

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE *ATM*, *TRIM29*,
TWIST1 İFADESİNİ KONTROL EDEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI**

Muzaffer DÜKEL

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE *ATM*, *TRIM29*,
TWIST1 İFADESİNİ KONTROL EDEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI**

Muzaffer DÜKEL

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez TUBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile
desteklenmiştir.)**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE *ATM*, *TRIM29*,
TWIST1 İFADESİNİ KONTROL EDEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI**

Muzaffer DÜKEL

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez/.../2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Pof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Bülent KAYA

Doç. Dr. Ayşe Gül Mutlu GÜLMEMİŞ

Yrd. Doç. Dr. Dilara Akçora YILDIZ

ÖZET

KÜLTÜRE EDİLMİŞ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ATM, *TRIM29*, *TWIST1* İFADESİNİ KONTROL EDEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

Muzaffer DÜKEL

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN
Şubat 2016, 154 sayfa

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Meme kanseri toplam kanser vakalarının %23'ünü ve kanserin neden olduğu ölümlerin %14'ünü oluşturur. Kanserli hücrelerin oluşum süreci ve mekanizmaları çok komplekstir. Kanserle bağlantılı olan genlerin ekspresyonu ve kontrolünün nasıl sağlandığını anlamaya yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Kanserlin oluşum mekanizmalarının anlaşılması kanser tedavisi için farklı yöntemler geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Kanser tedavisinde günümüzde en önemli nokta erken teşhis ve çok yönlü tedavidir. Artık insanların gen haritaları çıkarılmakta ve gelecekteki kanser yatkınlık oranları test edilmektedir. Bu çalışmanın temel amacı gelecekte meme kanseri marker geni olmaya aday *ATM*'nin, tümör baskılayıcı gen olduğunu düşündüğümüz *TRIM29* ve *TWIST1* onkogeni arasındaki transkripsiyonel bağlantıların meme kanseri ve meme epiteli hücre gruplarında belirlenmesidir.

Çalışma kapsamında ilk olarak *ATM* ve *TRIM29* arasındaki transkripsiyonel ilişkinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu sebeple laboratuvarında bulunan 9 farklı meme epiteli hücre hattında *TRIM29* ekspresyonu test edilmiştir. Bu hücrelerden 7 tanesi meme kanseri, 1 tanesi normal meme epiteli hücresi ve 1 tanesi ölümsüz meme epiteli hücre hattıdır. 4 hücre hattının *TRIM29* ekspresyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. *TRIM29* ekspresyonu 2 meme kanseri hücre hattı (SKBr3, MDA-MB-468), 1 normal meme epiteli hücresi (HMEC) ve kanser oluşturma yeteneği olmayan MCF-10A hücrelerinde tespit edilmiştir. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri çalışma kapsamında kültüre edilmiştir. 2 adet *TRIM29* eksprese etmeyen hücre grubu (BT-549 ve MDA-MB-231) da çalışma boyunca kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Bu hücre gruplarından SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HMEC için shRNA aracılı, *ATM* inaktivasyonu sağlanmış hücreler elde edildi. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri için *ATM* azalışını takiben *TRIM29* protein ve mRNA ekspresyonunda azalma, *TWIST1* protein ve mRNA ekspresyonunda ise artma olduğu tespit edildi. Daha sonra *ATM* tarafından kontrol edilen transkripsiyon faktörleri belirlendi. Bu transkripsiyon faktörleri NF- κ B, HIF-1 α , Sp1 ve ATF'dir. SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HMEC için NF- κ B ve HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücreler elde edildi. HIF-1 α ekspresyonu azaltılmış hücre gruplarında *TRIM29* ve *TWIST1* ekspresyonu test edildi. NF- κ B inaktivasyonu sağlanmış hücre gruplarında ise HIF-1 α ve *TRIM29* ekspresyonu değişimi analiz edildi. Bu iki gendeki azalmanın *TRIM29* protein ve mRNA ekspresyonunu azalttığı tespit edildi. Buna karşılık *HIF-1 α*

inaktivasyonunu takiben TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunda artma tespit edildi. TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu *ATM* inaktivasyonu sağlanmış MDA-MB-231 hücrelerinde değişime uğramazken, TWIST1 mRNA ekspresyonu *HIF-1α* inaktivasyonu sağlanmış MDA-MB-231 hücrelerinde azaldı. Gen inaktivasyonlarının hedef genler üzerine etkisi RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western-blot yöntemleri ile analiz edildi.

HIF-1α artışının TRIM29 ekspresyonunu nasıl etkilediğini test etmek için SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri hipoksiye maruz bırakılmıştır. Hipoksik koşullar altında, HIF-1α ekspresyonundaki artışı takiben TRIM29 ve TWIST1 ekspresyonu değişimi test edilmiştir. MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri hipoksiye maruz bırakılarak TWIST1 ekspresyonu değişimi analiz edilmiştir. TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun hipoksik koşullarda SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu hipoksik koşullarda TRIM29 ifade eden hücrelerde değişmediği belirlenmiştir. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde ise hipoksik koşullarda TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu artmıştır.

Hipoksik koşullarda TRIM29 ekspresyonunun arttığı anlaşılmıştır. Daha sonra *ATM* ve *HIF-1α* inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 ve MDA-MB-468 hücreleri hipoksiye maruz bırakılmış ve TRIM29 ekspresyonu değişimi analiz edilmiştir. TRIM29'un hipoksik koşullarda ekspresyon artışının *ATM* ve *HIF-1α* bağımlı olduğu gösterilmiştir.

SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grupları için *TRIM29* ve *TWIST1* ekspresyonu azaltılmış hücreler oluşturulmuş ve genlerin etkileşimi test edilmiştir. TRIM29 ile TWIST1 arasında antagonist bir etkinin olduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde TRIM29 ekspresyonu düşüşünü takiben TWIST1 ekspresyonu artmakta, TWIST1 ekspresyonundaki düşüş ise TRIM29 ekspresyonunu artırmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Meme kanseri, hipoksi, *ATM*, *HIF-1α*, TRIM29 ve TWIST1

JÜRİ: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)
Prof. Dr. Aysun ÖZKAN
Prof. Dr. Bülent KAYA
Doç. Dr. Ayşe Gül Mutlu GÜLMEMİŞ
Yrd. Doç. Dr. Dilara Akçora YILDIZ

ABSTRACT

UNDERSTANDING TRANSCRIPTIONAL CONTROL MECHANISMS OF THE ATM, TRIM29, TWIST1 PATHWAY IN CULTURED BREAST CANCER CELLS

Muzaffer DÜKEL

PhD thesis, Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN
February 2016, 154 pages

Breast cancer is the most common cancer in women. Breast cancer is accounting for 14% of deaths caused by cancer and 23% of total cancer cases. The formation process and mechanisms of the cancer cells are very complex. There are many studies to understand how to control and expression of genes associated with cancer. Understanding the mechanisms in cancer formation can help to develop different methods for the treatment of cancer.

The most important point the treatment of cancer is early diagnosis and multifaceted treatment. Human gene maps have been obtaining and are being tested to understand for cancer predisposition rate in future. The main purpose of this study is that to describe transcriptional relationship between *TRIM29* tumor suppressor gene, *TWIST1* oncogene and *ATM*, which is a candidate to be breast cancer marker gene, in breast cancer and mammary epithelial cell lines.

We aimed firstly to understand the transcriptional relationship between ATM and TRIM29. Therefore TRIM29 abundance were tested in nine different breast epithelial cell lines in the laboratory. Seven of these cells are breast tumor cells, one of these cell is non-tumorigenic mammary epithelium-derived cell and last one is human mammary epithelium cells. We observed that TRIM29 was only detected in the tumor lines SKBr3, MDA-MB-468, and non-tumorigenic mammary epithelium-derived (MCF-10A) and human mammary epithelium cells (HMEC). SKBr3, MDA-MB-468 and HMEC were cultured for this study. Also we used BT-549 and MDA-MB-231 cell lines which do not express TRIM29 as control during study.

We used shRNA mediated gene knockdown to diminish expression of ATM in SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 and HMEC cell lines. We measured a sharp decrease expression in TRIM29 protein and mRNA, unlike increasing expression in TWIST1 protein and mRNA following ATM knockdown. Then we determined transcription factors controlled by the ATM. These transcription factors are NF- κ B, HIF-1 α Sp1 and ATF. We obtained SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 and HMEC cell lines which have diminished expression of NF- κ B and HIF-1 α . Then we tested TRIM29 and TWIST1 expression in HIF-1 α knockdown cell lines. Also we analysed expression of HIF-1 α and TRIM29 in NF- κ B knockdown cells. We found out that expression of TRIM29 mRNA and protein decreased following HIF-1 α and NF- κ B knockdown unlike mRNA and protein expression of TWIST1 increased in HIF-1 α knockdown. TWIST1 mRNA and protein expression was stable following ATM

knockdown in MDA-MB-231 cell, on the other hand TWIST mRNA expression decreased in HIF-1 α knockdown for same cell line. The effect of knockdown process on target genes were tested by RT-PCR, real time qPCR and western-blot techniques.

SKBr3, MDA-MB-468 and HMEC cell lines were incubated under hypoxia to understand how to effect increased expression of HIF-1 α on TRIM29 and TWIST1. MDA-MB-231 and BT-549 cells exposed to hypoxia were analyzed TWIST1 exchange. We showed that, in SKBr3, MDA-MB-468 and HMEC cell lines, TRIM29 is upregulation in response to hypoxia and also expression of TWIST1 did not change in cell lines which express TRIM29 in response to hypoxia. We observed increases in TWIST1 mRNA and protein expression in MDA-MB-231 and BT-549 cells during hypoxia.

We found out that TRIM29 is upregulating in response to hypoxia. Then we examined TRIM29 hypoxic response in *ATM* and *HIF-1 α* knockdown SKBr3 and MDA-MB-468 cells. We showed that hypoxia inducible expression of TRIM29 is ATM and HIF-1 α dependent.

To understand the relationship between TRIM29 and TWIST1 we constituted TRIM29 and TWIST knockdown SKBr3, MDA-MB-468 and HMEC cells and tested mRNA and protein expression for those cells. We concluded that TRIM29 and TWIST antagonize the activity of each other. We observed that TRIM29 knockdown results in upregulation of TWIST1 and knockdown of TWIST1 drives up TRIM29 expression in cultured breast cancer and mammary epithelial cells.

KEYWORDS: Breast cancer, hypoxia, ATM, HIF-1 α TRIM29 and TWIST1

COMMITTEE: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN (Supervisor)

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Bülent KAYA

Assos. Prof. Dr. Ayşe Gül Mutlu GÜLMEMİŞ

Asst. Prof. Dr. Dilara Akçora YILDIZ

ÖNSÖZ

Bu çalışma TUBİTAK tarafından 2214-A yurt dışı doktora sırası araştırma bursu ile desteklenmiştir.

Günümüzde kanser alanında çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Kanser oluşumu çok karmaşık mekanizmaların etkileşime geçtiği bir süreçtir. Bu süreç içerisinde her veri çok önemlidir ve bu mekanizmaların çözülmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışma bazı meme kanseri hücrelerinde inaktif halde bulunan, bazılarında ise yüksek oranda ifade edilen TRIM29 proteininin transkripsiyonel kontrol yollarının belirlenmesi açısından ve bu proteinin onkogenik protein olan TWIST1 ile bağlantısının gösterilmesi bakımından önem teşkil etmektedir.

Doktora ders süreci ve tez çalışmalarım boyunca her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Kayahan FISKIN'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca doktora eğitimim boyunca her türlü desteği aldığım yüksek lisans tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe Gül Mutlu GÜLMEMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez çalışmalarını yapmam için beni laboratuvarına davet eden Prof. Dr. Kevin D. BROWN'a teşekkür ederim.

Halen çalışmakta olduğum Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Doç. Dr. Deniz İNNAL'a yurt dışında tezimi tamamlamam için verdiği destekten dolayı teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca hep yanımda olan, maddi ve manevi desteğini veren aileme ve eşim Tatiana DÜKEL'e çok teşekkür ediyorum. Çalışmalarım sırasında bana manevi destek veren çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Sadık ÇOĞAL, Araş. Gör. Duygu Ceren KAYA ve Araş. Gör. Mustafa ÖZTOP'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Meme Kanseri ve Epidemiyolojisi.....	3
2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	4
2.3. Meme Kanseri Gelişim Süreci.....	6
2.4. Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	6
2.4.1. Onkogenler.....	7
2.4.2. Tümör baskılayıcı genler.....	7
2.5. Ataksi-Telanjektazili ve ATM Geni.....	9
2.5.1. ATM meme kanseri ilişkisi.....	9
2.5.2. ATM proteini ve diğer PIKK üyeleri.....	9
2.5.3. ATM aktivasyonu ve bunu takip eden yollar.....	10
2.6. NF- κ B Proteini ve ATM/NF- κ B İlişkisi.....	11
2.6.1. NF- κ B meme kanseri ilişkisi.....	13
2.7. Kanser ve Hipoksi.....	14
2.7.1. HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1).....	15
2.7.2. ATM Proteininin HIF-1 α bağlantısı.....	16
2.7.3. NF- κ B Proteininin HIF-1 α bağlantısı.....	17
2.8. TRIM29 (Tripartite Motif-Containing 29).....	18
2.9. TWIST1.....	21
2.10. Meme Kanseri Tedavisi.....	23
2.11. Çalışmada Kullanılan Bazı Yöntemlerle İlgili Genel Bilgiler.....	25
2.11.1. RNAi aracılı gen inaktivasyonu.....	25
2.11.2. İmmünoblot (Western Blot).....	26
2.11.3. Eş zamanlı qRT-PCR.....	27
2.11.4. Lusiferaz reporter testi.....	28
3. MATERYAL ve METOT.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Hücre hatları.....	30
3.1.2. Kullanılan gereçler.....	30
3.1.3. Kimyasal çözeltiler.....	32
3.2. Metot.....	33
3.2.1. Hücre kültürü.....	33
3.2.2. Hücre pasajlama.....	33
3.2.3. Hücre proliferasyon analizi (MTT).....	34
3.2.3.1. İstatistiksel analiz.....	34
3.2.4. Plazmid DNA transformasyonu ve izolasyonu.....	34
3.2.5. RNA interference (RNAi).....	35
3.2.5.1. shRNA plazmid transfeksiyonu.....	35

3.2.5.2. siRNA transfeksiyonu.....	38
3.2.6. İmmüno blot analizi (Western Blot).....	39
3.2.6.1. Protein izolasyonu ve kantitasyonu.....	39
3.2.6.2. SDS-PAGE elektroforezi.....	40
3.2.6.3. İmmüno blot.....	40
3.2.7. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	41
3.2.8. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR).....	42
3.2.8.1. Agaroz jel elektroforezi.....	42
3.2.9. Eş zamanlı kantitatif reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	45
3.2.10. Çift aşamalı lusiferaz reporter testi.....	46
3.2.11. Hipoksi uygulaması.....	48
3.2.12. İyonize radyasyon uygulaması.....	48
3.2.13. İlaç uygulaması.....	48
3.2.13.1. 5-aza-2'-deoksisitidin uygulaması.....	48
3.2.13.2. N-asetil sistein (NAC) uygulaması.....	48
3.2.13.3. Sikloheksimid uygulaması.....	48
3.2.13.4. Aktinomisin D uygulaması.....	49
3.2.14. Rekombinant protein ifadesi.....	49
3.2.15. Gen klonlama.....	50
3.2.16. İstatistiksel analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hücre Hatlarının <i>TRIM29</i> Geni Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	52
4.1.1. 5-aza-2'-deoksisitidin uygulaması sonrası <i>TRIM29</i> değişimi.....	53
4.2. ATM Proteininin HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> Ekspresyonuna Etkisi.....	55
4.2.1. SKBr3 hücrelerinde ATM, HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	55
4.2.2. MDA-MB-468 hücrelerinde ATM, HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	57
4.2.3. HMEC hücrelerinde ATM, HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	59
4.2.4. MDA-MB-231 hücrelerinde ATM, HIF-1 α ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	61
4.2.5. İyonize radyasyonun <i>TRIM29</i> üzerine etkisi.....	63
4.3. NF- κ B Proteininin HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> Üzerine Etkisi.....	65
4.3.1. SKBr3 hücrelerinde NF- κ B, HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> bağlantısı.....	65
4.3.2. MDA-MB-468 hücrelerinde NF- κ B, HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> bağlantısı.....	67
4.3.3. HMEC hücrelerinde NF- κ B, HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> bağlantısı.....	69
4.3.4. NAC uygulamasının HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> ekspresyonuna etkisi.....	71
4.4. HIF-1 α Proteininin <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> Üzerine Etkisi.....	73
4.4.1. SKBr3 hücrelerinde HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	74
4.4.2. MDA-MB-468 hücrelerinde HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	76
4.4.3. HMEC hücrelerinde HIF-1 α , <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	78
4.4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 α ve <i>TWIST1</i> bağlantısı.....	80
4.5. Hipoksi'nin <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> Üzerine Etkisi.....	82
4.5.1. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksi uygulamasının <i>TRIM29</i> - <i>TWIST1</i> üzerine etkisi.....	82
4.5.2. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hipoksi uygulamasının <i>TWIST1</i> ekspresyonu üzerine etkisi.....	85
4.5.3. Hipoksi süresinin <i>TRIM29</i> ve <i>TWIST1</i> ekspresyonuna etkisi.....	87
4.6. Hipoksik HIF-1 α ve <i>TRIM29</i> Ekspresyonunun Kontrolü.....	93

4.6.1. ATM inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α ve TRIM29 değişimi.....	93
4.6.2. ATM inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α reporter aktivitesi.....	96
4.6.3. HIF-1 α inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda TRIM29 değişimi.....	98
4.6.4. HIF-1 α inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda TRIM29 reporter aktivitesi.....	100
4.7. Hipoksik TRIM29 Ekspresyon Artışının Transkripsiyonel ve Translasyonel Testi.....	102
4.8. TRIM29 ve TWIST1 Bağlantısı.....	103
4.8.1. TRIM29 inaktivasyonunun TWIST1 üzerine etkisi.....	103
4.8.2. TWIST1 inaktivasyonunun TRIM29 üzerine etkisi.....	107
4.8.3. Rekombinant protein ekspresyonunun TRIM29 ve TWIST1 üzerine etkisi.....	108
4.8.4. Epitelial-Mezenkimal belirteçlerin TRIM29 inaktif hücrelerde değişimi..	111
4.8.5. TRIM29'un hipoksik TWIST1 ekspresyonuna etkisi.....	113
4.9. Gen İnaktivasyonu Sonrası Hücrelerin Büyüme Oranları Değişimleri.....	116
4.10. ATM, TRIM29 ve TWIST1 Ekspresyonu Düzeylerinin Meme Kanserli Hastaların Ömür Uzunluğuna Olan Etkisi.....	117
5. TARTIŞMA.....	120
6. SONUÇ.....	129
7. KAYNAKLAR.....	131
8. EKLER.....	149
Ek-1. Çalışma kapsamında kültüre edilen hücrelerin mikroskopik görüntüleri.....	149
Ek-2. ATM inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri.....	150
Ek-3. NF- κ B inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri.....	151
Ek-4. HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri.....	152
Ek-5. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri.....	153
Ek-6. HIF-2 α inaktivasyonu sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları.....	154
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Bç	Baz çifti
cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
Gy:	Gray (radyasyon birimi)
IR	İyonize radyasyon
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
LB	Luria brot agar
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
N	Azot
ng	Nanogram
T _m	The melting temperature (Erime sıcaklığı)
UV	Ultraviyole
μ	Mikron
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

Kısaltmalar

APC	Adenomatosis poliposis coli
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATR	Ataksi-Telanjiektazili ve Rad3 ilişkili
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B hücre lenfoması 2)
BRAF	B-Raf proto-oncogene (B-Raf protoonkogeni)
BRCA1	Breast cancer type 1 (Meme kanseri tip 1)
BRCA2	Breast cancer type 2 (Meme kanseri tip 2)
BRCA3	Breast cancer type 3 (Meme kanseri tip 3)
CAIX	Carbonic anhydrase 9 (Karbonik anhidraz 9)
cAMP	Cyclic (Siklik) AMP
CHK2	Checkpoint kinase 2 (Kontrol noktası kinazı 2)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA-PKcs	DNA dependent protein kinase, catalytic subunit (DNA bağımlı protein kinaz, katalitik alt ünitesi)

