

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ YARIŞMASI

PROJE ÖN DEĞERLENDİRME FORMU

TAKIM ADI

ARGENOTYPE

PROJE ADI

Meme Kanserinde Alt Tiplerin Belirlenmesine Yönelik Gen Paneli

BAŞVURU ID

468366

Proje Ön Değerlendirme Formu

1.Proje Özeti:

Meme kanseri; farklı biyolojik davranış gösteren, farklı klinik-patolojik ve moleküler özelliklere sahip, çok sayıda alt tipi bulunan heterojen bir hastalıktır. Dünyada, kadınlar arasında kanser kaynaklı ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır (1). Çok sayıda alt tipi bulunan meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) gibi moleküler belirteçlerin varlığına göre Luminal A, Luminal B, HER2(+) ve **Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK)** olmak üzere 4 moleküler alt tipe ayrılmaktadır (2). ÜNMK ER, PR hormon reseptörleri ve HER2'nin negatif olduğu bir meme kanseri alt tipidir. Agresif bir klinik seyir, kötü prognoz ve yüksek hücre proliferasyonu ile karakterize edilmiştir (3). ÜNMK hastalarının sağ kalım süresi ise diğer meme kanseri alt tiplerine sahip hastalara göre daha kısadır ve 5 yıllık sağ kalım oranı %60'tır (4). ÜNMK'de metastaz sonrası ortalama hayatta kalma süresi sadece 13,3 aydır ve ameliyat sonrası nüks oranı %25'e kadar çıkmaktadır (5). ÜNMK hastalarında nüks süresi 19-40 aydır. ÜNMK hastalarının nüksü takip eden 3 ay içinde ölüm oranı %75'e kadar yükselmektedir (6,7). ÜNMK'nin moleküler heterojenitesi, tedavide uygulanacak klinik tedavi yaklaşımlarını oldukça zora sokmaktadır (8). Lehmann ve ark. (2011) 587 ÜNMK vakasında belirlenen gen ekspresyonu işaretlerini tespit ederek altı farklı moleküler ÜNMK alt tipi belirledi. Bu alt tipler bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör, mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR) şeklinde sınıflandırılmıştır. Ekspresyon analizleri sonucu belirlenen bu alt tipler oldukça heterojen olmakla birlikte, bazı alt gruplar arasındaki yüksek ekspresyon profil benzerlikleri, gruplar arasındaki net ayrımın sağlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu doğrultuda alt tiplerin belirlenmesinde yeni prognostik biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (8,9). Günümüzde, kısıtlı geleneksel prognostik faktörlerin yanında (Lenf nodu metastazı, tümör boyutu, tümör evresi vb.) klinik sonuçları öngörmede daha çok kabul gören çeşitli moleküler testler geliştirilmektedir. Bu testleri, son yıllarda dünya genelinde en sık kullanılan çoklu gen panelleri oluşturmaktadır ve belirli bir biyolojik örnek üzerinde çoklu gen ifadesinin değerlendirilmesini sağlarlar. Günümüzde tanı almış hastaları, uygulanan tedavinin yan etkilerinden korumak, hastalarda nüksü öngörmek ve adjuvan kemoterapinin erken evre meme kanseri hastalarında doğru bir şekilde önerilmesini sağlamak için tasarlanmış; Onkotype DX, MammaPrint, PAM50 / Prosigna, EndoPredict, MapQuant Dx, IHC4, Theros Breast Cancer Index (TBCI), BluePrint ve uPA/PAI-1 gibi birçok çoklu gen paneli bulunmaktadır. Ancak meme kanserinin en agresif alt tipi olan ÜNMK için kullanıma sunulan gen paneli bulunmamaktadır. Günümüzde Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı Kılavuzu (NCCN), Amerika Klinik Onkoloji Derneği (ASCO), Ulusal Sağlık ve Bakım Mükemmeliyeti Enstitüsü (NICE), St. Gallen ve Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) içerisinde de belli kriterler dahilinde gen panelleri önerilmektedir. Meme kanserinde alt tiplerin belirlenmesi için yurt dışından temin edilen patentli gen paneli testlerinin yüksek maliyetli olması hastaların bu testlere ulaşımını daha zor hale getirmekle beraber meme kanseri alt tiplerinde sağkalım oranı en düşük ve kötü prognoz oranı en yüksek alt tipi olan ÜNMK için yaygın bir gen panelinin bulunmaması bu grup için tedavi stratejilerini zora sokmaktadır. Bu bakımdan, ÜNMK hasta grubu için ülkemizde daha düşük

