Hücre süspansiyonu, besiyeri eklenerek 15 mL'lik Falcon tüplerine alındı ve 1.200 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelletinin üzerine 1 mL tam besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu, hücre yoğunluğuna bağlı olarak uygun şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan eşit miktarda (%1:1 oranında) alındı ve %0,4'lük tripan mavisini çözeltisi ile karıştırıldı. Tripan mavisini ile karıştırılmış hücre süspansiyonundan 10 µL

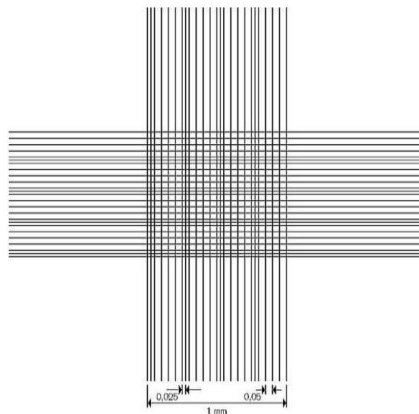
alındı ve Thoma sayım lamına dikkatlice yerleştirildi (Resim 2.1). Işık mikroskobu altında lam üzerindeki mavi (ölü) ve renksiz (canlı) hücreler sayıldı. Hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Hücre sayısı/mL} = 3 \text{ Karede sayılan hücre sayısının ortalaması} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 250.000$$



Resim 2.1. Hücrelerin trypan blue ile karıştırılıp lama yüklenme görüntüsü Thoma sayım lamının görünümü

Thoma lamına koyularak (Resim 2.1) inverted mikroskop altında bir Neubauer hemasitometresinde sayıldı (Şekil 2.1) hücreler Hemasitometre 16 büyük kareden oluşur ve her biri 16 küçük kareye bölünmüştür. Küçük bir kare, 0.00025 mm³'lük bir hacmi temsil eder. 1 mL'deki hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:



Şekil 2.1. Thoma sayım lamının görünümü

2.7.4. Dokсорubisin ilacının hazırlanması

Dokсорubisin (Adriamisin) bir antrasiklin antibiyotiktir. ilacının moleküler formülü C₂₇H₂₉N₀O₁₁.HCl'dir. Moleküler ağırlığı 580 gr/mol'dür. Dokсорubisin ilacını çözmek için DMSO kullanıldı. Stok dokсорubisin çözeltisi 5 mM hazırlandı. Bunun için, 5 mg dokсорubisin hassas terazi de tartılarak 1,72 ml DMSO içerisinde çözüldü. Hazırlanan bu stok -20°C dolapta saklandı. Hücrelere uygulanacağı zaman, 5 mM stok çözeltisi ilk olarak 5 µM'a seyreltildi. 5 µM dokсорubisin çözeltisinden istenilen konsantrasyonlarda (10 -20 - 40- 80- 160-320-640 nM) besiyerine hazırlanarak hücrelere dokсорubisin ilacı uygulandı. Dirençli hücreler aşamalı seçim yöntemi ile seçildi.

2.7.5. Dokсорubisin dirençli MCF-7 hücre hattının geliştirilmesi

Dokсорubisine dirençli MCF7/DOX hücre hattı, Kars vd., (2006) tarafından geliştirilen protokole göre oluşturuldu (1). Dokсорubisine direnç geliştirilen hücreler MCF-7/ DOX ve dirençli olmayan hücre hattı MCF-7/S olarak isimlendirildi.

Başlangıçta hücreler, 10 nM dokсорubisin konsantrasyonu içeren bir hücre kültürü ortamında büyütüldü ve uygun konfluansa eriştiklerinde, hücreler pasajlanarak aşamalı olarak plate'e yapışan hücreler seçildi. 640 nM (0,64 µM)'a kadar dokсорubisin konsantrasyonu yükseltilecek direnç gelişimi takip edildi. Bu aşamada, ilk olarak hücreler 4 gün boyunca 10 nM ilaçlı besiyerinde büyütülüp, ölen hücreler plakadaki besiyeri ile beraber atıldı. Sonrasında, aynı plakaya ilaç içermeyen besiyeri koyularak yaklaşık 2 hafta boyunca, 10 nM konsantrasyonda dokсорubisine direnç geliştiren hücrelerin çoğalmasına izin verildi. Bu şekilde 640 nM'a kadar çıktı. Sonuç olarak, dirençli hücreler aşamalı seçim yöntemi ile seçilmeye çalışıldı; başlangıçta hücrelerin her 4 günde bir besiyeri değiştirilmiş olup % 70 konfluansa erişebildiklerinde, hücreler pasajlandı ve dirençli hücrelerin aşamalı olarak seçilmesi sağlandı. MCF-7 hücrelerinin uzun süreli kültürüyle ilişkili etkileri hariç tutmak için, MCF-7/S hücreleri özdeş koşullar altında kültürlenerek ve kültürde MCF-7/ DOX hücreleriyle aynı süre boyunca ancak dokсорubisin yokluğunda tutuldu. Direnç geliştiren hücrelerin morfolojileri mikroskopta invaginyasyon ve çıkıntı oluşturmalarına, göre değerlendirilerek incelendi.

2.7.6. Hücrelerin dokсорubisin dirençliliği geliştirmesinin doğrulanması

In vitro çalışmalar, kanser hücrelerinin çeşitli mekanizmalar yoluyla kemoterapötiklere değişen derecelerde direnç geliştirebileceğini göstermiştir. Bu mekanizmalar, 'çoklu ilaç direnci' (MDR) sergileyen bir fenotipin gelişmesine yol açar (Rivera & Gomez, 2010). İlaç direncinin en iyi bilinen mekanizmasında, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP1) geninde ekspresyonlarında artış meydana gelmektedir (Bodó vd., 2003). Bu sebeple, çalışmamızda laboratuvarında bulunan MRP1 primerleri kullanılarak MCF-7/Dox ve MCF-7/S hücrelerinde bu

genlerin ekspresyon seviyeleri kantitatif eş zamanlı PCR (qPCR) yöntemi ile araştırıldı, ilaca karşı direnç oluşması gen düzeyinde de tespit edildi. Ayrıca, hücrelerin doksorubisine direnç geliştirme doğrulaması hücre canlılık deneyi (MTT uygulaması) yapılarak da test edildi.

2.7.6.1. Total RNA İzolasyonu

Hücreler öncelikle deneyde kullanılmak üzere 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 200.000 hücre/1ml olacak şekilde ekildi. Etüvde 24 saat bekletildikten sonra, besiyerleri uzaklaştırılıp, PBS ile yüzeyi yıkandı. 6 kuyucuklu plakalardaki her bir kuyucuğun üzerine 400 µl tripsin konup hücrelerin kalkması sağlandı. Hücreler 1.5 ml ependorf tüplere alınarak +4 °C, 2000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernetant dökülüp, pellet kısmı total RNA izolasyonu için kullanıldı. RNA izolasyon kitindeki (Ribospin II, GeneAll) protokol uygulandı. Bu protokole göre;

- Tüplere 350 µl RAL Buffer eklenip, pipetleme ile liziz işlemi gerçekleştirildi.
- %70'lik etanolden 350 µl eklenip pipetajlama yapıldı.
- Karışım mini-spin kolonlarına aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 1 dk boyunca 10 000 g de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası alta geçen kısım atılıp yeniden mini spin toplama kolonu yerleştirildi.
- Tüplere 350 µl RF Buffer'dan eklenip 30 sn boyunca 10 000 g de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası alta geçen kısım atılıp yeniden mini spin toplama kolonu yerleştirildi.
- Tüplere 350 µl RW Buffer'dan eklenip 30 sn boyunca 10 000 g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alta geçen kısım atılıp yeniden mini spin toplama kolonu yerleştirildi.
- Tüplere 500 µl RSW Buffer'dan eklenip 30 sn boyunca 10 000 g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alta geçen kısım atılıp yeniden mini spin toplama kolonu yerleştirildi.
- Tüplere 500 µl RSW Buffer'dan eklenip 30 sn boyunca 10 000 g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alta geçen kısım atılıp yeniden mini spin toplama kolonu yerleştirildi.
- Yıkama Buffer ile 1 dk boyunca 13 000 g hızda yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında minispın kolonu 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleriyle değiştirildi.
- Mini spin kolonunun merkezine 50 µl Nükleaz-free suyu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk boyunca inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında 1 dk boyunca 10 000 g de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası filtrenin bulunduğu yeşil tüpler atıldı ve alt kısımdaki ependorfun içerisine giren sıvıda izole edilen RNA miktar ölçümü (Nanodrop cihazı kullanılarak) yapıldıktan sonra -80°C (WiseCryo) dolapta saklandı. Elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı NanoDrop cihazı kullanılarak analiz edildi. Saflık derecesini belirten A260/A280 oranının 2.0'ye yakın olması özellikle göz önünde bulunduruldu. Ek olarak RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde 100V 30 dk yürütüldü ve UV görüntüleme sistemi (Chemidoc Imaging System)

kullanılarak görüntülendi. RNA miktarı ve jel görüntüsü EK-1'e temsili olarak yer almaktadır.

2.7.6.2. cDNA Sentez Protokolü ve Kantitatif Eş Zamanlı PCR Reaksiyonu (qPCR)

MCF-7/Dox hücrelerinden elde edilen total RNA'lar ile birlikte kontrol hücrelerden elde edilen total RNA'ların cDNA sentezi yapıldı. cDNA synthesis Kit with RNase Inhibitor (High Capacity) (A.B.T. Company Brand, Turkey) kitindeki prosedür uygulandı. İzole edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezlemek için Tablo 2.6'da gösterildiği şekilde tüplere 10X buffer, Rnaz inhibitörü, dNTP karışımı, rastgele altılı primer karışımı, RNA örneği ve enzim eklenip kısa santrifüj işleminden sonra 25°C'de 10 dakika ardından 37°C'de 120 dakika, 85 °C'de 5 dk, +4°C'de ∞ inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından tüpler -80°C'de saklandı.

Tablo 2.6. cDNA sentez reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
10X Rxn Buffer	2
RNAse Inhibitor	5
dNTP	1
Random Hexamer primer	2
Reverse Transcriptase	1
Total RNA örneği (500 ng)	Değişken
RNASız su	Değişken
Toplam	20

Elde edilen cDNA'lar qPCR deneylerinde kalıp DNA olarak kullanıldı. Belirlenen spesifik primerler yardımıyla real-time reaksiyonu hazırlandı (Tablo 2.7). SYBER Green Mastermix (A.B.T. Company Brand, Turkey) kullanılarak genlerin ekspresyon seviyelerine bakıldı. Bu işlemin analizi Step One Plus (Applied Biosystem) cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. Kantitatif Eş-zamanlı PCR reaksiyonu (qPCR)

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Mix	10
İleri Primer (FP)	0,4
Geri Primer (RP)	0,4
Rox dye	0,2
cDNA (5ng)	5
RNASız su	4
Toplam	20

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen CT değerlerinin ortalaması alınarak yapıldı. Bu çalışmada GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı. Öncelikle

araştırılmak istenen ilgili genin CT değeri, referans genin CT değerinden çıkartılarak normalize edilerek delta CT (Δ CT) değeri hesaplandı. Sonrasında kontrol grubunun Δ CT değerleri, deney grubunun Δ CT değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta$ CT değeri bulundu. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta$ CT olarak hesaplandı. Bu anlatım aşağıda formülize edildi.

$$\begin{aligned}\Delta\text{CT} &= \text{CT (kontrol)} - \text{CT (referans)} \\ \Delta\Delta\text{CT} &= \Delta\text{CT (hedef)} - \Delta\text{CT (kontrol)} \\ \text{Kat değışimi} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak, hedef genlere özgü primerlerle qPCR analizi yapıldı. MRP1, UCA1, E-Kaderin, Vimentin, Twist, Okludin, Klaudin-1, N-Kaderin, PTEN, AKT1, AKT2, Mtor primer setleri, genlerin kodlama dizilerinden tasarlandı. Bu tasarım, 'Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'nin (www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanlarından elde edilen gen dizileri kullanılarak, Perlprimer Yazılımı ile gerçekleştirildi.

2.7.6.3. Hücre Canlılık Deneyi (MTT Testi)

MTT yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] ile doksorubisinin MCF-7/S ve MCF-7/Dox (640 nM'a kadar dox uygulanmış) hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Bu testte, MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. Hücre canlılıklarını analiz etmek için Kazan vd., (2020) çalışmasında belirtilen (4) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) metodu uygulanarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu hücrelere (MCF-7/S) ve direnç geliştirmiş hücrelere seyreltilmiş farklı konsantrasyonlarda (0,0625-200 μ M) doksorubisin uygulamasından 48 saat sonra MTT testi uygulandı. Kısaca, hücreler 5×10^3 sayıda olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi. 24 saat boyunca hücreler plaka yüzeyine yapışması için inkübe edildi. Değişen konsantrasyonlarda doksorubisin verilerek 48 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 10 μ l MTT solüsyonu (5 mg/ml, Sigma) her bir kuyucuğa eklenerek 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Süpernatant aspire edilmeden oluşan MTT-formazan kristalleri 100 μ l SDS-HCl solüsyonu (10 ml solüsyonda 1 gr SDS ve 0.01 M HCl içeren) ile çözülerek 570 nm'de absorpsiyon ölçümü alındı. İlaç uygulanmayan kontrol grubunun canlılığı %100 kabul ederek doksorubisin uygulanan hücrelerin canlılığı bağıl olarak hesaplandı. Absorpsiyon verileri kullanılarak hücre canlılık oranları ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değeri, GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak konsantrasyon ve canlılık oranları temel alınarak belirlendi. IC₅₀ değeri, bir maddenin, belirli bir biyolojik veya biyokimyasal süreci inhibe etme etkinliğini ölçen bir parametredir. Başka bir deyişle, bu değer, bir süreci %50 oranında inhibe etmek için gerekli olan ilaç veya inhibitör miktarını ifade etmektedir.

(Hoetelmans ,2017). MTT testi, belirli konsantrasyonlardaki doksorubisin için en az üç kez tekrarlanarak sonuçlar doğrulandı.

Hücre canlılık yüzdesinin hesaplanmasında şu formül kullanıldı:

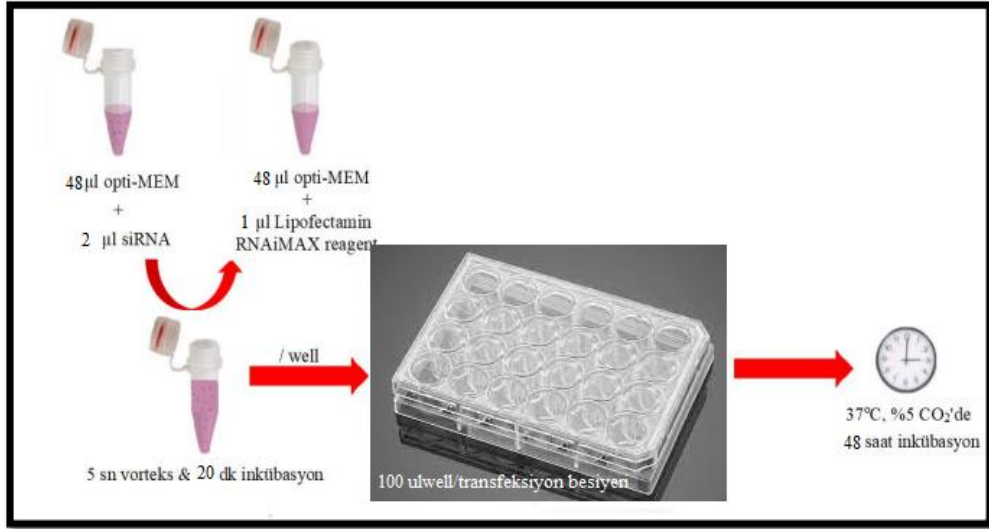
$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Ölçülen optik dansite değeri}) / (\text{Kontrol ortalama optik dansite değeri}) \times 100$$

2.7.7. RT-PCR yöntemi

MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde EMD sürecini analiz etmek için belirlenen altı genin (E-kaderin- Vimentin, Twist, Okcludin, Klaudin-1 ve N-Kaderin) mRNA düzeyinde ekspresyon değişimlerini incelemek hem RT-PCR hem de qPCR yapıldı. PCR işlemi; Reaktif 10 µl PCR master Mix, 0,4 µl İleri primer, 0,4 µl Geri Primer, 5 µl cDNA ve 4,2 µl nükleaz free su karıştırılarak konavnsiyonel PCR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonrasında örnekler %1,5 'lik agaroz jelde 100 V'de 30 dk süreyle yürütüldü. Jeldeki örnekler UV görüntüleme sistemi (Biorad Chemidoc Imaging System) kullnılarak görüntülendi.

2.7.8. siRNA teknolojisi ile UCA1 lncRNA'nın susturulması

Transfeksiyon deneyi için T25 flask içerisinde büyütülen MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücreleri Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific GmbH, Germany) ile kaldırıldı. Thoma lamında (MARIENFELD, Germany) incelenmesi için Trypan Blue (Gibco, Life Technologies, USA) ile boyandı. Burada yazılan protokol susturma deneylerinde yapılan optmizasyonlar sonucu karar verilen ve son uygulanan protokoldür. Her iki hücre grubu da 24 kuyulu kültür kuyularına (30000/kuyu) ekildi ve antibiyotik içermeyen %10 FBS'li kültür ortamı ile bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, siRNA ile gelen protokol uygulanarak transfeksiyon deneyi gerçekleştirildi. Bu protokole göre 10 pmol'lük hazırlanan Silencer Select siRNA'dan 2 ul alınıp üzerine 48 ul OPTİMEM solüsyonu eklendi. Ayrı bir tüp içerisinde 1 ul Lipofect Max + 49 ul OPTİMEM solüsyonu hazırlandı. Bu iki çözelti karıştırılarak son hacmi 100 ul olan bir karışım hazırlandı. Bu karışım 20 dk boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 ul olacak şekilde bu karışımdan yavaşça ve eşit şekilde dağıtılarak eklendi. Plaka yukarı aşağı doğru çalkalandı. 37 °C %5 CO2'lik inkübatöre plakalar kaldırılıp, 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlemler bittikten sonra deneysel çalışmalar yapıldı. Şekil 2.2 'de protokol özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Gen susturma protokolünün şematize edilmiş görüntüsü

2.7.9. Yara iyileşmesi (wound healing) yöntemi

UCA1 gen ekspresyonunun hücre göçü üzerindeki etkisini değerlendirmek için yara iyileşmesi (wound healing or t-scratch assay) deneyi yapıldı (C.-C. Liang vd., 2007). MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücreleri 24'lük kuyulu plakalarına her bir kuyuda 30.000 hücre yoğunluğunda olacak şekilde ekimi yapıldı ve %5 CO₂ ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, hücreler 10 pmol konsantrasyonlarında UCA1-siRNA veya kontrol-siRNA ile transfekte edildi ve ekstra 24 saat inkübe edildi. Ortam daha sonra serum içermeyen Opti-MEM ile değiştirildi ve hücreler %90-100 yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edildi. Ardından hücreler üzerinde çizik alan oluşturmak için bir 200 µl'lik sarı renkli pipet ucu yardımı ile yukarıdan aşağıya doğru dikey bir çizgi çekildi. Yapışan hücrelere zarar vermeden çizik yapılan hücreleri çıkarmak için hücreler PBS ile dikkatlice yıkandı ve daha sonra taze Opti-MEM içinde 37°C'de inkübe edildi. Yara yüzeyine göç eden hücreler, 24 saat sonra bir trinoküler ters mikroskop (Olympus) altında fotoğrafları çekildi. Görüntüler, ImageJ (v1.42, NIH) yazılımı ile analiz edildi.

2.7.10. Verilerin istatistiksel analizi

Gruplar arasındaki anlamlı farkı belirlemek için istatistiksel analiz SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların değerlendirilmesi için Student's t-testi uygulanmış ve anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3. BÖLÜM

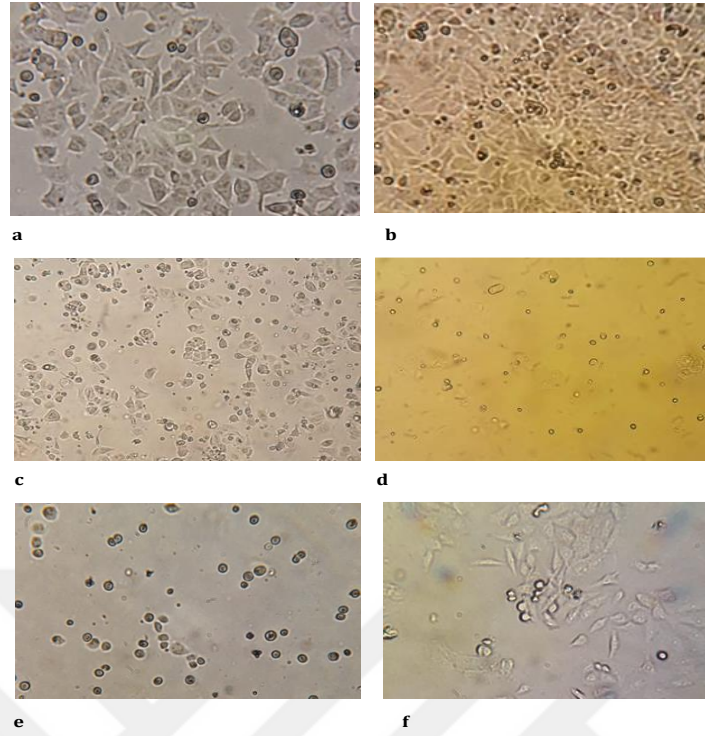
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında östrojen resptörü pozitif hücre hattı MCF-7'ye kademeli artırımı sağlayarak doksorubisin ilaç uygulaması yapılmıştır. MCF-7/Dox hücrelerde doksorubisine direnç geliştirilebildiği doğrulayan deneyleri, uzun kodlanmayan RNA UCA1'in bu hücrelerde transkripsiyonel regülasyonunu, lncRNA UCA1'susturulması ile PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna etkisinin gösteren bulgular yer almaktadır. Ek olarak, UCA1'in hücrelerin göç etme yeteneğine etkisini gösteren bulgular da gösterilmiştir.

3.1. MCF-7 Hücrelerinde Doksorubisin Direncinin Geliştirilmesi

3.1.1. Hücrelerin morfolojik görünümünün incelenmesi

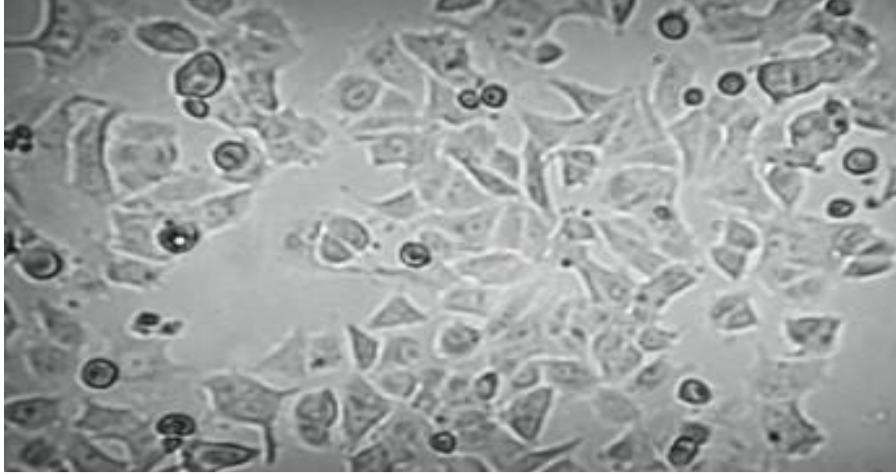
İlaç direnci geliştirmiş hücrelerin fenotipe farklı morfolojik özellikler kazandığı tespit edilmiştir. Doksorubisine dirençli MCF7/Dox hücre dizisi 0,64 µM'lik bir doksorubisin konsantrasyonu ile ardışık doksorubisin uygulamaları sonrasında oluşturulmuştur. İlaç konsantrasyonu arttıkça hücre ölümü artmıştır. Ancak 14 günde bir doksorubisin uygulaması yapıldığı için hücreler kısa periyotlarla doksorubisine maruz bırakılmıştır. Şekil 3.1'de hücrelere 10 nM (a), 20 nM (b), 40 nM (c), 80 nM (d), 100 nM (e), 160 nM (f) doksorubisin uygulandığı hücrelerin ters mikroskop altındaki morfolojileri gösterilmiştir. 80 nM'dan 160 nM doksorubisin uygulamasına geçildiğinde hücrelerin büyük bir kısmının öldüğü gözlemlendi ve morfolojileri yuvarlak hale geldi. 14 gün doksorubisin içermeyen besiyerinde de hücreler büyümediği için öncelikle hücreler, 100 nM doksorubisin besiyeri içerisinde inkübe edildi. 80 nM ve 100 nM doksorubisin içeren besiyerindeki hücrelerin morfolojileri tamamen yuvarlak görünümlü yapıda iken, ileri dozajlarda tekrar bu hücrelerde ipliksi çıkıntılar gözlemlendi.



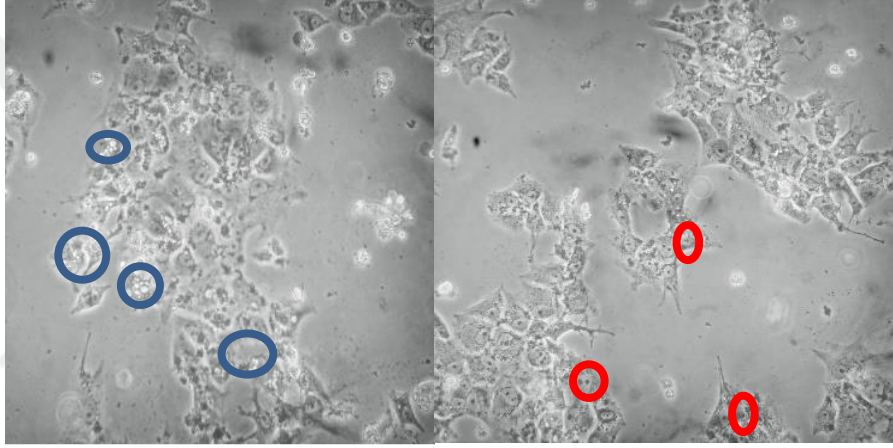
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanmış MCF-7 hücrelerinin morfolojileri (Doksorubisin konsantrasyonları a: 10 nM b:20 nM c:40 nM d:80 nM e: 100 nM f:160 nM)

Doksorubisin konsantrasyonu 160 nM'a çıkarılıp hücreler iki hafta boyunca bu konsantrasyonda besiyeri içeren kültür ortamında büyütüldükten sonra otuz gün doksorubisin içermeyen besiyerine alınarak kültüre edilmiştir. Böylece bu konsantrasyona adapte olabilen hücrelerin morfolojik olarak yuvarlak görünümünden tekrar iğsi forma dönüşümleri tespit edilmiştir. Son olarak 640 nM (0,64 μ M) doksorubisin içeren besiyerinde tutulan hücreler Şekil 3.2'de gösterildiği şekilde kaydedilmiştir. MCF-7/S hücreleri sık hücre-hücre adezyonları olan bir fenotipten doksorubisin uygulaması sonrasında (MCF-7/Dox) hücreler iğ benzeri bir görünüme dönüşmüştür ve şekil olarak uzamıştır. Ayrıca sitoplazmalarında çoklu, nispeten büyük veziküller de gözlenmiştir.