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamin tetraasetik asit)
EMT	Epithelial mesenchymal transition (Epiteliyal mezenkimal transisyon)
EPAS1	Endoteliyal PAS protein-1
ER	Estrogen receptor (Östrojen reseptörü)
ER α	Estrogen receptor α (Östrojen reseptörü α)
ER β	Estrogen receptor β (Östrojen reseptörü β)
ErbB2	Erb-B2 receptor tyrosine kinase (Reseptör tirozin kinaz)
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz)
HDAC	Histone deacetylase (Histon deasetilaz)
HIF-1	Hipoksi inducible factor 1
HREs	Hypoxia response element (Hipoksi yanıt bölgesi)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
ODD	Oxygen dependent degradation domain (Oksijen bağımlı yıkım bölgesi)
ORF	Open reading frame (Açık okuma bölgesi)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (Poliakrilamid jel elektroforezi)
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA hedefli susturma kompleksi)
Rb	Retinoblastoma
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu)
MTC1	Medullary thyroid carcinoma 1 (Medüller tiroit kanseri 1)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidilinositol 3-kinaz)
PIKKs	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (Fosfatidilinositol 3-kinaz ilişkili kinazlar)
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Sodyum dodesil sülfat)
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMG-1	Suppressor of morphogenesis in genitalia 1
SNP	Single nucleotide polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SUMO	Ubikutin benzeri proteinler
TAE	Tris-acetate-EDTA (Tris asetat EDTA)
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris buffered saline tween20
TGF- α	Transforming growth factor α (Transforme edici büyüme faktörü α)
TNF- α	Tumour necrosis factor α (Tümör nekroz factor α)
TRIM29	Tripartite motif-containing 29 (Üçlü motif içeren 29)
TRRAP	Transformation/transcription domain associated protein (Transformasyon/transkripsiyon ilişkili protein)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanser türleri ve miktarları.....	3
Şekil 2.2. Meme kanseri belirtileri ve risk faktörleri.....	5
Şekil 2.3. Meme kanseri gelişim süreci modeli.....	6
Şekil 2.4. ATM aktivasyonu ve aktif ATM’nin etkileşim sağladığı sinyal iletim yolları.....	11
Şekil 2.5. ATM/NF- κ B sinyal yolağı.....	12
Şekil 2.6. ATM/HIF-1 α bağlantısı ve normoksi hipoksi durumunda HIF-1 α regülasyonu.....	17
Şekil 2.7. RNAi aracılı gen inaktivasyonu.....	26
Şekil 2.8. Çift aşamalı lusiferaz reporter testi	29
Şekil 3.1. shRNA klonlanmamış pLKO.1 kontrol plazmid vektörünün haritası.....	36
Şekil 3.2. shRNA klonu içermeyen pGIPZ kontrol plazmid vektörünün haritası.....	36
Şekil 3.3. psPAX2 plazmid vektörünün haritası.....	37
Şekil 3.4. pMD2.G plazmid vektörünün haritası.....	37
Şekil 3.5. pGL3 plazmid vektörünün haritası.....	46
Şekil 3.6. pGL3-promoter plazmid vektörünün haritası.....	47
Şekil 3.7. pRL-TK plazmid vektörünün haritası.....	47
Şekil 3.8. pcDNA3.1 kontrol plazmid vektörünün haritası.....	49
Şekil 3.9. Boş lentiCRISPRv2 kontrol plazmid vektörünün haritası.....	51
Şekil 4.1. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları.....	52
Şekil 4.2. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde TRIM29 mRNA ekspresyon değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	52
Şekil 4.3. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları.....	53
Şekil 4.4. 3 ve 5 günlük 5-aza-2’-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29	

mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları.....	53
Şekil 4.5. 3 ve 5 günlük 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları..	54
Şekil 4.6. 3 ve 5 günlük 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları.....	54
Şekil 4.7. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	56
Şekil 4.8. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	56
Şekil 4.9. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	57
Şekil 4.10. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	58
Şekil 4.11. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	58
Şekil 4.12. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	59
Şekil 4.13. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	60
Şekil 4.14. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	60
Şekil 4.15. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	61
Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	62
Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1 α ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını	

gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	62
Şekil 4.18. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	63
Şekil 4.19. IR uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	64
Şekil 4.20. IR uygulaması sonrası TRIM29 ve γ H2AX protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları.....	64
Şekil 4.21. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	66
Şekil 4.22. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	66
Şekil 4.23. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	67
Şekil 4.24. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	68
Şekil 4.25. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	68
Şekil 4.26. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	69
Şekil 4.27. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	70
Şekil 4.28. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	70
Şekil 4.29. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	71
Şekil 4.30. SKBr3 hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş	

zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	72
Şekil 4.31. MDA-MB-468 hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	72
Şekil 4.32. HMEC hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	73
Şekil 4.33. SKBr3 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	74
Şekil 4.34. SKBr3 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	75
Şekil 4.35. SKBr3 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	76
Şekil 4.36. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	77
Şekil 4.37. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	77
Şekil 4.38. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	78
Şekil 4.39. HMEC hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	79
Şekil 4.40. HMEC hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	79
Şekil 4.41. HMEC hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	80
Şekil 4.42. MDA-MB-231 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	81

Şekil 4.43. MDA-MB-231 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	81
Şekil 4.44. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef genlerin mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları.....	83
Şekil 4.45. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	83
Şekil 4.46. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	84
Şekil 4.47. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	85
Şekil 4.48. MDA-MB-231 hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	86
Şekil 4.49. BT-549 hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	86
Şekil 4.50. MDA-MB-231 ve BT-549 hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	87
Şekil 4.51. SKBr3 hücre grubunda farklı sürelerde hipoksi uygulamasını takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	88
Şekil 4.52. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	88
Şekil 4.53. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	89
Şekil 4.54. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş	

zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	89
Şekil 4.55. SKBr3 hücre grubunda normoksi ve farklı sürelerde uygulanan hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	90
Şekil 4.56. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı sürelerde hipoksi uygulamasını takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	91
Şekil 4.57. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	91
Şekil 4.58. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	92
Şekil 4.59. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	92
Şekil 4.60. MDA-MB-468 hücre grubunda normoksi ve farklı sürelerde uygulanan hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	93
Şekil 4.61. SKBr3 ATM inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	94
Şekil 4.62. MDA-MB-468 ATM inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	95
Şekil 4.63. SKBr3 ve MDA-MB-468 ATM inaktif hücrelerde hipoksi sonrası HIF-1 α ve TRIM29 protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	96
Şekil 4.64. SKBr3 ATM inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α reporter aktivitesi değişimi.....	97
Şekil 4.65. MDA-MB-468 ATM inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α reporter aktivitesi değişimi.....	97
Şekil 4.66. SKBr3 HIF-1 α inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	98

Şekil 4.67. MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	99
Şekil 4.68. SKBr3 ve MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	100
Şekil 4.69. SKBr3 HIF-1 α inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla TRIM29 reporter aktivitesi değişimi.....	101
Şekil 4.70. MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla TRIM29 reporter aktivitesi değişimi.....	101
Şekil 4.71. SKBr3 hücrelerinde Sikloheksimid ve Aktinomisin D uygulaması sonrası uygulanan hipoksinin, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 ve HIF-1 α protein ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	102
Şekil 4.72. MDA-MB-468 hücrelerinde Sikloheksimid ve Aktinomisin D uygulaması sonrası uygulanan hipoksinin, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 ve HIF-1 α protein ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	103
Şekil 4.73. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları.....	104
Şekil 4.74. SKBr3 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	104
Şekil 4.75. MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	105
Şekil 4.76. HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	105
Şekil 4.77. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	106
Şekil 4.78. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC TRIM29 inaktif hücrelerde TWIST1 reporter aktivitesi.....	106
Şekil 4.79. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TWIST1 inaktivasyonunu	

takiben TWIST1 ve TRIM29 mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	107
Şekil 4.80. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TWIST1 inaktivasyonu sonrası TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	108
Şekil 4.81. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant HA-TRIM29 protein ekspresyonunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	109
Şekil 4.82. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant HA-TRIM29 protein ekspresyonunu takiben TWIST1 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	109
Şekil 4.83. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant Myc-TWIST1 protein ekspresyonunu takiben TRIM29 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	110
Şekil 4.84. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant Myc-TWIST1 protein ekspresyonunu takiben TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	111
Şekil 4.85. SKBr3 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	112
Şekil 4.86. MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	112
Şekil 4.87. HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	113
Şekil 4.88. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	114
Şekil 4.89. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları.....	114
Şekil 4.90. SKBr3 Crispr ve shTRIM29 gruplarında TRIM29 protein ekspresyonunu gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	115
Şekil 4.91. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 protein ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren	

western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi.....	115
Şekil 4.92. ATM inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları.....	116
Şekil 4.93. HIF-1 α inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları.....	116
Şekil 4.94. TRIM29 inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları.....	117
Şekil 4.95. Meme kanseri hastalarında ATM ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik.....	118
Şekil 4.96. Meme kanseri hastalarında TRIM29 ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik.....	118
Şekil 4.97. Meme kanseri hastalarında TWIST1 ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Meme kanseri ile ilişkili yatkınlık genleri ve bu genlerdeki mutasyonların hayat boyu oluşturabilecekleri kanser riskleri.....	8
Çizelge 2.2. <i>TRIM</i> ailesine ait genler ve bu genlerin değişik kanser türlerinde uğradıkları değişimler.....	20
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan hücrelerin genel özellikleri.....	31
Çizelge 3.2. SDS-PAGE hazırlanırken kullanılan maddeler ve bu maddelerin jel konsantrasyonuna bağlı miktarı.....	40
Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin sekansları ve TM değerleri.	43
Çizelge 3.4. Çalışma kapsamında analiz edilen genlere ait PCR koşulları.....	44

1. GİRİŞ

Kanser kontrolsüz olarak bölünen ve büyüyen anormal hücreler ile karakterize olmuş bir hastalık grubudur. Normal bir hücreden kanserli bir hücreye dönüşüm süreci karmaşık bir süreçtir ve bu süreç kanserin oluşacağı dokuya göre farklılık gösterebilir. Kanserli hücreler ilk oluştukları dokudan kontrolsüz büyüme ve bölünme sonrası komşu dokuları işgal edebilir ki bu süreç invazyon olarak bilinir. Ayrıca kanserli hücrelerdeki ileri mutasyonlar bu hücrelere metastaz yeteneğini kazandırır. Metastaz özelliği kazanan bu hücreler kaynak dokudan kan ve lenf damarları yardımı ile uzak doku ya da organlara yayılabilir. Bilindiği üzere kanser bir tek etkenin etkisi ile ortaya çıkan bir hastalık değildir. Birçok etkenin ortaklaşa ortaya çıkardığı, karmaşık ve tedavisi zor bir hastalıktır. Kanser hem dışsal faktörlerin (tütün kullanımı, radyasyon, bulaşıcı organizmalar ve kimyasallar) hem de içsel faktörlerin (kalıtsal mutasyonlar, hormonal ve bağışıklık sistemi bozuklukları) etkisi ile ortaya çıkabilir.

Dünya sağlık örgütü verilerine göre kanser ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde başlıca ölüm nedenidir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın ikinci ölüm nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı verilerine göre 2008 yılında 12,7 milyon yeni kanser teşhisi yapılmış ve bu vakaların 7,6 milyonu ölüm ile sonuçlanmıştır. 2030 yılı itibarıyla kanser vakalarının 21,4 milyonu aşacağı, ölüm vakalarının ise 13,2 olacağı tahmin edilmektedir (Center vd 2011). Meme kanseri akciğer kanserinden sonra en sık rastlanılan ikinci kanser türü olup, kanserin neden olduğu ölüm vakalarında beşinci sıradadır ve kadınlarda ölüme neden olan başlıca kanser türüdür (Jemal vd 2011).

Bütün hastalıkların ortaya çıkış sürecinde olduğu gibi, kanserin meydana gelmesinde etkili risk faktörleri vardır. Meme kanseri için başlıca risk faktörleri cinsiyet, yaş ve kalıtsal faktörler olarak sıralanabilir. Kadın olmak meme kanseri için bir risk faktörüdür. Erkeklerde de meme kanseri vakası tespit edilmiş olmasına karşın, bu durumun gözlenme olasılığı kadınlarda meme kanseri gözlenme olasılığına kıyasla çok düşük bir ihtimaldir. Yaş faktörü bütün kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinin ortaya çıkmasında etkili ikinci faktördür. Meme kanseri vakalarının %5-10 seviyesinde kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Kalıtsal meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğu *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu genlerin yanı sıra *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11* ve *PALB2* genlerindeki mutasyonların meme kanseri gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (Apostolou ve Fostira 2013).

Düzenli ve sağlıklı beslenme alışkanlığının edinilmesi, tütün kullanımının durdurulması, düzenli spor yapma ve obezitenin azaltılması yolları ile kanserin neden olduğu acı ve ölümler azaltılabilir. Bunların yanı sıra belli aralıklarla yapılan kanser tarama testleri ve kansere yatkınlık miktarının belirlendiği genetik testler kanser ortaya çıkmadan veya erken aşamada tedavi için büyük önem taşımaktadır. Bütün kanser vakaları ile mücadelede erken teşhisin önemi büyüktür. Kanser önceden bilmek ya da erken aşamada teşhis etmek için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Kanser marker proteinleri bu amaca hizmet etmektedir. Günümüzde bütün kanser türleri için ortak ve ayrıca belirli kanser türlerinde baskın olarak tespit edilen marker proteinler vardır ve yeni marker proteinlerin belirlenmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Kanser

moleküler biyolojisindeki gelişmeler ışığında, kanser marker proteinleri ile ilgili artan bilgiler bu proteinleri veya genleri hedef alan özel ilaçların geliştirilmesine ve çok yönlü kanser tedavisine büyük katkı sağlayacaktır (Raymond ve Ruddon 2007).

Kanser hücreleri genellikle 2 grup gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşur. Bu gen grupları proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler ya artan gen ekspresyonu ya da kontrolsüz olarak kodlanan proteinler aracılığı ile hücrede genetik değişikliğe sebep olarak anormal hücre bölünmesini uyarırlar. Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol ederek tümör gelişimini engeller. Çoğu tümörde, tümör baskılayıcı genler ya aktivasyonlarını kaybetmişler ya da inaktif hale geçmişlerdir. Bu yolla tümör hücreleri kontrolsüz olarak büyür ve çoğalırlar (Cooper ve Hausman 2000).

Bu çalışmanın temel amacı meme kanseri marker proteini olabileceği düşünülen ATM proteininin, meme kanseri için tümör baskılayıcı olduğu düşünülen *TRIM29* ve *TWIST1* onkogeni arasındaki transkripsiyonel ilişkinin bazı meme kanseri ve meme epiteli hücresinde araştırılmasıdır.

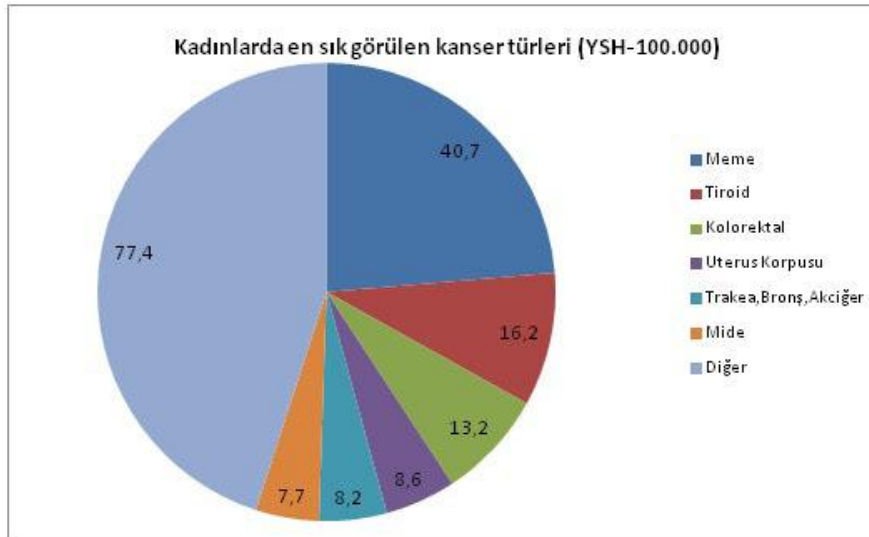
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Meme Kanseri ve Epidemiyolojisi

Meme kanseri, meme dokusunda birçok kompleks moleküler ve epigenetik mekanizmanın etkisi ile ortaya çıkan bir kanser türüdür. Meme kanserinde de diğer kanser vakalarında olduğu gibi kanser oluşumu sürecinin arkasındaki moleküler mekanizmalar tam olarak çözülememiştir.

Meme kanseri meydana gelme oranı popülasyon demografisi ve hayat standardına göre değişir. Gelişmiş ülkelerde (Avrupa, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Japonya) meme kanseri insidansı (67,8/100.000) geri kalmış ülkelere (Afrika, Güney Amerika ve Japonya hariç bütün Asya) göre (23,8/100.000) daha fazladır. Meme kanseri dünya çapında kadınlar için en ölümcül kanser türüdür ve kadınlarda görülen kanser vakalarının %30'unu meme kanseri oluşturmaktadır. Meme kanseri kadınlarda kanserin sebep olduğu ölümlerin %18'ini oluşturmaktadır. Her yeni yılda bir milyondan daha fazla yeni meme kanseri vakası tespit edilmektedir. Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2008 yılından 1.383.500 yeni meme kanseri vakası meydana gelmiş ve bunlardan 458.400'ü ölüm ile sonuçlanmıştır. Avrupa'da her yeni yıl 180.000, Amerika'da 184.000 yeni meme kanseri vakası tespit edilmektedir (Porter 2009, Curado 2011, Eroğlu 2011, Jemal vd 2011, Okutur 2011).

Ülkemizde de meme kanseri kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür ve vakalar son yıllarda artış göstermiştir. Ayrıca batı bölgelerinde meme kanseri insidansı (50/100.000) doğuya göre (20/100.000) 2 katından daha fazladır (Özmen 2009). Sağlık bakanlığı verilerine göre meme kanseri insidansı 2005 yılında 18/100.000, 2006 yılında 37/100.000 iken 2008 yılında 41/100.000 olarak belirlenmiştir. Yine bakanlık verilerine göre her yıl 30.000 yeni vaka meydana gelmektedir (Okutur 2011, Kardaş 2015).



Şekil 2.1. Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanser türleri ve miktarları (Sağlık Bakanlığı 2006)

2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

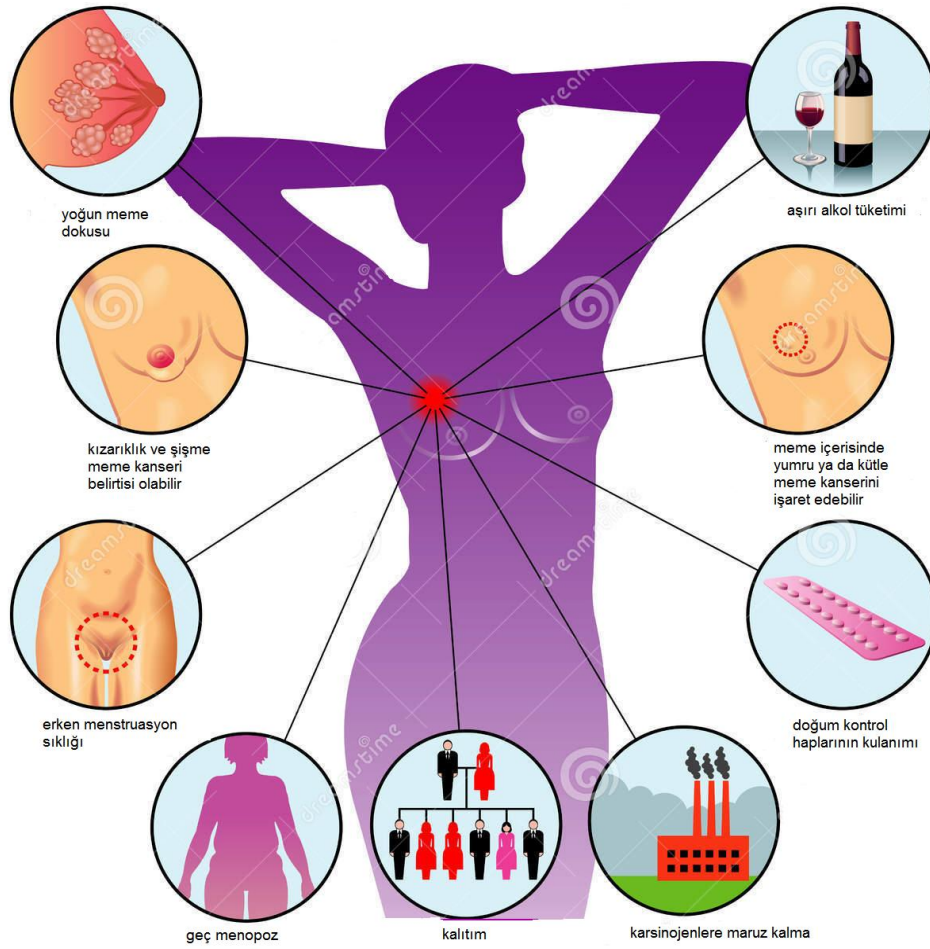
Meme kanseri için başlıca risk faktörleri yaş, cinsiyet, aile hikâyesi, yaşam tarzı ve çevresel faktörler olarak sınıflandırılabilir. Yaş meme kanseri için en iyi araştırılmış ve veri toplanmış risk faktörüdür. Kadınlarda 30 yaşından önce meme kanseri insidansı (25/100.000) oldukça düşüktür ancak 30 yaşından sonra 80'li yaşlara kadar bu oran artıp en üst rakama (500/100.000) ulaşmaktadır. 80 yaşından sonra insidans miktarı tekrar azalmaktadır (McPherson 2000, Singletary 2003). Erken menarj (12 yaşından önce) ve geç menopoz (geciken her yıl için) meme kanseri oluşma riskini artırmaktadır (Oldenburg vd 2007). Doğum öyküsü ve doğum yapma yaşı meme kanseri olma riskini etkileyen diğer bir faktördür. İlk doğumunu 30 yaşından sonra yapmış kadınlar, ilk doğumunu 20 yaşından önce yapmış kadınlara göre 2 kat daha fazla meme kanseri insidansına sahiptirler. İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış kadınlar en riskli grubu oluştururlar ki, bu gruptaki meme kanseri insidansı hiç doğum yapmamış kadınlardan bile daha yüksektir (Singletary 2003).

Cinsiyet meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür, erkeklerde meme kanseri olabilir fakat bu oran oldukça düşüktür. Erkekler ve kadınlar meme kanseri için ilerlemiş yaş ve aile hikayesi gibi ortak risk faktörlerine sahiptirler. Ayrıca, meme kanseri insidansı son yıllarda erkeklerde de artış göstermiştir. Erkek bireylerdeki meme karsinomları bütün meme karsinomlarının %0,6'sını oluştururken, erkeklerde gözlemlenen bütün kanserlerin %1'inden daha az bir miktarını oluşturmaktadır (Giordano vd 2004, White vd 2011).

Aile geçmişi ile ilişkili meme kanseri olma riski, çevresel ve genetik faktörlerin ortak etkisi sonucu ortaya çıkan kanser vakalarına oranla küçük bir miktarı temsil etmektedir. Aile geçmişinin kansere olan etkisi, kanser olmuş bireylerin akrabalık dereceleri, yaşı ve ailede kaç bireyin kansere yakalandığı ile ilgilidir (Pharoah vd 1997).