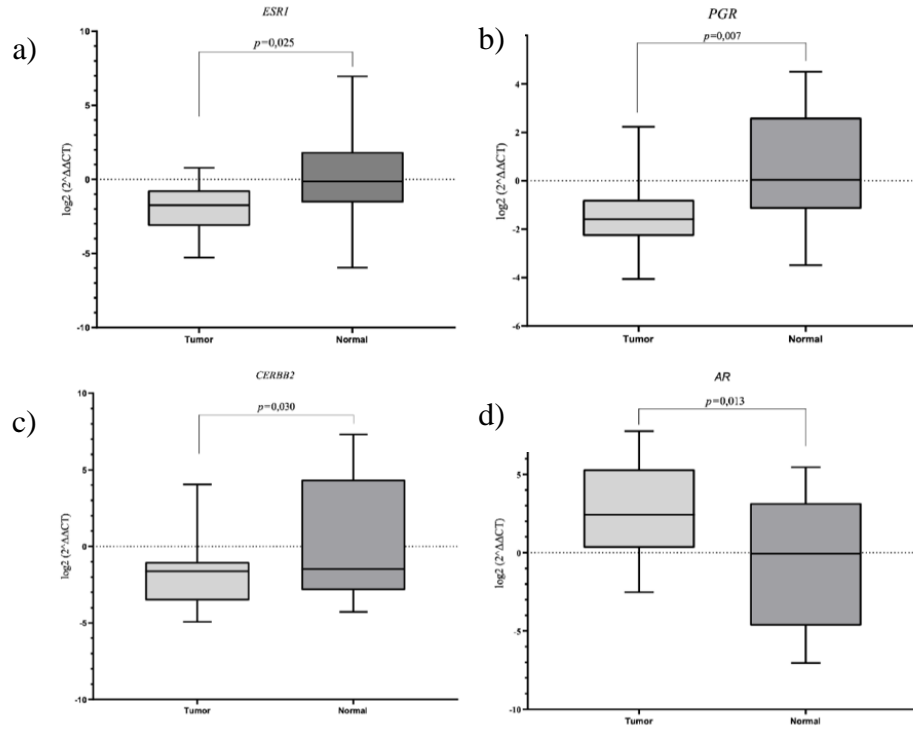
maliyetli, daha kapsamlı bir analizi mümkün kılan bir gen panelinin üretilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda belirlenen 18 genin ve 2 referans genin moleküler düzeyde ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi ve elde edilen bulgulara paralel ÜNMK'nin alt tiplendirmesini sağlayan gen panelinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. Sorun: Yeni tanı konmuş meme kanserli hastalarda prognostik ve prediktif biyobelirteçlerin belirlenmesi, uygulanacak tedavi protokollerinin oluşturulmasında önemli olduğu gibi hastalığın prognozu ve hastanın sağkalımı açısından da oldukça önemlidir. Bu doğrultuda bireye özgü tedavi protokollerinin düzenlenmesinde kullanılabilecek moleküler düzeyde spesifik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Her ne kadar meme kanseri için prognostik ve prediktif biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve onaylanmasında önemli ilerlemeler kaydedilmişse de, bu alanda özellikle testlerin hassasiyetinin geliştirilmesiyle ilgili aralıklar mevcuttur. Günümüzde özellikle meme kanserinde kullanılmaya başlanan, çoklu gen testleri ile ilgili en önemli sorun, testlerin analiz ve değerlendirme aşamalarının yurtdışına bağımlı olarak gerçekleştirilmesidir. Bu durum, zaman kaybına yol açmakla birlikte ülkemizdeki hastalara ait genetik bilginin dış ülkelerle paylaşılmasının önünü açmaktadır. İkinci en önemli sorun ise, testlerin döviz cinsinden fiyatlandırılmasına bağlı olarak ülkemizde sadece maddi durumu uygun olan belirli bir hasta grubunun bu testleri yaptırabiliyor olmasıdır.

3. Çözüm:

Meme kanserinde ÜNMK hastalarında LAR alt grubunun belirlenmesi amacıyla AR, PGR, ESR1, ERBB2 genlerinin ekspresyonun değerlendirildiği daha önceki çalışmamıza ek olarak yeni belirlenen 14 genin ekspresyonları değerlendirilerek ÜNMK'de diğer alt grupların ayrımının sağlanarak alt tiplendirmenin yapılması hedeflenmektedir. Mevcut projede oluşturulması planlanan çoklu gen paneli ile ÜNMK hastalarında BL 1, BL 2, M, ve LAR moleküler alt tiplendirmesinin gen ekspresyon analizi ile ayrımının yapılması, kemoterapiye duyarlılığı ve nüks ihtimalini öngörmeye kullanılabilecek genlerin moleküler düzeyde ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi ve elde edilen bulgulara paralel risk değerlendirmesinin yapılması amaçlanmaktadır. Elde edilecek bireye özgü bulgular ile hastanın alt tipi belirlenerek klinikte bu alt tipe uygun kişiye özgü tedavi protokolleri oluşturulabilecektir.

Çalışmamızın temel amacı; yüksek maliyeti nedeniyle yaygın şekilde kullanılmayan ve yurt dışından temin edilen prognostik testlerin yerine, her hasta için alt tiplendirmenin yapılması sonrası hastalar için kişiye özgü tedavilerin belirlenmesine imkan tanıyacak Türk popülasyonuna özgü ÜNMK hastalarında daha düşük maliyet ve daha kapsamlı sınıflandırmaları mümkün kılan çoklu gen panelinin üretilmesidir.



Şekil 1. ESR1(a), PGR (b), HER2(c) ve AR(d) genlerinin (referans GAPDH) ÜNMK hastalarına ait tümör ve normal dokularındaki mRNA ekspresyon seviyeleri

Ayrıca, geliştirilen yeni çoklu gen paneli, tümörün bireye özgü moleküler sınıflandırmasının yapılarak etkin tedavi protokollerinin geliştirilmesi ile hastanın gereksiz tedavi almasının önüne geçilmesine, hem hasta sağlığında hem de ülkemiz sağlık bütçesinde oluşan zararların azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

Tablo 1. ÜNMK alt tiplerinin belirlenmesinde ekspresyonları değerlendirilecek genler.

ÜNМК ALT TİPİ	GEN(LER)	AÇIKLAMA(LAR)
	IDO1	Anti-tümör bağışıklığının baskılayıcısı olarak işlev görür. Tümörlerin% 50'sinden fazlasında, tümöral, stromal veya endotel hücreleri tarafından eksprese edilir (tümördeki ekspresyon daha kötü bir klinik sonuçla ilişkilidir). İndoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) inhibisyonu, kanser hücrelerinin immün yanıtında rol oynar (10).
	CXCL11	C-X-C motifli kemokin 11 proteinini kodlar. CXC kemokin ailesinin bir üyesi olan C-X-C Motif Chemokine Ligand 11'in meme kanseri ilerlemesini etkileyebileceğini ortaya konulmuştur. <i>CXCL11</i> yaklaşık 8 ila 10 kDa'lık küçük bir boyuta sahiptir ve kemotaksik yanıtı indüklemek için aktive olmuş T hücrelerindeki proteini kodlar ve CXCR3 için baskın ligand olarak kabul