MCF-7/S



MCF-7/Dox



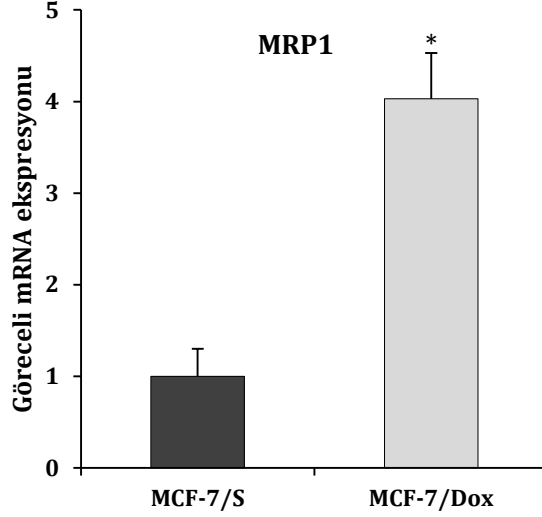
Şekil 3.2. MCF-7/S ve MCF7/Dox'un morfolojisinin karşılaştırılması. MCF-7/S hücreleri, tek çekirdekli, iğ şeklindeki hücreler olarak görünür. MCF-7/Dox hücreleri düzensiz çok sayıda veziküllü (mavi dairelerle vurgulanan) ve çok çekirdekli (kırmızı dairelerle vurgulanan) ve uzantıları olan hücreler düzensiz görünür

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Sonuçları

3.1.2. MRP1 geninin ekspresyon seviyelerinin araştırılması

MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein 1), ABCC1 geni tarafından kodlanan ve çeşitli kanser türlerinde kemoterapiye direnç gelişiminde önemli bir rol oynayan iyi tanımlanmış bir proteindir. Bir başka ifade ile, Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP1)'in antikanser ajanların hücre içine alınması ve dağılımında önemli bir çoklu ilaç salınım pompası görevi vardır. ATP'ye bağımlı bir taşıma pompası olan MRP1, kemoterapötik ilaçların geniş bir yelpazesini hücre içinden hücre dışı alana etkin bir şekilde taşıyarak bu ilaçların hücre içi birikimini ve sitotoksik etkilerini azaltmaktadır (Ohya vd., 2021; J. Yu vd., 2021).

Doksorubisin direnci gelişimini, ilaç direncinin indüklenmesinde rolü olduğu bilinen MRP1'in ekspresyonu qPCR metodu kullanılarak incelendi.



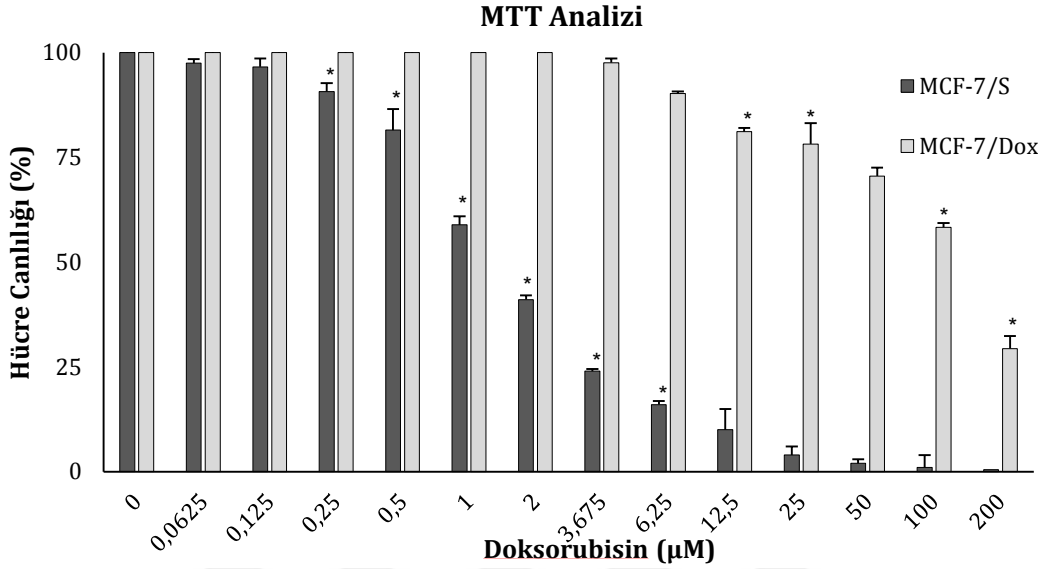
Şekil 3.3. MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinin MRP1 ve GAPDH genlerinin qPCR yöntemi ile mRNA ekspresyon seviyeleri. GAPDH geninden elde edilen CT ile normalizasyon yapıldı
*p < 0,05.

Şekil 3.3'te gösterildiği üzere MCF-7/Dox hücrelerinde duyarlı hücrelerdekine kıyasla MRP1 mRNA gen ekspresyon seviyesi anlamlı derecede dört kat daha fazla eksprese olduğu tespit edildi.

3.1.3. Hücre canlılık testi

MCF-7 hücrelerinde doksorubisine karşı direncin oluşmasıyla ilaca yanıtı belirlemek için MCF-7/Dox ve MCF-7/S hücrelerinin doksorubisine duyarlılığı karşılaştırılmıştır. Duyarlı ve dirençli MCF-7 hücrelerine 48 saat boyunca 0,0625- 200 µM aralığında doksorubisin ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığını ölçmek için MTT testi uygulanmıştır. MCF-7/Dox hücrelerinin MCF-7/S ile karşılaştırıldığında doksorubisine karşı oluşan sitotoksite deneyi sonucu hücre canlılık yüzdeleri Şekil 3.4'te gösterilmiştir. MCF-7/Dox ve MCF-7/S için IC₅₀ değerleri sırasıyla 128,5± 0,22 µM ve 1,65 ±0,10 µM olarak saptanmıştır. Direnç derecesi, şu bağıntıya göre hesaplanan direnç indeksi (R) cinsinden değerlendirilmiştir; $R = IC_{50} \text{ dirençli hücreler} / IC_{50} \text{ duyarlı hücreler}$. Bu nedenle, MCF7/Dox hücreleri, doksorubisine karşı duyarlı hücre hattından yaklaşık 78 kat daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.4'te görüldüğü üzere,

doksorubisin konsantrasyonu arttıkça MCF-7/S hücrelerde hücre canlılığın ciddi oranda düştüğü, ancak MCF-/Dox hücrelerde canlılık yüzdesinin sadece 200 μ M uygulamada %50'nin altına düşebildiği tespit edilmiştir.

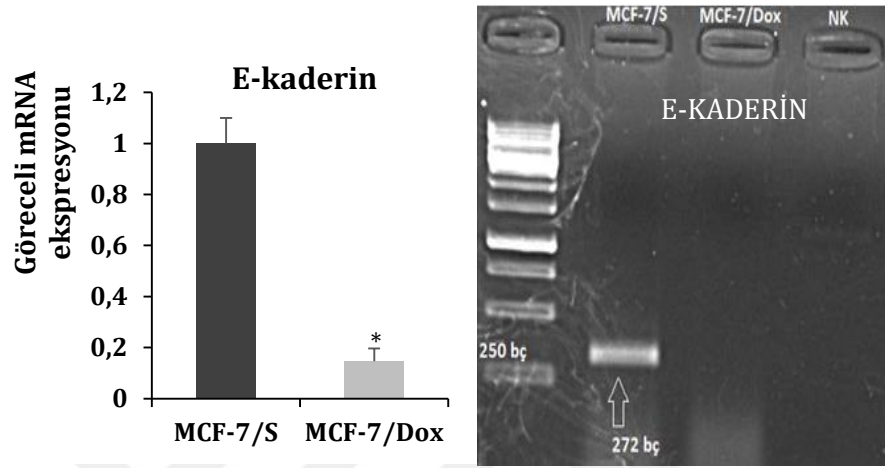


Şekil 3.4. MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücreleri, 48 saat boyunca farklı oranlarda doksorubisine maruz bırakıldı. Hücre canlılığı MTT sitotoksosite deneyi kullanılarak değerlendirildi. Veriler, hücre canlılığının %100 olduğu varsayılan negatif kontrol ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının yüzdesi olarak ifade edildi (* $p < 0,05$)

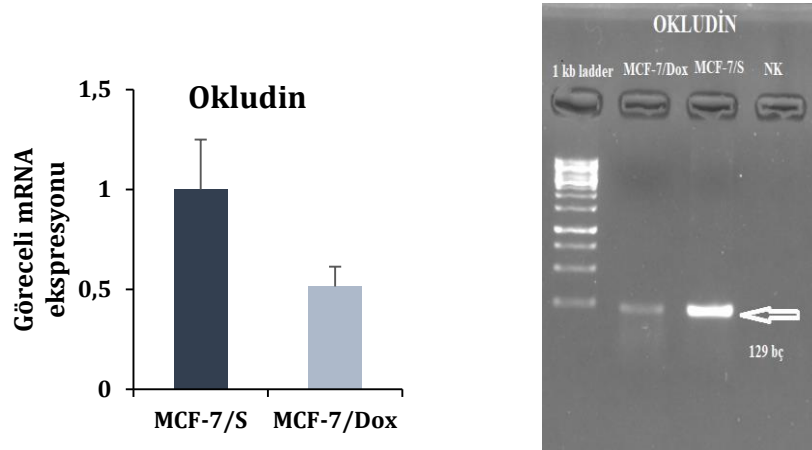
3.1.4. Doksorubisin dirençli hücrelerde epitelyal-mezenkimal dönüşüm sürecindeki bazı genlerin ekspresyon değişimleri

PCR ve qPCR yöntemleri ile MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinde E-kaderin, Okludin, Klaudin-1, N-kaderin, Twist ve Vimentin mRNA ekspresyon düzeylerini tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.5'te MCF-7/S hücrelerde, MCF-7/Dox hücrelere kıyasla E- kaderin geninin ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Doksorubisine duyarlı hücrelerde bu artışın 6,85 kat daha fazla olduğu qPCR sonuçlarından elde edilen Ct değerleri hesaplanarak bulunmuştur. Şekil 3.6'da okludin genindeki ekspresyon değişimini ifade eden grafik sunulmuştur. Bu grafiğe göre Okludinin MCF-7/S hücrelerde 1,9 kat daha fazla eksprese olduğu söylenebilir. Şekil 3.7'de ise Klaudin 1 geni kontrol grubunda 2,2 kat daha yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmektedir. Epitelyal özelliklerin oluşmasına sebep olan bu üç gen doksorobisine dirençli hücre grubunda duyarlı gruba göre daha fazla eksprese olmuştur. MCF-7/Dox hücrelerin epitelyal özelliklerinin azalması ya da kaybolması bu genlerin ekspresyon seviyelerinin düşmesi ile orantılı olduğu şeklinde yorumlanabilir

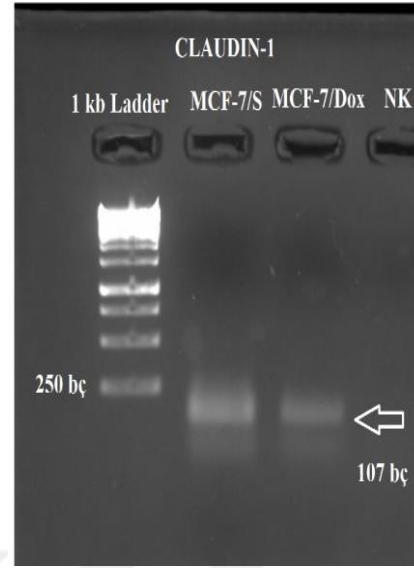
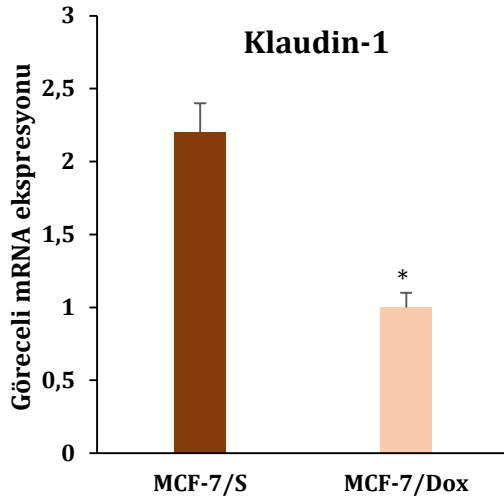
,okludin, klaudin-1 genlerinin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Ancak, MCF-7/Dox hücrelerinde N-kaderin, twist ve vimentin mRNA ekspresyon düzeylerinde MCF-7/S hücrelerine kıyasla belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.



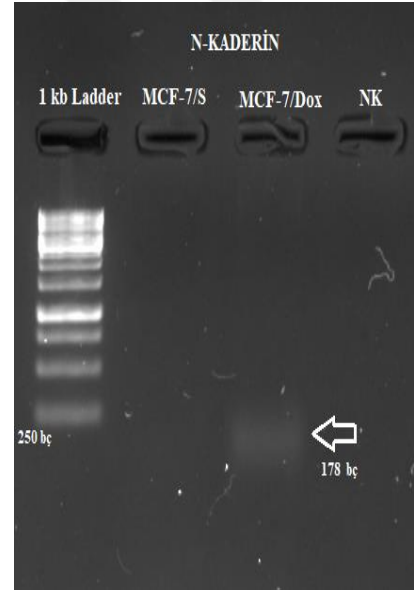
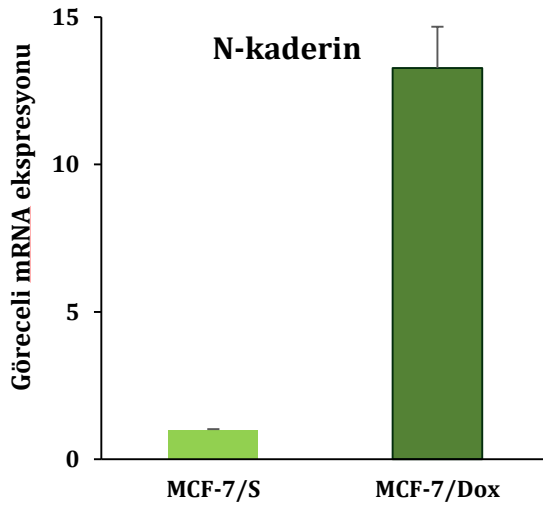
Şekil 3.5. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki E-kaderin karşılaştırılması (sol) E-kaderin'nin mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi



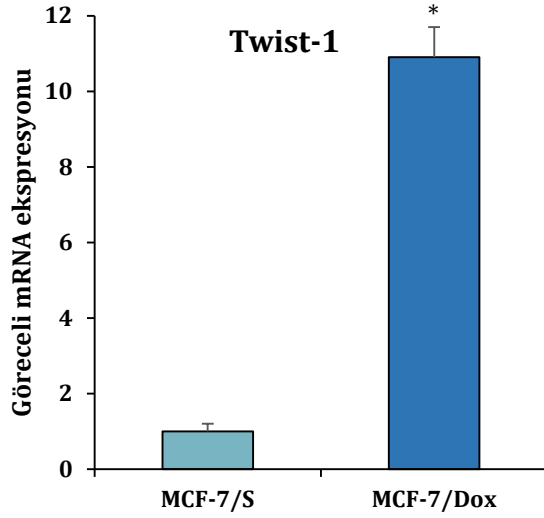
Şekil 3.6. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Occludin karşılaştırılması. (sol) Occludin'nin mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi



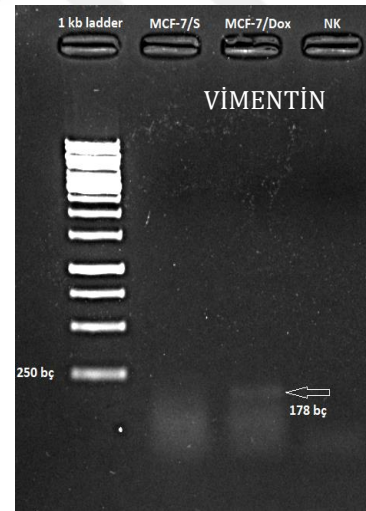
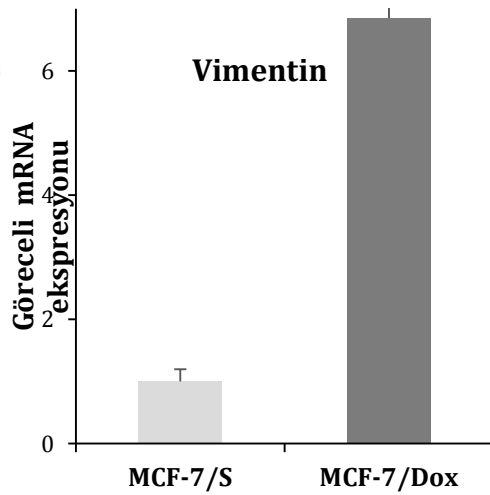
Şekil 3.7. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Klaudin-1 karşılaştırılması. (sol) Klaudin-1'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ)RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi



Şekil 3.8. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki N-kaderin karşılaştırılması (sol) N-Kaderin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ)RT-PCR analizi. mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi



Şekil 3.9. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Twist-1 karşılaştırılması (sol) Twist-1'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi



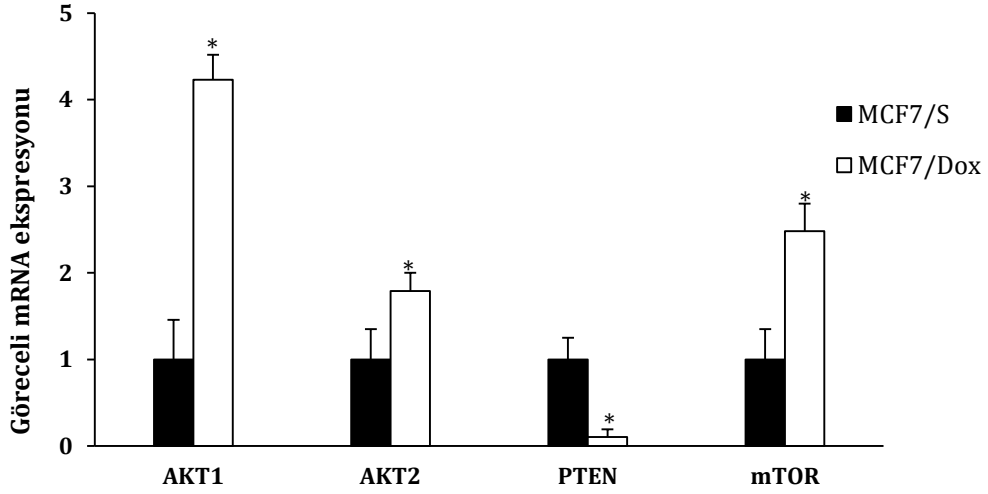
Şekil 3.10. MCF-7/S hücreleri ile MCF-7/Dox hücreleri arasındaki Vimentin karşılaştırılması (sol) Vimentin'in mRNA'sının qPCR analizi ve (sağ) RT-PCR analizi mRNA seviyeleri GAPDH'e göre normalize edildi

N-kaderin gen ekspresyonu MCF-7/Dox hücrelerde MCF-7/S hücrelere kıyasla anlamlı şekilde 13,7 kat daha yüksek tespit edildi (Şekil 3.8). Benzer şekilde Twist-1 gen ekspresyonunda MCF-7/S hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı 10,9 kat artış saptandı (Şekil 3.9). Son olarak, MCF-7/Dox hücrelerde Vimentin geninin 6,85 kat daha fazla eksprese olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, gen düzeyinde bu üç genin upregüle olması hücrelerin mezenkimal forma dönüşebildiği şeklinde yorumlanabilir.

3.2. Doksorubisin Dirençli Hücrelerde PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyonunun Araştırılması

Literatürde fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) sinyalizasyonu, çok sayıda meme kanserinde hücrelerin hayatta kalma sinyal yollarını aktive ederek tümör mikroçevresindeki kemoterapi ilaçlarına (Doksorubisin gibi) direnç oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Dong vd., 2021; Miricescu vd., 2020; Christowitz, Davis, Isaacs, Van Niekerk, vd., 2019). Bundan yola çıkarak doksorubisin direnci geliştirilen MCF-7 hücrelerinde bu sinyalizasyonun nasıl regüle olduğunu tespit etmek için sinyalizasyonda görev alan AKT1, AKT2, PTEN, mTOR genlerinin ekspresyon değişimleri qPCR yöntemi ile analiz edildi. qPCR sonucu elde edilen bu genlerin ekspresyon değişimleri MCF-7/S duyarlı hücrelerle kıyaslandığında Şekil 3.11'deki şekilde gözlemlendi.

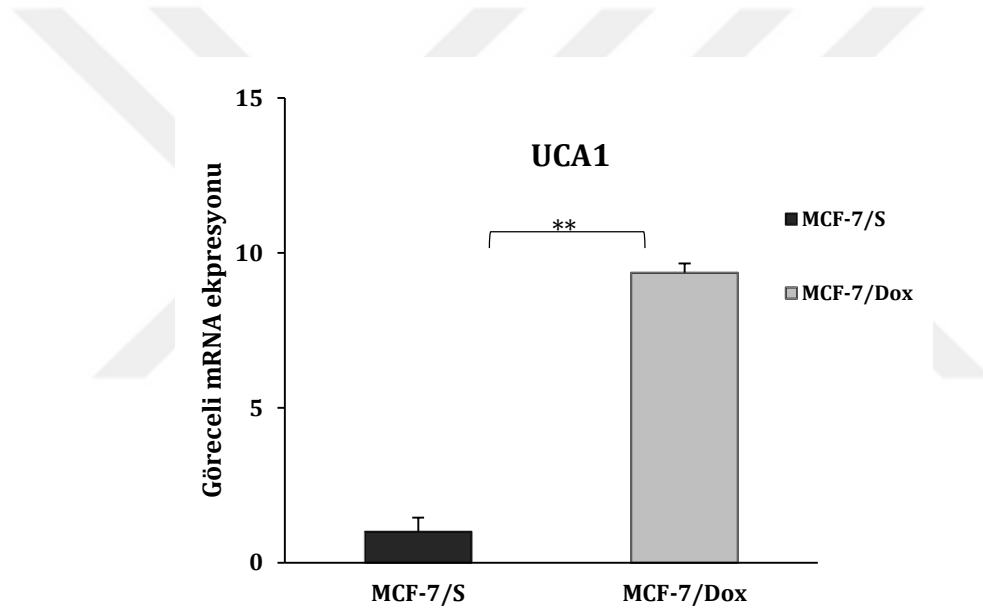


Şekil 3.11. MCF/S ve MCF7/Dox hücrelerde AKT1, AKT2, PTEN ve mTOR genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri *p < 0,05

MCF7/Dox hücrelerinde AKT1, AKT2, mTOR genlerinin mRNA düzeyleri MCF7/S hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı olarak sırasıyla 4,2, 1,8 ve 2,5 kat daha fazla eksprese olduğu görülmektedir. PTEN geninin mRNA düzeyinde ise MCF7/Dox hücrelerde MCF/S hücelere göre 10 kat daha az eksprese olduğu saptandı (Şekil 3.11). Doksorubisin direnci gelişmiş hücrelerde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının daha fazla çalıştığı şeklinde bir sonuca varılabilir.

3.3. Doksorubisin Dirençli Hücrelerde lncRNA UCA1'in Transkript Düzeylerinin Araştırılması

Doksorubisin direnci geliştirilen hücrelerde PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunun kontrol grubu hücelere kıyasla daha fazla aktive olduğu gösterildikten sonra lncRNA UCA1'in bu hücre gruplarında ekspresyon değişikliğini saptamak qPCR gerçekleştirildi. İstatiksel olarak MCF7/S ve MCF-7/Dox hücre grubu arasında UCA1 mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edildi. Şekil 3.12'deki grafikte MCF-7/Dox ve MCF-7/S hücrelerde UCA1 geninin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri gösterildi. qPCR test sonucuna göre, MCF7/Dox hücrelerinde kontrol hücre grubuna göre, UCA1 geninin mRNA düzeyinde yaklaşık 9,5 kat ($p<0.01$) daha fazla regüle olduğu tespit edildi.



Şekil 3.12. qPCR ile saptanan MCF7/S ve MCF7/Dox hücrelerde UCA1'in ekspresyon seviyeleri ($p<0.01$)

Sonuç olarak MCF-7/Dox hücrelerinde AKT1, AKT2, ve mTOR genlerinin ekspresyonlarında 1,8-4,2 kat arasında anlamlı olarak artış saptanırken UCA1'in 9,5 kat artması doksorubisin direnç mekanizmasında daha fazla indüklenebilen bir gen olduğunu diğer genlerinin regülasyonunun daha bazal seviyede değiştiği yorumu yapılabilir. Ayrıca, lncRNA UCA1'in direnç mekanizmasında markör olmaya potansiyel bir aday olabilir.

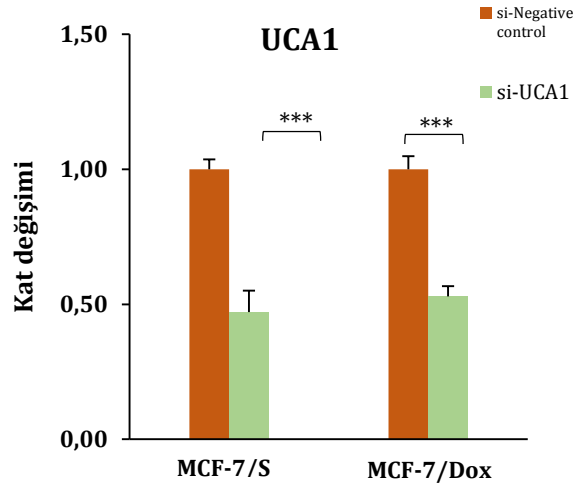
3.4. siRNA Teknolojisi ile lncRNA UCA1'in Susturulması

Tez çalışmasında önceden yapılan deneylerde doksorubisin direnci geliştirilen hücrelerde UCA1'in ekspresyonu ve PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu regülasyonu analiz edilmiştir. Bu kısımda ise UCA 1'in regülasyonundaki değişimin MCF-7/Dox hücrelerin doksorubisine olan

duyarlılığında bir değişime sebep olup olmaması incelenecektir. Bu amaçla UCA1 ekspresyonu yüksek olan MCF-7/Dox hücrelerinde siRNA teknolojisi ile baskınlanmıştır. Bu doğrultuda, UCA1 ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu MCF-7/Dox hücrelerinde, siRNA teknolojisi kullanılarak UCA1 gen ekspresyonu susturulmuştur. Bu çalışma ile UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki düzenleyici etkisinin ve bu iki molekül arasındaki karşılıklı ilişkinin detaylı bir şekilde incelenmesi hedeflenmiştir.

3.4.1. UCA1'in susturulması ile mRNA seviyesinin qPCR ile analizi

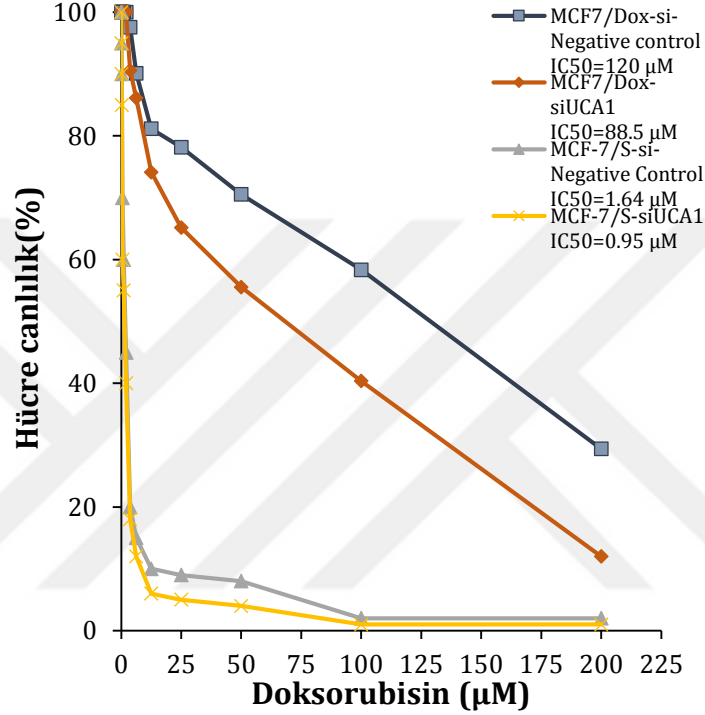
MCF-7/Dox ve MCF-7/S hücre hatlarında ticari olarak satın alınan ve lncRNA'lar için geliştirilmiş, UCA1'i hedefleyen UCA1 siRNA (Ambion, The RNA Company, USA) kullanılmıştır. Ticari olarak alınan Negatif Silencer Select siRNA kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı protokollerle hazırlanan (siRNA ve lipofektamin protokolleri) ile ve farklı sayıda plakadaki kuyulara hücre ekilmesi (20 000 ve 30 00 hücre/well) sonucu en iyi susturmanın gerçekleştiği ve hücrelerde en az toksik etki ve ölüme sebep olan anlamlı şekilde UCA1 susturulduğu deney 10 pmol ve 30.000/kuyu ile gerçekleştirilen olmuştur. Bu deney sonucunda 10 pmol siUCA1'in kullanılması ile anlamlı olarak UCA1 ekspresyonunun MCF-7/S hücrelerde 0,47 kat, MCF-7/Dox hücrelerde 0,53 kat ekprese olduğu qPCR ile analizi gösterilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. 10 pmol siUCA1 ile transfeksiyon sonrası MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinde UCA1'in ekspresyon seviyesinin qPCR ile gösterimi ($p < 0.001$).