Batı ülkelerinde meme kanserlerinin %10'unun aile hikâyesine dayandığı düşünülmektedir. İngiltere'de yapılan bir çalışmaya göre normal koşullarda meme kanseri olma riski %8 iken, 50 yaşından önce meme kanserine sahip bir ya da iki tane birinci dereceden akrabaya sahip kişilerin hayat boyu meme kanserine yakalanma risklerinin %12-25'e yükseldiği tespit edilmiştir (Price vd 2008). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon bulunan kadınların normal kişilere göre meme kanseri olma olasılıkları %60-80'den daha fazladır (Ford vd 1998).

Kanser oluşumu ve ilerlemesi sürecinde, yaşam tarzı ve çevresel faktörler farklı kanser türlerine değişik seviyelerde etki yapabilir. İsviçre, Danimarka ve Finlandiya'da ikizler ve kanserli bireylerin bulunduğu aileler ile yapılan çalışmalar, meme kanserinin %60'ından daha fazlasının çevresel etiyolojiye sahip olduğunu göstermektedir (Coyle 2004).



Şekil 2.2. Meme kanseri belirtileri ve risk faktörleri (Canceravoidmid 2015)

Beslenme sırasında doğal ya da kimyasal birçok karsinojene maruz kalınabilir. Çok pişmiş et tüketiminin meme kanseri riskini artırdığı rapor edilmiştir (Zheng vd 1998). Ayrıca yüksek oranda doymamış yağ asitleri ile beslenmenin meme kanseri oluşumu ile zayıf bir bağlantısının olduğu rapor edilmiştir (Dumitrescu ve Cotarla 2005). Östrojen ve androjen seviyesi artmış kadınlarda yüksek alkol tüketiminin meme kanseri olma riskini artırdığı düşünülmektedir (Singletary ve Gapstur 2001). Buna ek olarak erken menarj ve geç menopozun sebep olduğu artmış östrojen maruziyeti, yüksek kemik yoğunluğu ve obezite meme kanseri riskini artırmaktadır. Bağımsız yapılmış iki çalışma yüksek serbest plazma östrojen miktarının artmış meme kanseri riski ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Yue vd 2013).

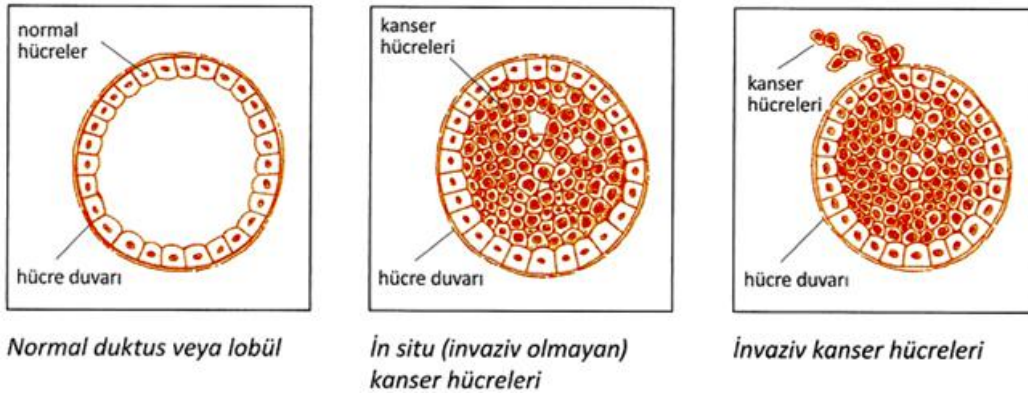
Meme bezlerinin uzun süreli iyonize radyasyona maruz kalması meme kanseri riskini artırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Radyasyonun kanser oluşumuna etkisi maruz kalma süresi ve miktarına göre değişebilir (Biglia vd 2004).

2.3. Meme Kanseri Gelişim Süreci

Kanserin gelişim süreci her kanser türü için değişik aşamalar içerebilir. Meme kanseri için ortaya atılmış birçok gelişim modeli vardır. Meme kanseri meme kanalları ya da meme loblarında oluşur. Dünya çapında meydana gelen meme kanseri vakalarının yaklaşık %80 oranında meme kanallarından köken aldığı düşünülmektedir (Bombonati ve Sgroi 2011). Vogelstein vd (1988)'in kolon kanseri gelişim modeli, meme kanseri için en çok kabul edilenidir. Çok aşamalı bu süreç normal hücrelerin (terminal kanal lobül ünitesi) hiperplazi oluşturması ile başlar ve bu olayları karsinoma in situ, invaziv karsinoma ve metastaz oluşumu takip eder (Wellings vd 1975).

Meme kanseri hücresel başlangıcı için sporadik klonal evrim modeli ve kanser kök hücresi modeli olmak üzere 2 önemli hipotez değerlendirilebilir. Sporadik modele göre rasgele mutasyonlar herhangi bir hücrede olabilir ve üst üste mutasyonların meydana geldiği hücre, kanserleşerek kanserli dokuyu oluşturur. Kanser kök hücresi modeline göre ise sadece kanser kök hücresi kanserin başlangıcı olabilir ve mutasyonlar rasgele değildir (Bombonati ve Sgroi 2011).

Kanser oluşumunun arkasındaki moleküler olayların tam anlamıyla ortaya çıkarılması çok uzun ve zorlu bir süreçtir. NF- κ B, STAT, TGF- β , Notch, Wnt ve IGF gibi proteinlerin görev aldığı gelişim sürecindeki önemli yollar, meme kanserinde yeniden düzenlenmişlerdir. Bir meme kanseri risk faktörü olan östrojen, meme kanseri oluşum ve gelişim sürecinde çok önemlidir. ER α ve ER β birlikte diğer birçok sinyal iletim faktörüyle birlikte meme kanserinin merkezi kontrol sistemini oluşturur (Karahan 2015).



Şekil 2.3. Meme kanseri gelişim süreci modeli (Kocer 2014)

2.4. Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi

Meme kanseri hücrelerindeki genomik değişiklikler; DNA amplifikasyon sayısı değişimleri, DNA kol kırıkları ve gen mutasyonlarıdır. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar; genomik kararlılık sağlanması, hücre bölünmesi ve hücre adezyonu gibi görevlerde yer alan genlerin inaktivasyonu veya anormal aktivasyonuna neden olarak normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine yol açar. Meme kanserindeki belirlenmiş genetik bozukluklar; *MYC*, *ERBB2* ve *CCDN1* onkogenlerinin

amplifikasyonu, *TP53* ve *CDH1* gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu ve 1, 3p, 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11, 13q, 16q, 17, 18q, 22q ve X kromozomlarındaki heterozigote kaybıdır (Ingvarson 1999).

2.4.1. Onkogenler

Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve bölünmesi sürecine yardımcı olan genlerdir. Karsinojenlerin sebep olduğu genomik mutasyonlar, protoonkogenlerin normal davranışlarının dışına çıkmasını sağlar ki bu durum kontrol dışı hücrelerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu aşamadan sonra protoonkogenler, onkogen olarak isimlendirilir. Hücre bölünmesini ve büyümesini inhibe eden tümör baskılayıcı genlerin aksine, onkogenler hücre bölünmesini ve hücre büyümesini uyarır (Osborne vd 2004).

Meme kanserlerinde yoğun olarak tanımlanmış birçok onkogen vardır. *HER-2* meme kanseri vakalarının yaklaşık %20-30'unda yüksek aktivasyon gösterir (Harari ve Yarden 2000). *Ras* ve *Myc* ailesine ait birçok genin meme kanserinde aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. *Ras* ailesine ait onkogenlerin nokta mutasyonları akciğer, kolorektal ve pankreas kanserinde aktivasyon göstermesine rağmen ilginç bir şekilde meme kanserinde bu mutasyonlar yüksek oranda gözlenmez (Downward 2003). Protoonkogen *c-Myc* insan meme tümörlerinde yaygın olarak aşırı ifade edilir. *c-Myc* geninin aşırı ekspresyonunun meme kanserlerinde tümörjenik etkisi bulunmaktadır (Nass ve Dickson 1997).

Hücre döngüsü ve bölünmesi, hücrelerde sıkı bir şekilde kontrol altındadır. Siklinler, siklin bağımlı kinazların düzenleyici alt üniteleridir ve siklin A, B1, C, D1, D2, D3 ve E olarak sınıflandırılırlar. Bu genlerin %35 oranında meme kanseri hücrelerinde aktivasyon artışı gösterdiği belirlenmiştir. Siklin D1 meme kanseri hücrelerinde en yüksek (%40-50) oranda eksprese edilen siklin çeşididir (Buckley vd 1993, Steeg ve Zhou 1998).

2.4.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesini kısıtlayan, DNA hasarını tamir eden ve hücrenin ölüm zamanına karar veren mekanizmaların kontrolünü sağlarlar. Bu genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi kötü huylu (malin) tümörlerin oluşması ile sonuçlanır. Klasik teoriye göre tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin bir alelinin kaybı ve diğer alelin mutasyonu sonucu ortaya çıkar (Oesterreich ve Fuqua 1999). Ancak günümüzde yapılan çalışmalar bu genlerdeki aktivasyon kaybının birçok nedeni olabileceğini göstermektedir. Foster vd (1998) HMEC hücreleri ile yaptıkları çalışmada *p16* geninin CpG adacıklarındaki metilasyon sonucu inaktive olabileceğini göstermişlerdir. İnsan *papilloma* virüsü tarafından üretilen E₆ onkoproteininin, *p53* tümör baskılayıcı proteini yapısını bozarak inaktive edebileceği gösterilmiştir (Storey vd 1998). Ayrıca *BRCA1* ve *p53* gibi tümör baskılayıcı genlerin, meme kanseri hücrelerinde lokasyon kayıpları sonucu inaktivasyona uğradıkları belirlenmiştir (Moll vd 1992, Chen vd 1995).

p53 bütün tümör baskılayıcı genler arasında en çok çalışılan gendir ve bütün kanserlerin %50'sinden daha fazlasında bu gen mutasyona uğramıştır. Meme

kanserlerinin yaklaşık %40'ında *p53* geni mutasyonludur (Hollstein vd 1991, Oesterreich ve Fuqua 1999). Retinablastom erken çocukluk döneminde ortaya çıkan ve retinada malign tümör oluşumunun gözlemlendiği bir kanser türüdür. *Rb* geni Retinoblastomlu hastalarda tanımlanmış bir tümör baskılayıcı gendir. Meme kanseri hücre kültürlerinde yapılan çalışma *Rb* geninin %25 oranında bu hücrelerde mutasyonlu olduğunu göstermiştir (T'Ang vd 1988, Goodrich ve Lee 1993). Adenomatöz polipozis koli, *APC* tümör baskılayıcı genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bir adenokarsinom çeşididir. Farklı çalışmalarda meme karsinomlarında farklı oranlarda *APC* tümör baskılayıcı geninin mutasyonlu olduğu gösterilmiştir (Thompson vd 1993, Kashiwaba vd 1994).

BRCA1, *BRCA2*, *BRCA3* ve *PTEN* meme kanseri için iyi çalışılmış tümör baskılayıcı genlerdir. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonuna sahip bireylerde meme kanseri görünme riski yüksektir. *BRCA* genlerinin DNA hasarının tespiti ve apoptozisi tetikleme görevleri olduğu düşünülmektedir (Hallam vd 2015). *BRCA3* mutasyonlarının meme kanseri ile ilişkili olduğu ile ilgili bazı kanıtlar vardır ancak bu gen çok iyi çalışılmamıştır (Oesterreich ve Fuqua 1999). *PTEN* geni mutasyonları Cowden hastalığına sahip bireylerin çocuklarında gözlenmiştir. Birçok meme kanseri hücre hattında bu gen mutasyonu tespit edilmiştir (Freihoff vd 1999).

Çizelge 2.1. Meme kanseri ile ilişkili yatkınlık genleri ve bu genlerdeki mutasyonların hayat boyu oluşturabilecekleri kanser riskleri (Apostolou ve Fostira 2013)

Gen ve Konum	Kanser Türü	Hayat Boyu Risk (%)
<i>BRCA1</i> -17q12-21	Kadın meme kanseri, ovaryum kanseri	40-80
<i>BRCA2</i> -13q12-13	Meme kanseri (erkek ve kadın), ovaryum, prostat ve pankreas kanseri	20-85
<i>TP53</i> -17q13.1	Meme kanseri, sarkomlar, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal karsinom, akciğer kanseri	56-90
<i>PTEN</i> -10q23.3	Meme ve endometriyal kanser	25-50
<i>STK11</i> -19p13,3	Meme, ovaryum, rahim ağzı, rahim, testis, bağırsak ve kolon karsinomları	32-54
<i>CDH1</i> -16q22.1	Kalıtımsal diffüz mide kanseri, lobüler meme ve kolorektal kanser	60
<i>ATM</i> -11q22.3	Meme ve ovaryum kanserleri	15-20
<i>CHEK2</i> -22q12.1	Meme, kolorektal, yumurtalık ve bağırsak kanserleri	25-37
<i>PALB2</i> -16p12.1	Meme, pankreas, ovaryum kanserleri ve erkek meme kanseri	20-40

ATM bu tez çalışmasının başlangıç noktasını oluşturmuş, *BRCA1*, *p53* ve *CHK2* gibi tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunda rol alan bir protein kinazdır.

2.5. Ataksi-Telanjiektazili ve ATM Geni

ATM, Ataksi-Telanjiektazili insanlarda mutasyona uğramış bir genin ürünü olup, DNA hasarına yanıt olarak oluşan bir protein kinazdır (Shiloh 2003). Otozomal resesif ve nörodejeneratif bir hastalık olan Ataksi-Telanjiektazili fonksiyonel ATM proteini eksikliğiyle karakterizedir ve erken çocukluk döneminde belirtileri oraya çıkar (McKinnon 2004, Kiragawa ve Kastan 2005). A-T'li hastalarda meydana gelmiş 300'den fazla farklı *ATM* geni mutasyonu belirlenmiştir ve bu mutasyonlar ATM proteininin olgunlaşmadan parçalanması ile sonuçlanır (Khanna vd 2001). Bu hastalığın gözlemlendiği bireylerde erken yaşlanma, immün yetmezliği, kromozomal kararsızlık, serebellar dejenerasyon ve yüksek oranda lenfoma gözlemlenir. A-T hastalarından elde edilen hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda bu hücre gruplarının iyonize radyasyona karşı aşırı hassas olduğu ve meydana gelen DNA çift kol kırıklarını onaramadığı tespit edilmiştir (Crawford 1998, Shiloh ve Kastan 2001).

ATM geni 11. kromozomda bulunmaktadır ve 9168 nükleotidlik ORF bölgesi içermektedir. *ATM* geni 150 kb DNA üzerine yayılmış 66 ekson bölgesi içermektedir, 370 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlar ve bu protein 3056 amino asit içermektedir. A-T hastalarında ki tespit edilmiş farklı mutasyonlar, ATM proteini kodlayan bütün bir genin çok farklı bölgelerinde tanımlanmışlardır. Bu mutasyonların çoğunluğunu geniş delesyonlar ve fonksiyonel olarak inaktif proteinlerin oluşmasına sebep olan nokta mutasyonları oluşturur (Platzer vd 1997).

2.5.1. ATM meme kanseri ilişkisi

A-T'li bireylerin normal popülasyona kıyasla kansere yakalanma risklerinin daha yüksek olduğu ilk olarak Swift vd (1991) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Daha sonra yapılan diğer birçok çalışma bu çalışmayı destekler nitelikte olmuştur ve analizler A-T hastalarında en sık gözlenen kanser türünün meme kanseri olduğunu göstermektedir (Morrell vd 1986, Swift vd 1991, Angele ve Hall 1999, Ahmed ve Rahman 2006). ATM inaktif hücreler yüksek oranda genomik kararsızlık gösterirler. İnsan ve farelerdeki ATM inaktif soylarla yapılan araştırmalar, artmış kanser yatkınlığını işaret etmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar *ATM* tümör baskılayıcı geni ile meme kanseri riski arasındaki bağlantıyı işaret etmektedir. A-T'li dişi heterozigot bireylerle yapılan çalışmalar, *ATM* mutasyonunun meme kanseri riskini 2 ile 5 kat arttırdığını göstermiştir (Thompson vd 2005, Renwick vd 2006). Bu nedenlerden dolayı *ATM* geniş oranda kabul edilen tümör baskılayıcı bir genidir. Ancak ATM proteininin meme kanserinin baskılanmasındaki fonksiyonunu tam olarak nasıl gerçekleştirdiği net değildir.

2.5.2. ATM proteini ve diğer PIKK üyeleri

ATM proteini COOH uç bölgesine sahiptir ve bu yapı ATM'yi yüksek organizasyonlu memeli canlılardan, tek hücreli organizmalara kadar korunmuş olan bir protein kinaz ailesi üyesi yapmaktadır (Banin vd 1998, Chaturvedi vd 1999). Bu protein ailesinin üyeleri özel bir yağ kinaz motifi içeren, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ailesi üyeleri ile benzerlik gösterir ve fosfatidilinositol 3-kinaz ile ilişkili kinazlar (PIKKs) olarak isimlendirilirler. PIKK ailesinin ATM dışındaki üyeleri; ATR, DNA-PKcs,

mTOR, SMG-1 ve TRRAP'tır (Lempiainen ve Halazonetis 2009). Bu protein ailesinin üyeleri aktif durumda iken oluşan strese karşı hücrel yanıtı organize ederler. ATM, ATR ve DNA-PKcs, DNA hasarına karşı oluşan hücrel yanıtın yönetilmesinde görev almaktadır (Durocher ve Jackson 2001). mTOR hücre büyümesinde, hücrenin besin ihtiyacı, enerji dönüşümlerine ve çevresel strese karşı oluşan cevapların kontrolünde görev alır (Wullschlegel vd 2006). SMG-1 kısmen zararlı ve kullanılmayan proteinlerin kodlanmasında görev alan mRNA fazlalığının oluşmasını önleyen mekanizma içerisinde yer alır (Yamashita vd 2005). TRRAP proteini ATM ile yüksek benzerlik göstermektedir ve transkripsiyonel adaptör protein olarak görev yaptığı düşünülmektedir (McMahon vd 1998).

2.5.3. ATM aktivasyonu ve bunu takip eden yollar

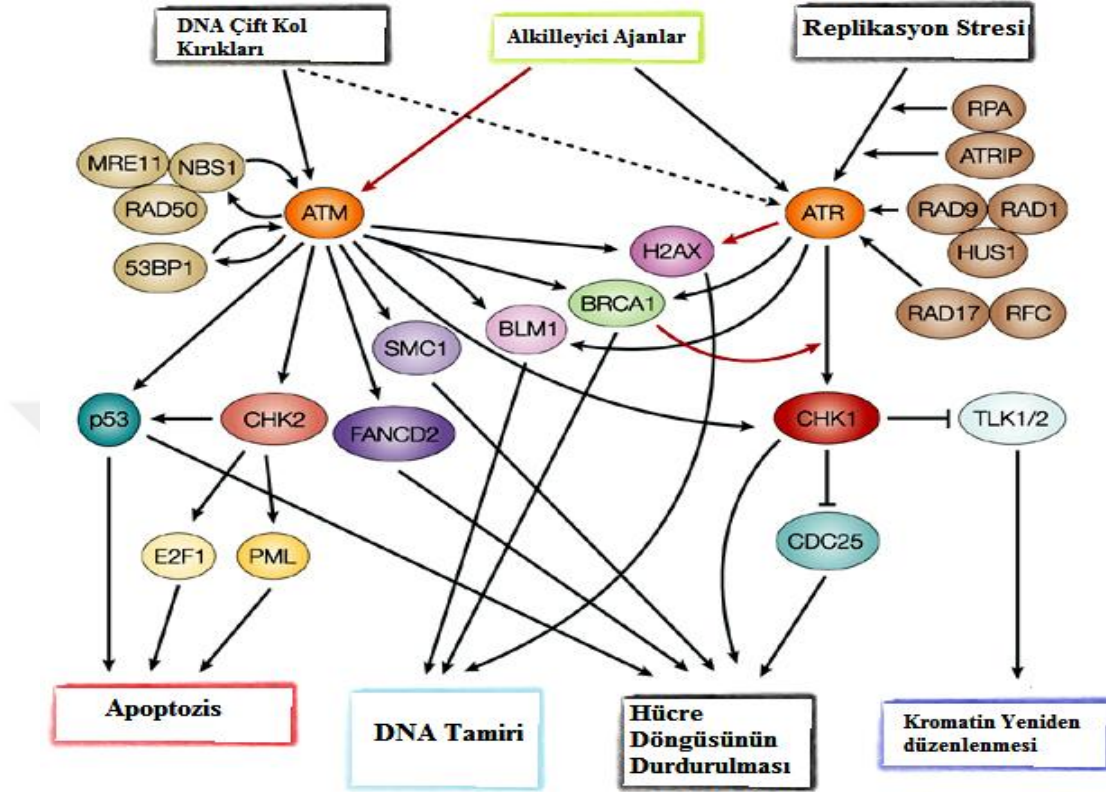
Hücrel DNA'da sürekli olarak çeşitli nedenler ile hasar meydana gelir. Meydana gelen bu hasar; tamir mekanizmalarını, hücre döngüsü kontrol noktalarını ve hücre ölümünü düzenleyen sinyal yollarını aktive eder (Banin vd 1998). ATM proteini normal hücrelerde dimer veya multimer şeklinde inaktif haldedir. Çevresel uyaranlar ile hücrede bir zarar oluşur ise ATM aktif hale gelir. ATM aktivasyonu ile ilgili farklı genotoksik ajanların farklı etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bakkenist ve Kastan (2003) hücrelerin IR'ye maruz bırakılmasını takiben ATM proteininin kendi kendini fosforilleyerek aktive olduğunu tespit etmişlerdir. Bu fosforillenme işlemi sırasında dimer haldeki ATM molekülünün kinaz bölgesi diğer ATM proteininin 1981. serin amino asidini fosforiller ve kompleks ayrılır (Bakkenist ve Kastan 2003).