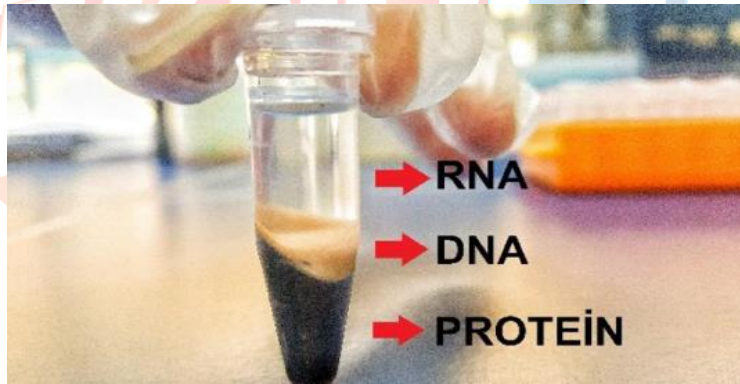
Basal-benzeri immune-activated (BLIA)		edilir. Son yıllarda, <i>CXCL11</i> 'in bir onkogen olduğu bildirilmiştir. Liu ve ark. çalışmalarında, <i>CXCL11</i> 'in sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolu ile ilişkili olduğunu ve meme kanserinde neoadjuvan kemoterapiyi değerlendirmek için bir biyobelirteç olabileceği bulunmuştur (11).
	CXCL13	CXCL13, CXC kemokin ailesindedir. CXCL13'in meme kanseri dokusundaki yüksek ekspresyonu özellikle lenf nodu metastazı, uzak dokulara metastaz, hastalık evresi ile ilişkili olduğu ve ekspresyonunun meme kanseri tanısı ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak işlev görebileceği düşünülmektedir (12).
	LAMP3	Lizozom ile ilişkili membran proteini 3 (LAMP3), otofaji sürecinde yer alan LAMP-protein ailesinin bir üyesidir. Meme kanserinde LAMP3'ün tümör hücresi hipoksisi ile ilişkisi olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (13,14).
Basal-benzeri immune-suppressed (BLIS)	SOX8	Bu gen, embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan SOX (SRY ile ilişkili HMG-box) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesini kodlar. Bu protein hücre proliferasyonu ve tümör büyümesini teşvik eder. Yüksek SOX8 ekspresyonunun ÜNMK patolojisi ile anlamlı korelasyon gösterdiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (15).
	FOXC1	Forkhead box protein C1-Transkripsiyonel koaktivatör görevi görür. Ayrıca meme kanseri hücrelerinde GLI2'nin DNA bağlanma kapasitesini artırarak transkripsiyonel bir koregülatör görevi görür yüksek ekspresyonu, son zamanlarda bazal benzeri meme kanserinin önemli bir prognostik biyobelirteci ve fonksiyonel düzenleyicisi olarak bildirilmiştir (16,17).
	FGFR2	FGFR2 tarafından kodlanan protein, amino asit dizisinin üyeler arasında ve evrim boyunca yüksek oranda korunduğu fibroblast büyüme faktörü reseptör ailesinin bir üyesidir. ÜNMK alt tiplerini karakterize etmek üzere yapılan DNA ve RNA profillemesinde FGFR2 gen amplifikasyonunun ÜNMK alt tiplerinden BLIS ile yüksek ilişkili olduğu saptanmıştır (18).
Mezenkimal (MES)	ADH1B	ADH1B tarafından kodlanan protein, alkol dehidrogenaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim ailesinin üyeleri, etanol, retinol, diğer alifatik alkoller, hidroksisteroidler ve lipit peroksidasyon ürünleri dahil olmak üzere çok çeşitli substratları metabolize eder. Alfa, beta ve gama alt birimlerinin birkaç homo ve heterodimerinden oluşan bu kodlanmış protein, etanol oksidasyonu için yüksek aktivite gösterir ve etanol katabolizmasında önemli bir rol oynar. ADH1B'nin ekspresyon seviyesi meme kanserinde önemli ölçüde azalmış olduğu ve ADH1B'nin yüksek ekspresyon seviyesi, meme kanserinde daha yüksek genel sağkalım oranları ile ilişkili olduğu görülmüştür. ADH1B, glikoliz/glukoneogenez, yağ asidi metabolizması ve meme kanserindeki sitokrom P450 yollarıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır (19).
	ADIPOQ	Ağırlıklı olarak beyaz adipositler tarafından salgılanan adiponektin, yağ dokularında en çok üretilen hormon üretimi sağlayan gendir. Anti-enflamatuar ve anti-aterojenik özelliklere sahiptir ve hücre proliferasyonu inhibe ettiği, insülin direncini azalttığı ve apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir. Meme karsinogenezi ve progresyonunda koruyucu bir rol oynamaktadır (20).
	CHAD	Kondrositlerin, fibroblastların ve osteoblastların bağlanmasını teşvik eder. İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, fare meme karsinomu 4T1 hücre hattında ve in vivo fare deneylerinde cyclic CHAD ve tümör büyümesi arasında ilişki olduğu saptanmıştır (21).
Luminal androgen receptor (LAR)	FOXA1	Nükleer hormon reseptörlerinin transkripsiyonel aktivitesini modüle eder. ESR1 aracılı transkripsiyonda yer alır. BCL2 ekspresyonunu inhibe ederek apoptozun düzenlenmesinde rol oynar. FOXA1'in öncü işlevi, luminal meme kanserinde östrojene duyarlı transkriptomlar oluşturur (22).
		Androjen reseptörü, meme kanserinin tüm evrelerinde eksprese edilir ve hastalığın ilerlemesinde meme kanseri evresine bağlı olarak ekspresyonu farklılık gösterebilir. Meme kanserli hastalar arasında AR ekspresyonunun yaklaşık %77 olduğu tahmin edilmektedir ve moleküler alt tipleri arasında

AR	önemli ölçüde değişmektedir (23). Androjen reseptörünün (AR) meme kanserinin LAR alt tipinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve mRNA seviyesinin diğer ÜNMK alt tiplerinde dokuz kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (24). ÜNMK'de AR pozitifliği olguların %13-37'sinde mevcuttur (25).
DHRS2	DHRS2, Dikarbonil bileşiklerinin indirgenmesini katalize eden NADPH'ye bağımlı oksidoredüktazı kodlar. Kanser hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını ve ayrıca kanserde ROS üretimini artırır (26). ER + VE ER-vakalarının ekspresyon profillerinin incelendiği bir çalışmada, ER- meme kanseri vakalarında anlamlı farkla DHRS2'in daha yüksek oranda eksprese edildiği belirtilmiştir (27).
PGR	PGR geni, steroid reseptörü süper ailesinin bir üyesini kodlar ve PGR geni hedef dokularda hücrel proliferasyonu ve farklılaşmayı etkiler. Progesteron reseptörü (PgR) meme kanserinde en önemli prognostik ve prediktif immünohistokimyasal belirteçlerden biridir (28).
ESR1	Steroid hormonları ve reseptörleri, ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar ve hedef dokularda hücrel proliferasyonu ve farklılaşmayı etkiler. Östrojen reseptör α (ER α) kodlayan ESR1, uzun zamandır meme kanserogenezi, gelişimi ve terapötikleri ile ilişkili olarak çalışılmaktadır. Yüksek östrojen seviyeleri, artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Preklinik ve klinik çalışmalar, ESR1 mutasyonlarının primer tümörlerde önceden var olabileceğini ve metastaz sırasında zenginleştirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca, ESR1 mutasyonları, tümör progresyonunu destekleyen bir transkripsiyonel profili ifade eder, bu da seçilmiş ESR1 mutasyonlarının metastazı etkileyebileceğini düşündürmektedir (29).
ERBB2	Bu onkogenin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonunun bazı agresif meme kanseri türlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Son yıllarda bu protein, meme kanseri hastalarının yaklaşık %30'u için önemli bir <u>biyobelirteç</u> ve tedavi hedefi haline gelmiştir. Klinik araştırmalar, meme kanserli hastalarda, ErbB2 genini aşırı eksprese eden tümörlerin, düşük ErbB2 seviyelerini ifade eden tümörlere kıyasla belirli kemoterapi ajanlarına daha az yanıt verdiğini göstermiştir, bu da ErbB2 aşırı ekspresyonunun meme kanserli hastalarda kemoterapiye zayıf yanıt için bir belirteç olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir (30).