3.4.2. UCA1 susturulmasının hücre canlılığına etkisi

UCA1'in susturulmasının ilaç dirençliliğini nasıl etkilediğini araştırmak için transfeksiyondan 48 saat sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı tespisi gerçekleştirildi.

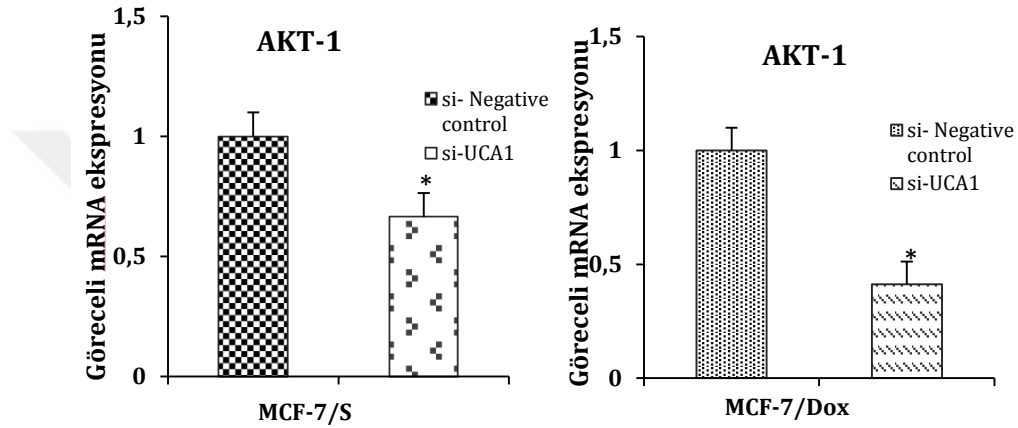


Şekil 3.14. UCA1'in susturulmasının hücre canlılık üzerine etkisi % Canlılık grafiği

MCF-7/S hücrelerinin kontrol grubunda (Negatif Kontrol siRNA) IC₅₀ değeri 1,64 µM tespit edilirken, bu değer MCF-7/S-siUCA1 hücrelerde 0,95 µM olarak saptanmıştır. MCF7-/S-siUCA1 hücrelerinde IC₅₀ değerinin MCF-7/S-si-negatif kontrol grubuna göre yaklaşık %43 azaldığı belirlenmiştir. MCF7/Dox hücrelerinin kontrol grubunda (Negatif Kontrol siRNA) IC₅₀ değeri 120 µM tespit edilirken, bu değer MCF-7/Dox-siUCA1 hücrelerde 88,5 µM'a düşmüştür. MCF7/Dox-siUCA1 hücrelerinde IC₅₀ değerinin MCF-7/Dox-si-negatif kontrol grubuna göre ise %26 azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, UCA1'in fonksiyonunu kaybetmesi hücre proliferasyonunu düşürdüğü yorumu yapılabilir.

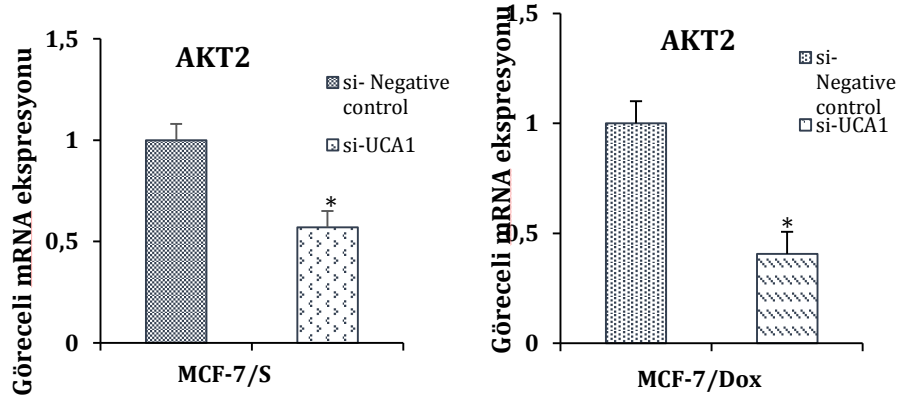
3.4.3. UCA1 susturulması sonrası AKT1, AKT2, PTEN ve mTOR genlerinin hücre düzeyinde ekspresyon analizi

MCF-7/Dox hücrelerinde siRNA teknolojisi ile UCA1 baskılanmış ve baskılanmamış hücre grupları ve kontrol olarak MCF-7 hücre grubunda UCA1'in susturulması sonrası, hücre düzeyinde AKT1, AKT2, PTEN ve mTOR genlerinin ekspresyonlarının değişimleri qPCR yöntemi ile karşılaştırılmıştır.



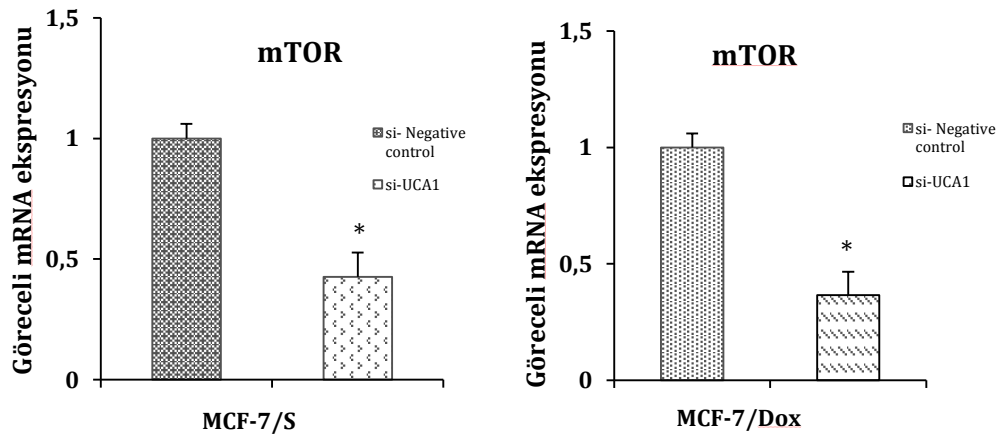
Şekil 3.15. Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu AKT1 gen ekspresyon değişimleri (AKT1 geni GAPDH genine göre normalize edildi) (* $p < 0.05$)

UCA1'in susturulması sonucunda AKT1 gen ekspresyonunun hem MCF-7/S hücrelerde (-0,66 kat) hem de MCF-7/Dox hücrelerde (-0,41 kat) anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 3.15).



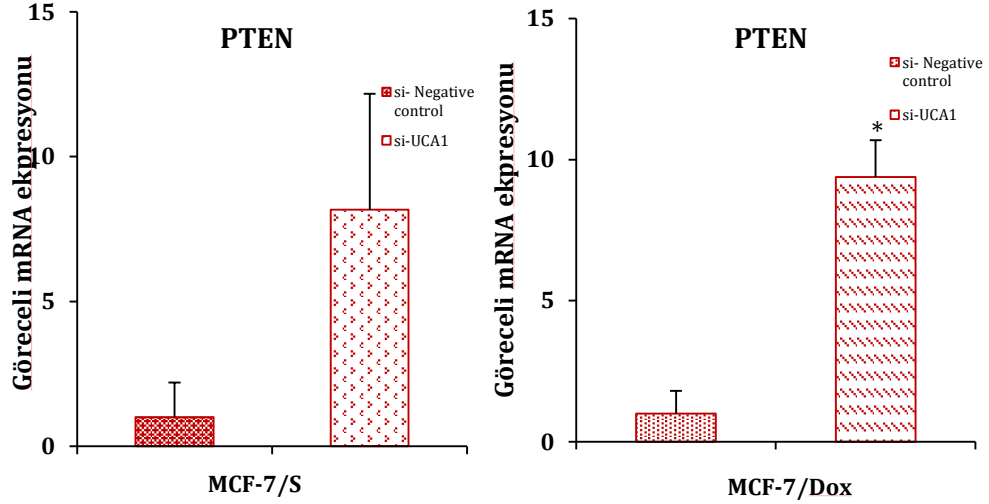
Şekil 3.16. Dokсорubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu AKT2 gen ekspresyon değışimleri (AKT2 geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05)

Benzer şekilde, UCA1'in susturulması sonucunda AKT2 gen ekspresyonunun hem MCF-7/S hücrelerde (-0,57 kat) hem de MCF-7/Dox hücrelerde (-0,40 kat) anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.17. Dokсорubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu mTOR gen ekspresyon değışimleri (mTOR geni GAPDH genine göre normalize edildi) (*p<0.05)

AKT1 ve AKT2 gen ekspresyonlarındakine benzer şekilde, UCA1'in susturulması sonucunda mTOR gen ekspresyonunun hem MCF-7/S hücrelerde (-0,42 kat) hem de MCF-7/Dox hücrelerde (-0,36 kat) anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.18. Doksorubisine duyarlı ve dirençli, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in susturulması sonucu PTEN gen ekspresyon değişimleri (PTEN geni GAPDH genine göre normalize edildi) (* $p < 0.05$)

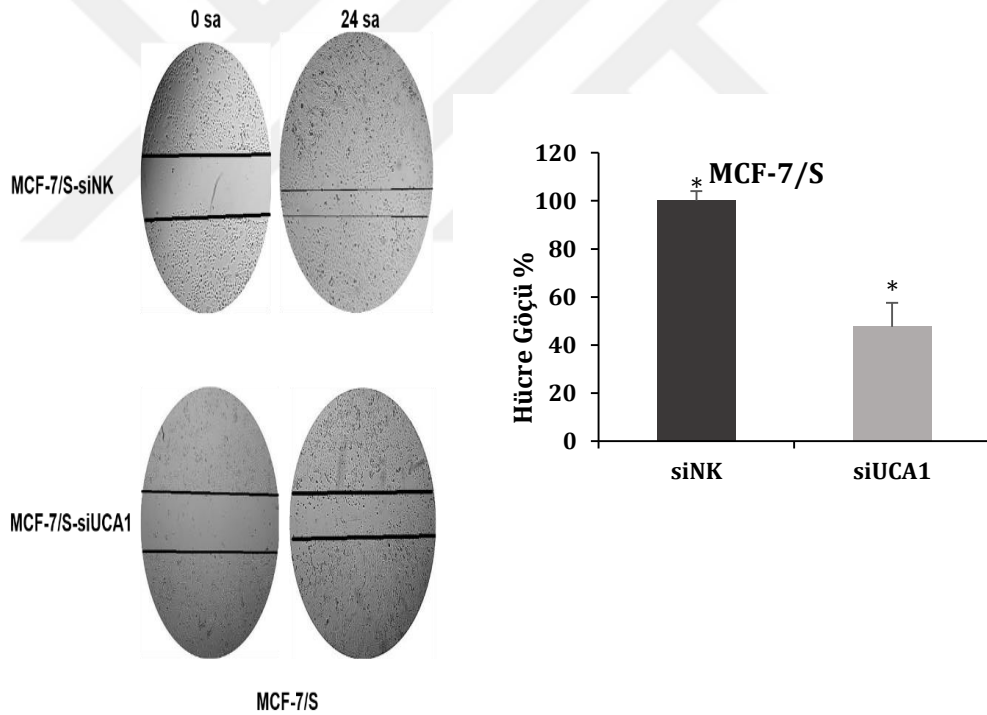
UCA1'in susturulması sonucunda PTEN geninin ekspresyonunun anlamlı olarak MCF-7/Dox hücrelerde (+9,38 kat) arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). MCF-7/S hücrelerdeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Sonuç olarak, UCA1'in susturulması ile birlikte her iki hücre grubunda da genlerin regülasyonu kontrol gruplarına göre tersine dönmüştür. Bir diğer ifade ile siUCA1 transfekte hücrelerde kontrol grubuna göre AKT1, AKT2 ve mTOR mRNA ekspresyon seviyeleri azalırken, tam tersi PTEN geninin ekspresyon seviyesi artmıştır (Şekil 15-18). Sonuç olarak UCA1'in susturulması bu sinyalizasyonda görevli AKT1, AKT2, mTOR, PTEN moleküllerini mRNA seviyelerini module sonucuna varılabilir.

3.5. UCA1'in Motilite Üzerine Etkisi

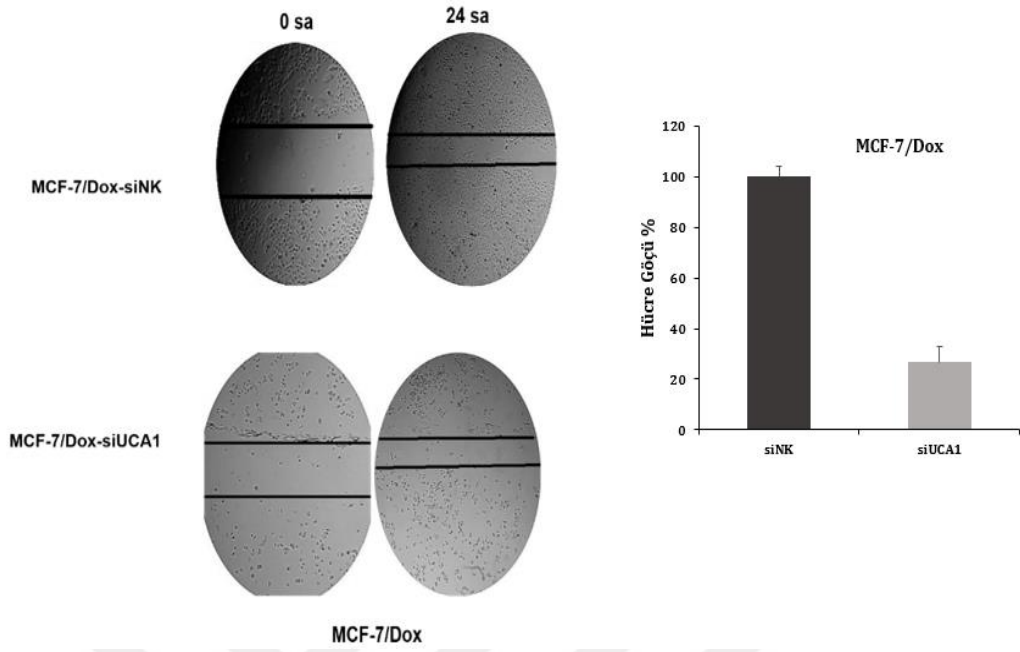
UCA1'in motilite üzerine etkisini incelemek MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücre hatlarında siUCA1 transfeksiyonunun ardından yara iyileşme (Wound Healing Assay, WHA) deneyleri yapılmıştır. 24 saat sonunda siUCA1 ile transfekte edilen hücrelerde negatif kontrol siRNA'ya kıyasla boş alan varlığı gözlenmiş ve yara yüzeyine göç eden hücrelerin trinoküler ters mikroskop altında

fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Çizik oluşturulan ve hücrelerin göç etmesi sonucu oluşan alanlar Image J programı kullanılarak çizilerek bu alan değerleri excel dosyasına kaydedildi. Hücrelerde 0. saatte çizik atılarak oluşturulan alandan 24. saatin sonunda hücrelerin göç etmesi sonucu kalan alan çıkarıldı. Sonuç olarak arada kalan boş alan hesaplandı. Negatif siRNA uygulamasında hücre göçü sonrasında kalan bu alan %100 kabul edilerek normalizasyonu gerçekleştirildi ve si-UCA1 uygulamasında hücrelerin göreceli göçü % olarak ifade edildi. Bu yüzde ifadeler çubuk grafikleri oluşturularak gösterildi. Yara iyileşme deneyleri her iki hücre hattında da UCA1'in hücre hareketliliğini engellediğini göstermektedir (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20).

MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerde, siNK grubu ile karşılaştırıldığında UCA1'in siRNA ile inhibisyonu hücre göçünü kontrol gruplarına kıyasla yavaşlattığı görülmektedir. Hücre göçü analizinde, si-UCA1 grubundaki göreceli göç oranının MCF-7/S hücrelerinde anlamlı olarak %47.67 azaldığı (Şekil 3.19) ve MCF-7/Dox hücrelerde %26.77 azaldığı (Şekil 3.20) saptandı.



Şekil 3.19. MCF-7/S hücrelerde siUCA1'in transfeksiyonunun hücre göçü üzerine etkisi



Şekil 3.20. MCF-7/Dox hücrelerde siUCA1'in transfeksiyonunun hücre göçü üzerine etkisi

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

Meme kanserinde doksorubisin direnci önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir (X. Pan vd., 2021). Son araştırmalar, P-glikoprotein (P-GP) ekspresyonundaki artışın (Billington vd., 2018), hücre sinyal yollarındaki değişimlerin, EMD'nin, mikroRNA ile uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) farklı ekspresyonlarının, meme kanseri hücrelerinde doksorubisin direncine yol açtığını göstermiştir (Mirzaei vd., 2021; Zheng vd., 2020; Perez-Añorve vd., 2019). Doksorubisin veya diğer antrasiklinlere karşı tümör hücrelerinin direncini tersine çevirmeyi amaçlayan birçok çalışma, uzun süreli maruziyetle geliştirilen dirençli hücre hatları kullanmıştır. Örneğin, Kars vd. (2006), MCF-7 meme kanseri hücrelerini bir yıldan fazla süre boyunca doksorubisine maruz bırakmışlardır. Bu çalışmaya benzer şekilde, çalışmamızda, doksorubisin dirençli hücre hattı uzun dönem (yaklaşık 1 yıl) hücrelerin doksorubisin ile kültüre edilmesi sonucu elde edilmiştir. Çalışmamızda doksorubisin direncinin geliştiği doğrulamak için hücrelerin morfolojisi, MRP1 gen ekspresyonu, doksorubisine karşı hücre canlılık testi ve literatürde dox-ilişkili olduğu bilinen PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunun aktivasyonu qPCR ile incelenmiş ve tüm bu veriler sonucunda hücrelerde doksorubisin direnci geliştiği doğrulanmıştır.

Hücre morfolojisi, hücrenin fenotipik özelliklerini ve biyolojik süreçlerini yansıtan önemli bir göstergedir. Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanlara gelişen direnç, in vitro hücre kültürü ortamında hücre hatlarında geleneksel biyomarkörlerde ayırt etmek güç olabilmektedir. İlk olarak hücrelerin nükleer morfolojilerindeki anormallikler dikkat çekici bir şekilde öne çıkar ve bu anormallikler, nükleer boyut ve şekil değişkenlikleri gibi patolojik özellikler, çeşitli kanser türlerinin klinik teşhisinde kritik bir rol oynar. Özellikle, çok loblu ya da çok çekirdekli yapılar gibi ileri derecede anormal nükleer morfoloji türleri, metastaz oluşumu ve hastalığın tekrar nüks etmesiyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu tür hücre morfolojik özelliklerin analizi, kemoterapi sonrası hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan biyolojik mekanizmaların ve direnç geliştiren hücrelerin evrimsel süreçlerinin daha iyi anlaşılmasında temel bir öneme sahiptir (C.-J. Kim vd., 2023).

Morfolojik analizler, protein işaretçilerinden bağımsız olarak direnç özelliklerini incelemek için alternatif bir yaklaşım sunmakta olup, dirençli ve hassas hücrelerin ayrılmasında yardımcı olmaktadır. Kanserli hücrede farklı morfolojilerin gözlenmesi bu hücrelerin kemoterapi ilacına direnç geliştirirken genellikle mitoz ve/veya sitokinez süreçlerini atlaması, G2/M hücre döngüsü kontrol noktasını devre dışı bırakmasından olabilmektedir. Bu mekanizma, hücre içeriklerin artmasına neden olmakta; bu artış, özellikle çekirdek boyutunda ve genomik materyal miktarında belirgin hale gelmektedir (Mirzayans vd., 2018). Sonuç olarak ilaç dirençli kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biri, yalnızca yüzeysel bir değişiklik değil, aynı zamanda altında yatan biyokimyasal ve genetik adaptasyonları yansıtan belirgin morfoloji değişiklikleri olduğu düşünülebilir. Başka bir çalışmada, doksorubisin dirençli

MCF7/D320 hücre hattı oluşturulmuştur. Hücrelerin sitoplazmalarında çoklu çekirdeklerin varlığı gözlenmiştir; bu gözlem, çoğunlukla, sürekli doksorubisin stresi altında hücreler arasındaki artan hücresel füzyona bağlanmıştır. Ek olarak, dirençli hücrelerin sitoplazmasında çok sayıda büyük veziküllerde tespit edilmiştir (AbuHammad & Zihlif, 2013). MCF-7 hücrelerini 0.5 µg/ml doksorubisin içeren ortamla bir hafta süreyle kültüre ettiklerinde hücrelerin morfolojilerinin daha büyük hale gelerek lamellapodialar oluşturacak şekilde değiştiklerini saptanmıştır (Putri vd., 2011). MCF-7 hücrelerine doksorubisin direnci geliştirilen başka bir çalışmada benzer morfolojik değişiklikler görülmekle birlikte, hücrelerin epitelial formdan mezankimal forma dönüştükleri EMD markörleri (BMI1, SLUG, SNAIL, E-KADERİN, SOX9, EZH2) ile gen ekspresyonu düzeyinde tespit edilmiştir (Santos vd., 2018). Güncel olarak araştırması yapılmış cisplatin direnci geliştiren adenokarsinom PC3 hücre hattında, hücrelerin multinükleer morfolojilere sahip olduğunu raporlanmıştır (C.-J. Kim vd., 2023). Bu bulgular, ilaç direncinin hücre morfolojisi ve biyolojik süreçler üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, literatürdeki bulgulara benzer şekilde direnç geliştirdiğimiz hücrelerinde morfolojileri değişmiştir. İlk olarak çalışmamızda dirençli hücre hattının morfolojik incelemeleri gerçekleştirilmiştir. MCF-7/S hücrelerinin sık hücre-hücre adezyonları olan bir fenotipten doksorubisin uygulaması sonrasında (MCF-7/Dox) hücreler iğ benzeri bir görünüme dönüştüğü ve hücre uzantılarının oluştuğu gözlemlendi. Ayrıca sitoplazmalarında çoklu, nispeten büyük veziküller de gözlemlendi. Çalışmamızda oluşturulan MCF-/Dox hücrelerinin AbuHammad vd. (2013) ve Putri vd. (2011) çalışmalarında rapor edilen doksorubisin direnci geliştirmiş MCF-7 hücreleri ile benzer morfolojilere sahip olduğu söylenebilir.

İkinci aşamada MCF-7/Dox hücrelerde direnç geliştiğini moleküler olarak doğrulamak için MRP1 geninin regülasyonu transkript düzeyinde incelenmiştir. Çalışmamızda MRP1 mRNA gen ekspresyon seviyesi, MCF-7/Dox hücrelerinde MCF-/S hücrelerine kıyasla dört kat daha yüksek bulunmuştur. Literatürde, doksorubisin direncinin temel nedenlerinden biri de, çoklu ilaç direnci (MDR) olarak bilinen fenomendir. MDR genellikle hücre zarında bulunan dışa akış pompa proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu pompa proteinleri arasında P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein-1 (MRP1) ve meme kanseri direnci proteini (BCRP) yer alır. Doksorubisin, bu dışa akış taşıyıcılarının hem substratı hem de indükleyicisi olarak bilinir ve bu taşıyıcıların artmış ekspresyonu, doksorubisin hücre içi birikimini engelleyerek tedaviye karşı direnç oluşumuna katkıda bulunur (Choi, 2005; Wind & Holen, 2011). Bu mekanizma, doksorubisin gibi kemoterapötik ajanların etkinliğini azaltan temel etmenlerden biri olarak öne çıkmaktadır. İlaç direnciyle ilişkili genlerden P-GP ve MRP1'in protein seviyeleri, MCF-7 hücreleriyle karşılaştırıldığında MCF-7/ADR hücrelerinde belirgin şekilde farklı ifade edildiğini ve bu proteinlerin hücre içi ekspresyonlarının arttığını ortaya koymuştur (N.-N. Chen vd., 2023).

İlaçlara özgü MDR (çoklu ilaç direnci) mekanizmalarını araştırıldığında, MCF-7/Adr hücre hatlarında, MCF-7/S'ye kıyasla, MRP1'in yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (W.-J. Li vd., 2013). Başka bir literatür çalışmasında meme hücre hatlarında doksorubisin, MRP1 ekspresyonunu

ve fonksiyonunu indüklediği tespit edilmiştir (B. Kim vd., 2015). Başka bir MCF-7 doksorubisin dirençli hücre hattı oluşturma sürecinin yapıldığı çalışmada, doksorubisin dozunun artırılması, miR-145 seviyesinin belirgin bir şekilde azalmasına ve MRP1 seviyesinin artmasına yol açmıştır (M. Gao vd., 2016). Bunlara ilaveten, MCF-7 hücre hatlarına doksorubisin (2,5 µM)'i 2 gün arayla 12 gün boyunca uygulandığı bir çalışmada, hücrelerde MRP1, MRP-2-3-6,7 protein seviyeleri araştırılmıştır. MRP 2, 3, 6, 7 ilaç öncesine göre ilaç sonrasında artma gözlenirken, ilaç öncesi ve sonrasında MDR, MRP1 protein ekspresyon seviyesinde bir artış saptanmamıştır. Bu çalışma, çalışmamızdaki sonuçlardan farklıdır. Benzer bir başka çalışmada doksorubisin dirençli MCF-7 hücreler, MCF-7 hücreleriyle karşılaştırıldığında MDR1 mRNA'sını veya onun ürünü olan P-glikoproteini ekprese ederken MRP1'i aşırı ekprese etmediği saptanmıştır (Kaya Koçdoğan vd., 2020). Bir çalışmada, doksorubisini nanokürelere yüklemişler (NS-Dox) P-glikoprotein ve MRP1 ekspresyon seviyesini yabanıl MCF-7, MCF-7/Dox ve NS-DOX-MCF-7 hücrelerde analiz etmişlerdir. Bu analiz sonucunda, MRP1'in dox dirençli MCF-7'lerde kontrol hücrelerdekine kıyasla iki kattan fazla ekprese olduğu saptanmıştır (Aouali vd., 2003). Başka bir kemoterapi ilacı olan doksotakselve doksorubisin MCF-7 hücre hatlarına uygulanmış ve direnç kazandırılmış, sonrasında ilaç direnci mekanizmasını ile ilgili çalışmaları bildirilmiştir. Bu çalışmada, dirençli hücre hatlarının belirli ABC taşıyıcı proteinlerini daha yüksek düzeyde ekprese ettiği rapor edilmiştir. ABCB1'in (Pgp) ekspresyon seviyesi yalnızca hücrelerinde çok yüksekken, ABCC1'in (MRP1) ekspresyon seviyesi yalnızca MCF-7/DOX hücrelerinde çok yüksek olduğu saptanmıştır (H. Wang vd., 2014). Literatürdeki bu bulgular ile kıyaslandığında, çalışmamızda MRP1 transkript seviyesinin MCF-7/Dox hücrelerde anlamlı olarak 4 kat daha çok ekprese olduğu bulgusu bir şekilde hücrelerin ilaca direnç geliştirebildiği ve ilacın hücre dışına salınımı için bu geni aktive ettiği yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda doksorubisin direncinin geliştirildiğini doğrulamak için yapılan sitotoksikite deneylerinde, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerin doksorubisin ilacına karşı direnç derecesini belirlemek için direnç indeksi (R), dirençli hücrelerin IC₅₀ değerlerinin ilgili ana hücrelerin IC₅₀ değerlerine bölünmesiyle hesaplanmıştır. Direnç indeksi, Kars vd., (2006) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. MCF-7/Dox ve MCF-7/S hücreleri için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri sırasıyla 128,5 µM ve 1,65 µM olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, MCF-7/Dox hücrelerinin doksorubisine karşı yaklaşık 78 kat daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Literatürde direnç derecesi ile ilgili bu çalışmaya çok benzer doksorubisin direnci geliştirilmiş bir araştırmada, 1 µM'a kadar doksorubisin direnci geliştirdikleri MCF-7 hücrelerine 0,4-200 µM aralıklarında doksorubisin uygulaması sonrası yapılan hücre canlılık testlerinden XTT yöntemi sonucunda IC₅₀ değerini 183,11 ± 23,63 µM olarak saptanırken MCF-7/S hücrelerde IC₅₀ değeri 1,14 ± 0,38 µM saptanmıştır. Sonuç olarak, MCF-7/Dox hücrelerinde direnç indeksinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 160,6 kat doksorubisine daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Darcansoy İşeri, 2009). Güncel bir çalışmada, MCF-7/ADR hücre hattının ilaç direnci fenotipini koruyup korumadığını test etmek için, doksorubisinin artan

konsantrasyonları altında hücre canlılığı değerlendirdiklerinde, bu hücrelerin 48 saat boyunca artan doksorubisin dozlarına maruz bırakılması ile hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Miri vd., 2023). Ek olarak, MCF-7/WT hücre hattını, farklı direnç seviyeleri gösteren bir dizi MCF-7 hücre hattı oluşturmak için doksorubisin uygulaması yapılmıştır. Dirençli hücreler, başlangıçta 1 nM doksorubisin ile seçilmiştir. Hücreler bu doza tolerans geliştirdikten sonra ilaç konsantrasyonu iki katına çıkarılarak hücreler direnç kazanana kadar işlem tekrarlamışlardır. Bu tekrar eden uygulamalar sonucunda, 1 nM'den 1 µM'ye kadar artan direnç gücüne sahip 11 hücre hattı oluşturmuşlardır. MCF-7/ADR-n hücre hattının sitotoksitesisi MTT testi ile ölçülmüştür. Ana MCF-7 (MCF-7/WT) ve özgün doksorubisin dirençli MCF-7 (MCF-7/ADR) hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,1 µM ve 12,9 µM olarak bulunmuştur. MCF-7/1024'teki IC₅₀ değeri (10,3 µM), MCF-7/ADR'ye yakındır. Tüm MCF-7/ADR hücre hatlarının düşük direnç indeksine sahip olduğu gözlenmiştir (Tsou vd., 2015). Aynı yıl başka bir araştırmada MCF-7/ADR hücrelerin doksorubisin uygulaması sonrası IC₅₀ değeri 74 µM, MCF-7 hücrelerde bu değer 2 µM olarak saptanmıştır (M. Gao vd., 2016). Bir başka çalışmada, adriamisin (doksorubisin) dirençli hücrelerde IC₅₀ değeri saptanmaya çalışılmış, hücrelerin yaklaşık 50 ila 200 kat daha dirençli olduğu belirtilmiştir. MCF-7/ADR hücrelerde IC₅₀ 1,9 µM saptanırken, MCF-7/WT hücrelerde bu değer 0,012 µM olarak belirlenmiştir (Panasci vd., 1996). Literatürde bu bulgular çalışmamızda elde edilenlerle örtüşmektedir.