ATM aktivasyonu için diğer bir yol Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) kompleks proteininin varlığıdır ki, birçok çalışma DNA hasarı sonrası ATM aktivasyonu için MRN proteininin gerekli olduğunu göstermektedir. MRN kompleksi Mre11, Rad50 ve Nbs1(p95) proteinlerinden oluşur (Trujillo vd 1998, Lee ve Paull 2005, Lee ve Paull 2007). Nbs1 alt biriminin DNA hasar yanıtı ve hücre bölünmesi kontrol noktalarının düzenlenmesinde ATM proteinini aktive eden birim olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Lim vd 2000, Buscemi vd 2001, Girard vd 2002). Hücrel DNA hasarına birçok çevresel etki yol açmakla birlikte diğer DNA hasarı nedeni oksidatif strestir. Hücrelerdeki ROS (reaktif oksijen türleri) miktarı artıp DNA hasarı meydana geldiği zaman ATM proteini aktifleşir ve bu protein DNA hasar yanıtını başlatır (Guo vd 2010).

Hücrel genotoksik stres dışında; hipoksi, yüksek tuz konsantrasyonu ve HDAC (histon deasetilaz) inhibitörlerinin de ATM proteini aktivasyonu sağladığı bilinmektedir. Hipoksik koşullar altında ATM'nin 1981. serin amino asidi fosforillenir ve aktif hale gelen ATM, Chk2'yi fosforiller. Bu olayları birçok aşağı yönlü sinyal iletim yolağının işlev görmesi takip eder (Shiloh ve Ziv 2013).

Günümüzde yapılan diğer çalışmalar düşündürmektedir ki; ATM çok yönlü bir proteindir ve sadece DNA hasarına oluşturulan yanıtta değil, hücre homeostazisini sağlamak içinde görev almaktadır. Ancak ATM ile ilgili yapılmış çoğu çalışma bu proteinin DNA çift kol kırıklarına karşı oluşturduğu yanıt ile ilgilidir. DNA hasarı nasıl ortaya çıkarsa çıksın, bu durum ATM proteininin bir dizi hücrel cevabı oluşturmak üzere aktive olmasını sağlar. Aktif ATM; p53, Chk2, BRCA1, RPAp34, H2AX, SMC1,

FANCD2, Rad17 ve Artemis'in de içinde bulunduğu hücre döngüsü kontrol noktalarında, DNA hasarının tamirinde ve apoptotik yanıtta görev alan birçok proteini fosforiller (Lee ve Paull 2007, Shiloh ve Ziv 2013).

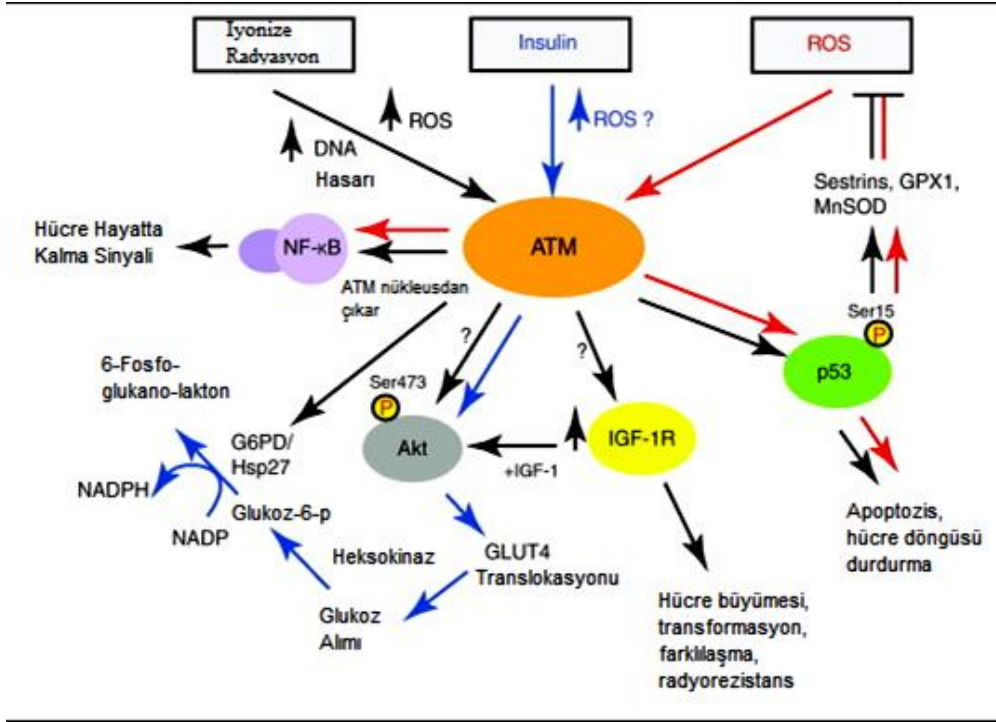


Şekil 2.4. ATM aktivasyonu ve aktif ATM'nin etkileşim sağladığı sinyal iletim yolları (Zhou ve Bartek 2004)

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi ATM birçok protein ve transkripsiyon faktörü ile ilişkilidir. ATF2 (Bhoumik vd 2005), HIF-1 α (Cam vd. 2010), NF- κ B (Rosato vd 2009) ve Sp1 (Beishline vd. 2012) ATM tarafından çeşitli hücrel stres durumunda aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. Bu tez kapsamında çalışılan ve ATM hedefi olan iki önemli yolak üzerinde durulacaktır. Bu proteinler HIF-1 α ve NF- κ B'dir.

2.6. NF- κ B Proteini ve ATM/NF- κ B İlişkisi

Ökaryot hücrelerdeki Rel/NF- κ B ailesine ait transkripsiyon faktörleri yapısal olarak birbiriyle ilişkili proteinlerden oluşur. Rel/NF- κ B transkripsiyon faktörleri yapısına katılan proteinler p50/p105, p52/p100, RelA(p65), c-Rel ve RelB'dir. Bu proteinler bir araya gelerek homodimer ya da heterodimer yapıdaki Rel/NF- κ B transkripsiyon faktörlerini oluştururlar. En yaygın Rel/NF- κ B transkripsiyon kompleksi RelA(p65)-p50'den oluşan heterodimer yapıdır ve özel olarak NF- κ B olarak adlandırılır (Pahl 1999).



Şekil 2.5. ATM/NF- κ B sinyal yolağı (Ditch ve Paull 2011)

NF- κ B hücre göçü, apoptozis, doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık, hücrenin hayatta kalması, metastaz ve anjiyogenez olaylarının kontrolünden sorumlu genlerin düzenlenmesinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B apoptozisi düzenler ve bu yüzden yeni kanser ilaçları geliştirmek için hedefdir. İnaktif haldeki NF- κ B sitoplazmaya yerleşir ve I κ B proteinine bağlı halde bulunur. IKK olarak bilinen bir kompleks protein, I κ B proteinini fosforilleyerek ubiquitin bağımlı yıkımını uyarır ve böylece NF- κ B serbest kalıp nükleusa girerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (Karin ve Ben-Neriah 2000, Wu vd 2006). IKK kompleksi 2 katalitik ve 1 düzenleyici alt birimden oluşur. Katalitik alt birimler IKK α (aynı zamanda IKK1 olarak da adlandırılır) ve IKK β (aynı zamanda IKK2 olarak da adlandırılır)'dır. Düzenleyici alt birim ise NEMO (aynı zamanda IKK γ olarak da adlandırılır)'dur. RelA alt birimi NF- κ B kompleksinin DNA'ya bağlanma bölgesidir (Cogswell vd 2000).

Birçok dışsal faktörün NF- κ B aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Bu faktörler arasında genotoksik stres, oksidatif stres, ısı şoku, etil alkol maruziyeti ve elektrik ile uyarılma yer almaktadır (Wuerzberger-Davis vd 2007). İyonize radyasyon ve topoizomeras hedef alan ilaçlar gibi genotoksik strese neden olan durumlarda IKK/NF- κ B yolağının aktif hale gelmesinin, ATM kinaz aktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Miyamoto 2011). IKK ve nükleer protein kinaz ATM çok yönlü DNA hasarı tarafından indüklenen NF- κ B aktivasyonu için önemlidir (Wu vd. 2010).

Li vd (2001) yaptıkları çalışmada IR'nin neden olduğu DNA çift kol kırıklarına yanıtta NF- κ B aktivasyonu için ATM gerekliliğini göstermişlerdir. Ancak daha ileri çalışmalar göstermiştir ki, genotoksik stres aracılı NF- κ B aktivasyonu için, ATM

aktivasyonu sağlanmış olsa dahi NEMO alt birimi gereklidir (Wuerzberger-Davis vd 2007).

Oksitatif strese neden olan ilaçlarla yapılan deneylerde, oksitatif strese yanıt olarak oluşan NF- κ B aktivasyonu için ATM-NEMO bağlantısı gerektiği gösterilmiştir. NEMO ya da ATM ekspresyonu azaltılmış gruplarda, NF- κ B aktivasyonu düşüşüne bağlı hücre ölümlerinde artış olduğu gözlenmiştir (Rosato vd 2009).

2.6.1. NF- κ B meme kanseri ilişkisi

Yukarıda da bahsedildiği üzere NF- κ B hücre göçü ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Brantley vd (2001) yaptıkları çalışmada fare meme epiteli gelişiminin NF- κ B tarafından düzenlendiğini göstermişlerdir. Cao vd (2001) fareler ile yaptıkları çalışmada meme bezi gelişimi ve süt üretimi için IKK α altı biriminin gerekli olduğunu göstermişlerdir. Yine Cao vd (2003) genetik olarak rekombine edilmiş farelerle yapılan çalışmasında, NF- κ B'nin meme bezi gibi birçok dokunun gelişiminde önemli olduğunu göstermişlerdir.

Sovak vd (1997) yaptıkları çalışmada MCF-7 ve 578T meme kanseri hücrelerinin yüksek oranda nükleer NF- κ B ekspresyonuna sahip olduğunu ve bu hücrelerde NF- κ B'nin doğrudan inhibisyonunun apoptozisi uyardığını ifade etmektedir. Ayrıca birincil fare meme tümörlerinde, normal fare meme bezi hücrelerindeki kıyasla yüksek oranda NF- κ B aktivasyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sebeple anormal nükleer NF- κ B ekspresyonunun meme kanseri ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Cogswell vd (2000) MCF-7, T47-D, MDA-MB-231, SKBr3 ve BT-474 insan meme kanseri hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, bu hücrelerde NF- κ B alt ünitesi p65/RelA aktivitesinin ve DNA bağlanma oranlarının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca meme kanseri hastalarından elde edilmiş primer hücre hatlarının yüksek NF- κ B aktivasyonuna sahip olduğunu göstermişlerdir.

Kim vd (2000) NF- κ B/Rel'in insan meme kanserinde anormal şekilde aktif olduğunu, bunun tümör hücrelerinin hayatta kalması ve hücre bölünmesini organize ettiğini göstermişlerdir. Dişi Sprague-Dawley (S-D) farelerinde yaptıkları çalışmada DMBA uygulaması yapılmış farelerde malignant tümör oluşumunun 7-9 haftadan, 3 haftaya düştüğünü ve farelerin %40'ının meme bezlerindeki hücrelerin nükleer NF- κ B/Rel miktarının arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca malin özelliği olmayan MCF-10F hücrelerinin DMBA ve Benzopiren müdahalesi sonrası malin transformasyona uğradığı ve NF- κ B aktivasyonunun 4-12 kat arttığını göstermişlerdir.

Biswas vd (2004) NF- κ B'nin çoğunlukla ER- ve ErbB2+ tümörlerde, ER+ tümörlere kıyasla daha yoğun bir şekilde aktif olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada SKBr3 meme kanseri hücrelerinde NF- κ B inhibisyonunun Heregulin aracılı hücre bölünmesini engellediğini ve hücrelerin apoptozise uğradığını göstermişlerdir.

Connelly vd (2011) meme tümörü geliştirmiş fare modellerinde yaptıkları çalışmada, meme tümörlü farelere NF- κ B inhibisyonu sağlayan ilaçlar verildiği zaman tümör gelişim sürecinin uzadığı ve tümör boyutlarının küçüldüğünü gözlemlemişlerdir.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, NF- κ B meme kanseri için önemli bir hedef proteindir ve bu proteinin bağlantı kurduğu yolların anlaşılması önem teşkil etmektedir. ATM aracılı NF- κ B aktivasyonu iyi şekilde çalışılmış ve gösterilmiştir. Bizim çalışmamız kapsamında ATM/NF- κ B üzerine ayrıca bir çalışma yapılmamıştır. Hem NF- κ B/HIF-1 α bağlantısı hem de NF- κ B/TRIM29 bağlantısı incelenmiştir. Bu proteinin meme kanserinde ki ifadesinin yüksek olması nedeniyle, çalışma kapsamında araştırılan TRIM29 bağlantısının anlaşılması önemlidir.

2.7. Kanser ve Hipoksi

Birçok kanser solid tümör içerir ve hızlı genişleme evresinde kan damarlarının olmadığı alanlara doğru büyüme olursa, bu durum hipoksik bölgelerin oluşmasına neden olur. Tümörler bu durumu anjiyogenik faktörlerin yardımı ile damar gelişimini uyararak çözerler. Ancak oksijen temini için uyarılan damar gelişimindeki anormallikler akut hipoksiye neden olur (Burroughs vd 2013). Kısacası hipoksi oksijen tüketimi ve varlığı arasındaki dengesizlikten dolayı ortaya çıkar ve tümörlerin normal oksijen tüketiminden daha düşük seviyede oksijen varlığını ifade etmektedir. Araştırmalar solid tümörlerin %50-60'lık kısmının, bütün tümör kitlesi içerisinde heterojen olarak yayılmış hipoksik dokular olabileceğini göstermektedir (Vaupel ve Mayer 2007).

Zhong vd (1999) değişmiş glikoz metabolizması ve hipoksiye hücrel adaptasyonun, kanser tedavisi ve biyolojisinin temeli olduğunu belirtmektedir. Bu tezini 4 durumun desteklediğini ileri sürmektedir. İlk olarak kanser hücrelerinin klonal genişlemesi için gelişmiş glikoz transportu ve glikolizin gerekli olması. İkincisi tümörlerin anjiyogenez olmaksızın büyümemeleri ve çoğu kanser vakasında hasta hayatta kalma süresinin damar gelişimi düzeyi ile yakından ilişkili olması. Üçüncüsü kanserde invazyon olasılığı, metastaz ve kanserin sebep olduğu ölümün tümör içerisindeki hipoksi ile bağlantılı olması. Son olarak ise tümör hipoksisinin kemoterapi, immünoterapi ve radyoterapiye dirençle ilişkili olmasıdır.

Zhong ve arkadaşları tarafımdan otaya atılan bu tezi daha açarsak ilk olarak Warburg etkisi ile ilgili bilgi vermek gerekmektedir. 1924 yılında Warburg kanser hücrelerinin normal hücrelerdekinden daha farklı bir glikoz metabolizmasına sahip olduğu gözlemledi. Bu gözlemin temelinde çoğu dokuda gerçekleşenin aksine, kanserli hücrelerin ortamda oksijen olsa bile glikozu laktoza fermente etmesi vardı. Warburg bu olayın kanserli hücrelerin mitokondrilerindeki bozukluklardan meydana geldiğini düşünüyordu ancak bu olayın kanser hücrelerinin önemli bir özelliği olduğu sonradan yapılan çalışmalar ile gösterildi (Warburg 1930, Heiden vd 2009).

Sürekli olarak büyüyen tümörler oksijen ve besin ihtiyaçlarının karşılanması için kan damarları gelişimini uyarırlar. Bu durum anjiyogenezis olarak bilinir ve tümör gelişimi için çok önemli bir süreçtir. Ancak tümörlerin aşırı ve damarların bulunduğu bölgenin dışına doğru büyümesi hipoksiyi artırır. Hipoksi ve anjiyogenezis

bağlantısındaki kilit rolü HIF-1 proteini üstlenmektedir. HIF-1 hipoksik yanıtın oluşmasında kontrol merkezidir ve HIF-1 hedef genleri anjiyogenez düzenlenmesinde görev alır. Bu nedenle hipoksi tarafından uyarılan anjiyogenezis, kanser tedavisi için cazip bir hedef halini almıştır (Liao ve Johnson 2007).

Metastaz oluşumu kanserin neden olduğu ölümlerin büyük bir çoğunluğunun nedenidir ve arkasındaki mekanizma ile ilgili bilgiler çok kısıtlıdır. Yapılan son çalışmalar metastaz sırasında transkribe olan genlerin kontrolünde, HIF-1'in fonksiyonel olarak görev aldığını işaret etmektedir (Gort vd 2008). Yaygın olarak tümör hipoksisinin potansiyel terepatik bir problem olduğu düşünülür, bunun sebebi hipoksinin solid tümörleri iyonize radyasyona ve kemoterapi ilaçlarına karşı daha dayanıklı hale getirmesidir. Hipoksi tümörlerin radyoterapiye ve kemoterapi ilaçlarına direncini, tümör hücrelerindeki genomik ve proteomik değişiklikleri uyararak yapar. Örneğin DNA tamir enzimlerinin miktarının arttırılması, HSP27 ve HSP70 gibi ısı şok proteinlerinin transkripsiyonunun uyarılması hipoksik tümörleri radyoterapiye karşı daha dirençli hale getirmektedir. Kan akışının zayıf olması kemoterapi ilaçlarının hipoksik tümörlerde etkinliğini düşürmektedir ve ayrıca bazı kemoterapik ilaçların etki mekanizmaları oksijen varlığına bağımlıdır (Harrison ve Blackwell 2004).

2.7.1. HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)

HIF-1 anjiyogenezis, oksijen transferi, demir metabolizması, glikoliz, büyüme faktörü sinyalleri, apoptozis, invazyon ve metastaz süreçlerinde görev alan hipoksi hedef genlerini aktive eden çok iyi tanımlanmış bir transkripsiyon faktörüdür (Bardos ve Ashcroft 2005). HIF-1 tümör hücrelerinin hipoksiye karşı adaptasyonunda önemli bir rol oynar ve 100'den daha fazla genin hipoksi sırasında transkripsiyonunu kontrol eder. Ayrıca HIF-1'in diğer proteinler ile etkileşime girerek hem kendi aktivasyonunu hem de başka proteinlerin stabilizasyonunu etkilediği düşünülmektedir (Liu vd 2012b).

Aktif HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β (aynı zamanda ARNT olarak da bilinir) alt ünitelerinden oluşmuş heterodimer yapıda bir proteindir. HIF-1 α 826 amino asit, HIF-1 β ise 789 amino asit içeren büyük proteinlerdir. İki alt ünite bHLH (basic-helix-loop-helix) transkripsiyon ailesinin üyesidir. Basic alt birimi DNA bağlanma bölgesi barındırır. HLH bölgesi ise iki proteinin dimerleşmesi için bağlantı bölgesi olarak görev alır. Her iki protein ayrıca PAS adı verilen özel bir bölge daha içerir ve bu bölge ise proteinin tanımlanmasında kullanılır. *HIF-1 α* geni 14. kromozom üzerinde yer alırken, HIF-1 β 1. kromozom üzerinde bulunur ve bu protein alt birimleri insan, rat ve farede %90 oranında homoloji gösterir. Ayrıca HIF-1 α oksijen bağımlı yıkım bölgesi içermektedir (ODD) ve bu bölge mükemmel bir şekilde oksijen varlığı ile kontrol edilir (Dery vd 2005).

HIF-1 β kurucu alt ünitesi hücrede sürekli olarak sentezlenir ve hem mRNA hem de protein sentezi oksijen seviyesi dikkate alınmaksızın devam eder. HIF-1 α proteini normal koşullarda devamlı olarak sentezlenir ancak ömrü çok kısadır (5 dakikadan daha az). Ortamda yeterli oksijen bulunduğu zaman HIF-1 α proteazom aracılığıyla parçalanır ve hücre normoksi halindeyken HIF-1 α proteini belirlenemez seviyededir. Hipoksi halinde HIF-1 α parçalanması engellenir ve HIF-1 β ile dimer oluşturarak aktif HIF-1 kompleksini oluşturur. HIF-1 kompleksi nükleusa geçer ve hedef genlerin

transkripsiyonunu uyarmak için çok iyi tanımlanmış HRE bölgesine bağlanır (Ke ve Costa 2006).

Yukarıda da bahsedildiği üzere HIF-1 α alt ünitesinin kontrolü protein seviyesinde O₂ (oksijen) bağımlı olarak kontrol edilir. HIF-1 α barındırdığı ODD bölgesi çok sayıda prolin rezidüsü içermektedir. Bu bölgeler prolin hidroksilaz enzimleri tarafından tanınır ve normoksi durumunda hidroksillenir. Hidroksillenmiş HIF-1 α , pVHL ve E3 ubiquitin ligaz kompleksi tarafından tanınır. Bu olayı HIF-1 α 'nın proteozomlarda yıkımı takip eder (Dery vd 2005).

HIF-1 α ve HIF-1 β (ARNT) proteinlerinin yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösterdikleri izoformlarıda tanımlanmıştır. Bu izoformlar HIF-2 α ve HIF-3 α , ARNT2 ve ARNT3'tür. HIF-2 α aynı zamanda EPAS-1 (endoteliyal PAS protein-1) olarak da bilinir ve hipoksi durumunda upregüle olur. Ayrıca amino asit içeriğinin %48'i HIF-1 α ile homoloji göstermektedir. HIF-2 α , HIF-1 β izoformu ARNT2 ile dimer oluşturur ve HRE'ye bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu HIF-1 α ile benzer şekilde uyarır. Yapısal ve fonksiyonel olarak paylaştıkları ortak özelliklerin yanı sıra, epitelial hücrelerde HIF-1 α , endoteliyal hücrelerde ise HIF-2 α 'nın daha baskın olduğu düşünülmektedir. HIF-3 α izoformu ise diğer izoformları kadar iyi çalışılmamıştır. Ancak çalışma prensibinin HIF-1 α ile benzer olduğu ve akciğer alveolü hücreleri gibi bazı hücre gruplarında daha yoğun olarak bulunduğu bilinmektedir (Bardos ve Ashcroft 2005, Ke ve Costa 2006, Li vd 2006).