4. Yöntem

4.1 Hasta seçimi ve materyalleri temini: Projede 40 ÜNMK hastasının parafinize edilmiş tümör dokuları ve yine aynı bireylere ait tümör gözlenmeyen normal dokuları olmak üzere deneyde toplamda 80 örneğin kullanılması planlanmaktadır. Mevcut ÜNMK hastalarında, AR, PGR, ESR1, ERBB2 ve kontrol GAPDH genlerinin ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla materyallerin kullanımı için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 29.04.2020 tarihli 2020-7/23 karar nolu etik kurul belgesi mevcuttur yeni belirlenen genleri değerlendirmek amacıyla aynı materyaller için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurulmuştur ve değerlendirmede olduğuna dair izin belgesi ektedir. Doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılacaktır. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilecek, ardından belirlenen genlerin mRNA ifade düzeyleri değerlendirilecektir. Elde edilecek veriler doğrultusunda belirlenen 18 genin ifade farklılıkları değerlendirilecek ve hastaların ÜNMK alt tipleri belirlenecektir.

4.2 RNA izolasyonu: Parafinize dokudan RNA izolasyonu için Trizol (HibriGen) protokolü kullanılacaktır. Trizol reaktifi, RNA izolasyonunun tek adımda yapılmasına olanak sağlayan fenol ve guanidyum izotiyosiyanatın tek fazlı bir çözeltisidir. Tüm hastaların parafinize tümör ve kontrol meme doku materyallerinden 0,2 µm kesitler alınarak her bir örnek için hazırlanan 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılır. Materyaller üzerine 1000 µl Ksilol eklenecek ve 30 sn vorteks edilecektir. Daha sonra ksilolden arındırmak için 1000 µl %100'lük etanol eklenecek ve 30 sn vorteks edilecektir. Etanolün uzaklaştırılması için örnekler 30 etüvde inkübe edilecek ve tekrar %100'lük alkol eklenerek aynı basamak tekrarlanacaktır. Etüvden alınan örneklere 1000 µl Trizol reaktifi eklenerek maksimum hızda 30 saniye vorteks işlemi uygulanacaktır. Oda ısısında 4-5 dakika inkübe edilen örnek üzerine 200 µl kloroform reaktifi eklenecek ve tekrar maksimum hızda örnekler homojen hale gelene kadar vorteks işlemi uygulanacaktır. +4°C'ye alınan mikrosantrifüj cihazında örnekler 12000 rpm hız ile 15 dakika santrifüj edilecektir. Kloroform ilavesinden sonra yapılan santrifüj işlemi ile birlikte organik ve sulu faz olmak üzere iki faza ayrılacak materyalin; solüsyon ve üst kısım RNA fazı, ara kısım DNA ve en alt faz protein olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1). Total RNA izolasyonunu için her hastanın RNA içeren fazı temiz ependorflara aktarılacak. Sulu fazın transferinden sonra RNA'nın geri kazanılması amacıyla ayrıştırılan faz üzerine 500 µl izopropil alkol eklenerek hafif bir çalkalama işlemi yapılacak ve 10 dakika oda ısısında inkübe edilecektir. Örnekler 12000 rpm hızda 10 dakika +4°C'de santrifüj edilecektir. RNA pelletine dikkat edilerek süpernatant kısmı atılacaktır. Pellet üzerine 1000 µl soğuk %75'lik etanol eklenerek yıkama işlemi başlatılacaktır. Yavaşça alt üst edilen tüpler 7500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilecektir. Bu işlem 2 defa tekrarlanacaktır. Etanolün uçurulmasını takiben pellet 100 µl RNaz içermeyen dH₂O eklenerek RNA çözülecektir.



Şekil 2. Trizol ile İzolasyon Sırasında Elde Edilen Fazlar

RNA'ların konsantrasyon hesaplanması 260 nm'deki absorbanza dayanmaktadır ve saflıkları değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. Bu çalışmada edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi, UV-Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD) cihazı kullanılarak ölçülecektir (Tablo 1). Örnekler -80°C'de muhafaza edilecektir.

Tablo 2. Normal Meme Doku (N) ve Tümör Meme Doku (T) Materyallerinden Elde Edilen RNA'ların Miktarları ve Kalitelerinin Spektrofotometre Cihazı ile Ölçüm Değerleri

Hasta N	260/280	CON.	Hasta N	260/280	CON.
35N	1,60	87,00	18T	1,70	901,00
35T	1,70	736,00	17N	1,80	95,00
34N	1,70	221,00	17T	1,00	395,00
34T	1,60	917,00	16N	2,10	105,00
33N	1,70	71,00	16T	1,70	132,00
33T	2,00	118,00	15N	1,80	240,00
32N	1,70	267,00	15T	1,70	989,00
32T	1,90	278,00	14N	2,00	315,00
31N	1,80	193,00	14T	2,00	402,00
31T	1,60	971,00	13N	1,70	166,00
30N	1,30	332,00	13T	1,80	153,00
30T	1,20	976,00	12N	1,70	84,00
29N	1,70	154,00	12T	1,90	382,00
29T	1,60	59,00	11N	1,70	105,00
28N	2,00	400,00	11T	1,70	226,00
28T	1,70	910,00	10N	1,90	147,00
27N	1,70	44,00	10T	1,80	367,00
27T	1,80	263,00	9N	1,60	94,00
26N	1,90	258,00	9T	1,60	142,00
26T	1,90	745,00	8N	1,70	211,00
25N	1,70	202,00	8T	1,60	128,00
25T	1,80	790,00	7N	1,70	165,00
24N	1,60	109,00	7T	1,90	313,00
24T	1,40	140,00	6N	1,90	90,00
23N	1,60	126,00	6T	1,60	138,00
23T	1,90	661,00	5N	1,60	92,00
22N	1,60	400,00	5T	1,90	204,00
22T	1,30	965,00	4N	2,00	102,00
21N	2,00	55,00	4T	1,60	910,00
21T	1,60	969,00	3N	1,80	60,00
20N	1,80	263,00	3T	1,80	130,00
20T	1,70	886,00	2N	1,80	80,00
19N	1,80	138,00	2T	1,60	109,00
19T	1,80	873,00	1N	2,00	92,00
18N	1,80	190,00	1T	2,00	436,00