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMD), epitel kökenli hücrelerin epitel özelliklerini ve polaritesini kaybettiği ve hücrelerin bir bölgeden başka bir bölgeye göç edebilmek için mezenkimal bir fenotip kazandığı temel bir gelişim sürecidir (Thompson vd., 2005) . Şuana kadar yapılan çalışmalar kemorezistans ile kanserde epitel-mezenkimal geçişin (EMT) kazanılması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Mirzaei vd., 2021; Bastid, 2012; Rosanò vd., 2011). Vimentin gibi mezenkimal proteinlerin pozitif şekilde regülasyonu ile hücreler arası adezyon moleküllerinin, E-KADERİN ve OKLUDİN genlerinin negatif regülasyonu, kanser hücrelerinin motilitesinde, invazivliğinde ve metastaz yeteneklerinde artışa yol açan EMT'nin ilk belirleyicileridir (Sarrió vd., 2008). E-KADERİN'nin downregülasyon ile mezenkimal kaderin N-KADERİN upregülasyonu da "kaderin switch" olarak bilinen bir fenomen olan EMT'nin karakteristik özelliğidir (Loh vd., 2019). Literatürde, MCF-7/Dox hücrelerinde EMD sürecinde etkili genler değerlendirildiğinde; 15 genin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin EMD süreci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Dokuz genin pozitif yönde regüle (SNAI2 (36,56), N-KADERİN (5,15), VİMENTİN (99,99), CLDN1 (75,12), CLDN11 (39,45), EGFR (18,27), FGFR1 (6,04), SMAD3 (8,65) ve TGFRB2 (6,30); altı genin downregüle (ER (-71,94), E-KADERİN (-328,95) , OCLN (-5,08), CLDN3 (-225,23), CLDN4 (-29,33) ve CLDN7 (-34,01)) olduğu rapor edilmiştir (Darcansoy İşeri, 2009). Tez çalışmasında ise, MCF-7/S ve MCF-7/Dox hücrelerinde EMD sürecini ve regülasyonunda E-KADERİN (-6,82), OKLUDİN (-1,9), KLAUDİN-1(-2,2), N-KADERİN (+13,7), TWİST-1(10,9), ve VİMENTİN (+6,85) genlerinin regüle olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bulgularımız, literatürdeki çalışma bulguları ile

benzer doğrultuda meme kanserinde DOX direncinin EMD ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Doksorubisin direnci mekanizmalarından bir tanesi Dox tarafından indüklenen apoptozun baskılanmasına yol açan hücrel sinyal yollarındaki bozulmalar olarak bilinmektedir. PI3K/AKT sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu ve tümör progresyonunun düzenlenmesinde hayati öneme sahip bir yoldur. Ayrıca bu yolak pek çok insan malignitesinde artış gösteren ve çoklu ilaç direnci (MDR) mekanizmalarında kritik bir rol oynadığı belirlenen önemli bir sinyal yoludur. Bu yol, yukarı ve aşağı akış hedefleriyle etkileşimde bulunarak kanserin progresyonunu desteklemekte ve BCRP, MRP1 ve P-gp gibi ABC taşıyıcılarının ekspresyonunu artırarak kemoterapi tedavilerine karşı direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır (Tazzari vd., 2007). Bu yolağın doksorubisin ile ilişkili olabileceğini rapor eden bir çalışmada p-AKT ve p-mTOR genlerinin MCF-7/Dox hücrelerinde sırasıyla yaklaşık 2,8 ve 1,5 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (J. Chen vd., 2018). Ek olarak, bir çok prelinik araştırma, PI3K/AKT/mTOR inhibitörlerinin meme kanserinde kemoterapi direncini tersine çevirmede önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bir çalışmada, PI3K inhibitörü wortmannin, MCF-7/ADR (ADR: Adriamisin direnci) hücre hattında hücre proliferasyonunu ve doksorubisine karşı oluşan direnci neredeyse tamamen baskıladığı tespit edilmiştir (Tsou vd., 2015). Benzer şekilde, yapılan bir başka çalışmada, econazole aracılığıyla PI3K inhibisyonunun hem in vitro hem de in vivo ortamda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerini adriamisine karşı daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Dong vd., 2019). Bununla birlikte, pan-PI3K inhibitörü BKM120'nin hem duyarlı hem de çoklu ilaç direnci (MDR) sergileyen meme kanseri hücrelerinde PI3K/AKT/NF- κ B sinyal yolunu baskılayarak güçlü bir antitümör etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, BKM120'nin doksorubisin ile kombinasyonu sinerjistik bir antikanser etki sağlamıştır. Benzer şekilde, doksorubisin ile pan-PI3K inhibitörü buparlisib kombinasyonunun da belirgin bir sinerjistik antiproliferatif etki ortaya koyduğu rapor edilmiştir (Y. Hu vd., 2015). Ek olarak, 3-metiladenin (3-MA)'in PI3K/AKT/mTOR yolunu inhibe ederek ve ilaç dışı akış taşıyıcılarını baskılayarak MDR'yi tersine çevirdiği belirtilmiştir (Zou vd., 2014). Sonuç olarak, kemoterapötik tedavilerde kullanılan doksorubisin, bu sinyalizasyonu da dolaylı olarak daha fazla aktive etmektedir ve direnç gelişimine sebep olmaktadır. Çalışmamızda, MCF7/Dox hücrelerinde AKT1, AKT2, mTOR genlerinin mRNA düzeyleri MCF7/S hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı sırasıyla 4,2, 1,8 ve 2,5 kat daha fazla eksprese olduğu görülmektedir. PTEN geninin mRNA düzeyinde ise MCF7/Dox hücrelerde MCF/S hücrelere göre 10 kat daha az eksprese olduğu bulunmuştur. Direnç gelişiminde bu yolağın çalışmasının bozulduğu, daha fazla aktive olduğu yorumu yapılabilir.

Literatürde, UCA1'in doksorubisine direnç geliştirmiş MCF-7 hücrelerinde ilaç direncini azaltmada rol oynayabilecek bir molekül olduğu düşünüldüğü için tez kapsamında öncelikli olarak MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in transkript düzeyinde regülasyonunda bir değişim olup olmadığına qPCR ile bakılmıştır. MCF7/Dox hücrelerinde kontrol hücre grubuna göre, UCA1 geninin mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede 9,5 kat daha fazla regüle olduğu

tespit edilmiştir. Literatürde, paklitaksel ve tamoksifen gibi ilaçlara dirençli meme kanseri hücre hatlarında UCA1'in upregüle olduğu gösterilse (C. Liu vd., 2020; H. Wang vd., 2014), doksorubisin dirençli meme kanseri hücre hatlarında UCA1'in regülasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Wo vd., 2022). Tamoksifene duyarlı MCF-7 ve T47D (kontrol) ve tamoksifene dirençli LCC2 ve LCC9 hücrelerde yapılan bir çalışmada UCA1 ekspresyonunun kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu analizi sonucunda yaklaşık 30 kat arttığını rapor edilmiştir (Z. Li, Yu, vd., 2019b). Başka bir çalışmada, tamoksifen dirençli MCF-7 ve T47D hücrelerde UCA1 mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol hücrelere kıyasla sırasıyla yaklaşık 4 kat ve 6 kat daha yüksek olduğu gösterildi (H. Liu vd., 2016). Sonuç olarak, MCF-7/Dox hücrelerinde AKT1, AKT2, ve mTOR genlerinin ekspresyonlarında 1,8-4,2 kat arasında anlamlı olarak artış saptanırken UCA1'in 9,5 kat artması doksorubisin direnç mekanizmasında daha fazla indüklenabilen bir gen olduğunu diğer genlerinin regülasyonunun daha bazal seviyede değiştiği yorumu yapılabilir. Bu sonuçlardan, lncRNA UCA1'in direnç mekanizmasında markör olmaya potansiyel bir aday molekül olabileceği düşünülebilir.

Tezde doksorubisin direncinin geliştirildiğine dair doğrulama çalışmaları yapıldıktan sonra ve UCA1'in dox dirençli hücrelerde upregüle olduğu tespit edildikten sonra, UCA1 gen susturması deneyleri gerçekleştirilmiştir. UCA1 genini susturmak üzere RNA interferansı (RNAi) teknolojisi kullanılmıştır. RNAi keşfedildiği günden bu yana herhangi bir hücre tipinde herhangi bir genin ekspresyonunu hızlı ve etkili bir şekilde susturma yeteneğine sahip güçlü bir araç olarak kabul edilmiştir. Bu devrim niteliğindeki yaklaşım, onkogenlerin hedeflenerek baskılanmasına olanak tanıyarak kanser tedavileri için önemli bir yol açmıştır. Küçük interferanslı RNA (small interfering RNA, siRNA) molekülü, bir mRNA molekülünün yıkımı yoluyla belirli bir proteinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu süreç genellikle siRNA oligosu ile mRNA'daki karşılık gelen dizilim arasında mükemmel bir eşleşme gerektirmektedir (Shen vd., 2013). Gen susturmada kullanılabilen bu teknikte, siRNA hücreye tanıtıldıktan sonra, gen susturulması başlatılmakta, bu süreç endojen RNAi makinesinin yönlendirdiği bir süreç olarak işlemektedir. İlk olarak lipozomlarla kapsüllenmiş siRNA'yı hücreye iletmek için ticari olarak mevcut olan farklı Lipofectamine RNAiMAX ve HiPerfect gibi bileşikler ile siRNA muamele edilmekte ve hücre içerisine alınmaktadır (Van Kuijk vd., 2022). Hücre içinde, çift sarmallı siRNA'lar RNAi yoluna dahil edilmektedir. Antisens zincirleri, karşılık gelen bu molekül, mRNA'ları tanımak için rehber olarak görev yapan RNA indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) yüklenmektedir. Hedef dizi tanımlandıktan sonra, RISC kompleksinin bir bileşeni olan AGO2 proteini, mRNA'yı keserek susturulan genin ürettiği protein seviyelerini düşürmektedir. SiRNA'ların geleneksel ilaç tedavilerine karşı en büyük avantajı, çok düşük toksisiteye sahip olmaları ve yüksek özgüllük sergilemeleridir (Ahmadzada vd., 2018).

Çalışmamızda hücre içerisine siRNA'nın alınmasında Lipofektamin 2000 bileşiği kullanılmıştır. Lipofektamine 2000, siRNA iletimi için yaygın olarak kullanılan bir reaktandır. Bu katyonik lipid, negatif yüklü siRNA iskeleti ile etkileşime girerek, oligonükleotid alımını artıran bir kompleks oluşturmaktadır (Meade & Dowdy, 2007). Ayrıca, nispeten verimli olması ve çeşitli

oligonükleotitlere geniş çapta uygulanabilir olması nedeniyle, Lipofectamine 2000 ile yapılan iletim, diğer yeni siRNA taşıyıcılarının etkinliğini karşılaştırmak için genellikle bir standart olarak kullanılmaktadır (Kumar vd., 2007). Gen susturma deneylerinde genin başarılı bir şekilde susturulduğunun değerlendirilmesi için yapılan mRNA analizlerinde literatürde farklı kat oranları kabul görmektedir. Ek olarak, NCBI GEO'da, gen susturma öncesi ve sonrası tam transkriptom analizi içeren örnekleri araştıran bir çalışmada dizi tabanlı ekspresyon verileri kullanarak hedef ve yan hedef genler için etkinliği değerlendirdiler. Toplamda 1,643 örnek, 429 deneyi temsil eden ve 207 çalışmada yayımlanan çalışma sonuçları analiz edildi. Hedef genin negatif regülasyonunun katlanmış değişimi (FC), deneylerin %18.5'inde 0,7'nin üzerinde ve %38.7'sinde 0,5'in üzerinde ve %42,8'inde 0,5'in altında tespit ettiler (Munkácsy vd., 2019). Mide kanseri hücre hatlarında UCA1'i susturduklarında kontrole göre 0,4 kat bu genin regüle olduğunu belirlemişlerdir. Akut miyeloid lösemi hücre hatlarında UCA1 susturulduğunda, kontrole kıyasla yaklaşık 0,5 kat UCA1'in eksprese olduğu saptandı (Shang vd., 2016). İki farklı yumurtalık kanser hücre hattında üç farklı UCA1 siRNA'sı kullanarak yaptıkları gen susturma çalışmalarında kontrole kıyasla UCA1 geninin ekspresyonu 0,2-0,7 kat arasında değiştiğini saptadılar (J. Wang vd., 2018). Bunlara ek olarak, retinablastoma hücrelerinde UCA1'in susturulduğu bir çalışmada, 9 kat kontrol gruba göre UCA1'in mRNA düzeyinde daha az regüle olduğu saptandı (N. Wang vd., 2022). Güncel başka bir çalışmada ise MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizilerinde UCA1'i susturduklarında gen ekspresyon seviyesinin kontrol gruba göre yaklaşık 4 kat az regüle olduğu gösterildi (X. Zhang vd., 2022). Wo vd., (2022) yaptıkları çalışmada meme kanseri hücre hatlarını TGF-beta ile muamele ettikten sonra hücrelere doksorubisin direnci kazandırılmış olup UCA1 geni susturulmuştur. Kontrol grubuna göre <0,5 kattan daha ekprese olduğu bildirilmiştir (Wo vd., 2022). Çalışmamızda kullandığımız gen susturma yöntemi ve bu yöntem sonucu elde edilen UCA1'in ekspresyonundaki azalma (MCF-7/S hücrelerde 0,47; MCF-7/Dox hücrelerde 0,53 kat daha az ekprese) ile ilgili bulguların literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Çalışmanın diğer kısmında UCA1'in susturulması sonucunda BC hücrelerini DOX'a karşı duyarlı hale getirmeye katkıda bulunabileceğini araştırmak için hücre canlılık testi (MTT) uygulanmıştır. MCF7/S hücrelerinin kontrol grubunda (Negatif Kontrol siRNA) IC₅₀ değeri 1,64 µM tespit edilirken, bu değer MCF-7/S-siUCA1 hücrelerde 0,95 µM olarak saptandı. MCF7/S-siUCA1 hücrelerinde IC₅₀ değerinin MCF-7/S-si-negatif kontrol grubuna göre yaklaşık %43 azaldığı saptandı. MCF7/Dox hücrelerinin kontrol grubunda (Negatif Kontrol siRNA) IC₅₀ değeri 120 µM tespit edilirken, bu değer MCF-7/Dox-siUCA1 hücrelerde 88,5 µM'a düştü. MCF7/Dox-siUCA1 hücrelerinde IC₅₀ değerinin MCF-7/Dox-si-negatif kontrol grubuna göre ise %26 azaldığı saptandı. Bu sonuçlara göre, UCA1'in fonksiyonunu kaybetmesi hücre canlılığını azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Bu bulgu ile benzer doğrultuda, UCA1'in meme kanseri hücrelerinde canlılığa etkisini araştıran başka bir çalışmada, UCA1 siRNA'sının MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doksorubisin uygulaması ile bu ilaca duyarlılığı arttırdığını, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği rapor edildi (Wo vd., 2022). Ek olarak, UCA1 susturmasının,

mide kanserinde SGC7901/ADR hücrelerinin Adriamisin duyarlılığını artırdığını bildirildi (Shang vd., 2016). Sonuç olarak, literatürdeki sonuçlarla benzer olarak, çalışmamızda UCA1'in doksorubisin dirençli MCF-7 hücrelerinde baskılanması, hücrelerin doksorubisine duyarlılığını artırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Güncel yayınlanan, meme kanseri hücre dizilerini (MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) 48 saat TGF- β ile hücrelerin indüklendiği çalışmada hücrelerin doksorubisin direnci kazandığı gösterildikten sonra, MCF-7/Dox hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla UCA1 mRNA ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış saptandı (Wo vd., 2022). Meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231, MDA-MB-468, ve MCF-7 hücrelerine 48 saat TGF- β (10 ng/mL) uygulandı. Bu hücrelerin doksorubisine yanıtının nasıl değiştiğini gözlemlemek için hücre canlılık testlerinden biri olan CCK-8 yöntemi uygulandı. MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 hücrelerinde Dox için ortalama yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri sırasıyla $1,66 \pm 0,12 \mu M$, $1,14 \pm 0,09 \mu M$ ve $0,28 \pm 0,03 \mu M$ olarak belirlendi. 48 saat TGF- β (10 ng/mL) uygulaması ardından MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 hücrelerinde Dox için IC_{50} değerleri sırasıyla $3,47 \pm 0,27 \mu M$, $1,92 \pm 0,11 \mu M$ ve $0,41 \pm 0,07 \mu M$ olarak saptandı. Bu çalışmada, 24 saat TGF- β (10 ng/mL) uygulanmış hücrelerde kontrol gruba kıyasla UCA1'in MDA-MB-231, MDA-MB-468 hücrelerinde anlamlı şekilde yaklaşık 2-2,5 kat ekspresyonunda artış olduğu qPCR yöntemi ile saptandı. Aynı grubun çalışmasında meme kanseri hücrelerine sadece 48 saat TGF- β 'nin uygulanması ile hücrelerin doksorubisine direnç geliştirdikleri rapor edilmiştir. Ek olarak, UCA1'in inhibisyonunun, meme kanseri hücrelerinin Dox'a duyarlılığını artırdığını in vitro deneylerde belirlendi. Sonuç olarak, TGF- β 'nin direnç üzerindeki etkisi, siUCA1 ile kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin doksorubisine dirençlerini ortadan kaldırdığını in vitro deneylerle rapor edildi. TGF- β uygulaması ile indüklenen VİMENTİN ve E-KADERİN seviyesindeki değişikliklerin, siUCA1 ile susturma işlemi sonunda kaybolduğu saptandı. Sonuç olarak TGF- β ile meme kanseri hücre hatlarında in vitro olarak doksorubisin direncini indüklediklerinde lncRNA UCA1'in doksorubisin direncinde ve epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) sürecinde etkili olabileceği bulgusunu ortaya konulmuştur. Bu sonuç, UCA1'in, EMD'yi düzenleyerek TGF- β -aracılı dirençte yer aldığı bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmadaki bulgular ilk bakışta tez kapsamında yapılan deneyler ile kısmen benzerlikler göstermektedir. Ancak tez çalışmasında kullandığım MCF-7 hücreleri uzun dönem (yaklaşık 1,5 yıl) ilaca maruz bırakıldıktan sonra doksorubisin direnci geliştirilmiştir. Bu durum, çalışmadan ayrılan en temel farktır.

Tezin özgünlüğünü ve hipotezin temelini oluşturan, UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu ilişkisini araştırmak üzere bu yolaktaki belirli moleküllerin nasıl düzenlendiği qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. UCA1'in susturulması ile birlikte her iki hücre grubunda da genlerin regülasyonu kontrol gruplarına göre tersine dönmüştür. Bir diğer ifade ile MCF7/S-siUCA1 ve MCF-7/Dox-siUCA1 hücrelerinde kontrol grubuna göre AKT1, AKT2 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır. Sinyal yolağında inhibitör olarak görev yapan PTEN geninin aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, UCA1'in

susturulmasının bu sinyalizasyon yolağını bir şekilde inaktive ettiği ve bu inaktivasyonunun PTEN molekülünün ekspresyon seviyesindeki ciddi bir artış göstermesi ile de olabileceği yorumu yapılabilir.

UCA1'in PI3K/AKT, Wnt/ β -katenin, MAPK, NF- κ B ve JAK/STAT sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı ve bu yolların, hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon, invazyon ve ilaç direnci gibi hücre biyolojik işlevlerin modülasyonunda önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, UCA1'in transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve epigenetik düzeylerde birden fazla hücre sinyal yolunun düzenlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Z. Liu vd., 2021). Doksorubisin dirençli meme kanseri hücreleri hariç bir çok kanserde ve hücre hatlarında, UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyon ilişkisini çalışan literatürde veriye ulaşılmıştır. UCA1'in, AKT sinyal yolunu aktive ederek pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hücrelerinde malign fenotiplerin gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (X. Liang vd., 2018). Bu süreç, hücre proliferasyonunun, invazyonunun, epitel-mezenkimal dönüşüm sürecinin tetiklenmesini, apoptozun inhibe edilmesini ve 5-FU direncinin artmasını kapsamaktadır (X. Liang vd., 2018). Başka bir kanser çalışması, mesane kanseri ve sistemik lupus eritematozus (SLE) durumlarında UCA1'in yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği ve PI3K/AKT sinyal yolunu aracılık ederek hücre proliferasyonunu artırdığı rapor etmiştir (C.-R. Jiang & Li, 2018; W. Wu vd., 2013). Makalede rapor edilen bilgilere göre, akut miyeloid lösemi (AML) hastalığında, UCA1'in miR-126 ile rekabet ederek PI3K/AKT yolunun inhibe ettiği ve bu mekanizmanın, RAS ile ilişkili C3 botulinus toksin substrat 1 (RAC1) ekspresyonunun baskılanmasına yol açtığı bildirilmiştir (M.-D. Sun vd., 2018). Prostat kanseri (PC) ve meme kanserinde (BC) yapılan araştırmalar, UCA1'in p27 ekspresyonunu inhibe ederek kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırdığını ortaya koymuştur (P. Chen vd., 2016; J. Huang vd., 2014). Ayrıca, UCA1'in mesane kanseri hücrelerinde PI3K-bağımlı yolak aracılığıyla cAMP yanıt elemanı bağlayıcı (CREB) protein seviyesini düşürdüğü ve hücre döngüsünü düzenlediği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise, UCA1'in brahma-ilişkili gen 1 (BRG1) proteininin p21 promotörüne bağlanmasını engellediği ve BRG1'in kromatin yeniden düzenleme aktivitesini bozarak mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir (X. Wang vd., 2014). Ayrıca, mesane kanseri hücrelerinde sisplatin ve gemsitabin direncinin, UCA1-CREB-miR-196a-5p yolları aracılığıyla regüle olduğu rapor edilmiştir (J. Pan vd., 2016).

UCA1'in, AKT/mTOR yolunu aktive ederek EGFR-mutant küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR-TKI'lara karşı kazanılmış direnç indükleyebildiğini bildirilmiştir (N. Cheng vd., 2015). UCA1, Wnt sinyalini Wnt6'ya bağımlı bir şekilde aktive ederek, mesane kanseri hücrelerinin kemorezistansının artmasına neden olduğu başka bir çalışmada rapor edilmiştir (Y. Fan vd., 2014b). UCA1'in overeksprese edildiği bir çalışmada, zeste homolog 2 (EZH2) ile bağlanması ve p21 ekspresyonunun inhibisyonu ile daha önceden duyarlı hücrelerin ilaç direnci geliştirmesini tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışma ekibi, UCA1'in PI3K / AKT sinyal yolunu da modüle ettiğini göstermiştir (Z. Li, Yu, vd., 2019b). Wu ve diğ. tamoksifen dirençli LCC2 ve

LCC9 hücrelerinde lncRNA UCA1'in susturulmasının, p-AKT ve p-mTOR'da anlamlı azalma ile birlikte tamoksifen tedavisi üzerine apoptozu arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmalarının devamında lncRNA UCA1'in tamoksifen duyarlı MCF7 hücrelerinde fazla ekspresyonu, tamoksifen kaynaklı apoptozu önemli ölçüde azalttığı ve bu etkinin mTOR'a özgü inhibitör rapamisin tarafından kaldırılabilceği gösterilmiştir (C. Wu & Luo, 2016). Bu sonuçlardan, lncRNA UCA1'in meme kanseri hücrelerinde tamoksifen direncini indüklediği ve bunu kısmen mTOR sinyal yolunun aktivasyonu ile yaptığı ortaya çıkmaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında UCA1'in farklı kanserlerde PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu ile farklı yollardan ilişkili olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda, lncRNA UCA1'in susturulmasının, meme kanseri hücrelerinin doksorubisine direncinde bir azalmaya neden olduğunu ve bu azalmanın PI3K/AKT/mTOR yolunun aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. lncRNA-UCA1, BC'de doksorubisin direncini tersine çevirmek için potansiyel bir aday olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, UCA1'in baskılanması, BC hücrelerinin doksorubisine duyarlılığını artırmaktadır ve bu durum, doksorubisin direnci ile UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki etkisi arasında yakın bir ilişki olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Tezin son aşamasında ise, UCA1 gen ekspresyonunun hücre göçü üzerindeki etkisini değerlendirmek için yara iyileşmesi (wound healing, scratch assay) deneyi yapıldı. Bu deney hücre göçünü incelemek için yaygın olarak kullanılan basit, ekonomik ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntem, hücre monolayerinde bir "çizik" oluşturulmasıyla başlar. Oluşturulan bu çizik çevresindeki hücrelerin göç ederek alanı kapatması süresince, başlangıç ve belirli aralıklarla görüntüler alınır. Hücrelerin göç hızı, bu görüntülerin karşılaştırılmasıyla nicel olarak hesaplanır. Diğer tekniklere kıyasla, in vitro scratch testi, özellikle hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için uygundur. Ayrıca, in vivo yara iyileşme sürecinde hücre göçünü taklit etmek ve hücre içi süreçleri canlı hücreler üzerinde izlemek isteyen çalışmalar için elverişli bir platform sağlar (C.-C. Liang vd., 2007). Çalışmamızda bu teknik, maliyetli olmadığı ve hücre göçünü taklit etmekte hala kullanılan standart bir yöntem olduğu için tercih edilmiştir. UCA1'in hücre göçüne etkisini araştırdığımız bu testte, hücrelere si-Negatif kontrol (NK) ve si-UCA1 uygulanarak 24- kuyulu plaklarda transfeksiyon gerçekleştirildi. Hücre çizik assayi, siUCA1'in hücre göçündeki rolünü belirlemek için yapıldı. UCA1'in siRNA ile inhibisyonunun kontrolle kıyaslandığında hücrelerde göç etme kapasitesini yavaşlattığı görülmektedir. Hücre göçü analizinde, si-UCA1 grubundaki göç oranının MCF-7/S hücrelerinde %47,67 azaldığı ve MCF-7/Dox hücrelerde'de %26,77 azaldığı saptandı. Literatürde farklı kanser türlerinde UCA1'in hücre göçüne etkisini araştırmak için yapılan çalışmalar da mevcuttur. UCA1'in susturulmasının hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada SCC15 ve Cal27 hücre hatları (Ağız Skuamöz Karsinom Hücre Hattı) kullanılarak, iki hücre hatlarında yara iyileşme deneyini gerçekleştirildi. 24 saatlik kültürleme sonrasında, si-UCA1 ile transfekte edilen hücrelerin her iki hücre hattında da göç eden hücre sayısı, si-kontrol ile transfekte edilenlere

göre önemli ölçüde azaldığı rapor edildi (Y.-T. Yang vd., 2016). Başka bir transfeksiyon çalışmasında, CCLP1 ve RBE (safrakanalı hücreleri) hücrelerinde transfeksiyon sonrası UCA1'in baskılanması ile hücrelerin göç yeteneğinin azaldığı saptandı (Y. Xu vd., 2017). UCA1 ve miR-182-5p'in birlikte transfeksiyonunun hücre göçü üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada böbrek kanseri hücrelerinin göçünün shUCA1 ve miR-182-5p mimiği ile önemli ölçüde baskılandığı rapor edildi (W. Wang vd., 2020). Çizik assayı, shUCA1 grubundaki göreceli göç oranının 786-O'da %44,35 azaldığı, ve Caki-1'de %42,23 azaldığı saptandı. Sonuç olarak, UCA1'in susturulmasının hücre göçünü yavaşlattığına dair elde edilen veriler literatür ile benzer bulgular vermiştir.