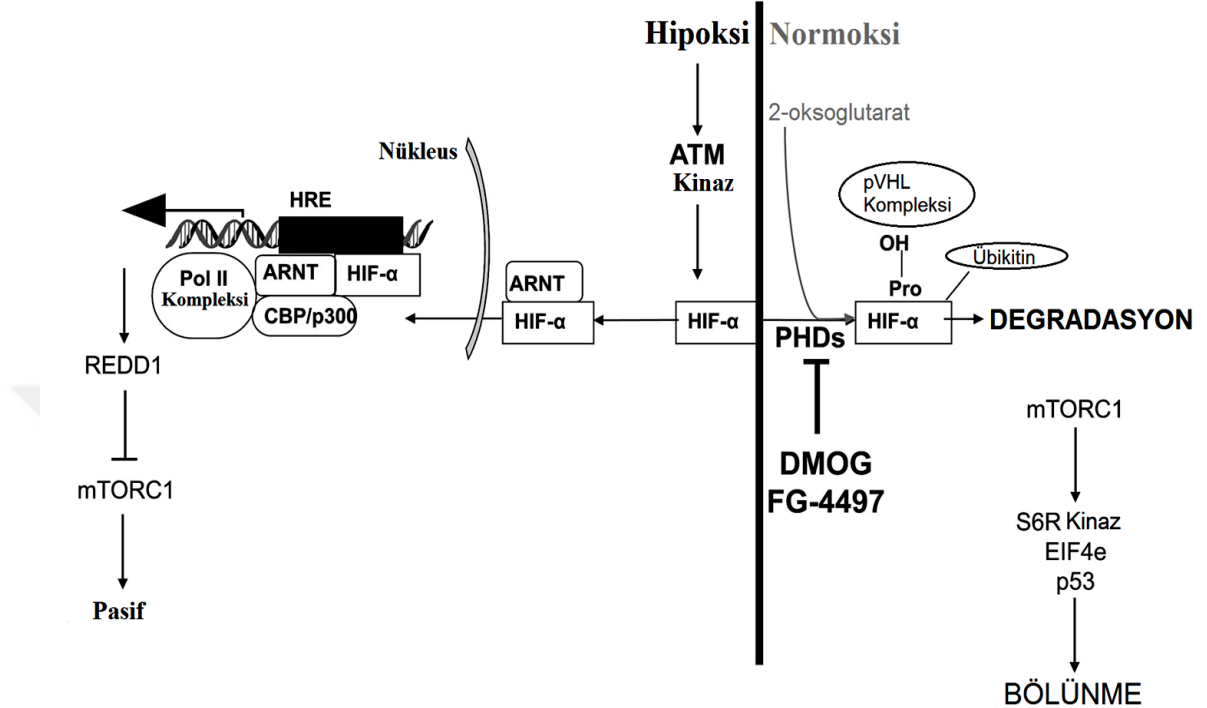
2.7.2. ATM Proteininin HIF-1 α bağlantısı

ATM, HIF-1 α bağlantısı ile ilgili literatürde farklı bilgiler bulunmaktadır ve sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Cam vd (2010) hipoksi sırasında ATM proteininin HIF-1 α 'yı fosforilleyerek aktive ettiğini ve bunun mTORC1 sinyalini baskıladığını bildirmişlerdir. mTORC1 kompleksi hipoksi gibi hücrede stres oluşturan durumlarda, hücre büyümesini ve metabolizmasını kontrol eder. Yapılan bu çalışmada A-T'li hastalardan elde edilen hücreler ve ATM^{-/-} farelerin fibroblast hücrelerine hipoksi uygulandığı zaman, HIF-1 α aktivasyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Bunu takiben hipoksi sırasında aktivasyonu azalan mTORC1'in, ATM inaktif hücrelerde normal aktivasyonuna devam ettiği gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada Ousset vd (2010) A-T'li hastalardan elde ettikleri farklı hücre gruplarının hipoksi sırasındaki HIF-1 α değişim miktarlarını test etmişlerdir. A-T'li bireylerden elde edilen hücrelerinin yanı sıra, ATM inaktivasyonu sağladıkları HeLa hücreleri kullanılmıştır. ATM inaktif hücrelere hipoksi uygulandığı zaman, kontrol gruplarına kıyasla HIF-1 α protein miktarının ATM inaktif hücrelerde daha çok arttığını bildirmişlerdir. Yine ATM inaktivasyonu gerçekleştirilmiş HeLa hücrelerinde hipoksi süresince daha yoğun HIF-1 α upregülasyonu belirlemişlerdir. ATM aktivasyonu bulunan hücrelerin hipoksi sırasında HIF-1 α miktar artışının, ATM inaktif hücrelerde gerçekleşen HIF-1 α artışına kıyasla daha az olduğu gösterilmiştir.

Yapılan iki çalışmada elde edilen sonuçlar ATM/HIF-1 α bağlantısı ile ilgili net bir bilgi sunmamaktadır. Biz çalışmamız boyunca meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde hipoksi sırasında ATM/HIF-1 α bağlantısını yeniden çalıştık. Bu bakımdan çalışmamızın literatürdeki bu çelişkiyi gidereceğini düşünmekteyiz.



Şekil 2.6. ATM/HIF-1 α bağlantısı ve normoksi hipoksi durumunda HIF-1 α regülasyonu (Forristal vd 2015)

2.7.3. NF- κ B Proteininin HIF-1 α bağlantısı

Hipoksik koşullar altında HIF-1 α aktivasyonu için bazal seviyede NF- κ B aktivitesi gerekli olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.

Koong vd (1994) memeli hücrelerinin düşük oksijene (%0,02 O₂) maruz bırakıldıklarında I κ B α parçalanmasının artmasına bağlı NF- κ B aktivasyonunun arttığını ve takibinde NF- κ B hedef genlerinin ifadelerinin yükseldiğini belirtmişlerdir.

Belaiba vd (2007) pulmoner arteri yumuşak kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hipoksik koşullar altında NF- κ B'nin nükleer translokasyonunun arttığını ve bunun HIF-1 α mRNA transkripsiyonunu arttırdığını ayrıca NF- κ B inaktivasyonunun ise hipoksik koşullarda HIF-1 α transkripsiyonunu durdurduğunu göstermişlerdir.

Rius vd (2008) IKK- $\beta^{-/-}$ farelerden elde ettikleri farklı hücre tiplerinde NF- κ B aktivasyonunun HIF-1 α transkripsiyonel aktivitesi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Aynı farelerin hipoksik koşullarda bekletilmesi sonucu karaciğer ve beyin hücreleri ile hipoksik hücrelerde bazal NF- κ B aktivasyonunun HIF-1 α protein akümüasyonu için

gerekli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca IKK- β eksikliğinde, HIF-1 α hedef genlerinin ekspresyonunun yetersiz olduğunu bildirmişlerdir.

Uden vd (2008) siRNA aracılı NF- κ B inaktivasyonunu takiben bazal HIF-1 α mRNA seviyesinin azaldığını ve bazal HIF-1 α ekspresyonu için NF- κ B gerekliliğini belirtmişlerdir. Ayrıca TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunu takiben HIF-1 α mRNA, protein ve aktivite miktarının arttığını göstermişlerdir.

Literatürde NF- κ B/HIF-1 α bağlantısı açık şekilde belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bu bağlantıyı meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde çalıştık. Ayrıca bu iki transkripsiyon faktörünün *TRIM29* geni üzerindeki etkileri araştırıldı.

2.8. TRIM29 (Tripartite motif-containing 29)

Tripartite motif-containing 29 (*TRIM29*), aynı zamanda Ataksi-Telanjiyektazili grup D tamamlayıcı geni (*ATDC*) olarak da bilinir, 11. kromozom üzerinde bulunur ve üçlü motif içeren TRIM protein ailesi üyesidir. Bu protein ailesi 70'ten daha fazla protein içerip benzersiz bir yapı ile karakterizedirler. TRIM protein ailesi üyeleri bir adet RING, bir ya da 2 adet B-boxes motifi ve coiled-coil (CC) bölgesi içermektedir (Short ve Cox 2006). Bu protein ailesi üyelerinden RING bölgesi içerenler E3 ubiquitin ligaz benzeri aktivite gösterirler (Reymond vd 2001). TRIM ailesi üyelerindeki bu çoklu protein bağlanma bölgelerinin varlığı, bu sınıf içerisindeki protein gruplarının diğer proteinler ile bağlantı kurmak için önemli ölçüde esnekliğe sahip olduğunu düşündürmektedir (Reymond vd 2001, Napolitano ve Meroni 2012). TRIM ailesindeki yapısal ve boyutsal farklılıklara bakıldığı zaman, bu proteinlerin; immün yanıt, transkripsiyonel düzenleme gibi onkogenik süreçler, apoptozis ve gelişim gibi geniş ölçekte biyolojik süreçlerde görev aldığı düşünülmektedir. Ayrıca *TRIM* genlerindeki mutasyonlar gelişim bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser oluşumu ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Hatakeyama 2011).

Diğer birçok TRIM protein ailesi üyesinin aksine TRIM29 RING bölgesi bulundurmaz (Short ve Cox 2006). Bu nedenle TRIM29 E3 ubiquitin ligaz aktivitesi göstermez. RING bölgesi içermeyen diğer TRIM ailesi proteinlerinin DNA hasar yanıtı ve apoptozisin düzenlenmesinde p53 ile bağlantı kurdukları düşünülmektedir (Yue vd 2014).

Yuan vd (2010) TRIM29'un p53'e bağlanarak p21 ve NOXA gibi genlerin transkripsiyonunu engelleyerek hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir.

Sho vd (2011) TRIM29'un bir asetil transferaz olan Tip60'a bağlandığını, normalin üzerinde TRIM29 ekspresyonunun Tip60 parçalanmasına sebep olarak p53 asetilasyonunu azalttığını ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada HCT116 hücrelerinde TRIM29'un, ultraviyolenin sebep olduğu apoptozisi baskıladığını göstermişlerdir.

TRIM29'un moleküler fonksiyonları ile ilgili yapılan çalışma sayısı sınırlıdır ve işlevlerinin anlaşılabilmesi için çalışmalar devam etmektedir. TRIM29 ve dahil olduğu protein grubunun kanserli hücrelerdeki akıbetinin ortaya çıkarılması için birçok çalışma

yapılmıştır. TRIM protein ailesine ait proteinler farklı kanser tiplerindeki gen transkripsiyonu çizgileri değişiklik göstermektedir.

Örneğin TRIM24'ün akut miyeloid lösemi ve meme kanserinde aşırı ifade edildiği, TRIM25'in yumurtalık kanserinde aşırı ifade edilirken, endometrial kanserde ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. *TRIM33* gen aktivasyonunun kronik miyelomonositik lösemide azaldığı belirtilmiştir (Hatakeyama 2011).

Kanserli dokulardaki TRIM29 ekspresyonu değişimi ile ilgili birçok çalışma olup, farklı kanser gruplarında TRIM29 ekspresyonu değişimi ile ilgili değişik sonuçlar sunulmuştur. Akciğer, mesane, kolon, yumurtalık, endometrial ve mide kanserlerinde TRIM29 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. TRIM29 ekspresyonunun meme ve prostat kanserinde azaldığı ya da DNA metilasyonu aracılığıyla baskılandığı tespit edilmiştir. Pankreas kanseri için *TRIM29* gen ekspresyonu artmaktadır ve bu proteinin pankreas kanseri için bir biyomarker protein olabileceği düşünülmektedir (Hatakeyama 2011, Avraham vd 2014).

TRIM40'ın gastrointestinal epiteli hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği, NF- κ B aktivitesinin TRIM40 tarafından engellendiği ve kolon kanserinde TRIM40 ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Noguchi vd 2011).

Liu vd (2012a) meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde yaptıkları çalışmada, MCF-7 (ER+) meme kanseri hücrelerinde TRIM29'un ifade edilmediğini, tümör oluşturmayan MCF-10A (ER-) hücrelerinin ise TRIM29 ekspresyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, MCF-10A hücre grubunda TRIM29 inaktivasyonunu takiben hücrelerin daha hızlı büyüyüp çoğaldıklarını, hücre göçü ve invazyonunun arttığını göstermişlerdir.

Çizelge 2.2. *TRIM* ailesine ait genler ve bu genlerin değişik kanser türlerinde uğradıkları değişimler (Hatakeyama 2011)

Gen	Kanser Tipi	Gözlenen değişimler
<i>TRIM8</i>	Gliyoblastom	Heterozigozite kaybı ya da gende delesyon
	Larinks kanseri	Nodal metastaz ilerlemesi ile kolerasyon
<i>TRIM13</i>	B hücre kronik lenfositik lösemi	Gende delesyon
	Kronik lenfositik lösemi	Gende delesyon
<i>TRIM19</i>	Akut promiyelositik lösemi	Kromozom translokasyonu: RARA
<i>TRIM24</i>	Papiller tiroid kanseri	Kromozom translokasyonu:MTC1
	Karaciğer Kanseri	Kromozom translokasyonu: BRAF
	MDS-bağılantılı AML	Artmış gen ekspresyonu
	Meme kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM25</i>	Ovaryum kanseri	Artmış ekspresyonu
	Meme kanseri	Erken teşhisin zorlaşması
	Endometriyal kanseri	Azalmış gen ekspresyonu
<i>TRIM27</i>	Lenfoma	Kromozom translokasyonu: RET
	Meme kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM28</i>	Mide kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM29</i>	Akciğer kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Mesane kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Kolon kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Ovaryum kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Endometriyal kanser	Artmış gen ekspresyonu
	Multipl myeloma	Artmış gen ekspresyonu
	Meme kanseri	Azalmış gen ekspresyonu
	Mide kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM31</i>	Mide kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM32</i>	Baş ve boyun kanseri	Artmış gen ekspresyonu
<i>TRIM33</i>	Kronik miyelomonositik lösemi	Azalmış gen ekspresyonu
<i>TRIM40</i>	Kolon kanseri	Azalmış gen ekspresyonu
<i>TRIM68</i>	Prostat kanseri	Artmış gen ekspresyonu

Ai vd (2014) birçok meme kanseri hücresinde TRIM29'un hipermetilasyon ile susturulduğunu göstermişlerdir. Ayrıca TRIM29 ifade eden meme kanseri hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben bu hücrelerde hücre bölünmesi, göçü ve invazyonunun arttığını bildirmişlerdir.

Avraham vd (2014) normal meme epiteli ve meme kanseri hücre gruplarında TRIM29 metilasyonu testi yapmışlardır. Normal meme epiteli hücrelerinde TRIM29'un herhangi bir metilasyona uğramamışken, ER+ meme kanseri hücrelerinde TRIM29'un metilasyona uğradığı gösterilmiştir.

Kanno vd (2014) prostat kanseri teşhisi için TRIM29'un yeni bir hücre belirteci olabileceğini ifade etmişlerdir. TRIM29 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda, TRIM29'un prostat kanserli dokularda kaybolduğunu göstermişlerdir.

Wang vd (2014) yine TRIM29 proteininin pankreas kanseri hücrelerinde aşırı ifade edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca TRIM29 inaktivasyonunu takiben pankreas kanseri hücrelerinin iyonize radyasyona daha hassas hale geldiğini ve hücrelerin apoptozise uğradıklarını belirtmişlerdir. İyonize radyasyona karşı pankreas hücrelerindeki direncin, ATM aracılı TRIM29 fosforilasyonu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Sun vd (2014) TRIM29'un, pankreas duktal adenokarsinomlarında ifade edilme düzeyinin arttığını ve normal pankreas hücrelerinde bu genin düşük seviyede olduğu gösterilmiştir. TRIM29 inaktivasyonunun pankreatik kanser hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü azalttığını belirtmişlerdir.

Tang vd (2013) tarafından TRIM8, TRIM22, TRIM38 ve TRIM40'ın aktivasyonunun NF- κ B aktivasyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Grubun akciğer kanseri hücreleri ile yaptığı çalışmada TRIM29 aşırı ekspresyonunun NF- κ B aktivasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Yine TRIM29 inaktivasyonunun NF- κ B aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Literatürde meme kanseri için ATM aracılı TRIM29 aktivasyonu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda ATM aracılı TRIM29'un transkripsiyonel kontrolü, meme kanseri hücrelerinde çalışılmıştır. Ayrıca ATM tarafından aktive edilen HIF-1 α ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin TRIM29 transkripsiyonu üzerindeki etkisi bugüne kadar araştırılmamıştır. Çalışmamız bu konuyu da içermektedir.

2.9. TWIST1

TWIST bHLH (basic-helix-loop-helix) ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür ve organogenez sürecinde görev alan proteinlerin sahip olduğu özel bir amino asit motifi içermektedir. TWIST ailesi iki üye ile temsil edilir, bunlar TWIST1 ve TWIST2'dir. TWIST2'nin gelişim sürecindeki işlevi net olarak bilinmemektedir ancak TWIST1 ile benzer işlevlere sahip olduğu düşünülmektedir. *Drosophila* embriyolarının TWIST1 mutasyonu sonrası normal gastrulasyon evresine girmemeleri ve ölmeleri sonrasında bu gen tespit edilmiştir. Devamında yapılan çalışmalar bu genin mezoderm gelişimi ve organ oluşumu için rolünü ortaya çıkarmıştır (Li vd 2012, Qin vd 2012, Craene ve Berx 2013). İnsan TWIST1 geni 7. kromozom üzerinde bulunur ve 2 ekson, 1 intron bölgesi içerir. Bu gen mutasyonu Saethre-Chotzen sendromuna neden olur (Howard vd 1997). TWIST genleri aynı zamanda kas, kemik gelişimi ve sinir sistemi oluşumu sürecinde görev alır. Normal gelişim sürecinin dışında, TWIST1

aktivasyonunun meme, mide ve prostat kanserinde arttığı tespit edilmiştir (Vesuna vd 2008).

Epitelyal mezenkimal transisyon (EMT) kanser hücrelerinin yayılması için anahtar mekanizmadır. Bu süreçte kanserli hücreler primer tümörden ayrılıp, doku, lenf sistemi ya da kan damarları içine göç etmelerini sağlayacak özellikleri kazanırlar. Ayrıca EMT kanserli hücrelerin kan damarlarından organlara hareket etmelerini sağlar. TWIST1 transkripsiyon faktörü kanser hücrelerinde EMT'yi ve hücre farklılaşmasını uyaran çok sayıda geni aktive eder. TWIST1'in apoptozisin engellenmesi ve kemoterapiye direnç ile alakalı olduğu düşünülmektedir (Finlay vd 2015). Buradan anlaşılabileceği üzere TWIST1 metastaz ve kanser hücrelerinin hayatta kalabilmeleri için anahtar rol üstlenmektedir. TWIST1'in meme kanserindeki durumunu inceleyecek olursak;

Li vd (2014) miR-720'nin TWIST1'i hedef alarak miktarını azalttığını bunu takiben meme tümörü invazyonu ve hücre göçünün azaldığını göstermişlerdir. TWIST1'in yeniden aktivasyonu E-kaderin ve β -katenin gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunu arttırırken, N-kaderin, fibronektin ve vimentin gibi belirteçlerin ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

Lin vd (2015) miR-33b ekspresyonunu meme kanseri hücrelerinde arttırarak TWIST1 ve diğer birçok onkogenik proteinin yapımının baskılandığını ortaya çıkarmışlardır. TWIST1 miktarındaki azalmanın, hücrelerin metastatik potansiyellerini azalttığını gösterilmiştir.

Ma vd (2015) Tamoxifen'nin ER- meme kanseri hücrelerinin invazyon ve metastaz özelliklerini, TWIST1 yıkımını hızlandırarak engellediğini göstermişlerdir. Çalışmada ayrıca TWIST1 mutasyonuna sahip yeni doğan farelerin yaşamadıklarını, yetişkin farelerde ise TWIST1 inaktivasyonunun uyarılmasının bir sağlık problemine neden olmadığını göstermişlerdir. Buda bu genin tedavi amaçlı inhibisyonunun, kanser metastazı ve invazyonunun engellenmesi için hedef alınabileceğini göstermektedir.

Yu vd (2015) meme kanseri hücre gruplarında TWIST1 aktivasyonunun azalmasının EMT'yi engellediğini bunu takiben ise hücre bölünmesi, göçü ve invazyonunun negatif yönde etkilendiğini göstermişlerdir.

Yapılan birçok çalışma TWIST1'in meme kanserinde ekspresyonunun arttığı ve bunun da kanserli hücrelerin metastatik özelliklerini arttırdığını göstermiştir. Çalışmamız kapsamında çalışacağımız NF- κ B, HIF-1 α ve TRIM29'un TWIST1 ile bağlantısını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Ancak literatür taraması sonucunda ATM-TWIST1 bağlantısı ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Pham vd (2007) kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı direnç geliştirmesinde TWIST1'in önemli olduğunu ve bu genin NF- κ B hedefi olduğunu belirlemişlerdir. TWIST1 kanser hücrelerinde bu koruyucu etkisini Bcl-2 inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir.

Yu vd (2013) TNF- α 'nın yutak altı kanserinde TWIST1 aktivasyonunu, NF- κ B upregülasyonunu uyararak gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Bir NF- κ B inhibitörü olan BAY11-7082 ve siRNA65 aracılı NF- κ B inhibisyonu sonrası TWIST1 miktarının azaldığını belirtmişlerdir.

TWIST1'in NF- κ B hedef geni olduğu bilinmektedir ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır.

Yang vd (2008) hipoksi ya da uyarılmış *HIF-1 α* gen ekspresyonunu takiben EMT'nin ve metastatik fenotipin uyarıldığını göstermişlerdir. Aynı deney grupları üzerinde yapılan ileri çalışmalar TWIST1 ekspresyonunun hipoksi ve artmış HIF-1 α ekspresyonunu takiben arttığını göstermiştir. Ancak siRNA aracılı TWIST1 inhibisyonunu takiben hipoksinin tekrar EMT ve metastatik karakterleri ortaya çıkardığını belirtmişlerdir.