4.3 cDNA sentezi: Elde edilen total RNA'dan "cDNA Reverse Transcription" kiti (Applied Biosystems) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Elde edilen cDNA'lar diğer işlem basamağına kadar -20 °C' de saklanacaktır.

4.4 RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizlerinin Gerçekleştirilmesi: Elde edilen total RNA materyalinden TaqMan™ Gene Expression Master mix protokolü ile gen ekspresyon testleri için yüksek özgüllük ve yüksek hassasiyet sağlayan tek basamakta RT-PCR analizi gerçekleştirilecektir. Master mix, reaksiyon için gerekli tampon (buffer), enzim, dNTP ve Mg(Cl)₂'yi içermektedir. 96 kuyulu plate için bir kuyuya son hacim miktarı, 10 µl olacak şekilde yükleme yapılacaktır (Tablo 3). 22 belirleyici gen ve kontrol GAPDH ve B-Aktin genlerinin mRNA ifade düzeyleri TaqMan problu primerler kullanılarak "The Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR" cihazında kantitatif olarak analiz edilecektir. Proje dahilinde kullanılacak primerlerin proje bütçesinden temin edilmesi planlanmaktadır.

Tablo 3. PCR için gerekli bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	
Primer	0,5 µl
Prob	0,5 µl
Master Mix	2 µl
dH ₂ O	4,5 µl
RNA materyali	2,5 µl
Toplam	10 µl

Tablo 4. Real Time PCR aşamaları ve döngü sayıları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Reverse			
Transkripsiyon	60	30 sn	1
Pre inkübasyon	95	10 dk	1
Amplifikasyon	95	15 sn	45
	58	30 sn	
Soğuma	40	30 sn	1



Şekil 3. RT-PCR cihazı/görüntüleme ve çalışma ortamı (Ulutek Teknopark, ARGEN)

Endojen kontrol olarak da bilinen 2 referans gen ve belirleyici 16 gen arasında göreceli miktar tayin analizi gerçekleştirilecektir bu analiz bir örnekteki iki farklı hedef genin ifadelerini karşılaştırır. LightCycler® 480 Software 1.5, göreceli miktar tayin analizi yaparken, her amplifikasyon eğrisinin döngü eşik değerini (Ct) belirleyerek her örnek için örnek/referans oranlarını otomatik olarak hesaplamaktadır.

4.5 İstatistiksel Analiz: Elde edilen veriler ve hastaların klinik özellikleri Bağımsız T testi (parametrik, non-parametrik) ve Chi-Square testleri kullanılarak karşılaştırılacaktır. Tüm istatistiksel analizler için SPSS 25.0 ve GraphPad Prism 8.1 programları kullanılacaktır. mRNA ekspresyon seviyeleri ve kat değişimleri, “Data Analysis Center-QIAGEN” (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>) platformundan yararlanılarak analiz edilecektir. Çalışmadan elde edilecek Ct değerleri referans genler ile normalize edilecektir. Kontrol Gen Eşik

değer (Threshold cycle) olarak tanımlanan Ct değeri, floresan ışımada (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade etmektedir. Yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu $R_n(+)$, negatif kontrol ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu $R_n(-)$ olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n , Ct değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. RT-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilecek veriler, web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı kullanılarak $2^{-\Delta CT}$ metodu ile değerlendirilecektir. Tüm analizlerde güven aralığı %95 olarak değerlendirilecek ve ($p < 0,05$) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü: Mevcut projede oluşturulacak gen paneli, ÜNMK alt tiplerinin ayırt edilmesine yönelik olması nedeniyle özgündür. Ayrıca, ülkemizde meme kanseri ile ilgili tanı veya tedaviyi yönlendirecek kendi popülasyonumuza özgü ayırt edici tanıyı oluşturmaya yönelik geliştirilmiş bir gen paneli de mevcut değildir. Klinik perspektiften bakıldığında ise, meme kanserli hastalar arasında kötü seyir gösteren ve tedaviye yanıt alınamayarak çoğunlukla kaybedilen ÜNMK hastalarında etkin tedavi protokollerinin geliştirilmesi ciddi önem arz etmektedir. Etkin tedavi algoritmasının belirlenebilmesi için spesifik gen panelinin geliştirilmesi hem hastanın gereksiz kemoterapi almasını hem de gereksiz tedavi bütçelerinin önüne geçilebilecektir. Ayrıca, geliştirilen ÜNMK çoklu gen paneli yaptığımız fizibilite çalışmaları dahilinde ülkemizde daha uygun maliyet ile piyasaya sürülebileceğinden ülkemizde daha geniş bir hasta grubuna hitap edebilecektir. Kanserde kişiye özgü etkin tedavi araştırma konusu uluslararası araştırmalarda da yoğun ilgi çekmekle birlikte, ülkemizdeki güncel bir soruna çözüm oluşturması açısından da ciddi öneme sahiptir.