SONUÇ/SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, meme kanserinde doksorubisine karşı edinilmiş direncin altında yatan mekanizma, PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonu ve UCA1'in ilişkisi açısından değerlendirildi. Bunlara ek olarak, doksorubisin dirençli hücrelerde UCA1'in hücrelerdeki göç etme yeteneği üzerindeki etkisi araştırıldı. Aşağıda elde edilen bulgular özetlenmiştir.

- Tezde kullanılan doksorubisine dirençli MCF-7 (MCF-7/Dox) hücreler, laboratuvarında uzun dönem (yaklaşık 1 yıl) doksorubisin ile muamele edilerek geliştirildi. Bu hücrelerin iğsi bir forma büründüğü ve hücre uzantılarının oluştuğu fark edildi. Bunun yanı sıra, sitoplazmalarında birden fazla ve göreceli olarak büyük veziküllerin bulunduğu gözlemlendi.
- Direnç geliştiği gen düzeyinde araştırıldığında, literatürde en sık bakılan MRP1 gen ekspresyonu analiz edildi. MCF-7/Dox hücrelerinde, duyarlı hücrelerle karşılaştırıldığında, MRP1 mRNA gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu belirlendi. Hücrelerin doksorubisinin hücre içine alınmasını MRP1 genini aktive ederek direnç gelişimini sağlamış olabileceği yorumu yapılabilir.
- MCF-7/Dox hücrelerin doksorubisine duyarlılığının test edilmesi için yapılan MTT analizinde, MCF-7/Dox ve MCF-7/S için IC_{50} değerleri sırasıyla $128,5 \pm 0,22 \mu M$ ve $1,65 \pm 0,10 \mu M$ olarak tespit edildi. MCF-7/Dox hücrelerde IC_{50} değerinin yüksek olması doksorubisine direncin arttığı şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlardan, MCF7/Dox hücrelerinin, doksorubisine duyarlı (MCF-7/S) hücrelere kıyasla, doksorubisine karşı 78 kat daha dirençli olduğu belirlendi.
- MCF-7 hücrelerinin doksorubisine direnç kazandıktan sonra mezenkimal hücre formuna dönüştüğü bilinmektedir. Bu dönüşüm epitelyal-mezenkimal dönüşüm olarak isimlendirilen bir süreçtir. Bu süreçte markör olarak bilinen altı genin transkript düzeyinde ekspresyonu incelendi. Epitelyal hücrelerde markör olduğu bilinen E-kaderin, Okludin, Klaudin-1 ekspresyon seviyelerinin düştüğü, mezenkimal hücrelerde markör N-kaderin, Twist-1 ve Vimentin gen ekspresyonlarının arttığı saptandı. Bu sonuçtan, MCF-7/Dox hücrelerimizin de mezenkimal forma dönüştüğü söylenebilir.
- Dox direnci gelişen hücrelerde ile PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunun daha fazla çalıştığı, bu sinyalizayonda görev alan AKT1, AKT2, mTOR, PTEN genlerinin ekspresyonlarındaki değişime bağlı olarak tespit edildi. Dox dirençli hücrelerde duyarlı gruba göre AKT1 (+4,2), AKT2 (1,8), mTOR (+2,5), PTEN (-10) kat gen ekspresyonunda farklılık saptandı.
- MCF-7/Dox hücrelerde UCA1'in upregüle olduğu tespit edildi.
- UCA1'in susturulmasını takiben gerçekleştirilen hücre canlılık testi sonuçları, MCF7/S-siUCA1 hücrelerinde IC_{50} değerinin MCF-7/S-si-negatif kontrol grubuna göre yaklaşık %43 azaldığı, MCF7/Dox-siUCA1 hücrelerinde ise IC_{50} değerinin MCF-7/Dox-si-negatif kontrol grubuna göre ise %26 azaldığı saptandı. IC_{50} değerlerindeki düşüşle birlikte, UCA1'in hücre canlılıklarını inhibe ettiği sonucuna varılabilir.

- UCA1 ile susturulması ile birlikte her iki hücre grubunda da genlerin regülasyonu kontrol gruplarına göre tersine dönmüştür. Bir diğer ifade ile siUCA1 transfekte MCF7/Dox hücrelerde AKT1, AKT2 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak azalırken, PTEN gen ekspresyonu ise anlamlı derecede yükseldi. PTEN, bu yolağın inhibitörü olduğu için, PTEN gen ekspresyonundaki bu artışın PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunun çalışmasını inhibe ettiği yorumu yapılabilir.
- UCA1'in susturulması PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunun çalışmasını azalttı. UCA1'in susturulmasının bu yolağı bir şekilde inaktive ettiği ve bu inaktivasyonunun PTEN molekülünün ekspresyon seviyesindeki ciddi bir artış göstermesi ile de olabileceği düşünülmektedir. Çünkü PTEN bu sinyalizasyonu baskılamada görev almaktadır.
- Yukarıda bahsedilen deneylerden kısmen bağımsız olarak UCA1'in susturulması ile kanserli hücrelerin göç etme yeteneğinin azaldığı bulundu.

Elde edilen verilerden, lncRNA-UCA1, meme kanserinde DOX direncini tersine çevirmek için potansiyel bir aday olarak değerlendirilebilir. Sonuç olarak, UCA1'in baskılanması, meme kanseri hücrelerinin doksorubisine duyarlılığını artırmaktadır. Tez çalışmamız ile, meme kanserinde doksorubisin direnci ve UCA1'in PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu arasında ilişki olabileceği düşündürülen veriler literatüre ilk kez kazandırılmıştır (Suicmez vd., 2024). UCA1'in susturulması, kemoterapi direnci oluşmuş meme kanseri hücrelerinin doksorubisine direncini tersine çevirebilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, ER-pozitif meme tümörlerinin kemoterapi yanıtı için yeni bir mekanizma sağlaması ve UCA1'in, meme kanseri hastalarında direnç gelişimi tedavi etmek için PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyonunu hedef alan yeni terapötik stratejiler geliştirmede anahtar bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

Bütçedeki sınırlılıklar nedeniyle, tez kapsamında planlanan protein seviyesinin araştırılması ile ilgili deneylerin yapılması mümkün olmamıştır. Bu yüzden gelecek çalışmalarda, UCA1-PI3K/AKT/mTOR ilişkisi Western blotlama veya immün floresans yöntemleri ile protein düzeyinde ekspresyonu analizi yapılması planlanmaktadır. Bunlara ilaveten, hücrelere UCA1 aşırı ekprese eden sistemler entegre edildiğinde, bu sinyalizasyonun nasıl çalıştığına tersten bakılabilir. Literatürde çok fazla sayıda UCA1 geninin sünger (sponge) görevi görerek miRNA'larla etkileşimde olduğu bilindiğinden, bu sinyalizasyon içerisinde de etkileşime girebileceği aday miRNA'lar saptanabilir. İleri aşamalarda, klinikte meme kanseri doksorubisin tedavisi uygulanmış ancak tedaviye yanıt alınamamış bireylerde, UCA1'in klinikopatolojik özellikleri ile ilişkilendirilme yapılabilir.

KAYNAKÇA

- A, J., Zhang, B., Zhang, Z., Hu, H., & Dong, J.-T. (2021). Novel Gene Signatures Predictive of Patient Recurrence-Free Survival and Castration Resistance in Prostate Cancer. *Cancers*, 13(4), 917. <https://doi.org/10.3390/cancers13040917>
- Abdullah, L. N., & Chow, E. K. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), e3. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-3>
- Abrams, S. L., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Wong, E. W. T., Chappell, W. H., Bäsecke, J., Stivala, F., Donia, M., Nicoletti, F., Libra, M., Martelli, A. M., & McCubrey, J. A. (2010). The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(9), 1781-1791. <https://doi.org/10.4161/cc.9.9.11483>
- AbuHammad, S., & Zihlif, M. (2013). Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, 101(4), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.11.009>
- Achour, C., & Aguilo, F. (2018). Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer biology. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23(11), 2106-2132. <https://doi.org/10.2741/4693>
- Ahmadzada, T., Reid, G., & McKenzie, D. R. (2018). Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophysical Reviews*, 10(1), 69-86. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0392-1>
- Ai, B., Kong, X., Wang, X., Zhang, K., Yang, X., Zhai, J., Gao, R., Qi, Y., Wang, J., Wang, Z., & Fang, Y. (2019). LINC01355 suppresses breast cancer growth through FOXO3-mediated transcriptional repression of CCND1. *Cell Death & Disease*, 10(7), 502. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1741-8>
- Akerman, I., Tu, Z., Beucher, A., Rolando, D. M. Y., Sauty-Colace, C., Benazra, M., Nakic, N., Yang, J., Wang, H., Pasquali, L., Moran, I., Garcia-Hurtado, J., Castro, N., Gonzalez-Franco, R., Stewart, A. F., Bonner, C., Piemonti, L., Berney, T., Groop, L., ... Ferrer, J. (2017). Human Pancreatic β Cell lncRNAs Control Cell-Specific Regulatory Networks. *Cell Metabolism*, 25(2), 400-411. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.016>
- Akyolcu, N., Özhanlı, Y., & Kandemir, D. (2013). Meme Kanserinde Güncel Gelişmeler. *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi*, 6(3), 583-594.
- Al-Aamri, H. M., Ku, H., Irving, H. R., Tucci, J., Meehan-Andrews, T., & Bradley, C. (2019). Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia. *BMC Cancer*, 19(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5377-y>
- Al-Harras, M. F., Houssen, M. E., Shaker, M. E., Farag, K., Farouk, O., Monir, R., El-Mahdy, R., & Abo-Hashem, E. M. (2016). Polymorphisms of glutathione S-transferase π 1 and toll-like receptors 2 and 9: Association with breast cancer susceptibility. *Oncology Letters*, 11(3), 2182-2188. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4159>
- Alzahrani, A. S. (2019). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.009>
- American Cancer Society Facts & Figures 2022-2024. (2022). American Cancer Society.

- Amilcar, Castillo-Pichardo, L., Gerena, Y., & Dharmawardhane, S. (2016). Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *PloS One*, 11(6), e0157251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157251>
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2023). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*, 10(4), 1367-1401. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>
- Aouali, N., Morjani, H., Trussardi, A., Soma, E., Giroux, B., & Manfait, M. (2003). Enhanced cytotoxicity and nuclear accumulation of doxorubicin-loaded nanospheres in human breast cancer MCF7 cells expressing MRP1. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.4.1195>
- Arab, K., Park, Y. J., Lindroth, A. M., Schäfer, A., Oakes, C., Weichenhan, D., Lukanova, A., Lundin, E., Risch, A., Meister, M., Dienemann, H., Dyckhoff, G., Herold-Mende, C., Grummt, I., Niehrs, C., & Plass, C. (2014). Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A. *Molecular Cell*, 55(4), 604-614. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.031>
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *Caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(6), 1101-1110. <https://doi.org/10.1002/bit.260110607>
- Aspden, J. L., Eyre-Walker, Y. C., Phillips, R. J., Amin, U., Mumtaz, M. A. S., Brocard, M., & Couso, J.-P. (2014). Extensive translation of small Open Reading Frames revealed by Poly-Ribo-Seq. *eLife*, 3, e03528. <https://doi.org/10.7554/eLife.03528>
- Azim, H. A., & Peccatori, F. A. (2011). Managing cancer during pregnancy: What evidence do we have? *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, 121(1-2), 29-34.
- Bacus, S. S., Kiguchi, K., Chin, D., King, C. R., & Huberman, E. (1990). Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Molecular Carcinogenesis*, 3(6), 350-362. <https://doi.org/10.1002/mc.2940030607>
- Bao, L., Haque, A., Jackson, K., Hazari, S., Moroz, K., Jetly, R., & Dash, S. (2011). Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *The American Journal of Pathology*, 178(2), 838-852. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.029>
- Barnett, G. C., West, C. M. L., Dunning, A. M., Elliott, R. M., Coles, C. E., Pharoah, P. D. P., & Burnet, N. G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: Towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), 134-142. <https://doi.org/10.1038/nrc2587>
- Barrios-González, J., & Mejía, A. (2008). Production of Antibiotics and other Commercially Valuable Secondary Metabolites. *Içinde A. Pandey, C. R. Soccol, & C. Larroche (Ed.), Current Developments in Solid-state Fermentation (ss. 302-336)*. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_14
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Bastid, J. (2012). EMT in carcinoma progression and dissemination: Facts, unanswered questions, and clinical considerations. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1-2), 277-283. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9344-6>

Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews. Cancer*, 11(4), 239-253. <https://doi.org/10.1038/nrc3007>

Bellance, N., Furt, F., Melsers, S., Lalou, C., Thoraval, D., Maneta-Peyret, L., Lacombe, D., Moreau, P., & Rossignol, R. (2020). Doxorubicin Inhibits Phosphatidylserine Decarboxylase and Modifies Mitochondrial Membrane Composition in HeLa Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1317. <https://doi.org/10.3390/ijms21041317>

Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nature Reviews. Cancer*, 6(9), 702-713. <https://doi.org/10.1038/nrc1950>

Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., van de Vijver, M. J., & Bernards, R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4), 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.030>

Bernstein, E., & Allis, C. D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes & Development*, 19(14), 1635-1655. <https://doi.org/10.1101/gad.1324305>

Bhan, A., & Mandal, S. S. (2015). LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1856(1), 151-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001>

Bianchini, G., De Angelis, C., Licata, L., & Gianni, L. (2022). Treatment landscape of triple-negative breast cancer—Expanded options, evolving needs. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 19(2), 91-113. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00565-2>

Bilardi, R. A., Kimura, K.-I., Phillips, D. R., & Cutts, S. M. (2012). Processing of anthracycline-DNA adducts via DNA replication and interstrand crosslink repair pathways. *Biochemical Pharmacology*, 83(9), 1241-1250. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.029>

Billington, S., Ray, A. S., Salphati, L., Xiao, G., Chu, X., Humphreys, W. G., Liao, M., Lee, C. A., Mathias, A., Hop, C. E. C. A., Rowbottom, C., Evers, R., Lai, Y., Kelly, E. J., Prasad, B., & Unadkat, J. D. (2018). Transporter Expression in Noncancerous and Cancerous Liver Tissue from Donors with Hepatocellular Carcinoma and Chronic Hepatitis C Infection Quantified by LC-MS/MS Proteomics. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 46(2), 189-196. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.077289>

Bodó, A., Bakos, E., Szeri, F., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2003). The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicology Letters*, 140-141, 133-143. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00497-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00497-6)

Booy, E. P., Henson, E. S., & Gibson, S. B. (2011). Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene*, 30(20), 2367-2378. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.616>

Breast Cancer Facts&Figures: Hearing on 861022 de American Cancer Society. 2022

Brockmann, H. (1963). [ANTHRACYCLINONES AND ANTHRACYCLINES. (RHODOMYCINONE, PYRROMYCINONE AND THEIR GLYCOSIDES)]. *Fortschritte Der Chemie Organischer*

Naturstoffe = Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Progres Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles*, 21, 121-182.

Brosh, R., & Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 701-713. <https://doi.org/10.1038/nrc2693>

Brown, C. J., Ballabio, A., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., & Willard, H. F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 349(6304), 38-44. <https://doi.org/10.1038/349038a0>

Burgess, D. J., Doles, J., Zender, L., Xue, W., Ma, B., McCombie, W. R., Hannon, G. J., Lowe, S. W., & Hemann, M. T. (2008). Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9053-9058. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803513105>

Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & Development*, 25(18), 1915-1927. <https://doi.org/10.1101/gad.17446611>

Calanca, N., Abildgaard, C., Rainho, C. A., & Rogatto, S. R. (2020). The Interplay between Long Noncoding RNAs and Proteins of the Epigenetic Machinery in Ovarian Cancer. *Cancers*, 12(9), 2701. <https://doi.org/10.3390/cancers12092701>

Campbell, I. G., Russell, S. E., Choong, D. Y. H., Montgomery, K. G., Ciavarella, M. L., Hooi, C. S. F., Cristiano, B. E., Pearson, R. B., & Phillips, W. A. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, 64(21), 7678-7681. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2933>

Cao, W., Li, J., Hao, Q., Vadgama, J. V., & Wu, Y. (2019). AMP-activated protein kinase: A potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1107-2>

Caon, I., Bartolini, B., Parnigoni, A., Caravà, E., Moretto, P., Viola, M., Karousou, E., Vigetti, D., & Passi, A. (2020). Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*, 62, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.07.007>

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., ... RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), 1559-1563. <https://doi.org/10.1126/science.1112014>

Carroll, J. S., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Williams, M., & Tilley, W. D. (2017). Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 54-64. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.116>

Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267-3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>

Chaires, J. B., Fox, K. R., Herrera, J. E., Britt, M., & Waring, M. J. (1987). Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry*, 26(25), 8227-8236. <https://doi.org/10.1021/bi00399a031>

Chang, L., Hu, Z., Zhou, Z., & Zhang, H. (2018). Linc00518 Contributes to Multidrug Resistance Through Regulating the MiR-199a/MRP1 Axis in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(1), 16-28. <https://doi.org/10.1159/000491659>

Chen, J., Bai, J., & Yang, K. (2018). Effect of resveratrol on doxorubicin resistance in breast neoplasm cells by modulating PI3K/Akt signaling pathway. *IUBMB Life*, 70(6), 491-500. <https://doi.org/10.1002/iub.1749>

Chen, J., Zhang, B., Wong, N., Lo, A. W. I., To, K.-F., Chan, A. W. H., Ng, M. H. L., Ho, C. Y. S., Cheng, S.-H., Lai, P. B. S., Yu, J., Ng, H.-K., Ling, M.-T., Huang, A.-L., Cai, X.-F., & Ko, B. C. B. (2011). Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Research*, 71(12), 4138-4149. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4274>

Chen, N.-N., Ma, X.-D., Miao, Z., Zhang, X.-M., Han, B.-Y., Almaamari, A. A., Huang, J.-M., Chen, X.-Y., Liu, Y.-J., & Su, S.-W. (2023). Doxorubicin resistance in breast cancer is mediated via the activation of FABP5/PPAR γ and CaMKII signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1150861. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1150861>

Chen, P., Wan, D., Zheng, D., Zheng, Q., Wu, F., & Zhi, Q. (2016). Long non-coding RNA UCA1 promotes the tumorigenesis in pancreatic cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 83, 1220-1226. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.041>

Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., Qian, J., Duan, E., Zhai, Q., & Zhou, Q. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6271), 397-400. <https://doi.org/10.1126/science.aad7977>

Chen, S., Shao, C., Xu, M., Ji, J., Xie, Y., Lei, Y., & Wang, X. (2015). Macrophage infiltration promotes invasiveness of breast cancer cells via activating long non-coding RNA UCA1. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(8), 9052-9061.

Chen, Y., Jia, Y., Song, W., & Zhang, L. (2018). Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1453. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01453>

Cheng, M., Rizwan, A., Jiang, L., Bhujwala, Z. M., & Glunde, K. (2017). Molecular Effects of Doxorubicin on Choline Metabolism in Breast Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(8), 617-627. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.004>

Cheng, N., Cai, W., Ren, S., Li, X., Wang, Q., Pan, H., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., Zhao, C., Chen, X., Fei, K., Zhou, C., & Hirsch, F. R. (2015). Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(27), 23582-23593. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4361>

Choi, C.-H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5, 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-30>

Christakis, P. (2011). The birth of chemotherapy at Yale. Bicentennial lecture series: Surgery Grand Round. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(2), 169-172.

Christidi, E., & Brunham, L. R. (2021). Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death & Disease*, 12(4), 339. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03614-x>

- Christowitz, C., Davis, T., Isaacs, A., van Niekerk, G., Hattingh, S., & Engelbrecht, A.-M. (2019). Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC Cancer*, 19(1), 757. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5939-z>
- Christowitz, C., Davis, T., Isaacs, A., Van Niekerk, G., Hattingh, S., & Engelbrecht, A.-M. (2019). Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC Cancer*, 19(1), 757. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5939-z>
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Research*, 22(5), 885-898. <https://doi.org/10.1101/gr.131037.111>
- Clusan, L., Ferrière, F., Flouriot, G., & Pakdel, F. (2023). A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6834. <https://doi.org/10.3390/ijms24076834>
- Collette, J., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2017). Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2319. <https://doi.org/10.3390/ijms18112319>
- Connerty, P., Lock, R. B., & de Bock, C. E. (2020). Long Non-coding RNAs: Major Regulators of Cell Stress in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 285. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00285>
- Cox, J., & Weinman, S. (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*, 3(1), 57-59. <https://doi.org/10.2217/hep.15.41>
- Cullinane, C., & Phillips, D. R. (1990). Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions. *Biochemistry*, 29(23), 5638-5646. <https://doi.org/10.1021/bi00475a032>
- Czajka, M. L., & Pfeifer, C. (2024). Breast Cancer Surgery. İçinde StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553076/>
- Dalmark, M., & Storm, H. H. (1981). A Fickian diffusion transport process with features of transport catalysis. Doxorubicin transport in human red blood cells. *The Journal of General Physiology*, 78(4), 349-364. <https://doi.org/10.1085/jgp.78.4.349>
- Dalmases, A., González, I., Menendez, S., Arpí, O., Corominas, J. M., Servitja, S., Tusquets, I., Chamizo, C., Rincón, R., Espinosa, L., Bigas, A., Eroles, P., Furriol, J., Lluch, A., Rovira, A., Albanell, J., & Rojo, F. (2014). Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF-κB target genes in human breast cancer. *Oncotarget*, 5(1), 196-210. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1556>
- Darcansoy İşeri. (2009). Investigation of docetaxel and doxorubicin resistance in MCF-7 breast carcinoma cell line. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Dass, S. A., Tan, K. L., Selva Rajan, R., Mokhtar, N. F., Mohd Adzmi, E. R., Wan Abdul Rahman, W. F., Tengku Din, T. A. D. A.-A., & Balakrishnan, V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>
- Dayal, S., Chaubey, D., Joshi, D. C., Ranmale, S., & Pillai, B. (2024). Noncoding RNAs: Emerging regulators of behavioral complexity. *WIREs RNA*, 15(3), e1847. <https://doi.org/10.1002/wrna.1847>

de Kruijf, E. M., Dekker, T. J. A., Hawinkels, L. J. a. C., Putter, H., Smit, V. T. H. B. M., Kroep, J. R., Kuppen, P. J. K., van de Velde, C. J. H., Ten Dijke, P., Tollenaar, R. a. E. M., & Mesker, W. E. (2013). The prognostic role of TGF- β signaling pathway in breast cancer patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(2), 384-390. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds333>

Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104(6), 1129-1137. <https://doi.org/10.1002/cncr.21324>

Deocesano-Pereira, C., Machado, R. A. C., De Jesus-Ferreira, H. C., Marchini, T., Pereira, T. F., Carreira, A. C. O., & Sogayar, M. C. (2019). Functional impact of the long non-coding RNA MEG3 deletion by CRISPR/Cas9 in the human triple negative metastatic Hs578T cancer cell line. *Oncology Letters*, 18(6), 5941-5951. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10969>

Done, S. (Ed.). (2011). *Breast Cancer—Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*. InTech. <https://doi.org/10.5772/1748>

Dong, C., Chen, Y., Li, H., Yang, Y., Zhang, H., Ke, K., Shi, X.-N., Liu, X., Li, L., Ma, J., Kung, H.-F., Chen, C., & Lin, M. C. (2019). The antipsychotic agent flupentixol is a new PI3K inhibitor and potential anticancer drug for lung cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 15(7), 1523-1532. <https://doi.org/10.7150/ijbs.32625>

Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J., & Chen, C. (2021). Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 628690. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>

Doroshov, J. H. (2019). Mechanisms of Anthracycline-Enhanced Reactive Oxygen Metabolism in Tumor Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9474823. <https://doi.org/10.1155/2019/9474823>

Du, J., He, Y., Li, P., Wu, W., Chen, Y., & Ruan, H. (2018). IL-8 regulates the doxorubicin resistance of colorectal cancer cells via modulation of multidrug resistance 1 (MDR1). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81(6), 1111-1119. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3584-x>

Dudas, J., Ladanyi, A., Ingruber, J., Steinbichler, T. B., & Riechelmann, H. (2020). Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*, 9(2), 428. <https://doi.org/10.3390/cells9020428>

Durante, M., & Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(1), 37-43. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>

Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P. J., & Parissenti, A. M. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism*, 16(6), 412-426. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>

Eisenblätter, T., Hüwel, S., & Galla, H.-J. (2003). Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Research*, 971(2), 221-231. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02401-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02401-6)

- Emens, L. A., Molinero, L., Loi, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Diéras, V., Iwata, H., Barrios, C. H., Nechaeva, M., Nguyen-Duc, A., Chui, S. Y., Husain, A., Winer, E. P., Adams, S., & Schmid, P. (2021). Atezolizumab and nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Biomarker Evaluation of the IMpassion130 Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(8), 1005-1016. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab004>
- ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., ... de Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799-816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
- Estrela, J. M., Ortega, A., & Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43(2), 143-181. <https://doi.org/10.1080/10408360500523878>
- Fan, J., To, K. K. W., Chen, Z.-S., & Fu, L. (2023). ABC transporters affects tumor immune microenvironment to regulate cancer immunotherapy and multidrug resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 66, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100905>
- Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., & Liu, Y. (2014a). Long non-coding RNA UCA 1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. *The FEBS Journal*, 281(7), 1750-1758. <https://doi.org/10.1111/febs.12737>
- Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., & Liu, Y. (2014b). Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. *The FEBS Journal*, 281(7), 1750-1758. <https://doi.org/10.1111/febs.12737>
- Fares, J., Kanojia, D., Rashidi, A., Ulasov, I., & Lesniak, M. S. (2020). Landscape of combination therapy trials in breast cancer brain metastasis. *International Journal of Cancer*, 147(7), 1939-1952. <https://doi.org/10.1002/ijc.32937>
- Fillmore, C. M., Gupta, P. B., Rudnick, J. A., Caballero, S., Keller, P. J., Lander, E. S., & Kuperwasser, C. (2010). Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21737-21742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007863107>
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 26, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>
- Fowler, A. M., Salem, K., DeGrave, M., Ong, I. M., Rassman, S., Powers, G. L., Kumar, M., Michel, C. J., & Mahajan, A. M. (2020). Progesterone Receptor Gene Variants in Metastatic Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Hormones & Cancer*, 11(2), 63-75. <https://doi.org/10.1007/s12672-020-00377-3>
- Freeman, M. D., Gopman, J. M., & Salzberg, C. A. (2018). The evolution of mastectomy surgical technique: From mutilation to medicine. *Gland Surgery*, 7(3), 308-315. <https://doi.org/10.21037/gs.2017.09.07>
- Freshney, R. I. (1988). *Culture of animal cells: A manual of basic technique* (2. ed., 2. pr). Liss.