Ai vd (2014) TRIM29 ve TWIST1 arasında meme kanseri hücrelerinde karşılıklı inhibisyon etkisinin olduğunu göstermişlerdir. TRIM29 ekspresyonu artışının TWIST1 aktivasyonunu azalttığını ve uyarılmış TWIST1 aktivasyonunun TRIM29 inhibisyonu gerçekleştirdiğini ifade etmişlerdir.

TWIST1'in HIF-1 α tarafından aktivasyonu bazı kanser hücresi gruplarında gösterilmiş fakat meme kanseri hücre gruplarında çalışılmamıştır. TRIM29 ve TWIST1 ilişkisi meme kanseri hücreleri için çalışılmıştır. Biz çalışmamızda ATM aracılı TRIM29-TWIST1 kontrolünün nasıl gerçekleştiğini bulmaya çalıştık. Ayrıca TRIM29-TWIST1 ilişkisinin hipoksik koşullar altında değişimini değerlendirdik.

2.10. Meme Kanseri Tedavisi

Kanser moleküler biyolojisindeki bilgi düzeyinin artması ve kanserin genetik bir hastalık olduğunun anlaşılması, bu hastalık ile mücadele yöntemlerinin değişmesine neden olmuştur. Her kanser çeşidi için erken teşhis hayati önem arz etmektedir. Günümüzde kanserin erken teşhisi için çok farklı teknikler geliştirilmiştir. Bu hastalık ile mücadelenin belki de en etkili basamağı, onu önceden bilmek ve gerekli tedaviye erken başlamaktır. Meme kanseri erken teşhisi için kendi kendine muayene, klinik meme muayenesi, mamografi, ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntüleme yöntemlerine başvurulabilir. Diğer önemli konu ise kansere neden olan çevresel faktörlerden uzak durabilmek, sağlıklı beslenme ve spor yapma alışkanlığıdır.

Meme kanseri ve diğer kanser türlerinde uygulanan tedavinin amacı kanserin ortaya çıktığı ve yayıldığı dokulardaki büyümesini kontrol altına almaktır. Meme kanseri için en yaygın kullanılan yöntemler cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik tedavidir. Bu tedavi yöntemleri meme kanserinin tipine, büyüklüğüne, evresine, büyüme hızına, kanser hücrelerinin sahip olduğu reseptörlere ve kişinin genel sağlık durumuna göre farklı şekillerde uygulanır.

Cerrahi tedavi yöntemi erken invaziv meme kanseri tedavisinde en yaygın kullanılan yöntemdir. Cerrahi tedavi için önemli olan meme kanserini erken aşamada,

kanserli hücreler yayılmadan ve başka dokuya taşınmadan teşhis edebilmektir (McCready vd 2004).

Radyoterapi hem erken hem de metastaz yapmamış ileri aşamadaki meme kanseri tedavisinde kullanılır. Radyoterapi, kemoterapi ve hormon terapi ile birlikte uygulandığı zaman hasta ömrünü 10 yıla kadar arttırdığı bilinmektedir. Tümörün yayılmasını önlemek ve hasta ömrünü uzatmak için yaygın kullanılan tedavi yöntemidir (Mansfield vd 1995).

Kemoterapi bütün kanserler için uygulanan bir ilaç tedavisidir. Hem kanserli dokuyu küçültmek hem de yapılan diğer tedavilere destek amacı ile uygulanabilir. Bazen birden fazla kemoterapi ilacı bir arada kanser tedavisi için kullanılabilir (Turna 2006).

Meme kanserinde hastalar sahip oldukları östrojen ve progesteron hormon reseptörlerine göre sınıflandırılabilirler. Bu hastalar için üretilmiş ve oral yolla alınan ilaç grubu hormon terapiyi oluşturmaktadır. Kanserli dokunun büyümesini, yayılmasını ve yeniden ortaya çıkmasını engellemek için kullanılan bir yöntemdir. Hormon reseptörü bakımından pozitif olan hastalarda cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi sonrasında ya da hastalığın herhangi bir aşamasında koruyucu veya tedavi etme amaçlı kullanılabilir (Alpözgen 2013).

Kanserle mücadelede yenilikçi yaklaşımların uygulandığı tedavi yöntemlerinin tamamı biyolojik tedavi adı altında sınıflandırılmaya başlanmıştır. Nanoteknoloji ile üretilmiş kanser hücrelerini hedef alan ilaçlar, gen terapisi, immünoterapi, hücre sinyal iletim yollarını hedef alan ilaçlar ya da tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun uyarılması yöntemleri bu grup içerisinde sınıflandırılabilir. Örneğin meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan Herceptin (trastuzumab) bir monoklonal antikordur ve belirli bazı proteinlere bağlanırlar. HER2 büyüme faktörü reseptörüdür ve Herceptin tarafından bloke edilerek inaktive edilir (Schramm vd 2015).

Meme kanseri ve diğer kanser çeşitleri için hedef odaklı tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Biyolojik tedavi yöntemlerinde kanserli hücrelerin gen aktivasyonu profillerinin bilinmesi önemlidir. Bu sebeple farklı kanser türlerindeki, kanserli hücreleri diğer hücrelerden ayıran özelliklerin ortaya çıkarılması kanser çalışmalarının temelini oluşturur. Ayrıca ortaya çıkarılan her bir yeni büyüme faktörü reseptörü, tümör baskılayıcı gen ve bunların bağlantı kurduğu diğer protein ve genler hakkındaki bilgi birikimi yeni fikirler ve yeni ilaçlar geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

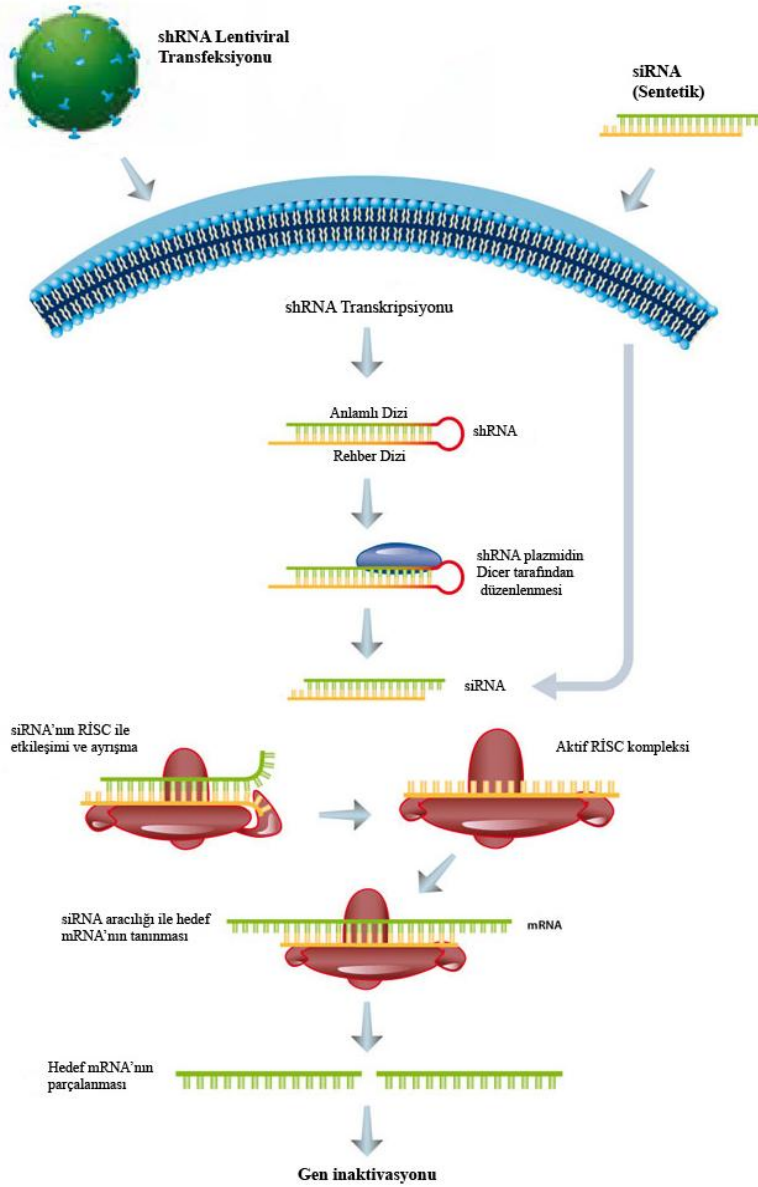
Bizim çalışmamızda meme kanseri için tümör baskılayıcı protein olduğu düşünülen ATM ve TRIM29 arasındaki bağlantı meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca birçok kanser türünde aşırı ekspresyona uğrayan *TWIST1* geninin bu iki tümör baskılayıcı gen ile ilişkisi araştırılmıştır. Yaptığımız bu çalışmanın meme kanseri ile mücadelede hedef odaklı tedavi süreçlerine fayda sağlayacağını düşünmekteyiz.

2.11. Çalışmada Kullanılan Bazı Yöntemlerle İlgili Genel Bilgiler

2.11.1. RNAi aracılı gen inaktivasyonu

RNA interference (RNAi) aracılı gen inaktivasyonu primer hücrelerde gen fonksiyonunun analiz edilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Gen mutasyonu yoluyla gen fonksiyonu çalışılmasına kıyasla bu yöntem daha hızlı ve etkilidir (Stewart vd 2003). RNAi ilk defa fare embriyolarında yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. RNAi aracılı gen inaktivasyonu mekanizması, temelde hedefe özgü sekans içeren çift sarmal bir RNA (dsRNA) yardımıyla özgül mRNA'nın parçalanmasıdır. Hedef mRNA'nın parçalanması iç kaynaklı RISC adı verilen proteinin görev aldığı enzimatik bir reaksiyon ile gerçekleştirilir. İlk olarak RNase III Dicer tarafından çift sarmal RNA 21-25 nükleotid içerecek şekilde düzenlenir. Çift sarmallı RNA'nın bir kolu Argonaute (Ago) ve çift sarmallı RNA bağlama proteinleri aracılığıyla, RISC proteinine bağlanır. RISC rehber RNA'yı kullanarak hedef mRNA'ya bağlanır ve parçalanmasını sağlar. Birçok RNAi metodu bulunmaktadır (Kawasaki vd 2005, Moore vd 2010). Bu çalışma kapsamında kullanılan siRNA ve shRNA yöntemleridir.

siRNA yöntemi en basit yöntemlerden biridir. Kimyasal olarak sentezlenmiş RNA oligonükleotidlerin doğrudan sitoplazmaya aktarılması ile gerçekleştirilir. Sitoplazmaya aktarılma oranları kullanılan transfeksiyon ajanının etkinliğine bağlıdır ve yüksek oranda gen inaktivasyonunun sağlandığı bir yöntemdir. Ancak bu yöntem ile sağlanan gen inaktivasyonu kısa sürelidir (Moore vd 2010).



Şekil 2.7. RNAi aracılı gen inaktivasyonu (Uder vd 2011)

Diğer RNAi gen inaktivasyonu hedef hücreye vektör aracılı shRNA'ların üretilmesi yoluyla yapılır. Paketleme sistemi olarak adlandırılan genel kullanımda, shRNA vektörü, psPAX2 ve pMD2.G vektörü ile birlikte aracı bir hücreye aktararak virüs üretimi yapılır. Daha sonra hücreler hedef gene ait shRNA vektörü bulunduran virüslerle enfekte edilir. shRNA vektörler lentivirüsler aracılığıyla hedef hücreye aktarılırlar ve genom içerisine entegre olurlar. Genoma entegre olan plazmid vektör hücre bölünmesi sırasında transkripte edilir ve hedef gene ait siRNA oluşarak geni inaktive eder (Moore vd 2010).

2.11.2. İmmünoblot (western blot)

Bu yöntem homojenize doku ya da hücre kültürü örneklerinde hedef protein varlığının belirlenmesinde ya da protein miktarı değişimlerinin kalitatif olarak analiz

edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntem poliakrilamid jelde yürütülen proteinlerin, nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra uygun antikor bağlanarak görüntülenmesi temeline dayanır.

Poliakrilamid jel elektroforezi protein analizi ve saflaştırması yapan her laboratuvar için standart bir teknik haline gelmiştir. Daha sıklıkla miktar ve protein büyüklüğü çalışmalarında kullanılır. Poliakrilamid jel elektroforezinin protein ayırıştırma oranı jelin por büyüklüğü ile ilişkilidir ve çalışılan proteinin büyüklüğüne göre farklı konsantrasyonlarda kullanılarak daha yüksek verimde ayırıştırma sağlanır. Büyük proteinler için düşük, küçük proteinler için yüksek konsantrasyonda jel kullanılması gerekmektedir (Towbin vd 1979). Jelde proteinler yürütülürken moleküler ağırlık belirteci kullanılması gerekmektedir. Moleküler ağırlık belirteci hedef proteininin bulunduğu aralık bilineceği için en son görüntüleme aşamasında hedef proteininin doğru görüntülenip görüntülenmediğini belirlememize yardımcı olur (Tsang vd 1984).

Proteinlerin poliakrilamid jelde yürütülmesinden sonra diğer önemli basamak bu proteinlerin jelden ayrılmasıdır. Bu aşama için nitroselüloz membran 1980'li yılların başından beri kullanılmaktadır ve kullanılan diğer malzemelere kıyasla yüksek başarı elde edilmesini sağlamıştır (Burnette 1981). Başarılı bir transfer western blot çalışmasının en önemli basamağını oluşturur. Aktarılma işleminin başarılı yapılması hedef odaklı değişebilir. Eğer hedef protein küçük bir protein ise aktarımın kısa sürede güçlü bir voltaj ile yapılması en uygundur. Hedef protein büyük ise uzun sürede düşük voltaj uygulaması gerekmektedir (Brown vd 1999).

Western blot'un en son aşaması membrandaki hedef proteininin uygun antikor ile etkileşimi sağlanarak görüntü alınmasıdır. Başarılı transfer işleminden sonra iyi çalışan bir antikor kullanılarak güvenilir bir western blot sonucu alınacaktır. Antikor bağlanması aşaması için hangi konsantrasyonda antikor kullanılacağı, inkübasyonunun yapılacağı sıcaklık ve süre etkin bağlanmayı etkileyecek değişkenlerdir. Bunların belirlenmesi için yeni çalışılan antikor ile kontrollü olarak deneme yapıp sonuçların kıyaslanması gerekmektedir. Uygun koşullar belirlendikten sonra yapılan antikor bağlama işlemini immüno blot sonuçlarının X-ray filmlerine aktarılması takip eder ve sonuçlar değerlendirilir (Brown vd 1999).

2.11.3. Eş zamanlı qRT-PCR

PCR yöntemi moleküler biyolojide kullanılan bir genin çok sayıda kopyasını yaparak, gen aktivasyonu ve gen ekspresyonu düzeylerini belirlemek için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Çok sayıda farklı PCR yöntemi bulunmaktadır ve bu yöntemler filogeni, kalıtsal hastalıkların teşhisi, sekans analizi, DNA klonlama, genlerin fonksiyonel analizi, genetik kimlik çalışmaları gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Klasik PCR niteleyici olarak gen varlığını ya da miktarını analiz etmek için kullanılır. Bütün PCR türlerinde hedef gene özgü primerler dizayn edilir ve bu primerler özgü gen bölgeleri PCR cihazları yardımıyla çoğaltılır. Sonradan geliştirilen ve gen ekspresyonuna ait kantitatif veri sunan qPCR küçük miktarda DNA ya da mRNA'yı

analiz edebilmektedir. mRNA kullanılarak gen ekspresyonunu analiz etmek için kullanılan PCR yöntemi RT-PCR olarak adlandırılır (Gibson vd 1996). Kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan eş zamanlı PCR cihazlarının geliştirilmesiyle RNA miktarının belirlenmesi gen ekspresyonu değişimi ve aktivasyon kıyaslamaları çok kolaylaşmıştır. Eş zamanlı qRT-PCR çok hassas bir şekilde hedef gene ait mRNA miktarının analizinin yapılmasına olanak sağlar. Bu teknikte ilk olarak RNA izolasyonu yapılır. İzole edilen RNA'nın saf olması elde edilen sonuçların güvenilirliği için çok önemlidir. Daha sonra RNA'dan reverse transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA elde edilir. Bu aşamada kullanılan enzimin kalitesi ve reaksiyon koşullarının doğru optimize edilmesi elde edilen cDNA kalitesini etkileyen önemli faktörlerdir. Daha sonra elde edilen cDNA'nın analizi için birçok farklı yol kullanılabilir. En yaygın ve güvenilir yöntem DNA ya bağlanan boyaların verdiği floresansa göre ölçüm yapan eş zamanlı PCR cihazlarıdır (Bustin 2000). Yaygın bir şekilde Sybr Green boyası kullanılır. Bu boya PCR reaksiyonu sonucu oluşan çift zincir DNA'ya bağlanır ve sadece bağlanma sonrası floresan ışık oluşturur. PCR reaksiyonu döngüleri boyunca DNA miktarının fazlalığına göre Sybr Green tarafından oluşturulan floresan artar. PCR cihazı bu gene ait floresan değerlerini ilk döngüden itibaren alır gene ait gerçek sinyalin okunduğu döngü sayısı CT numarası olarak kaydedilir ve hesaplamalar için kullanılır (Morrison vd 1998).

Eş zamanlı qRT-PCR'de elde edilen CT değerleri üzerinde iki tür hesaplama yapılmaktadır. Bunlardan biri rölatif hesaplamadır ve hedef genin ekspresyon değişimi referans olarak kullanılan bir genden çıkartılarak yapılır. Diğer yöntem ise kesin hesaplama yöntemidir. Bu yöntemde ise dahili ya da harici bir kalibrasyon eğrisi temel alınarak hesaplama yapılır (Pfaffl 2001).

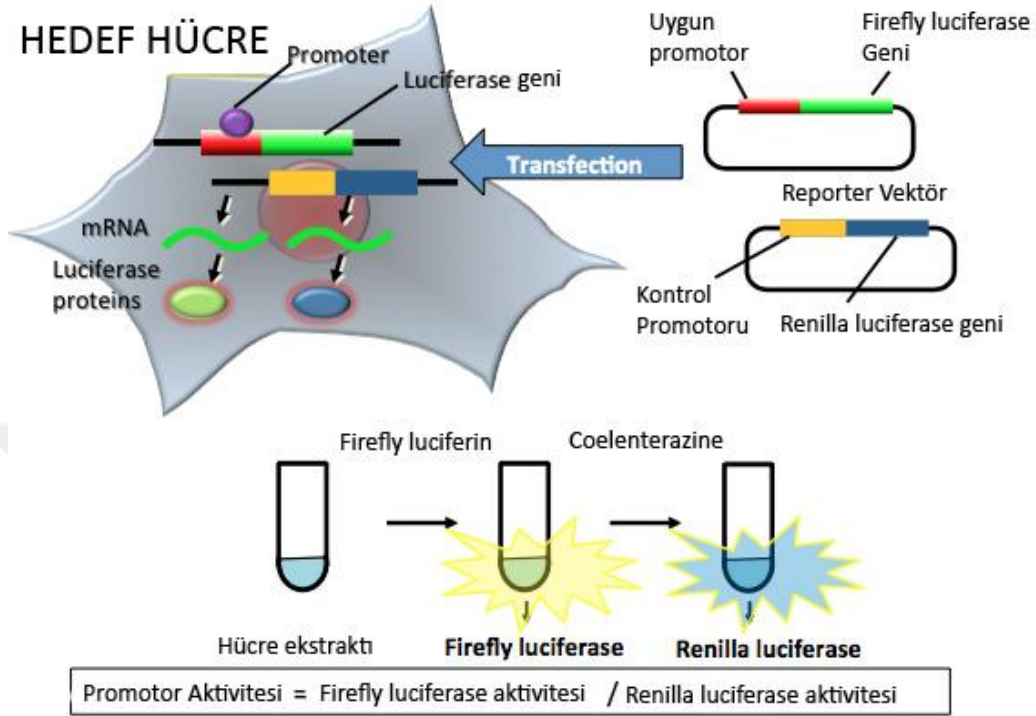
2.11.4. Lusiferaz reporter testi

Genetik reporter moleküller gen ifadesi çalışmalarında indikatör olarak kullanılırlar. Bu sistem hedef genin klonlandığı reporter plazmid ile transfekte edilmiş hücrenin dışarıdan verilen uyarı ya da hücrede değişim gösteren bir faktöre verdiği tepkinin, gen promotorundaki aktivite değişimini nasıl etkilediğini analiz etmek için kullanılır (Brasier vd 1989).

Lusiferaz reporter teknolojisi, lusiferaz enziminin lusiferin substratı ile etkileşime girmesi esasına dayanır ki bu olay biyoluminesans süreci aracılığı ile ışık oluşturur. Biyoluminesans olayı birçok organizmada meydana gelir ancak en yaygın olarak kullanılan biyoluminesant, firefly (*Photinus pyralis*) lusiferaz'dır. 61 kDa büyüklüğündeki bu monomerik enzim iki basamaklı oksidasyon reaksiyonlarını katalizler ve yeşil ışık oluşturur. Lusiferaz kodlayan gen, *luc* olarak bilinir ve herhangi bir post-translasyonel dönüşüme uğramaz. Diğer yaygın kullanılan lusiferaz *Renilla reniformis*'den elde edilen Renilla lusiferaz'dır. 36 kDa büyüklüğündeki bu monomerik enzim ise coelenterazine'yi coelenterami'de oksitler ve mavi ışık oluşturur. Renilla kodlayan gen *Rluc* herhangi bir post-translasyonel değişime uğramaz (Wood 2007).

Klasik reporter assay yönteminde tek bir reporter plazmidi kullanılır ve hedef gen lusiferaz plazmidinin yanıt elementinin aşağısına klonlanır. Eğer değişen koşullar genin daha yüksek promotor aktivitesine yol açarsa, o kadar çok lusiferaz mRNA'sı

transkripte olur ve enzim miktarına bağlı olarak ışık oluşumu artar. Bu yöntemle tek reporter plazmid kullanılarak genin transkripsiyonel aktivitesi değerlendirilebilir (Allard 2008).