6. Uygulanabilirlik

Geliştirilmesi planlanan çoklu gen paneli, üçlü negatif meme kanserinin erken tanısını belirlemeyi sağlayacak, nüks tahmini ve prognozla ilgili spesifik genlerin bir arada bulunduğu ve belirlenmiş olan tüm bu genlerin her hasta için ekspresyon profillerine bakılarak kişiye özgü tanı ve tedavi protokollerinin belirleneceği RT-PCR tabanlı bir analize dayanmaktadır. Mevcut şartlar ve özellikle de üçlü negatif meme kanserinin alt tiplerinin belirlenmesinin etkin tanı/tedavi protokolleri açısından ciddi bir öneme sahip olduğu göz önüne alındığında;

- Geliştirilecek gen paneli için patent başvurusu yapılarak ticari bir ürüne dönüştürülmesi ve konferans katılımlarıyla ürün tanıtımı gerçekleştirilerek Türkiye’de meme kanserinin etkin tedavisinde Kişiselleştirilmiş Tıp uygulamaları için ilk adımların atılması sağlanmış olacaktır.
- Geliştirilecek gen paneli sayesinde daha ucuz maliyette, ulaşılabilir, daha etkin, spesifik ve yüksek hassasiyette analizler gerçekleştirilebilecektir.
- Meme kanseri hastalarının alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla Oncotype Dx, Prosigna, MamaPrint gibi piyasada yurt dışı menşeli gen panellerine başvurulması, dışa bağımlılığa neden olmaktadır. Planlanan proje çıktısı ile bu sorun azaltılacaktır ve hastaların genetik materyallerinin dış ülkelerle paylaşılmasının önüne geçilecek, Türk popülasyonundaki hasta grubuna hitap edilmesi sağlanabilecektir.
- Geliştirilecek gen paneli, tanısal biyopsi materyalinden de çalışılabildiğinden meme kanseri tanısı alan her bireyde ilave bir invaziv girişime gerek duyulmadan analiz gerçekleştirilebilecek ve hastanın ilaç tedavisi başlamadan önce sonuçlar Medikal Onkolog’a sunulabilecektir.

- Hastanın tedaviye cevabı; en az 4 kür tedavi sonrası yapılan görüntülemeler sayesinde belirlenen tümör boyutundaki değişiklikler ile takip edilmektedir. Eğer tümör boyutunda küçülme olmamış ise, tedavi değiştirilmekte veya ilave ajanlar eklenerek tedavinin etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Bu durum hastanın psikolojisini olumsuz etkilemekte olup, bağışıklık sisteminin zayıflamasına dahi yol açmaktadır. Hastaya uygulanacak etkinliği belirsiz bir tedaviden ziyade, kişiye özgü geliştirilmiş bir tedavi protokolü gereksiz işlemlerin ve tedavinin önüne geçerek oluşabilecek tedaviye bağlı yan etkileri engelleyecektir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Çizelgesi

7.1 Proje Takvimi

İP	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kimler Tarafından Gerçekleşeceği	Zaman Aralığı	Başarı Ölçütleri ve Projenin Başarısına Katkısı
1	Hasta seçimi ve materyalleri temini	Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER Doktora Öğrencisi Havva TEZCAN ÜNLÜ	2 ay	% 15
2	RNA İzolasyonu	Yüksek Lisans Öğrencisi Ebrucan BULUT Yüksek Lisans Öğrencisi Nuseybe HURİYET Yüksek Lisans Öğrencisi Rümeyza F. BALABAN	2 ay	% 15
3	cDNA Sentezi	Yüksek Lisans Öğrencisi Nuseybe HURİYET Doktora Öğrencisi Havva TEZCAN ÜNLÜ	2 ay	% 15
4	RT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizinin Gerçekleştirilmesi	Yüksek Lisans Öğrencisi Ebrucan BULUT Yüksek Lisans Öğrencisi Rümeyza F. BALABAN	4 ay	% 30
5	İstatistiksel Analiz	Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER Doktora Öğrencisi Havva TEZCAN ÜNLÜ	2 ay	% 25

7.2 Projede Kullanılacak Malzeme Listesi

Kalem	Malzeme Adı	Birim fiyatı	Adet	KDV	Tutar	Gerekçe
1	FG,TCII REACTION PLT,96 WELL, BARCODE, 20 Plates Thermo Fisher	1.760,00	1	%8	1.760,00	RT-PCR cihazına örnekleri yüklerken kullandığımız plate.

2	WATER. Sterile-filtered.Dnase/Rnase/Protease free 1L BIOSHOP	480,00 TL	1	%8	480,00 TL	Biyolojik karışımı hazırlarken gerekli olan steril su.
3	AMPIGENE qPCR Probe Mix Hi-ROX, 1000 Reactions ENZO	8.500,00 TL	2	% 8	17.000,0 TL	Master mix: RT-PCR tekniğinde bir bileşen olarak kullanılan öncülleri ve enzimleri içeren bir karışımdır.
4	10µl Filter Tips(32mm), Sterile, RNase-/DNase-free LABSELECT 8x96ad/pk	600,00TL	2	% 18	1.200,0 TL	Pipet uçları, laboratuvarında sıvı taşıma ve sıvı aktarma işlemleri için pipet ucuna takılan tek kullanımlık bir üründür. (10 µl)
5	Microcentrifuge tubes with attached lid MERCK	1.136,0 TL	1	% 18	1.136,0 TL	Deney tüpleri, az miktarda olan numuneleri saklamak ve gerekli deney aşamasında kullanabilmek için gereklidir. (1,5 ml)
6	Filtered, Low Retention, Pre-Sterilized 200 µL, Universal Fit, 8x96ad/pk	1.082,72 TL	1	%1	1.082,72 TL	Pipet uçları, laboratuvarında sıvı taşıma ve sıvı aktarma işlemleri için pipet ucuna takılan tek kullanımlık bir üründür. (200 µl)
7	Filtered, Low Retention, Pre-Sterilized 100-1000µL, Universal Fit 8x96ad/pk	1.082,72 TL	1	% 18	1.082,72 TL	Pipet uçları, laboratuvarında sıvı taşıma ve sıvı aktarma işlemleri için pipet ucuna takılan tek kullanımlık bir üründür. (1000µl)
8	Eppendorf® PCR tubes	1.992,312 TL	1	% 18	1.992,312 TL	Deney tüpleri, az miktarda olan numuneleri saklamak ve gerekli deney aşamasında kullanabilmek için gereklidir. (0,5 ml)
9	TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM) XS75 rx	2.592,00 TL	18	%8	46.656,00 TL	RT-PCR reaksiyonunu başlatmak için kullanılan kısa dizileridir her gen için farklı primer bulunmaktadır (18 farklı genin ekspresyonu değerlendirilecektir).