- Fruci, D., Cho, W. C. S., Nobili, V., Locatelli, F., & Alisi, A. (2016). Drug Transporters and Multiple Drug Resistance in Pediatric Solid Tumors. *Current Drug Metabolism*, 17(4), 308-316. <https://doi.org/10.2174/1567205010666131212110948>
- Gao, C., Yuan, X., Jiang, Z., Gan, D., Ding, L., Sun, Y., Zhou, J., Xu, L., Liu, Y., & Wang, G. (2019). Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 β and PTEN to control chemoresistance in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 176(2), 291-301. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05239-3>
- Gao, M., Miao, L., Liu, M., Li, C., Yu, C., Yan, H., Yin, Y., Wang, Y., Qi, X., & Ren, J. (2016). miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1. *Oncotarget*, 7(37), 59714-59726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10845>
- Gao, Y.-F., Liu, J.-Y., Mao, X.-Y., He, Z.-W., Zhu, T., Wang, Z.-B., Li, X., Yin, J.-Y., Zhang, W., Zhou, H.-H., & Liu, Z.-Q. (2020). LncRNA FOXD1-AS1 acts as a potential oncogenic biomarker in glioma. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 26(1), 66-75. <https://doi.org/10.1111/cns.13152>
- Garg, M. (2022). Emerging roles of epithelial-mesenchymal plasticity in invasion-metastasis cascade and therapy resistance. *Cancer Metastasis Reviews*, 41(1), 131-145. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10003-5>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.-L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C.-Q., Mirshahi, P., Laurent, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.-P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., & Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: Differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-63>
- Ghanei, M. (2004). Delayed haematological complications of mustard gas. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 24(6), 493-495. <https://doi.org/10.1002/jat.1006>
- Goodall, G. J., & Wickramasinghe, V. O. (2021). RNA in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 21(1), 22-36. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00306-0>
- Gooding, A. J., Zhang, B., Gunawardane, L., Beard, A., Valadkhan, S., & Schiemann, W. P. (2019). The lncRNA BORG facilitates the survival and chemoresistance of triple-negative breast cancers. *Oncogene*, 38(12), 2020-2041. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0586-4>
- Grant, C. E., Gao, M., DeGorter, M. K., Cole, S. P. C., & Deeley, R. G. (2008). Structural determinants of substrate specificity differences between human multidrug resistance protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(12), 2571-2581. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022491>
- Greenwalt, I., Zaza, N., Das, S., & Li, B. D. (2020). Precision Medicine and Targeted Therapies in Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 29(1), 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2019.08.004>
- Gu, H., Chen, J., Song, Y., & Shao, H. (2018). Gastric Adenocarcinoma Predictive Long Intergenic Non-Coding RNA Promotes Tumor Occurrence and Progression in Non-Small Cell Lung Cancer via Regulation of the miR-661/eEF2K Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(5), 2136-2147. <https://doi.org/10.1159/000495831>
- Guadagnolo, B. A., Liao, K.-P., Elting, L., Giordano, S., Buchholz, T. A., & Shih, Y.-C. T. (2013). Use of radiation therapy in the last 30 days of life among a large population-based cohort of elderly

patients in the United States. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(1), 80-87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.0585>

Guh, C.-Y., Hsieh, Y.-H., & Chu, H.-P. (2020). Functions and properties of nuclear lncRNAs—from systematically mapping the interactomes of lncRNAs. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00640-3>

Gumireddy, K., Li, A., Yan, J., Setoyama, T., Johannes, G. J., Orom, U. A., Tchou, J., Liu, Q., Zhang, L., Speicher, D. W., Calin, G. A., & Huang, Q. (2013). Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step. *The EMBO Journal*, 32(20), 2672-2684. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.188>

Guo, B., Zhu, H.-L., Li, S.-X., Lu, X.-C., & Fan, H. (2011). Individualized liposomal doxorubicin-based treatment in elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Onkologie*, 34(4), 184-188. <https://doi.org/10.1159/000327008>

H., F., Zarghi, A., Kobarfard, F., Zendejdel, R., Nakhjavani, M., Arfaiee, S., Zebardast, T., Mohebi, S., Anjidani, N., Ashtarinezhad, A., & Shoeibi, S. (2011). Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. İçinde M. Gunduz (Ed.), *Breast Cancer—Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/23005>

Han, C., Li, X., Fan, Q., Liu, G., & Yin, J. (2019). CCAT1 promotes triple-negative breast cancer progression by suppressing miR-218/ZFX signaling. *Aging*, 11(14), 4858-4875. <https://doi.org/10.18632/aging.102080>

Han, J., Han, B., Wu, X., Hao, J., Dong, X., Shen, Q., & Pang, H. (2018). Knockdown of lncRNA H19 restores chemo-sensitivity in paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer through triggering apoptosis and regulating Akt signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 359, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.018>

Han, Y., Yang, Y., Yuan, H., Zhang, T., Sui, H., Wei, X., Liu, L., Huang, P., Zhang, W., & Bai, Y. (2014). UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. *Pathology*, 46(5), 396-401. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000125>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hanssen, K. M., Haber, M., & Fletcher, J. I. (2021). Targeting multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-expressing cancers: Beyond pharmacological inhibition. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 59, 100795. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100795>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Harrow, J., Denoeud, F., Frankish, A., Reymond, A., Chen, C.-K., Chrast, J., Lagarde, J., Gilbert, J. G. R., Storey, R., Swarbreck, D., Rossier, C., Ucla, C., Hubbard, T., Antonarakis, S. E., & Guigo, R.

(2006). GENCODE: Producing a reference annotation for ENCODE. *Genome Biology*, 7 Suppl 1(Suppl 1), S4.1-9. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-s1-s4>

Hausmann, J., Corradini, S., Nestle-Kraemling, C., Bölke, E., Njanang, F. J. D., Tamaskovics, B., Orth, K., Ruckhaeberle, E., Fehm, T., Mohrmann, S., Simiantonakis, I., Budach, W., & Matuschek, C. (2020). Recent advances in radiotherapy of breast cancer. *Radiation Oncology (London, England)*, 15(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01501-x>

He, R.-Z., Luo, D.-X., & Mo, Y.-Y. (2019). Emerging roles of lncRNAs in the post-transcriptional regulation in cancer. *Genes & Diseases*, 6(1), 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.01.003>

Hernández, D. L. (2016). Letter to the Editor: Use of Antibiotics, Gut Microbiota, and Risk of Type 2 Diabetes: Epigenetics Regulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(5), L62-63. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1151>

Hernandez-Aya, L. F., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2011). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The Oncologist*, 16(4), 404-414. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0402>

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C. J., Green, S. J., Martin, N. M. B., Orr, A. I., Reaper, P. M., Jackson, S. P., Curtin, N. J., & Smith, G. C. M. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Research*, 64(24), 9152-9159. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2727>

Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., & Bell, A. W. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323(6087), 448-450. <https://doi.org/10.1038/323448a0>

Hu, G., Lou, Z., & Gupta, M. (2014). The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-Myc translation. *PloS One*, 9(9), e107016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107016>

Hu, S.-H., Wang, C.-H., Huang, Z.-J., Liu, F., Xu, C.-W., Li, X.-L., & Chen, G.-Q. (2016). miR-760 mediates chemoresistance through inhibition of epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(23), 5002-5008.

Hu, X.-L., Wang, J., He, W., Zhao, P., & Wu, W.-Q. (2018). Down-regulation of lncRNA Linc00152 suppressed cell viability, invasion, migration, and epithelial to mesenchymal transition, and reversed chemo-resistance in breast cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(10), 3074-3084. https://doi.org/10.26355/eurrev_201805_15067

Hu, Y., Guo, R., Wei, J., Zhou, Y., Ji, W., Liu, J., Zhi, X., & Zhang, J. (2015). Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 6(12), e2020-e2020. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.363>

Huang, J., Zhou, N., Watabe, K., Lu, Z., Wu, F., Xu, M., & Mo, Y.-Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death & Disease*, 5(1), e1008-e1008. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.541>

Huang, J.-F., Wen, C.-J., Zhao, G.-Z., Dai, Y., Li, Y., Wu, L.-X., & Zhou, H.-H. (2018). Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells in vitro. *Cancer*

Chemotherapy and Pharmacology, 82(2), 199-210. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3603-y>

Huang, K. M., Zavorka Thomas, M., Magdy, T., Eisenmann, E. D., Uddin, M. E., DiGiacomo, D. F., Pan, A., Keiser, M., Otter, M., Xia, S. H., Li, Y., Jin, Y., Fu, Q., Gibson, A. A., Bonilla, I. M., Carnes, C. A., Corps, K. N., Coppola, V., Smith, S. A., ... Sparreboom, A. (2021). Targeting OCT3 attenuates doxorubicin-induced cardiac injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(5), e2020168118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020168118>

Jaramillo, A. C., Cloos, J., Lemos, C., Stam, R. W., Kaspers, G. J. L., Jansen, G., & Peters, G. J. (2019). Ex vivo resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlations between BCRP, MRP1, MRP4 and MRP5 ABC transporter expression and intracellular methotrexate polyglutamate accumulation. *Leukemia Research*, 79, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.02.008>

Jasra, S., & Anampa, J. (2018). Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the Modern Era: A Review. *Current Treatment Options in Oncology*, 19(6), 30. <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0547-8>

Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., & Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 114, 108800. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108800>

Jia, X., Shi, L., Wang, X., Luo, L., Ling, L., Yin, J., Song, Y., Zhang, Z., Qiu, N., Liu, H., Deng, M., He, Z., Li, H., & Zheng, G. (2019). KLF5 regulated lncRNA RP1 promotes the growth and metastasis of breast cancer via repressing p27kip1 translation. *Cell Death & Disease*, 10(5), 373. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1566-5>

Jiang, C.-R., & Li, T.-H. (2018). Circulating UCA1 is highly expressed in patients with systemic lupus erythematosus and promotes the progression through the AKT pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(8), 2364-2371. https://doi.org/10.26355/eurrev_201804_14828

Jiang, X., Wu, J., Guo, C., & Song, W. (2022). Key lncRNAs Associated With Oxidative Stress Were Identified by GEO Database Data and Whole Blood Analysis of Intervertebral Disc Degeneration Patients. *Frontiers in Genetics*, 13, 929843. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.929843>

Jiang, X., Zhou, Y., Sun, A.-J., & Xue, J.-L. (2018). NEAT1 contributes to breast cancer progression through modulating miR-448 and ZEB1. *Journal of Cellular Physiology*, 233(11), 8558-8566. <https://doi.org/10.1002/jcp.26470>

Johnson-Arbor, K., & Dubey, R. (2024). Doxorubicin. *Çinde StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/>

Jorgensen, T. J. (2009). Enhancing radiosensitivity: Targeting the DNA repair pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 8(8), 665-670. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.8.8304>

Juracek, J., Iliev, R., Svoboda, M., & Slaby, O. (2014). Long Noncoding RNAs in Breast Cancer: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. *Çinde D. Barh (Ed.), Omics Approaches in Breast Cancer* (ss. 153-170). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0843-3_7

Kalyanaraman, B. (2020). Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biology*, 29, 101394. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394>

- Kars, M. D., Iseri, O. D., Gündüz, U., Ural, A. U., Arpacı, F., & Molnár, J. (2006). Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Research*, 26(6B), 4559-4568.
- Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., & Chen, Z.-S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 18, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002>
- Kaya Koçdoğan, A., Oğuztüzün, S., Güler ŞİMşek, G., & Türk, M. (2020). MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda Doksorubisin Öncesi ve Sonrası GST İzozimlerinin, İlaç Dirençlilik Proteinlerinin ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması. *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10, 1-18. <https://doi.org/10.38079/igusabder.631695>
- Kazan, H. H., Urfali-Mamatoglu, C., Yalcin, G. D., Bulut, O., Sezer, A., Banerjee, S., & Gunduz, U. (2020). 15-LOX-1 has diverse roles in the resensitization of resistant cancer cell lines to doxorubicin. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4965-4978. <https://doi.org/10.1002/jcp.29375>
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*, 12(4), 659. <https://doi.org/10.3390/cells12040659>
- Khalili-Tanha, G., & Moghbeli, M. (2021). Long non-coding RNAs as the critical regulators of doxorubicin resistance in tumor cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 26(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00282-9>
- Kharb, R., Haider, K., Neha, K., & Yar, M. S. (2020). Aromatase inhibitors: Role in postmenopausal breast cancer. *Archiv Der Pharmazie*, 353(8), e2000081. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000081>
- Kim, B., Stephen, S. L., Hanby, A. M., Horgan, K., Perry, S. L., Richardson, J., Roundhill, E. A., Valleley, E. M. A., Verghese, E. T., Williams, B. J., Thorne, J. L., & Hughes, T. A. (2015). Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer*, 15(1), 634. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1625-y>
- Kim, C.-J., Gonye, A. L., Truskowski, K., Lee, C.-F., Cho, Y.-K., Austin, R. H., Pienta, K. J., & Amend, S. R. (2023). Nuclear morphology predicts cell survival to cisplatin chemotherapy. *Neoplasia*, 42, 100906. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100906>
- Kim, W., Takyar, F. M., Swan, K., Jeong, J., VanHouten, J., Sullivan, C., Dann, P., Yu, H., Fiaschi-Taesch, N., Chang, W., & Wysolmerski, J. (2016). Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone-Related Protein. *Cancer Research*, 76(18), 5348-5360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2614>
- Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., & Chrousos, G. P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science Signaling*, 3(107), ra8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000568>
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., & Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 543531. <https://doi.org/10.4061/2010/543531>
- Kort, A., Durmus, S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2015). Brain and Testis Accumulation of Regorafenib is Restricted by Breast Cancer Resistance Protein

(BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1). *Pharmaceutical Research*, 32(7), 2205-2216. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1609-7>

Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2021). *Genome Stability: From Virus to Human Application* (2nd ed). Elsevier Science & Technology.

Krishna, B. M., Jana, S., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., Salgia, R., & Singhal, S. S. (2019). Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy. *Cancer Letters*, 461, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.07.012>

Kubiliūtė, R., Šulskytė, I., Daniūnaitė, K., Daugelavičius, R., & Jarmalaitė, S. (2016). Molecular features of doxorubicin-resistance development in colorectal cancer CX-1 cell line. *Medicina* (Kaunas, Lithuania), 52(5), 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2016.09.003>

Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K.-E., Hee Kim, M., Davidson, B. L., Kyung Lee, S., Shankar, P., & Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448(7149), 39-43. <https://doi.org/10.1038/nature05901>

Lai, P. B. S., Chi, T.-Y., & Chen, G. G. (2007). Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(2), 387-393. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0571-1>

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

Lee, E.-R., Kim, J.-Y., Kang, Y.-J., Ahn, J.-Y., Kim, J.-H., Kim, B.-W., Choi, H.-Y., Jeong, M.-Y., & Cho, S.-G. (2006). Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(9), 958-968. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.06.006>

Lei, S., Fan, P., Wang, M., Zhang, C., Jiang, Y., Huang, S., Fang, M., He, Z., & Wu, A. (2020). Elevated estrogen receptor β expression in triple negative breast cancer cells is associated with sensitivity to doxorubicin by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(2), 1630-1636. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8809>

Leisegang, M. S., Fork, C., Josipovic, I., Richter, F. M., Preussner, J., Hu, J., Miller, M. J., Epah, J., Hofmann, P., Günther, S., Moll, F., Valasarajan, C., Heidler, J., Ponomareva, Y., Freiman, T. M., Maegdefessel, L., Plate, K. H., Mittelbronn, M., Uchida, S., ... Brandes, R. P. (2017). Long Noncoding RNA MANTIS Facilitates Endothelial Angiogenic Function. *Circulation*, 136(1), 65-79. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026991>

Lennox, K. A., & Behlke, M. A. (2016). Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 44(2), 863-877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1206>

Li, W.-J., Zhong, S.-L., Wu, Y.-J., Xu, W.-D., Xu, J.-J., Tang, J.-H., & Zhao, J.-H. (2013). Systematic expression analysis of genes related to multidrug-resistance in isogenic docetaxel- and adriamycin-resistant breast cancer cell lines. *Molecular Biology Reports*, 40(11), 6143-6150. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2725-x>

Li, X., Lu, Y., Liang, K., Liu, B., & Fan, Z. (2005). Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 7(5), R589-597. <https://doi.org/10.1186/bcr1259>

- Li, X., Wu, Y., Liu, A., & Tang, X. (2016). Long non-coding RNA UCA1 enhances tamoxifen resistance in breast cancer cells through a miR-18a-HIF1 α feedback regulatory loop. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(11), 14733-14743. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5348-8>
- Li, Y., Ma, H.-Y., Hu, X.-W., Qu, Y.-Y., Wen, X., Zhang, Y., & Xu, Q.-Y. (2020). LncRNA H19 promotes triple-negative breast cancer cells invasion and metastasis through the p53/TNFAIP8 pathway. *Cancer Cell International*, 20(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01261-4>
- Li, Y., Wang, B., Lai, H., Li, S., You, Q., Fang, Y., Li, Q., & Liu, Y. (2017). Long non-coding RNA CRALA is associated with poor response to chemotherapy in primary breast cancer. *Thoracic Cancer*, 8(6), 582-591. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12487>
- Li, Z., Qian, J., Li, J., & Zhu, C. (2019). Knockdown of lncRNA - HOTAIR downregulates the drug- resistance of breast cancer cells to doxorubicin via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7629>
- Li, Z., Yu, D., Li, H., Lv, Y., & Li, S. (2019a). Long non - coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21 axis and the PI3K/AKT signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 54(3), 1033-1042. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4679>
- Li, Z., Yu, D., Li, H., Lv, Y., & Li, S. (2019b). Long non - coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21 axis and the PI3K/AKT signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 54(3), 1033-1042. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4679>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liang, X., Qi, M., Wu, R., Liu, A., Chen, D., Tang, L., Chen, J., Hu, X., Li, W., Zhan, L., & Shao, C. (2018). Long non-coding RNA CUDR promotes malignant phenotypes in pancreatic ductal adenocarcinoma via activating AKT and ERK signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 53(6), 2671-2682. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4574>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. (2020). Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Liau, S. L., Connell, P. P., & Weichselbaum, R. R. (2013). New paradigms and future challenges in radiation oncology: An update of biological targets and technology. *Science Translational Medicine*, 5(173), 173sr2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005148>
- Liedtke, C., Cardone, L., Tordai, A., Yan, K., Gomez, H. L., Figureoa, L. J. B., Hubbard, R. E., Valero, V., Souchon, E. A., Symmans, W. F., Hortobagyi, G. N., Bardelli, A., & Pusztai, L. (2008). PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), R27. <https://doi.org/10.1186/bcr1984>
- Linders, A. N., Dias, I. B., López Fernández, T., Tocchetti, C. G., Bommer, N., & Van der Meer, P. (2024). A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *Npj Aging*, 10(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00135-7>
- Linders, A. N., Dias, I. B., Ovchinnikova, E. S., Vermeer, M. C. S. C., Hoes, M. F., Markousis Mavrogenis, G., Deiman, F. E., Arevalo Gomez, K. F., Bliley, J. M., Nehme, J., Vink, A., Gietema, J., de Boer, R. A., Westenbrink, D., Sillje, H. H. W., Hilfiker-Kleiner, D., van Laake, L. W., Feinberg, A.

- W., Demaria, M., ... van der Meer, P. (2023). Evaluation of Senescence and Its Prevention in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Using Dynamic Engineered Heart Tissues. *JACC. CardioOncology*, 5(3), 298-315. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.03.012>
- Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., Zeng, M., & Song, E. (2015). A cytoplasmic NF- κ B interacting long noncoding RNA blocks I κ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 27(3), 370-381. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.004>
- Liu, C., Jiang, F., Zhang, X., & Xu, X. (2020). Long Non-Coding RNA UCA1 Modulates Paclitaxel Resistance in Breast Cancer via miR-613/CDK12 Axis. *Cancer Management and Research*, Volume 12, 2777-2788. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S241969>
- Liu, H., Wang, G., Yang, L., Qu, J., Yang, Z., & Zhou, X. (2016). Knockdown of Long Non-Coding RNA UCA1 Increases the Tamoxifen Sensitivity of Breast Cancer Cells through Inhibition of Wnt/ β -Catenin Pathway. *PloS One*, 11(12), e0168406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168406>
- Liu, L., Zhang, Y., & Lu, J. (2020). The roles of long noncoding RNAs in breast cancer metastasis. *Cell Death & Disease*, 11(9), 749. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02954-4>
- Liu, Z., Wang, Y., Yuan, S., Wen, F., Liu, J., Zou, L., & Zhang, J. (2021). Regulatory role of long non-coding RNA UCA1 in signaling pathways and its clinical applications (Review). *Oncology Letters*, 21(5), 404. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12665>
- Lo, U.-G., Lee, C.-F., Lee, M.-S., & Hsieh, J.-T. (2017). The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2079. <https://doi.org/10.3390/ijms18102079>
- Loh, C.-Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10), 1118. <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
- Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet (London, England)*, 397(10286), 1750-1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3)
- Lytle, N. K., Barber, A. G., & Reya, T. (2018). Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 18(11), 669-680. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x>
- Mackowiak, S. D., Zauber, H., Bielow, C., Thiel, D., Kutz, K., Calviello, L., Mastrobuoni, G., Rajewsky, N., Kempa, S., Selbach, M., & Obermayer, B. (2015). Extensive identification and analysis of conserved small ORFs in animals. *Genome Biology*, 16(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0742-x>
- Mahner, S., Eulenburg, C., Staehle, A., Wegscheider, K., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., Pfisterer, J., & du Bois, A. (2013). Prognostic impact of the time interval between surgery and chemotherapy in advanced ovarian cancer: Analysis of prospective randomised phase III trials. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(1), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.07.023>
- Marina, N. M., Cochrane, D., Harney, E., Zomorodi, K., Blaney, S., Winick, N., Bernstein, M., & Link, M. P. (2002). Dose escalation and pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil)

in children with solid tumors: A pediatric oncology group study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(2), 413-418.

Márquez-Garbán, D. C., Deng, G., Comin-Anduix, B., Garcia, A. J., Xing, Y., Chen, H.-W., Cheung-Lau, G., Hamilton, N., Jung, M. E., & Pietras, R. J. (2019). Antiestrogens in combination with immune checkpoint inhibitors in breast cancer immunotherapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 193, 105415. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105415>

Marra, A., Viale, G., & Curigliano, G. (2019). Recent advances in triple negative breast cancer: The immunotherapy era. *BMC Medicine*, 17(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1326-5>

Martins-Teixeira, M. B., & Carvalho, I. (2020). Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem*, 15(11), 933-948. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000131>

Mattioli, R., Ilari, A., Colotti, B., Mosca, L., Fazi, F., & Colotti, G. (2023). Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Molecular Aspects of Medicine*, 93, 101205. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205>

Maximov, P. Y., Lee, T. M., & Jordan, V. C. (2013). The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Current Clinical Pharmacology*, 8(2), 135-155. <https://doi.org/10.2174/1574884711308020006>

McKenna, M., McGarrigle, S., & Pidgeon, G. P. (2018). The next generation of PI3K-Akt-mTOR pathway inhibitors in breast cancer cohorts. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1870(2), 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.08.001>

Meade, B. R., & Dowdy, S. F. (2007). Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2-3), 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.004>

Mehrmohamadi, M., Jeong, S. H., & Locasale, J. W. (2017). Molecular features that predict the response to antimetabolite chemotherapies. *Cancer & Metabolism*, 5, 8. <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0170-3>

Meric-Bernstam, F., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(13), 2278-2287. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.0766>

Miladiyah, I., Yuanita, E., Nuryadi, S., Jumina, J., Haryana, S. M., & Mustofa, M. (2020). Synergistic Effect of 1,3,6-Trihydroxy-4,5,7-Trichloroxanthone in Combination with Doxorubicin on B-Cell Lymphoma Cells and Its Mechanism of Action Through Molecular Docking. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 92, 100576. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2020.100576>

Miri, A., Gharechahi, J., Samiei Mosleh, I., Sharifi, K., & Jajarmi, V. (2023). Identification of co-regulated genes associated with doxorubicin resistance in the MCF-7/ADR cancer cell line. *Frontiers in Oncology*, 13, 1135836. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1135836>

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S. C., Stefani, C., & Greabu, M. (2020). PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 173. <https://doi.org/10.3390/ijms22010173>

Mirzaei, S., Abadi, A. J., Gholami, M. H., Hashemi, F., Zabolian, A., Hushmandi, K., Zarrabi, A., Entezari, M., Aref, A. R., Khan, H., Ashrafzadeh, M., & Samarghandian, S. (2021). The

involvement of epithelial-to-mesenchymal transition in doxorubicin resistance: Possible molecular targets. *European Journal of Pharmacology*, 908, 174344. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174344>

Mirzayans, R., Andrais, B., & Murray, D. (2018). Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. *Cancers*, 10(4), 118. <https://doi.org/10.3390/cancers10040118>

Missailidis, S. (Ed.). (2008). *Anticancer therapeutics*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470697047>

Moding, E. J., Kastan, M. B., & Kirsch, D. G. (2013). Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(7), 526-542. <https://doi.org/10.1038/nrd4003>

Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., ... Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(0), S78-S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>

Munkácsy, G., Herman, P., & Györfy, B. (2019). Independent validation of induced overexpression efficiency across 242 experiments shows a success rate of 39%. *Scientific Reports*, 9(1), 343. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36122-8>

Murphree, S. A., Tritton, T. R., Smith, P. L., & Sartorelli, A. C. (1981). Adriamycin-induced changes in the surface membrane of sarcoma 180 ascites cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 649(2), 317-324. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90421-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90421-1)

Nath, A., Cohen, A. L., & Bild, A. H. (2022). ENDORSE: A prognostic model for endocrine therapy in estrogen-receptor-positive breast cancers. *Molecular Systems Biology*, 18(6), e10558. <https://doi.org/10.15252/msb.202110558>

Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 8(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>

Nicoletto, R. E., & Ofner, C. M. (2022). Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 89(3), 285-311. <https://doi.org/10.1007/s00280-022-04400-y>

Nicolini, A., Giardino, R., Carpi, A., Ferrari, P., Anselmi, L., Colosimo, S., Conte, M., Fini, M., Giavaresi, G., Berti, P., & Miccoli, P. (2006). Metastatic breast cancer: An updating. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 60(9), 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.086>

Niemantsverdriet, M., van Goethem, M.-J., Bron, R., Hogewerf, W., Brandenburg, S., Langendijk, J. A., van Luijk, P., & Coppes, R. P. (2012). High and low LET radiation differentially induce normal tissue damage signals. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 83(4), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.057>

Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>

Niknafs, Y. S., Han, S., Ma, T., Speers, C., Zhang, C., Wilder-Romans, K., Iyer, M. K., Pitchiaya, S., Malik, R., Hosono, Y., Prensner, J. R., Poliakov, A., Singhal, U., Xiao, L., Kregel, S., Siebenaler, R. F., Zhao, S. G., Uhl, M., Gawronski, A., ... Feng, F. Y. (2016). The lncRNA landscape of breast cancer

reveals a role for DSCAM-AS1 in breast cancer progression. *Nature Communications*, 7, 12791. <https://doi.org/10.1038/ncomms12791>

Nitiss, J. L., & Beck, W. T. (1996). Antitopoisomerase drug action and resistance. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 32A(6), 958-966. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00056-1](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00056-1)

Noack, A., Gericke, B., von Köckritz-Blickwede, M., Menze, A., Noack, S., Gerhauser, I., Osten, F., Naim, H. Y., & Löscher, W. (2018). Mechanism of drug extrusion by brain endothelial cells via lysosomal drug trapping and disposal by neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), E9590-E9599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719642115>

Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2018). Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 9(3), e1471. <https://doi.org/10.1002/wrna.1471>

Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y., & Lawrence, T. S. (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 876-885. <https://doi.org/10.1038/nrc1953>

O'Brien, S. J., Carter, J. V., Burton, J. F., Oxford, B. G., Schmidt, M. N., Hallion, J. C., & Galandiuk, S. (2018). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer: A systematic review. *International Journal of Cancer*, 142(12), 2501-2511. <https://doi.org/10.1002/ijc.31282>

Ohya, S., Kajikuri, J., Endo, K., Kito, H., Elboray, E. E., & Suzuki, T. (2021). Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa 1.1 as a therapeutic target to overcome chemoresistance in three-dimensional sarcoma spheroid models. *Cancer Science*, 112(9), 3769-3783. <https://doi.org/10.1111/cas.15046>

Okada, Y., Tosaka, A., Nimura, Y., Kikuchi, A., Yoshida, S., & Suzuki, M. (2001). Atypical multidrug resistance may be associated with catalytically active mutants of human DNA topoisomerase II alpha. *Gene*, 272(1-2), 141-148. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00554-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00554-6)