Şekil 2.8. Çift aşamalı lusiferaz reporter testi (Ohmiya 2014)

Çift aşamalı reporter testinde ise hem Firefly hem de Renilla reporter plazmidleri ile hücreler aynı anda transfekte edilir. Firefly lusiferaz geni, hedef genin yanıt bölgesinin aşağısına klonlanır. Renilla plazmidini ise bütün koşullar altında sürekli aktif olacak şekilde çalışır. Renilla lusiferaz kontrol plazmidini normal seviyede lusiferaz üretir diğer plazmid ise hedef genin değişkenden etkilenme seviyesine bağlı olarak lusiferaz üretimi yapar. İki plazmid farklı lusiferaz ışığı oluşturur ve bu veriler luminometrede ölçülür. İki verinin birbirine oranlanması ile hedef genin promotor aktivitesinin verdiği tepkiyi ortaya koyar (Allard 2008).

3. MATERYAL ve METOT

Çalışma 2014 ve 2015 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Florida Üniversitesi Kanser Genetik Araştırma Merkezinde yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre hatları

Çalışmada SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve BT-549 meme kanseri hücreleri ile HMEC insan meme epiteli hücrelerinin sürekli kültürü yapılmıştır. Ayrıca Çizelge 3.1’de verilen diğer hücre grupları *TRIM29* gen ifadesi miktarının analizini yapmak için kısa süre kültüre edilmiştir. Kültüre edilen hücrelerin özellikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan gereçler

Vorteks karıştırıcı (Nuve Mix), mikro santrifüj (Eppendorf), elektroforez için güç kaynağı (Thermo), elektroforez sistemi (Thermo), jel görüntüleme sistemi (ImageQuart 300), mikrodalga fırın (Kenmore), hassas terazi (Smart Weight Digital Pro), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Hanna Instruments HI 190M), pH metre (Impermeables), PCR cihazı (Labnet MultiGene Optimax Thermal Cycler), otomatik pipet takımı (Eppendorf), su banyosu (Edvotek), western blot sistemi (Bio-Red), western blot film okuyucu (Kodak), eş zamanlı qRT-PCR cihazı (Applied Biosystems), hücre kültür etüvü (Thermo), hücre kültür kabini (Clemson), -20 ve -80°C soğutucular (Thermo) ve 96 plate okuyucu spektrofotometre (SpectraMAX) cihazları tez çalışması boyunca kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan hücrelerin genel özellikleri (Holliday ve Speirs 2011)

Hücre Hattı	Reseptör	Tümörijenisite	Hastalık	Hücre Tipi	Motilite
MCF-7	ER+, PR+/-, HER2-	+	Adenokarsinoma	Epiteliyal	++
MDA-MB-231	ER-, EGF+, TGF α	+	Adenokarsinoma	Epiteliyal	++++
MD-MB-468	ER-, EGF+, TGF α , PR-, HER2-	+	Adenokarsinoma	Epiteliyal	+++
T47-D	ER+, PR+/-, HER2-	+	Duktal karsinoma	Epiteliyal	+++
HMEC	ER-	-	-	Epiteliyal	-
MCF-10	ER+, EGF+	-	Fibrokistik	Epiteliyal	+
SKBr3	ER-, PR-, HER2+	+	Adenokarsinoma	Epiteliyal	++
BT-549	ER-, PR-, HER2-	+	Duktal karsinoma	Epiteliyal	+
MDA-MB-435	ER-	+	Adenokarsinoma	Epiteliyal	++++

3.1.3. Kimyasal çözeltiler

Dondurucu Solüsyonu

%90 FBS+%10 DMSO olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

LB Agar

10 g Bacto tryptone

5 g Yeast extract (maya ekstraktı)

10 g NaCl, 800 ml dH₂O ile karıştırıldı ve NaOH ile pH 7.5 olacak şekilde ayarlandı.

Daha sonra 15 g agar eklendi, hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlandı ve otoklavla steril hale getirilirdi.

Süper Brot

35 g Tryptone

20 g Yeast extract (maya ekstraktı)

5 g NaCl

5 mL 1 N NaOH, 1 L suda çözüldü ve otoklavla steril hale getirilirdi.

SOC Besiyeri

20 g Bacto tryptone

5 g Yeast extract (maya ekstraktı)

2 ml 5 M NaCl

2,5 ml 1 M KCl

10 ml 1 M MgCl₂

10 ml 1 M MgSO₄

20 ml 1 M glukoz'u, 900 ml ddH₂O içerisinde çözüldü ve hacmi 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı. Otoklovla steril hale getirildi.

10XTAE

48,5 g Tris

11,4 ml Glasiyal asetik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0), 1 L suda karıştırılarak stok 10XTAE hazırlandı.

Protein Lizis Tamponu

125 mM Tris-HCl (pH 7.5)

5 mM EDTA

%1 SDS, ihtiyaca göre verilen miktarlarla içerik kullanılarak hazırlandı.

SDS-PAGE Tamponu

150 mM Tris-HCl (pH 6.8)

%10 B-merkaptetanol

%20 Gliserin

%3 SDS

%0,01 Brom fenol mavi

%0,01 Pyronin-Y içeriği toplam hacim 100 ml olacak şekilde iyice karıştırılarak hazırlandı, süzme işlemi yapıldı ve ependorf tüplerine bölündü.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu

28,8 g Glisin

6,04 g Tris baz

2 g SDS 1600 ml dH₂O içerisinde çözöldü ve hacmi 2 L'ye tamamlandı.

Transfer Tamponu

28,8 g Glisin

6,04 g Tris Bazı 1,6 L dH₂O ile çözöldü ve 200 ml Methanol eklendi. İyice karıştırıldı ve toplam hacmi dH₂O ile 2 L'ye tamamlandı.

Ponceau boyası

1 g Ponceau S

50 ml Asetik asit, 1 L ddH₂O'ya eklendi, iyice karıştırıldı ve filtreden geçirilerek hazırlandı.

1xTBST

20 mM Tris

137 mM NaCl (pH 7.6)

1 ml Tween20 eklendi ve iyice karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Metot**3.2.1. Hücre kültürü**

SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve BT-549 meme kanseri hücreleri ile HMEC insan meme epiteli hücre hatları American Type Culture Collection'dan temin edildi (ATCC Manassas, VA). Bütün hücre hatları %10 FBS ve 5 ml Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş, 4,5 Glukoz, L-Glutamin ve Sodyum piruvat içeren hazır DMEM (Cellgro) ortamında Ai vd (2012) tanımlandığı şekilde kültüre edildi. Bütün hücre grupları %5 CO₂ ve 37 °C'de hücre kültür etüvünde (THERMO) steril şartlarda kültüre edildi. Hücre kültürü için, ihtiyaç duyulan miktara uygun olacak şekilde 100x20 mm, 35x10mm ve 60mm boyutlarında steril kültür plateleri kullanıldı.

3.2.2. Hücre pasajlama

Hücre pasajlaması hücre yoğunluğu %80-90'a ulaşınca yapıldı. İstenilen hücre yoğunluğu yakalanınca ilk olarak kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 3 ml PBS ile iki defa yıkandı. PBS uzaklaştırıldı ve kullanılan kültür plate büyüklüğüne göre tripsin (100x20 mm plate için 1,5 ml, 60 mm için 500 µl ve 35x10 mm için 300 µl) eklendi. Hücreler plate yüzeyinden ayrılncaya kadar etüvde inkübe edildi. Hücreler plate yüzeyinden ayrılınca, plate büyüklüğüne göre farklı miktarda (100x20 mm plate için 10 ml, 60 mm için 3 ml ve 35x10 mm için 2 ml) DMEM besiyeri ile tripsin etkisi inhibe edildi ve hücreler yeni platelere pasajlandı.

Hücreler eğer daha uzun süre inkübe edilmeyecekse tripsin uygulanmasından sonra 5 ml DMEM eklenerek, 15 ml falkon tüplerine aktarıldı ve 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve dondurucu solüsyonundan 500 µl eklenerek

hücreler 6 ay ve daha kısa süre için -80°C’de, uzun dönemli stoklar için sıvı nitrojen içerisinde bekletildi.

3.2.3. Hücre proliferasyon analizi (MTT)

Hücre proliferasyon analizi CellTiter-Blue Reagent (Promega) üretici firma tarafından belirlenen protokole ve Ai vd 2008’de uygulandığı şekilde yapıldı.

- Test uygulanacak her bir hücre grubu 12’li plaka, toplam hacim 2 ml olacak şekilde kültüre edildi.
- Hücreler 24 ve 48 saatlik periyotlarda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 2 kere PBS ile yıkandı.
- 2 ml besiyeri ve 200 µl CellTiter-Blue Reagent eklendi. 10 saniye çalkalama işleminden sonra hücreler 1,5 saat boyunca normal kültür koşullarında inkübe edildi.
- 100 µl besiyeri kültürden alındı ve 560/580 nm’de BMG Labtech marka florimetre de ölçüm yapıldı. 24 saatlik kültürdeki hücre konsantrasyonu 48 saatteki hücre konsantrasyonuna kıyaslanarak grafikler oluşturuldu.

3.2.3.1. İstatistiksel analiz

Hücre proliferasyonu analizi sonucu elde edilen sayısal veriler SPSS programı kullanılarak analiz edildi. Analiz işleminde t testi kullanıldı ve $\alpha=0,05$ değerine göre önem aralığı belirlendi (Ai vd 2014).

3.2.4. Plazmid DNA transformasyonu ve izolasyonu

shRNA plazmid vektörlerinden yeteri kadar elde etmek için bu plazmidler DH α 5 olarak bilinen *E.coli* hücrelerine transforme edilip çoğaltılmaları gerekmektedir. Bunun için öncelikle LB brot agar hazırlandı. LB agar otoklavda steril hale getirildi ve plâtelere eşit miktarda dağıtılarak soğuması beklendi. Her plazmid vektör için ayrı DH α 5 hücresi kullanıldı. LB ağarlar hazır hale gelince;

- Öncelikle her shRNA plazmidi özel ependorf tüpleri içindeki DH α 5 hücre ortamına toplam hacmi 1 µg olacak şekilde eklendi ve 1-2 saat buz içerisinde bekletildi.
- Buz içinden alınan ependorf 1-2 dk 42°C’de hot-shock işlemi için su banyosunda bekletildi, ependorf tüpüne 500 µl SOC besiyeri eklendi ve 2 saat 37 °C’de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
- shRNA plazmidi ile transforme olmuş DH α 5 hücreleri ampisilin içeren LB ağarlara ekildi ve 1 gün boyunca 37 °C’de inkübe edildi.
- Normal koşullarda DH α 5 hücreleri ampisilin direnç geni taşımazlar. Transforme olmuş hücreler ampisilin direnç geni içeren shRNA vektörlerini aldıkları için LB ağarda tek koloniler oluştururlar.
- Seçilen tek koloni hedef gene ait shRNA içeren plazmid taşımaktadır. Bu plazmid DNA’sından yeteri kadar elde edebilmek için süper brot içerisinde çoğaltılması gerekir.

- shRNA içeren tek koloniler seçildi ve 5ml süper brot içerisinde en fazla 18 saat süre boyunca çalkalamalı etüvde 37 °C’de inkübe edildi.

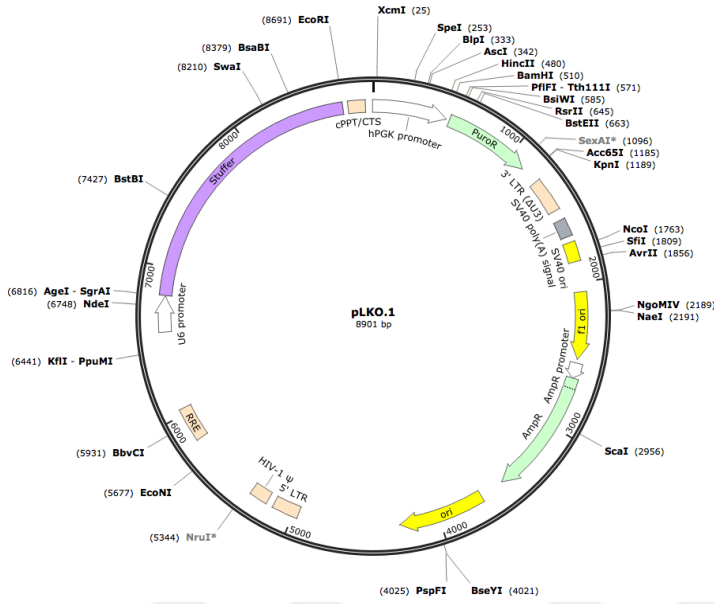
Yeterli miktarda bakteri üretimi sağlandıktan sonra Thermo GeneJet Miniprep Kit’i kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

- Öncelikle süper brot içerisindeki ortam ependorf tüplerine aktarıldı, santrifüj edildi ve bakteri peleti elde edildi.
- Her örnek peleti için 250 µl Resuspension çözeltisi eklendi ve pipetleme yapılarak bütün pelet sıvı içerisinde homojen hale getirildi.
- 250 µl Lizis çözeltisi eklendi ve ependorf tüpü alt üst edilerek Resuspension çözeltisi ile iyice karışması sağlandı.
- En son olarak Neutralization çözeltisi eklendi, tekrar ependorf tüpü alt üst edilerek bütün içeriğin karışması sağlandı ve 5 dk 14000 rpm’de santrifüj edildi.
- Elde edilen süpernatant firma tarafından sağlanan spin kolonlara aktarıldı ve 1 dk santrifüj edildi.
- Kolondaki filtreye aktarılan plazmid DNA’ları 2 kere yıkama çözeltisi ile yıkanıp diğer hücresel yapılardan arındırıldı.
- Kit tarafından sağlanan Elution çözeltisinden 50 µl kolon içindeki filtreye eklenerek 2 dk beklendi ve 2 dk 14000 rpm’de santrifüj edilerek, plazmid DNA’ları ependorf tüpüne aktarıldı. Plazmid DNA konsantrasyon oranları spektrofotometrede dsDNA ölçüm için hazırlanmış özel program ile belirlendi. Plazmid DNA’ları 1/50 oranında sulandırılarak ölçüm yapıldı.

3.2.5. RNA interference (RNAi)

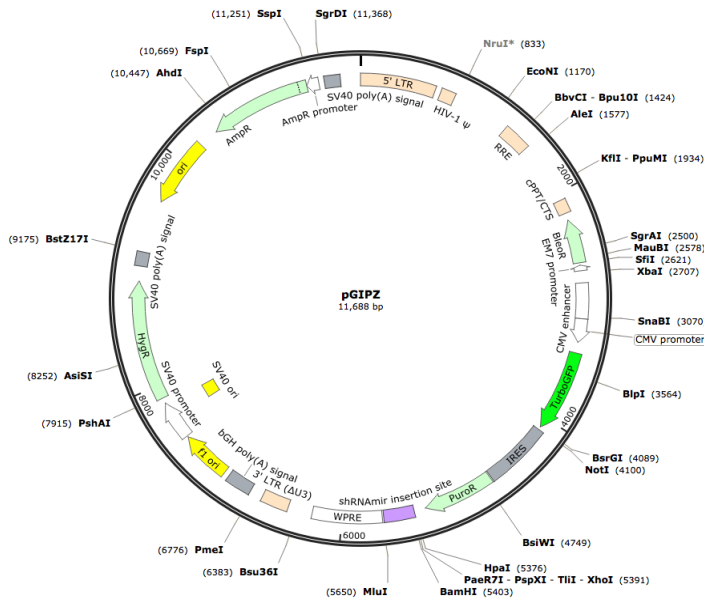
3.2.5.1. shRNA plazmid transfeksiyonu

shRNA kontrol plazmidi olarak pLKO.1-TRC ve pGIPZ kullanıldı. Hedef genlere ait shRNA klonu içeren plazmidler Open Biosystem’den elde edildi. ATM, HIF-1α, RelA, TRIM29 ve HIF-2α için 5 adet shRNA plazmidi sağlandı. ATM ve RelA shRNA gen inaktivasyonu için pGIPZ kontrol ve shRNA klonu içeren pGIPZ plazmidleri kullanılırken, HIF-1α, TRIM29 ve HIF-2α için pLKO.1-TRC kontrol ve shRNA klonu içeren pLKO.1 plazmidleri kullanıldı. Genel olarak bu plazmidlerden en iyi gen inaktivasyonu sağlanan 2 ya da 3 tanesinden elde edilen sonuçlar değerlendirmeye alındı.



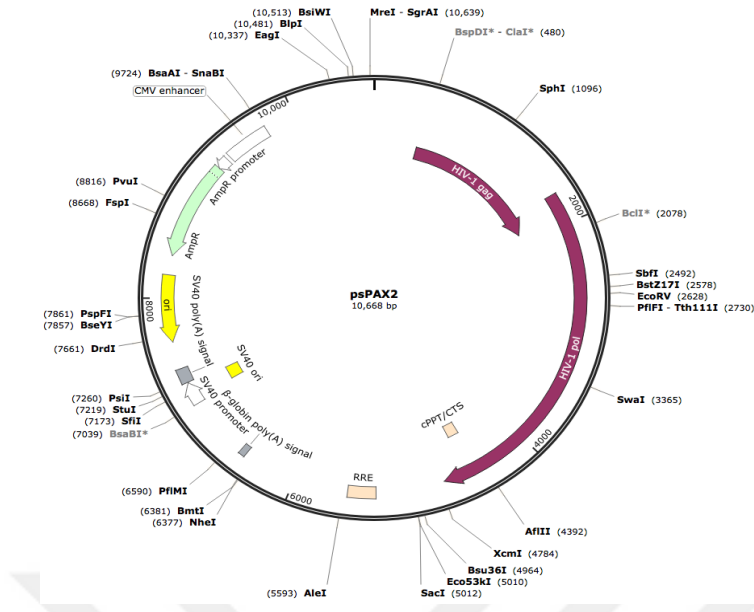
Şekil 3.1. shRNA klonlanmamış pLKO.1 kontrol plazmid vektörünün haritası

pLKO.1 Ampisilin ve Puromisin direnç geni içerir. shRNA U6 geni ile hPGK promotörü arasına klonlanır (Snapgene 2015).



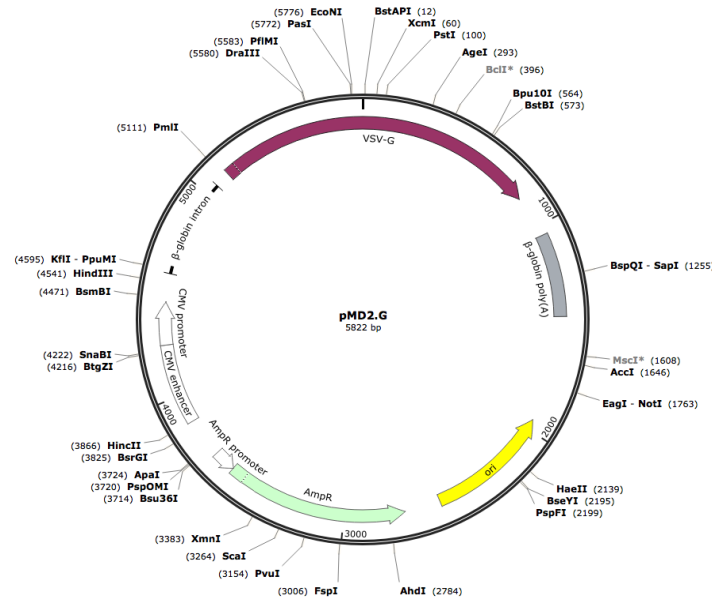
Şekil 3.2. shRNA klonu içermeyen pGIPZ kontrol plazmid vektörünün haritası

pGIPZ Ampisilin ve Puromisin direnç geni içerir. Hedef gene ait shRNA, PURO geni ile WRE geni arasına klonlanır (Snapgene 2015).



Şekil 3.3. psPAX2 plazmid vektörünün haritası

psPAX2 plazmidini lentivirüs üretimi için gerekli olan enzim yapılarını içeren plazmidir. Bu plazmid Ampisilin direnç geni içerir (Snapgene 2015).



Şekil 3.4. pMD2.G plazmid vektörünün haritası

pMD2.G ise virüs içeriğinin paketlenmesi için gerekli olan yapısal proteinlerin kodlarını içermektedir. Bu plazmid Ampisilin direnç geni içerir (Snapgene 2015).

shRNA kodlayan plazmidler, boş plazmid (kontrol plazmid), psPAX2 ve pMD2.G plazmidleri ile birlikte HEK-293FT hücreleri içine, üretici firma protokolü uygulanarak Lipofectamin2000 (Life Technology, Grand Island, NY) aracılığı ile

transfekte edilmiştir. HEK-293FT hücreleri transfeksiyondan bir gün önce yapılacak transfeksiyon miktarına göre 6, 12 ya da 24'lü plate'lere (kuyucuklara) ekildi ve %70 yoğunluğa ulaşana kadar kültüre edildi. Transfeksiyon işlemi üretici firma Thermo Fisher tarafından sağlanan protokole göre yapıldı.