TOPLAM: 72.389,752TL

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir (1). Ülkemizde de kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. ÜNMK ER, PR hormon reseptörleri ve HER2'nin negatif olduğu ve hastalarda sağkalım süresinin diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha kısa olduğu ve 5 yıllık sağ kalım oranının %60 olarak belirlendiği meme kanseri alt tipidir (4). Agresif bir klinik seyir gösteren bu alt tip, kötü prognoz ve yüksek hücre proliferasyonu ile karakterize edilmiştir (3). ÜNMK'de ameliyat sonrası nüks oranı %25'e kadar ve nüksü takip eden 3 ay içinde ölüm oranı %75'e kadar yükselmektedir (6,7). ÜNMK hastalarına klinikte uygulanacak olan en etkin tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi için alt tiplendirmenin yapılması gerekmektedir. Lehmann ve ark. tarafından 2011 yılında ÜNMK alt tipleri, bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör, mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR) şeklinde sınıflandırılmıştır. Ekspresyon analizleri sonucu belirlenen bu alt tipler oldukça heterojendir. ÜNMK'nin alt grupları arasındaki yüksek ekspresyon profil benzerlikleri, gruplar arasındaki net ayrımın sağlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu projenin çıktısı olarak sunulacak gen paneli, meme kanserinde en agresif klinik seyri gösteren ve sağkalım oranlarının en düşük olduğu ÜNMK hastalarına hitap edecektir. Böylece meme kanseri hastalarının tanısal ayrımının doğruluğunu artırarak klinikte bireye özgü en uygun ve etkin tedavinin belirlenmesi sağlanacaktır.

9. Riskler

İP NO	EN ÖNEMLİ RİSK(LER)	B PLANI
2	RNA izolasyonu aşamasında parafinize tümör ve normal dokuların, parafinizasyon aşamaları sırasında doku kalitesinin düşmüş olması. Kaliteli RNA'nın elde edilememesi.	Projeye dahil edilecek hastaların klinik bilgileri ve materyalleri tarafımızdan etik kurul başvurusu sırasında belirlenmiş olup, 40 hasta için onay alınmıştır. Yeterli görülmeyen materyaller projeye dahil edilmeyecektir. Sorunun devam etmesi durumunda Tıbbi Biyoloji AD'da ameliyat sırasında çıkarılmış fresh tümör ve normal dokusu bulunan hastalara ait materyallerden oluşan doku bankasından proje kriterlerine uygun örnekler temin edilebilecektir.
3	cDNA sentezi Deney optimizasyonunun gerçekleştirilememesi.	Tıbbi Biyoloji AD bünyesinde gerçekleştirilen projeler dahilinde en sık kullanılan ve optimizasyonu yapılan cDNA kiti kullanılacaktır. Farklı RNA oranları kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilecektir. Real-Time PCR aşamasında kullanılan master mix ile uyumlu çalışan kit prosedürü takip edilecektir.
4	RT- PCR aşaması Optimal Ct değerlerinin elde edilememesi.	Optimizasyonun sağlanamaması durumunda RNA miktarı ve cDNA aşaması revize edilecektir.

10. Proje Ekibi

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER	Yürütücü	Bursa Uludağ Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji AD	Uzun yıllardır ulusal/uluslararası projelerde yürütücülük ve araştırmacı olarak görev almıştır ve uluslararası 101 adet makalesi bulunmaktadır.
Yüksek Lisans Öğrencisi Ebrucan BULUT	Araştırmacı	Bursa Uludağ Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji AD	Lisans ve yüksek lisans eğitimi boyunca Tübitak ve BAP projelerinde araştırmacı olarak yer almıştır, laboratuvar tecrübesi bulunmaktadır.
Yüksek Lisans Rumeysa Fatma BALABAN	Araştırmacı	Bursa Uludağ Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji AD	Lisans ve yüksek lisans eğitimi boyunca Tübitak ve BAP projelerinde araştırmacı olarak yer almıştır, laboratuvar tecrübesi bulunmaktadır.
Yüksek Lisans Öğrencisi Nuseybe HURİYET	Araştırmacı	Bursa Uludağ Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji AD	Lisans ve yüksek lisans eğitimi boyunca Tübitak ve BAP projelerinde araştırmacı olarak yer almıştır, laboratuvar tecrübesi bulunmaktadır.
Doktora Öğrencisi Havva TEZCAN ÜNLÜ	Araştırmacı	Bursa Uludağ Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji AD	Yüksek lisans ve doktora eğitimi boyunca Tübitak ve BAP projelerinde araştırmacı/bursiyer olarak yer almıştır, uluslararası 6 adet makalesi bulunmaktadır. Uzun yıllardır laboratuvar tecrübesi kazanmıştır.

11. Kaynakça

- 1.Vuong D1, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. Virchows Arch. 2014 Jul;465(1):1-14. doi: 10.1007/s00428-014-1593-7. Epub 2014 May 31.
- 2.Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA. 2019 Jan 22;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323. PMID: 30667505.
3. Morris GJ, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. Cancer. 2007;110(4):876-84.
- 4.Dent R, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.

5. Lin NU, et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008;113(10):2638–45.
6. Zhang L, et al. Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:357485.
7. Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., & Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 20(12), 1913–1927. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>
8. Lehmann BD, Pietersen JA. Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2(0 2): S36-40. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.009. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253813; PMCID: PMC4641762.
9. Györfy, B., Hatzis, C., Sanft, T., Hofstatter, E., Aktas, B., & Pusztai, L. (2015). Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast cancer research: BCR*, 17(1),
10. Guney Eskiler, G., & Bilir, C. (2021). The efficacy of indoximod upon stimulation with pro-inflammatory cytokines in triple-negative breast cancer cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 43(5), 554–561. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1953064>
11. Zhang, J., & Hu, D. (2021). miR-1298-5p Influences the Malignancy Phenotypes of Breast Cancer Cells by Inhibiting *CXCL11*. *Cancer management and research*, 13, 133–145. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S279121>
12. Jiang, L., Wang, D., Sheng, M., Tong, D., Liu, H., Dong, L., & Ma, J. (2020). CXCL13/CXCR5 are potential biomarkers for diagnosis and prognosis for breast cancer. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(6), 2552–2561.
13. Nagelkerke, A., Mujcic, H., Bussink, J., Wouters, B. G., van Laarhoven, H. W., Sweep, F. C., & Span, P. N. (2011). Hypoxic regulation and prognostic value of LAMP3 expression in breast cancer. *Cancer*, 117(16), 3670–3681. <https://doi.org/10.1002/cncr.25938>
14. Nagelkerke, A., Sieuwerts, A. M., Bussink, J., Sweep, F. C., Look, M. P., Foekens, J. A., Martens, J. W., & Span, P. N. (2014). LAMP3 is involved in tamoxifen resistance in breast cancer cells through the modulation of autophagy. *Endocrine-related cancer*, 21(1), 101–112. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0183>
15. Tang, H., Chen, B., Liu, P., Xie, X., He, R., Zhang, L., Huang, X., Xiao, X., & Xie, X. (2019). SOX8 acts as a prognostic factor and mediator to regulate the progression of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis*, 40(10), 1278–1287. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz034>
16. Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K., & Pan, D. (2022). Single-gene diagnostic assay for rapid subclassification of basal like breast cancer with mRNA targeted antisense oligonucleotide capped molecular probe. *Biosensors & bioelectronics*, 207, 114178. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114178>
17. Lian, J., Ma, H. X., Xu, E. W., Bu, P., Yun, K. M., & Xi, Y. F. (2022). Subclassifying triple-negative breast cancers and its potential clinical utility. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 10.1007/s00428-022-03329-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03329-0>
18. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-

negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>

19. Wu, J., Chen, J., Zhang, Y., Dai, W., Lin, X., Yang, X., & Chen, M. (2021). ADH2 Is Downregulated by Methylation and Acts as a Novel Biomarker for Breast Carcinoma Prognosis. *Annals of clinical and laboratory science*, 51(1), 12–21.

20. Llanos, A., Yao, S., Singh, A., Aremu, J. B., Khiabani, H., Lin, Y., Omene, C., Omilian, A. R., Khoury, T., Hong, C. C., Ganesan, S., Foran, D. J., Higgins, M. J., Ambrosone, C. B., Bandera, E. V., & Demissie, K. (2021). Gene expression of adipokines and adipokine receptors in the tumor microenvironment: associations of lower expression with more aggressive breast tumor features. *Breast cancer research and treatment*, 185(3), 785–798. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05972-0>

21. Rucci, N., Capulli, M., Olstad, O. K., Önnarfjord, P., Tillgren, V., Gautvik, K. M., Heinegård, D., & Teti, A. (2015). The $\alpha 2\beta 1$ binding domain of chondroadherin inhibits breast cancer-induced bone metastases and impairs primary tumour growth: a preclinical study. *Cancer letters*, 358(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.032>

22. Seachrist, D. D., Anstine, L. J., & Keri, R. A. (2021). FOXA1: A Pioneer of Nuclear Receptor Action in Breast Cancer. *Cancers*, 13(20), 5205. <https://doi.org/10.3390/cancers13205205>

23. Christopoulos, P. F., Vlachogiannis, N. I., Vogkou, C. T., & Koutsilieris, M. (2017). The Role of the Androgen Receptor Signaling in Breast Malignancies. *Anticancer research*, 37(12), 6533–6540. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12109>

24. Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

25. Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 18(5), e841–e850. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>

26. Men, X., Ma, J., Wu, T., Pu, J., Wen, S., Shen, J., Wang, X., Wang, Y., Chen, C., & Dai, P. (2017). Transcriptome profiling identified differentially expressed genes and pathways associated with tamoxifen resistance in human breast cancer. *Oncotarget*, 9(3), 4074–4089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23694>

27. Wang, J., Scholtens, D., Holko, M., Ivancic, D., Lee, O., Hu, H., Chatterton, R. T., Jr, Sullivan, M. E., Hansen, N., Bethke, K., Zalles, C. M., & Khan, S. A. (2013). Lipid metabolism genes in contralateral unaffected breast and estrogen receptor status of breast cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 6(4), 321–330. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0304>

28. Zhao, S., Zuo, W. J., Shao, Z. M., & Jiang, Y. Z. (2020). Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Annals of translational medicine*, 8(7), 499. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.194>

29. Dustin, D., Gu, G., & Fuqua, S. (2019). ESR1 mutations in breast cancer. *Cancer*, 125(21), 3714–3728. <https://doi.org/10.1002/cncr.32345>

30. Yang, W., Klos, K. S., Zhou, X., Yao, J., Yang, Y., Smith, T. L., Shi, D., & Yu, D. (2003). ErbB2 overexpression in human breast carcinoma is correlated with p21Cip1 up-regulation and tyrosine-15 hyperphosphorylation of p34Cdc2: poor responsiveness to chemotherapy with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil is associated with Erb2 overexpression and with p21Cip1 overexpression. *Cancer*, 98(6), 1123–1130. <https://doi.org/10.1002/cncr.11625>

RAPOR TASLAKLARI İLE İLGİLİ NOT:

- Yukarıda yer alan 10 madde en fazla 16 (on altı) sayfada anlatılacaktır.
- Kapak ve içerik olmak üzere en fazla 17 sayfa olacaktır.
- Tüm raporlar akademik rapor standartlarına uygun olarak yazılmalıdır.
- Her rapor bir kapak sayfası içermelidir.
- Yazı tipi: Times New Roman, Punto: 12, Satır Aralıkları: 1,15, iki tarafa yaslı, sayfa kenar boşlukları üst-alt-sağ-sol 2,5 cm olmalıdır. Cilt payı bırakılması gerekmemektedir.
- Rapor içindeki cümleler birbirinin aynı ve tekrarı niteliğinde olmamalıdır.
- Kaynaklardan alınan cümleler ve ifadeler proje rapor yazarının uyarlamalarına sahip olmalı kopyala – yapıştır ile doğrudan alınan cümlelere yer verilmemelidir.
- Raporunda, Web sitemizde yer alan Geçmiş yıl Raporlarından yararlanmış olan takımlarımız alıntı yaptığını ilgili sayfada belirtmesi gerekmektedir. Açıklamayı alıntı yapılan cümlenin ardından belirtmeniz gerekmektedir. ALINTI FORMATI: "Alıntı yapılan Cümle/ler" (Yıl, Yarışma Adı, Kategori, Takım Adı) ÖRNEK ALINTI: "Enkazda depremzedenin nerede olduğunu tespit edilememesi, enkaz kaldırma ve depremzede arama çalışmalarını yavaşlatan en önemli sorundur." (2020, İnsanlık Yararına Teknoloji Yarışması, Afet Yönetimi, X Takımı)

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 2011-KAEK-26/ 366
Konu : Araştırma başvurusu

10 /05/ 2022

İLGİLİ MAKAMA

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Gülşah Çeçener'in sorumlu araştırmacısı olduğu "*Meme kanserinde alt tiplerin belirlenmesine yönelik gen paneli*" başlıklı araştırma değerlendirilmek üzere Etik Kurulumuzca teslim alınmıştır.

Bilgilerinize sunulur.

Prof.Dr.Mustafa HACEMUSTAFAOĞLU
Kurul Başkanı