Orre, C., Dieu, X., Guillon, J., Gueguen, N., Ahmadpour, S. T., Dumas, J.-F., Khiati, S., Reynier, P., Lenaers, G., Coqueret, O., Chevrollier, A., Mirebeau-Prunier, D., & Desquirit-Dumas, V. (2021). The Long Non-Coding RNA SAMMSON Is a Regulator of Chemosensitivity and Metabolic Orientation in MCF-7 Doxorubicin-Resistant Breast Cancer Cells. *Biology*, 10(11), 1156. <https://doi.org/10.3390/biology10111156>

Ortega, M. A., Fraile-Martínez, O., Asúnsolo, Á., Buján, J., García-Honduvilla, N., & Coca, S. (2020). Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of Oncology*, 2020, 9258396. <https://doi.org/10.1155/2020/9258396>

Otter, M., Csader, S., Keiser, M., & Oswald, S. (2021). Expression and Functional Contribution of Different Organic Cation Transporters to the Cellular Uptake of Doxorubicin into Human Breast Cancer and Cardiac Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 255. <https://doi.org/10.3390/ijms23010255>

Pachmayr, E., Treese, C., & Stein, U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis—Molecular Biology. *Visceral Medicine*, 33(1), 11-20. <https://doi.org/10.1159/000454696>

Pan, J., Li, X., Wu, W., Xue, M., Hou, H., Zhai, W., & Chen, W. (2016). Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. *Cancer Letters*, 382(1), 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.015>

- Pan, J.-X., Wang, F., & Ye, L.-Y. (2016). Doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition through SEMA 4A in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), 610-614. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.167>
- Pan, X., Hong, X., Li, S., Meng, P., & Xiao, F. (2021). METTL3 promotes adriamycin resistance in MCF-7 breast cancer cells by accelerating pri-microRNA-221-3p maturation in a m6A-dependent manner. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(1), 91-102. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00510-w>
- Panasci, L., Jean-Claude, B. J., Vosilescu, D., Mustafa, A., Damian, S., Damian, Z., Georges, E., Liu, Z., Batist, G., & Leyland-Jones, B. (1996). Sensitization to doxorubicin resistance in breast cancer cell lines by tamoxifen and megestrol acetate. *Biochemical Pharmacology*, 52(7), 1097-1102. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00456-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00456-X)
- Pandey, R. R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-DiNardo, D., & Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation. *Molecular Cell*, 32(2), 232-246. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.022>
- Pang, E., Hu, Y., Chan, K. Y.-Y., Lai, P. B.-S., Squire, J. A., Macgregor, P. F., Beheshti, B., Albert, M., Leung, T. W.-T., & Wong, N. (2005). Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(5), 664-674. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700254>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 212-226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Patel, K. J., Trédan, O., & Tannock, I. F. (2013). Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(1), 127-138. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2176-z>
- Paul, J., & Duerksen, J. D. (1975). Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 9(1), 9-16. <https://doi.org/10.1007/BF01731728>
- Pereg, D., Koren, G., & Lishner, M. (2008). Cancer in pregnancy: Gaps, challenges and solutions. *Cancer Treatment Reviews*, 34(4), 302-312. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.01.002>
- Perez, E. A. (2016). Treatment strategies for advanced hormone receptor-positive and human epidermal growth factor 2-negative breast cancer: The role of treatment order. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 24, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.001>
- Perez-Añorve, I. X., Gonzalez-De la Rosa, C. H., Soto-Reyes, E., Beltran-Anaya, F. O., Del Moral-Hernandez, O., Salgado-Albarran, M., Angeles-Zaragoza, O., Gonzalez-Barrios, J. A., Landero-Huerta, D. A., Chavez-Saldaña, M., Garcia-Carranca, A., Villegas-Sepulveda, N., & Arechaga-Ocampo, E. (2019). New insights into radioresistance in breast cancer identify a dual function of miR-122 as a tumor suppressor and oncomiR. *Molecular Oncology*, 13(5), 1249-1267. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12483>
- Pérez-Tenorio, G., Alkhori, L., Olsson, B., Waltersson, M. A., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L. E., Skoog, L., & Stål, O. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(12), 3577-3584. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1609>

Pinkerton, J. V., & Thomas, S. (2014). Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.011>

Ponnusamy, L., Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2017). Treatment schedule and estrogen receptor-status influence acquisition of doxorubicin resistance in breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 104, 424-433. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.04.020>

Press, M. F., Sauter, G., Buyse, M., Bernstein, L., Guzman, R., Santiago, A., Villalobos, I. E., Eiermann, W., Pienkowski, T., Martin, M., Robert, N., Crown, J., Bee, V., Taupin, H., Flom, K. J., Tabah-Fisch, I., Pauletti, G., Lindsay, M.-A., Riva, A., & Slamon, D. J. (2011). Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: Association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), 859-867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.5644>

Prihantono, null, & Faruk, M. (2021). Breast cancer resistance to chemotherapy: When should we suspect it and how can we prevent it? *Annals of Medicine and Surgery* (2012), 70, 102793. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102793>

Putri, D. D. P., Sarmoko, S., Febriansah, R., Puspitasari, E., Ismiyati, N., & Fitriyanti, A. (2011). MCF-7 Resistant Doxorubicin are Characterized by Lamellapodia, Strong Adhesion on Substrate and P-gp Overexpression. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2(3), 304. <https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev2iss3pp304-309>

Qian, W., Zhu, Y., Wu, M., Guo, Q., Wu, Z., Lobie, P. E., & Zhu, T. (2020). Linc00668 Promotes Invasion and Stem Cell-Like Properties of Breast Cancer Cells by Interaction With SND1. *Frontiers in Oncology*, 10, 88. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00088>

Qui, H., & Wang, Y. (2009). Exploring DNA-binding proteins with in vivo chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 8(4), 1983-1991. <https://doi.org/10.1021/pr8009319>

Radhakrishnan, R., & Kowluru, R. A. (2021). Long Noncoding RNA MALAT1 and Regulation of the Antioxidant Defense System in Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, 70(1), 227-239. <https://doi.org/10.2337/db20-0375>

Raimondi, M. V., Randazzo, O., La Franca, M., Barone, G., Vignoni, E., Rossi, D., & Collina, S. (2019). DHFR Inhibitors: Reading the Past for Discovering Novel Anticancer Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1140. <https://doi.org/10.3390/molecules24061140>

Rainey, M. D., Charlton, M. E., Stanton, R. V., & Kastan, M. B. (2008). Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Research*, 68(18), 7466-7474. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0763>

Rephaeli, A., Waks-Yona, S., Nudelman, A., Tarasenko, I., Tarasenko, N., Phillips, D. R., Cutts, S. M., & Kessler-Icekson, G. (2007). Anticancer prodrugs of butyric acid and formaldehyde protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *British Journal of Cancer*, 96(11), 1667-1674. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603781>

Reuter, G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: Composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2(2), 43-53.

Rimawi, M., Ferrero, J.-M., de la Haba-Rodriguez, J., Poole, C., De Placido, S., Osborne, C. K., Hegg, R., Easton, V., Wohlfarth, C., Arpino, G., & PERTAIN Study Group. (2018). First-Line

Trastuzumab Plus an Aromatase Inhibitor, With or Without Pertuzumab, in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and Hormone Receptor-Positive Metastatic or Locally Advanced Breast Cancer (PERTAIN): A Randomized, Open-Label Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(28), 2826-2835. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.7863>

Ringborg, U., Bergqvist, D., Brorsson, B., Cavallin-Ståhl, E., Ceberg, J., Einhorn, N., Frödin, J.-E., Järhult, J., Lamnevik, G., Lindholm, C., Littbrand, B., Norlund, A., Nylén, U., Rosén, M., Svensson, H., & Möller, T. R. (2003). The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001—Summary and conclusions. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 42(5-6), 357-365. <https://doi.org/10.1080/02841860310010826>

Rivera, E., & Gomez, H. (2010). Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: The evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Research*, 12(S2), S2. <https://doi.org/10.1186/bcr2573>

Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *The New England Journal of Medicine*, 377(6), 523-533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

Rodemann, H. P., & Blaese, M. A. (2007). Responses of normal cells to ionizing radiation. *Seminars in Radiation Oncology*, 17(2), 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2006.11.005>

Roger, P., Sahla, M. E., Mäkelä, S., Gustafsson, J. A., Baldet, P., & Rochefort, H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Research*, 61(6), 2537-2541.

Rosanò, L., Cianfrocca, R., Spinella, F., Di Castro, V., Nicotra, M. R., Lucidi, A., Ferrandina, G., Natali, P. G., & Bagnato, A. (2011). Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(8), 2350-2360. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2325>

Ruggiero, A., De Rosa, G., Rizzo, D., Leo, A., Maurizi, P., De Nisco, A., Vendittelli, F., Zuppi, C., Mordente, A., & Riccardi, R. (2013). Myocardial performance index and biochemical markers for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia. *International Journal of Clinical Oncology*, 18(5), 927-933. <https://doi.org/10.1007/s10147-012-0458-9>

Saeidnia, S. (2015). Anticancer Antibiotics. İçinde S. Saeidnia, *New Approaches to Natural Anticancer Drugs* (ss. 51-66). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14027-8_4

Salerno, D., Brogioli, D., Cassina, V., Turchi, D., Beretta, G. L., Seruggia, D., Ziano, R., Zunino, F., & Mantegazza, F. (2010). Magnetic tweezers measurements of the nanomechanical properties of DNA in the presence of drugs. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7089-7099. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq597>

Sambi, M., Bagheri, L., & Szewczuk, M. R. (2019). Current Challenges in Cancer Immunotherapy: Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates. *Journal of Oncology*, 2019, 4508794. <https://doi.org/10.1155/2019/4508794>

- Santos, J. C., Lima, N. D. S., Sarian, L. O., Matheu, A., Ribeiro, M. L., & Derchain, S. F. M. (2018). Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Scientific Reports*, 8(1), 829. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19339-5>
- Saranya, I., Dharshini, V. S., Akshaya, R. L., Subhashini, P. S., & Selvamurugan, N. (2024). Regulatory and therapeutic implications of competing endogenous RNA network in breast cancer progression and metastasis: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266(Pt 2), 131075. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131075>
- Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, 68(4), 989-997. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2017>
- Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1), 3-29. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00169-2)
- Schneble, E., Jinga, D.-C., & Peoples, G. (2015). Breast Cancer Immunotherapy. *Maedica*, 10(2), 185-191.
- Sebastian-delaCruz, M., Gonzalez-Moro, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Castellanos-Rubio, A., & Santin, I. (2021). The Role of lncRNAs in Gene Expression Regulation through mRNA Stabilization. *Non-Coding RNA*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010003>
- Sert, P. İ., & Tüylü Küçükkilinç, Z. T. (2022). Meme Kanseri Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.959879>
- Serviss, J. T., Johnsson, P., & Grandér, D. (2014). An emerging role for long non-coding RNAs in cancer metastasis. *Frontiers in Genetics*, 5, 234. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00234>
- Shang, C., Guo, Y., Zhang, J., & Huang, B. (2016). Silence of long noncoding RNA UCA1 inhibits malignant proliferation and chemotherapy resistance to adriamycin in gastric cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(5), 1061-1067. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3029-3>
- Shati, A. A. (2020). Doxorubicin-induces NFAT/Fas/FasL cardiac apoptosis in rats through activation of calcineurin and P38 MAPK and inhibition of mTOR signalling pathways. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 47(4), 660-676. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13225>
- Shen, H., Mittal, V., Ferrari, M., & Chang, J. (2013). Delivery of gene silencing agents for breast cancer therapy. *Breast Cancer Research*, 15(3), 205. <https://doi.org/10.1186/bcr3413>
- Shi, X., Valizadeh, A., Mir, S. M., Asemi, Z., Karimian, A., Majidina, M., Safa, A., & Yosefi, B. (2020). miRNA-29a reverses P-glycoprotein-mediated drug resistance and inhibits proliferation via up-regulation of PTEN in colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 880, 173138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173138>
- Shi, Y., Bieerkehazhi, S., & Ma, H. (2018). Next-generation proteasome inhibitor oprozomib enhances sensitivity to doxorubicin in triple-negative breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(5), 2347-2355.
- Shi, Y., Li, J., Liu, Y., Ding, J., Fan, Y., Tian, Y., Wang, L., Lian, Y., Wang, K., & Shu, Y. (2015). The long noncoding RNA SPRY4-IT1 increases the proliferation of human breast cancer cells by upregulating ZNF703 expression. *Molecular Cancer*, 14, 51. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0318-0>

- Shukla, A., Hillegass, J. M., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L., Vacek, P. M., Pass, H. I., Carbone, M., Testa, J. R., & Mossman, B. T. (2010). Blocking of ERK1 and ERK2 sensitizes human mesothelioma cells to doxorubicin. *Molecular Cancer*, 9, 314. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-314>
- Si, X., Zang, R., Zhang, E., Liu, Y., Shi, X., Zhang, E., Shao, L., Li, A., Yang, N., Han, X., Pan, B., Zhang, Z., Sun, L., & Sun, Y. (2016). LncRNA H19 confers chemoresistance in ER α -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget*, 7(49), 81452-81462. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13263>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). *Cancer Statistics, 2017*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). *Cancer statistics, 2020*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., & Beckman, B. (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: Insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 228(9), 995-1003. <https://doi.org/10.1177/153537020322800903>
- Slingerland, M., Guchelaar, H.-J., & Gelderblom, H. (2012). Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discovery Today*, 17(3-4), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.015>
- Smith, L., Watson, M. B., O'Kane, S. L., Drew, P. J., Lind, M. J., & Cawkwell, L. (2006). The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 2115-2120. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0190>
- Sokolosky, M. L., Stadelman, K. M., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Martelli, A. M., Stivala, F., Libra, M., Nicoletti, F., Drobot, L. B., Franklin, R. A., Steelman, L. S., & McCubrey, J. A. (2011). Involvement of Akt-1 and mTOR in sensitivity of breast cancer to targeted therapy. *Oncotarget*, 2(7), 538-550. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.302>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
- Spencer, D. M. S., Bilardi, R. A., Koch, T. H., Post, G. C., Nafie, J. W., Kimura, K.-I., Cutts, S. M., & Phillips, D. R. (2008). DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 638(1-2), 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.005>
- Spoerke, J. M., Gendreau, S., Walter, K., Qiu, J., Wilson, T. R., Savage, H., Aimi, J., Derynck, M. K., Chen, M., Chan, I. T., Amler, L. C., Hampton, G. M., Johnston, S., Krop, I., Schmid, P., & Lackner, M. R. (2016). Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nature Communications*, 7, 11579. <https://doi.org/10.1038/ncomms11579>
- Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 278, 119527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(2), 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>

- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 7(3), 165-168. <https://doi.org/10.1038/nrc2072>
- Suicmez, M., Namalir, G., Konus, M., & Ozdil, H. (2024). Silencing of lncRNA UCA1 Reverses Doxorubicin Resistance of Breast Cancer Through Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *ChemistrySelect*, 9(20), e202400819. <https://doi.org/10.1002/slct.202400819>
- Sun, M.-D., Zheng, Y.-Q., Wang, L.-P., Zhao, H.-T., & Yang, S. (2018). Long noncoding RNA UCA1 promotes cell proliferation, migration and invasion of human leukemia cells via sponging miR-126. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(8), 2233-2245. https://doi.org/10.26355/eurev_201804_14809
- Sun, X., Huang, T., Liu, Z., Sun, M., & Luo, S. (2019). LncRNA SNHG7 contributes to tumorigenesis and progression in breast cancer by interacting with miR-34a through EMT initiation and the Notch-1 pathway. *European Journal of Pharmacology*, 856, 172407. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172407>
- Swain, S. M., Whaley, F. S., & Ewer, M. S. (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. *Cancer*, 97(11), 2869-2879. <https://doi.org/10.1002/cncr.11407>
- Sweta, S., Dudnakova, T., Sudheer, S., Baker, A. H., & Bhushan, R. (2019). Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 228. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00228>
- Szczęśniak, M. W., & Makałowska, I. (2016). lncRNA-RNA Interactions across the Human Transcriptome. *PloS One*, 11(3), e0150353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150353>
- Tada, Y., Wada, M., Migita, T., Nagayama, J., Hinoshita, E., Mochida, Y., Maehara, Y., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., & Naito, S. (2002). Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *International Journal of Cancer*, 98(4), 630-635. <https://doi.org/10.1002/ijc.10246>
- Tan, A. C., Bagley, S. J., Wen, P. Y., Lim, M., Platten, M., Colman, H., Ashley, D. M., Wick, W., Chang, S. M., Galanis, E., Mansouri, A., Khagi, S., Mehta, M. P., Heimberger, A. B., Puduvalli, V. K., Reardon, D. A., Sahebjam, S., Simes, J., Antonia, S. J., ... Khasraw, M. (2021). Systematic review of combinations of targeted or immunotherapy in advanced solid tumors. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(7), e002459. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002459>
- Tang, J., Li, Y., Sang, Y., Yu, B., Lv, D., Zhang, W., & Feng, H. (2018). LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/beta-catenin signaling. *Oncogene*, 37(34), 4723-4734. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0310-4>
- Tang, Y., Wang, J., Lian, Y., Fan, C., Zhang, P., Wu, Y., Li, X., Xiong, F., Li, X., Li, G., Xiong, W., & Zeng, Z. (2017). Linking long non-coding RNAs and SWI/SNF complexes to chromatin remodeling in cancer. *Molecular Cancer*, 16(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0612-0>
- Tao, S., Hou, Y., Diao, L., Hu, Y., Xu, W., Xie, S., & Xiao, Z. (2023). Long noncoding RNA study: Genome-wide approaches. *Genes & Diseases*, 10(6), 2491-2510. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.10.024>
- Tazzari, P. L., Cappellini, A., Ricci, F., Evangelisti, C., Papa, V., Grafone, T., Martinelli, G., Conte, R., Cocco, L., McCubrey, J. A., & Martelli, A. M. (2007). Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction

network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia*, 21(3), 427-438. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404523>

Thompson, E. W., Newgreen, D. F., & Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: A role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Research*, 65(14), 5991-5995; discussion 5995. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0616>

Torino, F., Barnabei, A., Paragliola, R., Baldelli, R., Appetecchia, M., & Corsello, S. M. (2013). Thyroid dysfunction as an unintended side effect of anticancer drugs. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 23(11), 1345-1366. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0241>

Toulany&Rodemann. (2013). Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway. *Translational Cancer Research*, 2(3), 190-202. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.09>

Tournilhac, O., Cazin, B., Leprêtre, S., Diviné, M., Maloum, K., Delmer, A., Grosbois, B., Feugier, P., Maloisel, F., Villard, F., Villemagne, B., Bastit, D., Belhadj, K., Azar, N., Michallet, M., Manhès, G., & Travade, P. (2004). Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 103(1), 363-365. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1449>

Traphagen, N. A., Hosford, S. R., Jiang, A., Marotti, J. D., Brauer, B. L., Demidenko, E., & Miller, T. W. (2021). High estrogen receptor alpha activation confers resistance to estrogen deprivation and is required for therapeutic response to estrogen in breast cancer. *Oncogene*, 40(19), 3408-3421. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01782-w>

Tsou, S.-H., Chen, T.-M., Hsiao, H.-T., & Chen, Y.-H. (2015). A Critical Dose of Doxorubicin Is Required to Alter the Gene Expression Profiles in MCF-7 Cells Acquiring Multidrug Resistance. *PLOS ONE*, 10(1), e0116747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116747>

Tuo, Y.-L., Li, X.-M., & Luo, J. (2015). Long noncoding RNA UCA1 modulates breast cancer cell growth and apoptosis through decreasing tumor suppressive miR-143. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(18), 3403-3411.

van der Zanden, S. Y., Qiao, X., & Neefjes, J. (2021). New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS Journal*, 288(21), 6095-6111. <https://doi.org/10.1111/febs.15583>

Van Kuijk, K., Nagenborg, J., & Sluimer, J. C. (2022). Effective Transfection and Gene Silencing of Primary Murine Macrophages with Small Interfering RNA. In D. Ramji (Ed.), *Atherosclerosis* (C. 2419, ss. 125-132). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1924-7_8

Varela-López, A., Battino, M., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., Collado, R., & Quiles, J. L. (2019). An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110834. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110834>

Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. M., & Durkacz, B. W. (2003). Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Research*, 63(18), 6008-6015.

- Visone, V., Szabó, I., Perugino, G., Hudecz, F., Bánóczy, Z., & Valenti, A. (2020). Topoisomerases inhibition and DNA binding mode of daunomycin-oligoarginine conjugate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1363-1371. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1780226>
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 489-501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis, H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., & Muggia, F. M. (1979). Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine*, 91(5), 710-717. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-91-5-710>
- Voulgari, A., & Pintzas, A. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1796(2), 75-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.002>
- Vu, L. D., Gevaert, K., & De Smet, I. (2018). Protein Language: Post-Translational Modifications Talking to Each Other. *Trends in Plant Science*, 23(12), 1068-1080. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.004>
- Wallin, J. J., Guan, J., Prior, W. W., Edgar, K. A., Kassees, R., Sampath, D., Belvin, M., & Friedman, L. S. (2010). Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer. *Science Translational Medicine*, 2(48), 48ra66. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000630>
- Wang, F., Li, X., Xie, X., Zhao, L., & Chen, W. (2008). UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Letters*, 582(13), 1919-1927. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.012>
- Wang, F., Ying, H.-Q., He, B.-S., Pan, Y.-Q., Deng, Q.-W., Sun, H.-L., Chen, J., Liu, X., & Wang, S.-K. (2015). Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway. *Oncotarget*, 6(10), 7899-7917. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3219>
- Wang, H., Guan, Z., He, K., Qian, J., Cao, J., & Teng, L. (2017). LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget*, 8(38), 64638-64650. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18344>
- Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I. A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I. B., & Tiedge, H. (2002). Dendritic BC1 RNA: Functional role in regulation of translation initiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(23), 10232-10241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10232.2002>
- Wang, H., Vo, T., Hajar, A., Li, S., Chen, X., Parissenti, A. M., Brindley, D. N., & Wang, Z. (2014). Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 14(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-37>
- Wang, J., Ye, C., Liu, J., & Hu, Y. (2018). UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABCB1 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(4), 1034-1040. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.104>
- Wang, N., Fan, H., Fu, S., Li, S., Zhou, B., Jin, Q., & You, Z. (2022). Long noncoding RNA UCA1 promotes carboplatin resistance in retinoblastoma cells by acting as a ceRNA of miR-206. *American Journal of Cancer Research*, 12(5), 2160-2172.
- Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q., & Cao, X. (2014). The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6181), 310-313. <https://doi.org/10.1126/science.1251456>

- Wang, W., Hu, W., Wang, Y., An, Y., Song, L., Shang, P., & Yue, Z. (2020). Long non-coding RNA UCA1 promotes malignant phenotypes of renal cancer cells by modulating the miR-182-5p/DLL4 axis as a ceRNA. *Molecular Cancer*, 19(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1132-x>
- Wang, W., Min, L., Qiu, X., Wu, X., Liu, C., Ma, J., Zhang, D., & Zhu, L. (2021). Biological Function of Long Non-coding RNA (LncRNA) Xist. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 645647. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645647>
- Wang, X., Gong, Y., Jin, B., Wu, C., Yang, J., Wang, L., Zhang, Z., & Mao, Z. (2014). Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 induces cell replication by inhibiting BRG1 in 5637 cells. *Oncology Reports*, 32(3), 1281-1290. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3309>
- Wang, X.-S., Zhang, Z., Wang, H.-C., Cai, J.-L., Xu, Q.-W., Li, M.-Q., Chen, Y.-C., Qian, X.-P., Lu, T.-J., Yu, L.-Z., Zhang, Y., Xin, D.-Q., Na, Y.-Q., & Chen, W.-F. (2006). Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(16), 4851-4858. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0134>
- Wang, Y., Fu, M., Liu, J., Yang, Y., Yu, Y., Li, J., Pan, W., Fan, L., Li, G., Li, X., & Wang, X. (2019). Inhibition of tumor metastasis by targeted daunorubicin and dioscin codelivery liposomes modified with PFV for the treatment of non-small-cell lung cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4071-4090. <https://doi.org/10.2147/IJN.S194304>
- Wang, Y., & Minden, A. (2022a). Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11046. <https://doi.org/10.3390/ijms231911046>
- Wang, Y., & Minden, A. (2022b). Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11046. <https://doi.org/10.3390/ijms231911046>
- Wang, Y., Zhou, P., Li, P., Yang, F., & Gao, X.-Q. (2020). Long non-coding RNA H19 regulates proliferation and doxorubicin resistance in MCF-7 cells by targeting PARP1. *Bioengineered*, 11(1), 536-546. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1761512>
- Wijdeven, R. H., Pang, B., van der Zanden, S. Y., Qiao, X., Blomen, V., Hoogstraat, M., Lips, E. H., Janssen, L., Wessels, L., Brummelkamp, T. R., & Neefjes, J. (2015). Genome-Wide Identification and Characterization of Novel Factors Conferring Resistance to Topoisomerase II Poisons in Cancer. *Cancer Research*, 75(19), 4176-4187. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0380>
- Wind, N. S., & Holen, I. (2011). Multidrug resistance in breast cancer: From in vitro models to clinical studies. *International Journal of Breast Cancer*, 2011, 967419. <https://doi.org/10.4061/2011/967419>
- Wo, L., Zhang, B., You, X., Hu, Y., Gu, Z., Zhang, M., Wang, Q., Lv, Z., & Zhao, H. (2022). Up-regulation of LncRNA UCA1 by TGF- β promotes doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 44(4), 492-499. <https://doi.org/10.1080/08923973.2022.2054428>
- Wu, C., & Luo, J. (2016). Long Non-Coding RNA (lncRNA) Urothelial Carcinoma-Associated 1 (UCA1) Enhances Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells via Inhibiting mTOR Signaling Pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 3860-3867. <https://doi.org/10.12659/msm.900689>

- Wu, D., Tang, S., Ye, R., Li, D., Gu, D., Chen, R., Zhang, H., Sun, J., & Chen, Z. (2021). Case Report: Long-Term Response to Pembrolizumab Combined With Endocrine Therapy in Metastatic Breast Cancer Patients With Hormone Receptor Expression. *Frontiers in Immunology*, 12, 610149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.610149>
- Wu, W., Zhang, S., Li, X., Xue, M., Cao, S., & Chen, W. (2013). Ets-2 Regulates Cell Apoptosis via the Akt Pathway, through the Regulation of Urothelial Cancer Associated 1, a Long Non-Coding RNA, in Bladder Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(9), e73920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073920>
- Wutz, A. (2011). Gene silencing in X-chromosome inactivation: Advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nature Reviews. Genetics*, 12(8), 542-553. <https://doi.org/10.1038/nrg3035>
- Wysocki, P. J. (2009). mTOR in renal cell cancer: Modulator of tumor biology and therapeutic target. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(3), 231-241. <https://doi.org/10.1586/erm.09.8>
- Xia, D., Yang, X., Liu, W., Shen, F., Pan, J., Lin, Y., Du, N., Sun, Y., & Xi, X. (2017). Over-expression of CHAF1A in Epithelial Ovarian Cancer can promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(1), 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.026>
- Xia, P., & Xu, X.-Y. (2015). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: From basic research to clinical application. *American Journal of Cancer Research*, 5(5), 1602-1609.
- Xing, Z., Zhang, M., Liu, J., Liu, G., Feng, K., & Wang, X. (2021). LINC00337 induces tumor development and chemoresistance to paclitaxel of breast cancer by recruiting M2 tumor-associated macrophages. *Molecular Immunology*, 138, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.07.009>
- Xu, C.-G., Yang, M.-F., Ren, Y.-Q., Wu, C.-H., & Wang, L.-Q. (2016). Exosomes mediated transfer of lncRNA UCA1 results in increased tamoxifen resistance in breast cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(20), 4362-4368.
- Xu, L., Chen, Y., Mayakonda, A., Koh, L., Chong, Y. K., Buckley, D. L., Sandanaraj, E., Lim, S. W., Lin, R. Y.-T., Ke, X.-Y., Huang, M.-L., Chen, J., Sun, W., Wang, L.-Z., Goh, B. C., Dinh, H. Q., Kappei, D., Winter, G. E., Ding, L.-W., ... Koeffler, H. P. (2018). Targetable BET proteins- and E2F1-dependent transcriptional program maintains the malignancy of glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22), E5086-E5095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712363115>
- Xu, Y., Yao, Y., Leng, K., Li, Z., Qin, W., Zhong, X., Kang, P., Wan, M., Jiang, X., & Cui, Y. (2017). Long non-coding RNA UCA1 indicates an unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis via regulating AKT/GSK-3 β signaling pathway in cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 8(56), 96203-96214. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21884>
- Xue, M., Chen, W., & Li, X. (2016). Urothelial cancer associated 1: A long noncoding RNA with a crucial role in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(7), 1407-1419. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2042-y>
- Xue, M., Zhang, K., Mu, K., Xu, J., Yang, H., Liu, Y., Wang, B., Wang, Z., Li, Z., Kong, Q., Li, X., Wang, H., Zhu, J., & Zhuang, T. (2019). Regulation of estrogen signaling and breast cancer proliferation by an ubiquitin ligase TRIM56. *Oncogenesis*, 8(5), 30. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0139-x>

- Yang, F., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2013). Doxorubicin enhances nucleosome turnover around promoters. *Current Biology: CB*, 23(9), 782-787. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.043>
- Yang, H., Lv, X., Li, X., Mao, L., Niu, Z., Wang, T., Zhuang, T., & Huang, Q. (2021). ZNF213 Facilitates ER Alpha Signaling in Breast Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 638751. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.638751>
- Yang, H., Yu, N., Xu, J., Ding, X., Deng, W., Wu, G., Li, X., Hou, Y., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, M., Yu, S., Wang, B., Li, X., Niu, G., Wang, H., Zhu, J., & Zhuang, T. (2018). SMURF1 facilitates estrogen receptor α signaling in breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 37(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0672-z>
- Yang, J., Guo, W., Wang, L., Yu, L., Mei, H., Fang, S., Chen, A., Liu, Y., Xia, K., & Liu, G. (2017). Notch signaling is important for epithelial-mesenchymal transition induced by low concentrations of doxorubicin in osteosarcoma cell lines. *Oncology Letters*, 13(4), 2260-2268. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5708>
- Yang, Y.-T., Wang, Y.-F., Lai, J.-Y., Shen, S.-Y., Wang, F., Kong, J., Zhang, W., & Yang, H.-Y. (2016). Long non-coding RNA UCA1 contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma by regulating the WNT/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Science*, 107(11), 1581-1589. <https://doi.org/10.1111/cas.13058>
- Yao, F., Wang, Q., & Wu, Q. (2019). The prognostic value and mechanisms of lncRNA UCA1 in human cancer. *Cancer Management and Research*, 11, 7685-7696. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S200436>
- Yao, R.-W., Wang, Y., & Chen, L.-L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*, 21(5), 542-551. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>
- Ye, P., Feng, L., Shi, S., & Dong, C. (2022). The Mechanisms of lncRNA-Mediated Multidrug Resistance and the Clinical Application Prospects of lncRNAs in Breast Cancer. *Cancers*, 14(9), 2101. <https://doi.org/10.3390/cancers14092101>
- Yeasmin, F., Yada, T., & Akimitsu, N. (2018). Micropeptides Encoded in Transcripts Previously Identified as Long Noncoding RNAs: A New Chapter in Transcriptomics and Proteomics. *Frontiers in Genetics*, 9, 144. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00144>
- Yndestad, S., Austreid, E., Svanberg, I. R., Knappskog, S., Lønning, P. E., & Eikesdal, H. P. (2017). Activation of Akt characterizes estrogen receptor positive human breast cancers which respond to anthracyclines. *Oncotarget*, 8(25), 41227-41241. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17167>
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2013). Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *Journal of Molecular Biology*, 425(19), 3723-3730. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.024>
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Martindale, J. L., De, S., Huarte, M., Zhan, M., Becker, K. G., & Gorospe, M. (2012). LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular Cell*, 47(4), 648-655. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.027>
- Young, A. M., Allen, C. E., & Audus, K. L. (2003). Efflux transporters of the human placenta. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1), 125-132. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00174-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00174-6)
- Yu, F.-J., Zheng, J.-J., Dong, P.-H., & Fan, X.-M. (2015). Long non-coding RNAs and hepatocellular carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(1), 13-17. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.429>

- Yu, J., Chen, W., Xie, W., Chen, R., Lin, D., You, W., Ye, W., Zhang, H., Lin, D., & Xu, J. (2021). Silencing of the CrkL gene reverses the doxorubicin resistance of K562/ADR cells through regulating PI3K/Akt/MRP1 signaling. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(8), e23817. <https://doi.org/10.1002/jcla.23817>
- Yu, J., Jin, T., & Zhang, T. (2020). Suppression of Long Non-Coding RNA Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1) Potentiates Cell Apoptosis and Drug Sensitivity to Taxanes and Adriamycin in Breast Cancer. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e922672. <https://doi.org/10.12659/MSM.922672>
- Zahra Azizi. (2022). Meme kanserler hücre hatlarında NEAT1 ekspresyon seviyesinin doxorubicin direnci ile ilişkisinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi.
- Zalberg, J., Hu, X. F., Slater, A., Parisot, J., El-Osta, S., Kantharidis, P., Chou, S. T., & Parkin, J. D. (2000). MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3(2), 66-75. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500394>
- Zhang, L., Li, Y., Wang, Q., Chen, Z., Li, X., Wu, Z., Hu, C., Liao, D., Zhang, W., & Chen, Z.-S. (2020). The PI3K subunits, P110 α and P110 β are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1112-1>
- Zhang, M., Wang, F., Xiang, Z., Huang, T., & Zhou, W. (2020). LncRNA XIST promotes chemoresistance of breast cancer cells to doxorubicin by sponging miR-200c-3p to upregulate ANLN. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(8), 1464-1472. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13307>
- Zhang, M., Wang, Y., Jiang, L., Song, X., Zheng, A., Gao, H., Wei, M., & Zhao, L. (2021). LncRNA CBR3-AS1 regulates of breast cancer drug sensitivity as a competing endogenous RNA through the JNK1/MEK4-mediated MAPK signal pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01844-7>
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.-S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. H. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 18(11), 1639-1642. <https://doi.org/10.1038/nm.2919>
- Zhang, X., Zhu, Y., Wu, J.-D., Zhou, Y., Chen, W., & Gu, W. (2022). Two lncRNAs, MACC1-AS1 and UCA1, co-mediate the expression of multiple mRNAs through interaction with individual miRNAs in breast cancer cells. *Non-Coding RNA Research*, 7(3), 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2022.06.003>
- Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J., & Lee, J. T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5902), 750-756. <https://doi.org/10.1126/science.1163045>
- Zhao, Y., Sun, H., & Wang, H. (2016). Long noncoding RNAs in DNA methylation: New players stepping into the old game. *Cell & Bioscience*, 6, 45. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0109-3>
- Zheng, R., Jia, J., Guan, L., Yuan, H., Liu, K., Liu, C., Ye, W., Liao, Y., Lin, S., & Huang, O. (2020). Long noncoding RNA lnc-LOC645166 promotes adriamycin resistance via NF- κ B/GATA3 axis in breast cancer. *Aging*, 12(10), 8893-8912. <https://doi.org/10.18632/aging.103012>

- Zhou, S., He, Y., Yang, S., Hu, J., Zhang, Q., Chen, W., Xu, H., Zhang, H., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2018). The regulatory roles of lncRNAs in the process of breast cancer invasion and metastasis. *Bioscience Reports*, 38(5), BSR20180772. <https://doi.org/10.1042/BSR20180772>
- Zhou, X., Tan, M., Stone Hawthorne, V., Klos, K. S., Lan, K.-H., Yang, Y., Yang, W., Smith, T. L., Shi, D., & Yu, D. (2004). Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(20), 6779-6788. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0112>
- Zhou, Y., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1999). Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multidrug transporter and phosphatidylcholine flippase. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1450-1459. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1450>
- Zhu, L., Wang, F., Fan, W., Jin, Z., Teng, C., & Zhang, J. (2021). lncRNA NEAT1 promotes the Taxol resistance of breast cancer via sponging the miR-23a-3p-FOXA1 axis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 53(9), 1198-1206. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab098>
- Zhu, M., Liu, C.-C., & Cheng, C. (2013). REACTIN: Regulatory activity inference of transcription factors underlying human diseases with application to breast cancer. *BMC Genomics*, 14, 504. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-504>
- Zhu, Y., Hu, H., Yuan, Z., Zhang, Q., Xiong, H., Hu, Z., Wu, H., Huang, R., Wang, G., & Tang, Q. (2020). LncRNA NEAT1 remodels chromatin to promote the 5-Fu resistance by maintaining colorectal cancer stemness. *Cell Death & Disease*, 11(11), 962. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03164-8>
- Ziauddin, M. F., Hua, D., & Tang, S.-C. (2014). Emerging strategies to overcome resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 33(2-3), 791-807. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9504-6>
- Zou, Z., Zhang, J., Zhang, H., Liu, H., Li, Z., Cheng, D., Chen, J., Liu, L., Ni, M., Zhang, Y., Yao, J., Zhou, J., Fu, J., & Liang, Y. (2014). 3-Methyladenine can depress drug efflux transporters via blocking the PI3K-AKT-mTOR pathway thus sensitizing MDR cancer to chemotherapy. *Journal of Drug Targeting*, 22(9), 839-848. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.936870>

EKLER

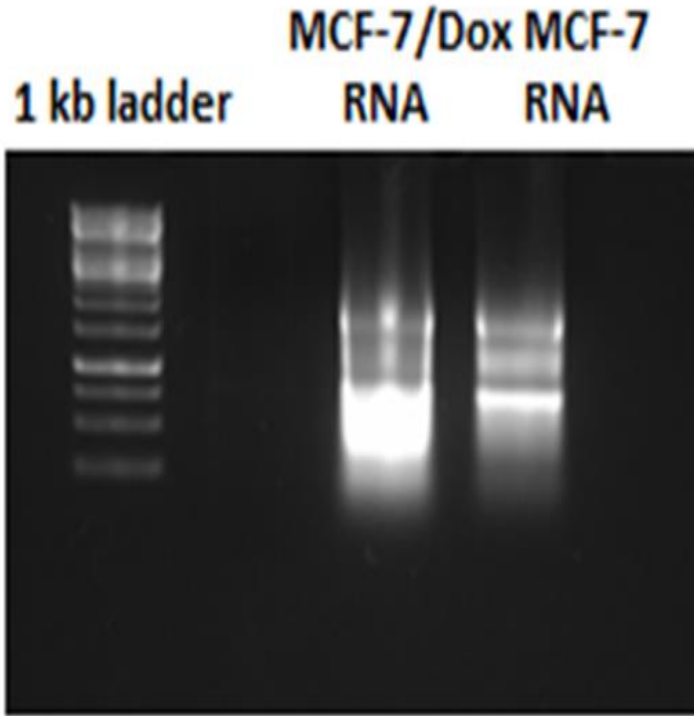


EK-1. RNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve temsili agaroz jel görüntüsü

Aşağıdaki çizelgede yapılan RNA izolasyonlarının spektrofotometrik değerleri yer almaktadır.

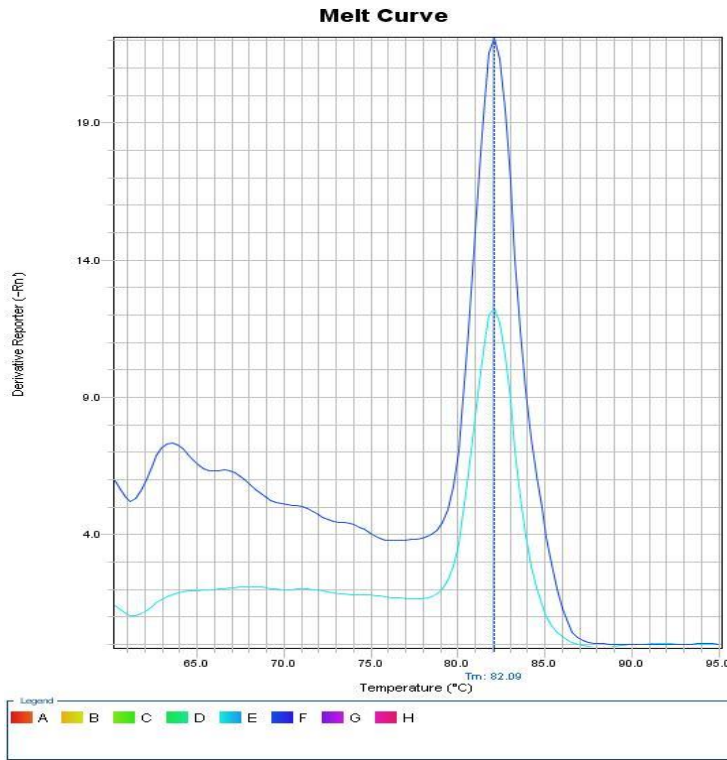
Tablo EK 1-1. Hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık değerleri

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/µl)	A260/230
MCF-7/S	672.964	2.04
MCF-7/Dox	606.184	2.10
MCF-7/S-Negatif	221.32	2.0
kontrol siRNA		
MCF-7/S-siUCA1	151.25	2.0
MCF-7/Dox-Negatif	332.14	1.99
Kontrol siRNA		
MCF-/Dox-siUCA1	265.9	2.0

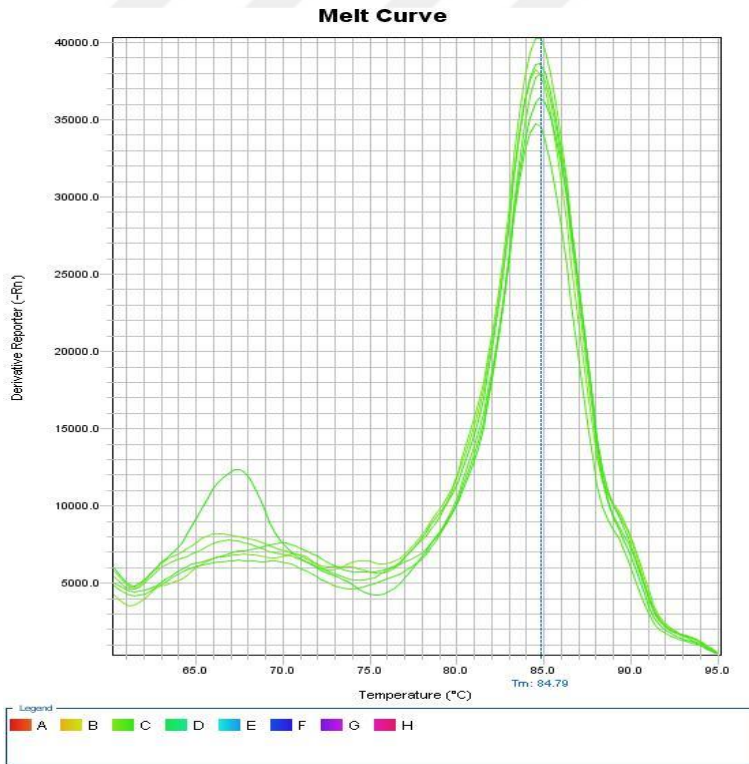


Şekil Ek 1-1. Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin temsili jel görüntüsü (%0,8'lik agaroz jelde yürütme)

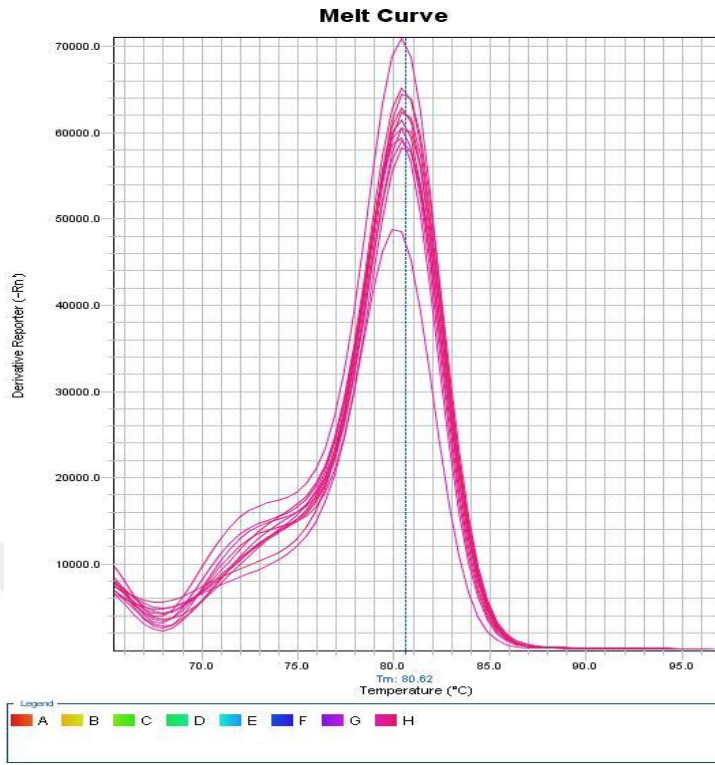
EK-2. Erime eğrisi analiz sonuçları



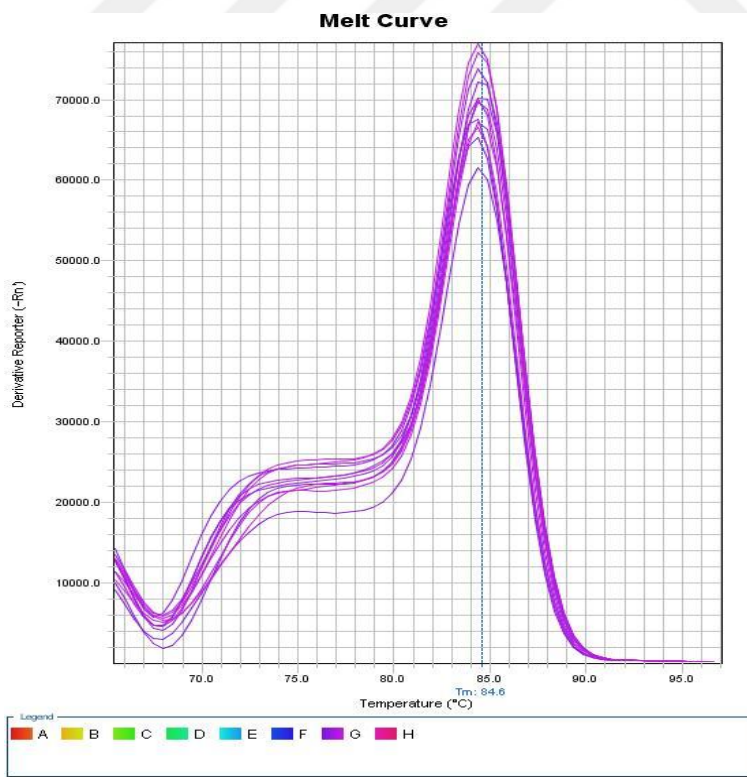
Şekil EK 2-1. Temsili MRP1 geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



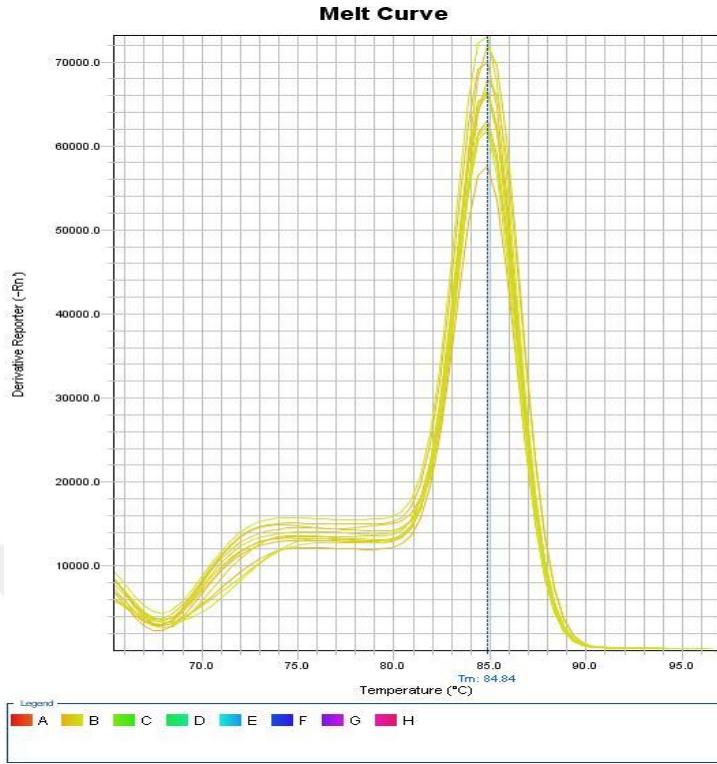
Şekil EK 2-2. Temsili GAPDH geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



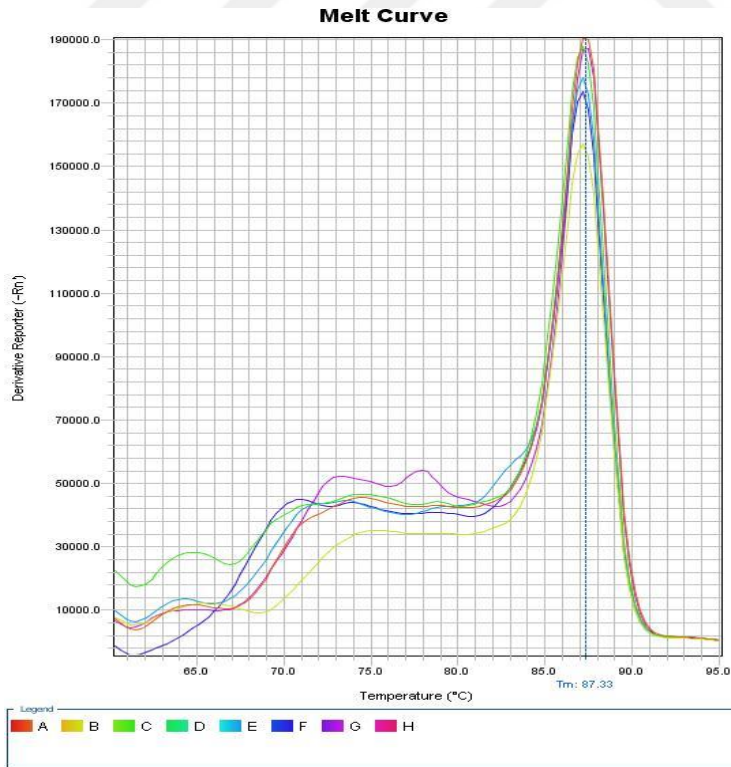
Şekil EK 2-3. Temsili AKT1 geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



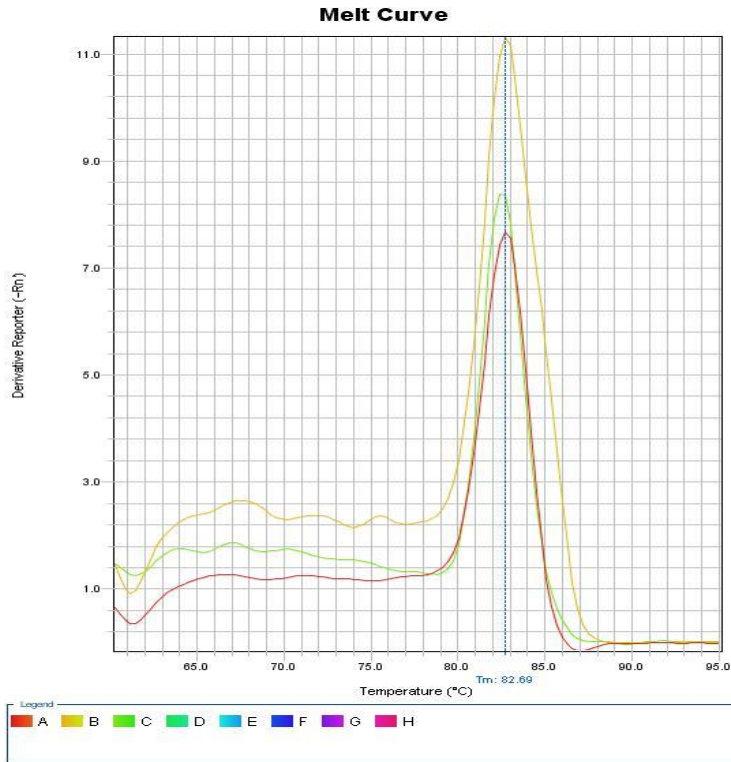
Şekil EK 2-4. Temsili AKT2 geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



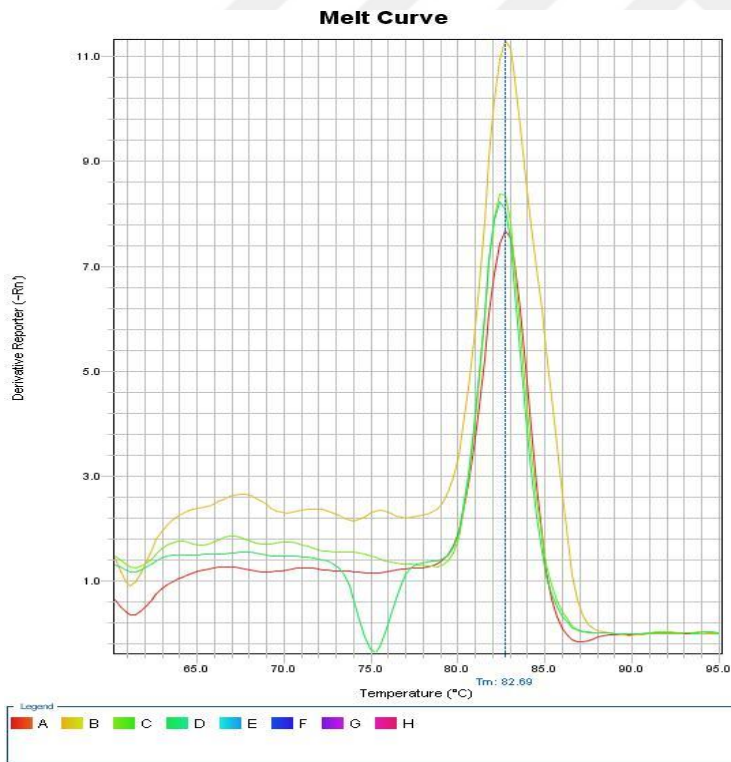
Şekil EK 2-5. Temsili PTEN ve mTOR genleri SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



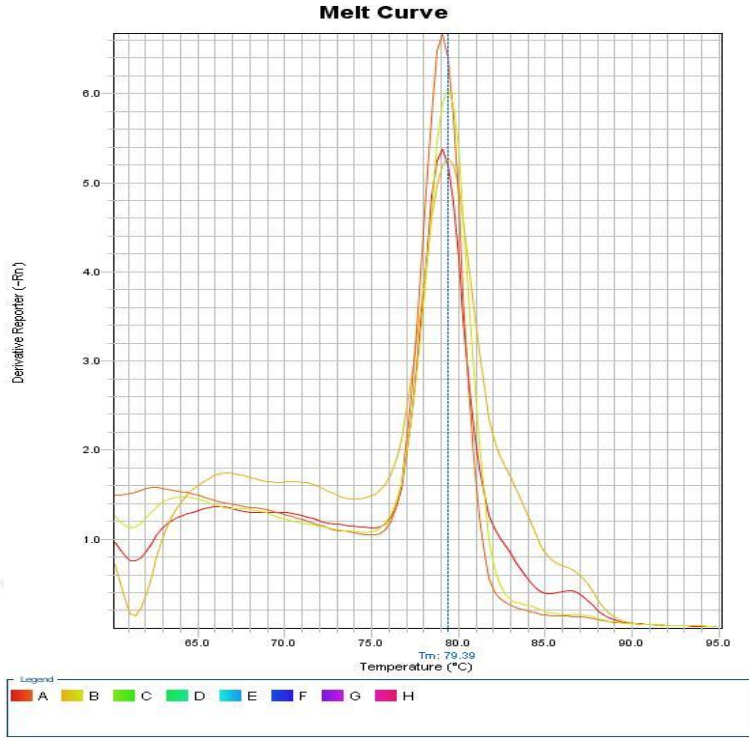
Şekil EK 2-6. Temsili E-KADERİN geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



Şekil EK 2-7. Temsili KLAUDİN-1 geni SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



Şekil EK 2-8. Temsili OKLUDİN ve N-KADERİN genleri SYBER Green Mix erime eğrisi analizi



Şekil EK 2-9. Temsili VİMENTİN ve TWİST genleri SYBER Green Mix erime eğrisi analizi