- Transfeksiyon işleminden önce HEK-293FT hücreleri %70 yoğunluğa ulaşana kadar 6'lü platelerde kültüre edildi.
- Yapılacak her bir transfeksiyon için 2 adet steril deney tüpü hazırlandı. Bu tüplerin her birine 250 µl FBS ve antibiyotik içermeyen Opti-MEM eklendi.
- Tüplerden ilkinde 10 µl Lipofectamin2000 çözeltisi konuldu. Diğer tüpe hedef gene ait shRNA içeren plazmid, psPAX2 ve pMD2.G plazmidlerinden konsantrasyon değeri 1 µg olacak şekilde eklendi.
- İki tüp içeriği birbirine karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildi.
- Yeteri yoğunluğa ulaşmış HEK-293FT hücrelerinin ortamı uzaklaştırıldı ve 2 kere PBS ile yıkandı.
- Plate sayısına göre antibiyotik içermeyen %10 FBS'li DMEM eklendi. Tüp içerisindeki Lipofectamin2000-plazmid karışımı platlere eklendi.
- 3 gün boyunca HEK-293FT hücrelerine virüs üretimi için kültüre edildi. 3. günün sonunda virüsler toplandı. Toplanan virüsler kısa süreli kullanım için 4 °C'de, uzun süre için ise -80 °C'de saklandı.
- Hedef hücreler virüs ile transdükte edilmeden önce 6'lü platelere aktarıldı.
- Hedef hücre grubu %50-60 yoğunluğa ulaşınca kadar kültüre edildi. Toplanan Virüslerin bulundukları ortama, hedef hücre içerisine alınımının kolaylaşması için konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde Polibiren eklendi.
- shRNA plazmid içeren virüsler şırınga ile alındı ve filtre yardımıyla süzülerek 6'lü platede bulunan hedef hücre transdükte edildi. Transdüksiyondan sonra hedef hücre 2 gün boyunca kültüre edildi. Bu iki gün boyunca eğer hücre ortamında sarı-portakal rengi ortaya çıkmışsa ortama biraz daha DMEM eklendi.
- 2 gün sonunda hücrelerin bulunduğu ortam uzaklaştırıldı ve yeni besiyeri eklendi. Virüs ile enfekte olmuş hücrelerin seçilebilmesi için ortama konsantrasyonu 2 µg/ml olacak şekilde Puromisin eklendi ve hücreler yeteri yoğunluğa ulaşınca kadar inkübe edildi.

3.2.5.2. siRNA transfeksiyonu

İnsan TWIST1 siRNA ve kontrol siRNA'ları Thermo Fisher Scientific'den satın alındı. Transfeksiyon işlemi üretici firma tarafından sağlanan protokole göre yapıldı.

- Hedef hücre grupları transfeksiyondan bir gün önce 24'lü platelere ortam hacmi 500µl olacak şekilde ekildi. Transfeksiyon öncesi hücreler yoğunluk %60-70'e ulaşınca kadar kültüre edildi.
- Her transfeksiyon örneği için 50 µl opti-MEM serumu içinde 50 pmol/L siRNA olacak şekilde karıştırıldı.
- Her 50 µl opti-MEM serumu için 1 µl Lipofectamin2000 olacak şekilde karışım hazırlandı. Oda sıcaklığında 15 dk beklendi.
- 15 dk beklemeden sonra siRNA ve Lipofectamin2000 karıştırıldı. Oda sıcaklığında tekrar 15 dk bekletildi.
- Önceden kültüre edilmiş hücre ortamları uzaklaştırıldı ve 400 µl antibiyotik içermeyen DMEM ortama eklendi.

- Her plate için 100 µl siRNA-Lipofectamin2000 karışımı ortama eklendi. 24'lü plate nazikçe karıştırıldı.
- Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler toplandı ve analiz edildi.

3.2.6. İmmünoblot analizi (western blot)

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ve immunoblot testi Brown vd (1999)'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Western blot analizi temelde 3 aşamadan oluşur ve ilk olarak protein izolasyonu ve protein konsantrasyonunun belirlenmesi gerçekleştirildi.

3.2.6.1. Protein izolasyonu ve kantitasyonu

- Öncelikle kültüre edilmiş hücreler tripsin uygulanarak toplandı, PBS ile 1 kere yıkandı ve santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pelet kısmı kullanılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı.
- Protein lizis çözeltisi pelet büyüklüğüne bağlı olarak farklı miktarlarda uygulandı.
- Lizis çözeltisi eklenmiş hücre peleti içeren tüpler 5 dk boyunca ısıtıcıda 100 °C'de kaynatıldı, kısaca ultrasonik parçalayıcıya maruz bırakıldı ve 5 dk 14000 rpm'de santrifüj uygulandı.
- Protein konsantrasyonu üretici firma (Pierce) tarafından belirlenen BSA protein testi uygulanarak belirlendi.
- Stok çözeltiden alınan protein örnekleri 1/4, 1/8, 1/12 olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış her örnek için 1, 2, 4 ve 8 µl olacak şekilde 96 well plate eklendi. Konsantrasyonu 2 µg/ml olan BSA standardından 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 µl 96 well plate yüklendi.
- Üretici firma tarafında sağlanan A ve B çözeltisi 1/50 olacak şekilde karıştırıldı, standart ve her örnek üzerine 100 µl eklendi. 37 °C'de 30 dk bekletildi. 96'lı plate okuyuculu spektrofotometre, BSA protein kantitasyonu programı kullanılarak protein konsantrasyonları belirlendi.
- Protein konsantrasyonu belirlendikten sonra stok proteinden ve SDS tampon çözeltisinden 40 µl eklenerek örnekler seyreltilti. Her yükleme işleminden önce örnekler 2 dakika 100 °C'de ısıtıldı.

Protein büyüklüğüne göre farklı konsantrasyonlarda SDS-Poliakrilamid jel hazırlandı. Konsantrasyonlarına göre jel içeriği Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE hazırlanırken kullanılan maddeler ve bu maddelerin jel konsantrasyonuna bağlı miktarı

Jel türü	Resolving jel						Stacking jel
Jel yüzdesi	%5	%6	%7,5	%10	%12	%15	Sabit
Akrilamid/Bis	4,1 ml	5 ml	6,3 ml	8,3 ml	10,3 ml	12,4 ml	1,3 ml
Tampon	6,2 ml						2,5 ml
Su	14,6 ml	13,8 ml	12,5 ml	10,5 ml	8,5 ml	6,4 ml	6,2 ml
TEMED	25 µl						10 µl
%10 APS	250 µl						100 µl

3.2.6.2. SDS-PAGE elektroforezi

İkinci temel aşama SDS-PAGE jel elektroforezi ve proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması işlemidir.

- Örnekler ve protein belirteci SDS-Poliakrilamid jele yüklendi ve 1-2 saat boyunca 40-80 mA'da (eğer iki jel aynı anda yürütülecekse 80 mA'da yapıldı) elektroforez gerçekleştirildi. Jel üzerindeki protein bantlarının gözlenebilmesi için metilen mavisi ile jeller boyandı. Bu işlem protein izolasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için yapıldı.
- Elektroforez işleminden sonra jelde bulunan protein bantları nitroselüloz membrana transfer tamponu aracılığı ile aktarıldı.
- Büyük proteinler için 12 V'de gece boyunca transfer yapılırken küçük proteinler için 25 V'de 5 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.
- Membran Ponceau boyası ile boyanarak protein bantlar gözlemlendi (Brown vd 1999).
- Başarılı transfer gerçekleştirildiği anlaşıldıktan sonra immüno blot işlemine geçildi.

3.2.6.3. İmmüno blot

Son olarak membrana aktarılmış proteinlerin uygun antikor ile bağlanması ve görüntülenmesi gerçekleştirilir.

- Membranın Antikor ile inkübasyonundan önce spesifik olmayan protein etkileşimlerini önlemek için %5 Süt-TBST (100 ml TBST ve 5 gr yağsız süt) ile membran 45 dk boyunca blokladı.
- Bloklama işleminden sonra membran 30 dk boyunca TBST ile yıkandı.
- Nitroselüloz membranlar %5 BSA-TBST (100 ml TBST ve 5 gr BSA) ve her çalışılan proteine özgü antikor ile gece boyunca ya da önceden antikor için belirlenmiş sürede inkübe edildi. Büyük proteinlerin immüno blot işlemi gece boyunca yapıldı.
- Kullanılan antikorlar anti-ATM (1:1000 GeneTex) anti-HIF-1α (1:3000 GeneTex, 1:2000 NOVES), anti-TWIST1 (1:3000 GeneTex), anti-NF-KappaB (1:2000 GeneTex), anti-CAIX (1:4000 ABCAM), anti-TRIM29 (1:7500 Santa Cruz), anti-H2AX (1:3000 ABCAM), anti-HA (1:1000 Santa Cruz), anti-Myc

(1:1500 Santa Cruz)'dir. Kontrol olarak anti- α Aktin (1:10000 ABCAM) ya da anti-Tübülin (1:5000 Santa Cruz) kullanıldı.

- Primer antikor inkübasyonundan sonra membranlar TBST ile 3 kere 10 dk boyunca yıkandı ve 1:3000 oranında ikincil antikor ile 3 saat boyunca inkübe edildi.
- İkincil antikor inkübasyonundan sonra membranlar 3 kere 10 dk TBST ile yıkandı. Proteinlerin varlığı Thermo marka SuperSignal West Chemiluminescent substratı kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan iki çözelti eşit oranda (küçük nitroselüloz membran için 2'şer ml, daha büyük nitroselüloz membranlar için 4'er ml) karıştırılarak nitroselüloz membran üzerine döküldü ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. X-ray filmi kullanılarak protein varlığı western blot film okuyucuda kaydedildi. X-ray filmindeki görüntüler taranarak, Photoshop programında bant büyüklükleri analizi yapıldı.

3.2.7. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu Trizol reaktifi kullanılarak (Invitrogen, Carlsbad, CA) gerçekleştirildi.

- 1 ml Trizol hücre peletinin üzerine eklendi, pipet yardımı ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- 200 μ l kloroform eklendi ependorf tüpü alt üst edilerek iyice karışması sağlandı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4 °C'de 15 dk boyunca 12000 rpm'de santrifüj edildi.
- Ependorf tüpü içerisinde en üste kalan şeffaf renkli kısım yeni ependorf tüpüne aktarıldı, 500 μ l izopropanol eklendi, tüp alt üst edilerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- Daha sonra 8 dk 12000 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml %75 alkol ile yıkandı.
- 5 dk 7500 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet oda sıcaklığında 10 dk kurumaya bırakıldı.
- Pelet üzerine 50 μ l nukleaz içermeyen su eklendi ve 10 dk boyunca 55 °C'de ısıtıldı. Daha sonra spektrofotometrede 3 μ l RNA/150 μ l dH₂O olacak şekilde sulandırma yapılarak RNA konsantrasyonları belirlendi. Konsantrasyon oranları belirlenirken 260 ve 280 nm'de elde edilen oranların bölümü sonucu elde edilen değer 1,8'in altında olan örneklerde DNA ya da protein kontaminasyonu olduğu değerlendirilerek RNA izolasyonu tekrar yapıldı.

Applied Biosystems High Capacity RNA'dan cDNA'ya kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bütün örnekler için RNA konsantrasyonlarına bağlı olarak en fazla 5 μ g RNA içerecek şekilde reaksiyon kurularak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyon şu şekilde kuruldu;

- 10 μ l Reaksiyon Buffer
- 1 μ l Reverse Transkriptaz enzim
- 9 μ l RNA-su, olacak şekilde her bir örnek için 20 μ l reaksiyon kuruldu.

1. Basamak: 37 °C'de 1 saat
2. Basamak: 95 °C'de 5 dk
3. Basamak: 4 °C'de ∞, olacak şekilde PCR cihazında üretici firma tarafından verilen koşullara uygun reaksiyon kuruldu.

Elde edilen cDNA'lar 1:10 olacak şekilde nukleaz içermeyen saf suyla sulandırıldı. Kullanım zamanına kadar kısa süre için -20'de uzun süreli beklemeler için -80'de bekletildi.

3.2.8. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR reaksiyonları için Promega GoTaq Green Master Mix kullanıldı ve RT-PCR reaksiyonu üretici firma tarafından sağlanan kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

- 12,5 µl GoTaq
- 5 µl primer (Reverse-Forward karışımı 5 µg/ml olacak şekilde hazırlandı)
- 5 µl Su
- 2,5 µl cDNA, olmak üzere 25 µl reaksiyon kuruldu. Çalışılan genlere ait primer sekansları ve PCR koşulları Çizelge 3.3. ve 3.4'te verilmiştir.

3.2.8.1. Agaroz jel elektroforezi

Bakteri plazmid izolasyonu ve RT-PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler için %1 (1 g agaroz+100 ml 1xTAE) ve %2 (2 g agaroz+100 ml 1xTAE)'lik agaroz jeller hazırlandı. Agaroz, TAE içerisinde çözüldükten sonra kaynatıldı ve üzerine konsantrasyonu 10 mg/ml olan 5 µl etidyum bromür eklendi. Agaroz jel, jel yatağı içerisine döküldü ve yükleme kuyucuklarını oluşturmak için jelin üzerine tarak yerleştirildi. Soğuma işleminden sonra tarak çıkarılarak, elektroforez tankının içine yerleştirildi ve tank jel kuyucukları kaplanıncaya kadar 1xTAE ile dolduruldu. 7 µl örnek ve 3 µl yükleme tamponu ile kuyucuklara yüklendi. Jel elektroforez tankı, güç kaynağına bağlandı ve 90 V'de 60 dk boyunca yürütüldü. RT-PCR sonuçlarını görüntülemek için ImageQuart 300 cihazı kullanıldı ve jel fotoğrafları çekildi.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin sekansları ve TM değerleri

Gen Adı	Forward Primer	TM (°C)	Reverse Primer	TM (°C)
ATM	5'-CAGGGTAGTTTGTAGTTGAGGTTGACAG-3'	57	5'-CTATACTGGTGGTCAGTGCCAAAGT-3'	58,5
HIF-1α	5'-CCTATGACCTGCTTGGTGCTGA-3'	59,2	5'-TCCACCTCTTTTGGCAAGCA-3'	57,3
HIF-2α	5'-GAACAGCAAGAGCAGGTTCC-3'	56,3	5'-AGAGAGTGAAGCTGGTGGGA-3'	57,9
RelA	5'-GCTCCTGTGCGTGTCTCCAT-3'	59,9	5'-GTGGGTCCGCTGAAAGGACT-3'	59,7
TRIM29	5'-TTGCATGTTCCAGGAGCACAAGAAT-3'	59,3	5'-CAATGCACCAAATTCCTGCAGAAACA-3'	58,7
TWIST1	5'-CAGTCTTACGAGGAGCTGCAGAC-3'	59,1	5'-CTGGAAACAATGACATCTAGGTCTCCG-3'	58,7
CAIX	5'-GTCTCGCTTGGAAGAAATCG-3'	53,7	5'-AGAGGGTGTGGAGCTGCTTA-3'	58,2
Vimentin	5'-CTTCAGAGAGAGGAAGCCGA-3'	55,9	5'-ATTCCACTTTGCGTTCAAGG-3'	54
E-kaderin	5'-TTGACGCCGAGAGCTACAC-3'	57,2	5'-GACCGGTGCAATCTTCAAA-3'	53,3
EpCAM	5'-CAGCTCAGGAAGAATGTGTCTGTGAA-3'	58,7	5'-TTCAATGATGATCCAGTAGGTTCTCACTCG-3'	59,4
N-Kaderin	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'	57,4	5'-CCACCTTAAAATCTGCAGGC-3'	55
GAPDH	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	56,6	5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'	55,8
AKTİN	5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3'	58,3	5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3'	56,4

Çizelge 3.4. Çalışma kapsamında analiz edilen genlere ait PCR koşulları

Gen Adı	Başlangıç Denaturasyon	Denaturasyon	Bağlanma	Uzama	Final Uzama	Döngü Sayısı
ATM	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	59 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	35
HIF-1α	95 °C, 7dk	94 °C, 45sn	57 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 7dk	26
HIF-2α	95 °C, 5dk	94 °C, 30sn	58 °C, 30sn	72 °C, 1dk	72 °C, 7dk	25
RelA	95 °C, 10dk	94 °C, 45sn	60 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	26
TRIM29	95 °C, 7dk	94 °C, 45sn	59 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 7dk	25
TWIST1	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	59 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 5dk	37
CAIX	95 °C, 5dk	94 °C, 30sn	55 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 5dk	27
Vimentin	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	55 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	30
E-kaderin	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	55 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	28
EpCAM	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	59 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	33
N-Kaderin	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	56 °C, 45sn	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	28
GAPDH	95 °C, 5dk	94 °C, 30sn	59 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	22
AKTİN	95 °C, 5dk	94 °C, 45sn	57 °C, 1dk	72 °C, 1dk	72 °C, 10dk	25

3.2.9. Eş zamanlı kantitatif reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Eş zamanlı qRT-PCR için Applied Biosystems Power Sybr Green kullanıldı. Eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları Çizelge 3.3'te verilmiştir. Hem RT-PCR hem de eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonları için aynı primerler kullanılmıştır

- 10 µl Sybr Green
- 4 µl cDNA
- 2 µl primer (Reverse-Forward karışımı 5 µg/ml olacak şekilde hazırlandı)
- 4 µl ddH₂O olmak üzere her bir örnek için 20 µl reaksiyon kuruldu.

Eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonu Applied Biosystems'e ait eş zamanlı PCR cihazında gerçekleştirildi. Yapılan bütün eş zamanlı qRT-PCR analizleri için ayrıca erime noktası eğrisi elde edildi.

Eş zamanlı qRT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları;

1. Basamak 95 °C'de 10dk
2. Basamak 95 °C'de 15 sn
3. Basamak 60 °C'de 1dk olmak üzere toplam 40 döngü halinde eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

Kantitatif olarak TM değerleri arasındaki tutarlılığı göstermesi için bütün eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonları erime eğrisi ile yapılmıştır. Erime eğrisi noktası dışında alınan TM değerleri doğru kabul edilmeyerek değerlendirmeye alınmamıştır.

Erime eğrisi reaksiyon koşulları;

1. Basamak 95 °C'de 15 sn
2. Basamak 60 °C'de 1 dk
3. Basamak 95 °C'de 15 sn olmak üzere 1 döngü olacak şekilde reaksiyon kuruldu.

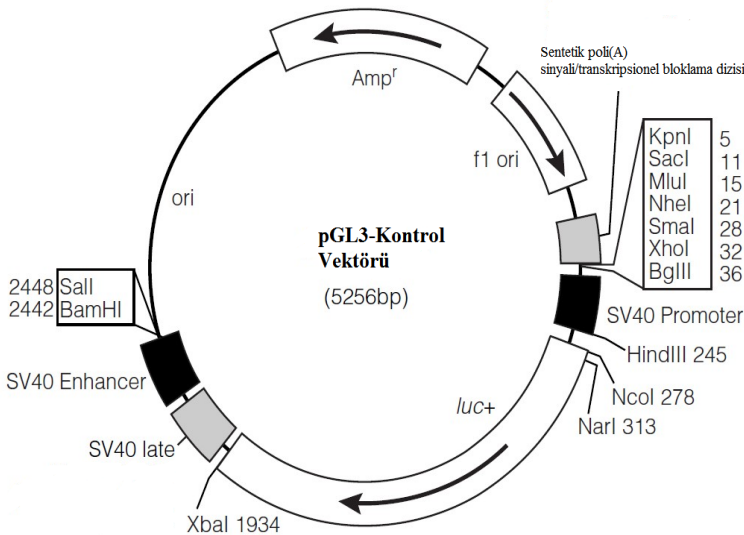
Reaksiyon sonucu elde edilen eşik siklus (Ct) değerleri ABI yazılımında analiz edilerek Microsoft Excel'e aktarılmış, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodundan yararlanılarak hesaplanmış ve grafikler oluşturulmuştur (Livak ve Schmittgen 2001). Kıyaslama yapılırken kontrol grubu olarak referans genler (housekeeping gene) kullanılmıştır. Kıyaslaması yapılacak her gen ve referans gen için 3 farklı eş zamanlı qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her gen ve bu gene ait farklı gruplar için elde edilen 3 farklı Ct değerine Microsoft Excel'de Student Ti testi yapılarak istatistiksel açıdan önemli bir fark olup olmadığı test edilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen bu üç reaksiyona ait verilerin ortalaması alınmış, gruplara ait grafiklerde verilen değerler elde edilmiştir. Ayrıca bu üç farklı reaksiyon verisi arasındaki standart sapma hesaplanarak grafik üzerinde hata barı ile gösterilmiştir.

3.2.10. Çift aşamalı lusiferaz reporter testi

Lusiferaz reporter testi üretici firma (PROMEGA) tarafından sağlanan kit protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir.

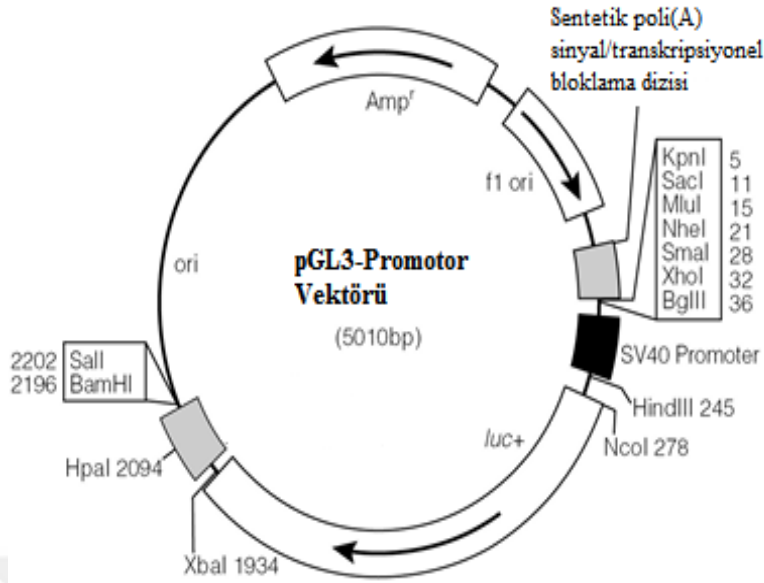
- Hücreler 24'lü platelerde kültüre edildi. Plazmid transfeksiyonu kısmında anlatıldığı gibi hücreler kontrol ve hedef gene ait reporter plazmidler ile transfekte edildi.
- Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler PBS ile yıkandı ve tiripsin aracılığıyla hücre peletleri elde edildi.
- 100µl lizis çözeltisi eklendi. 20 µl lizat temiz bir tüpe firefly lusiferaz ölçümü için eklendi ve ölçüm yapıldı.
- Aynı lizat üzerine 100 µl reaksiyon sonlandırma çözeltisi eklenip karıştırıldı ve Renilla lusiferaz için ölçüm alındı. Reporter sistem çalışmalarında genelde bir transkripsiyon faktörünün etkisindeki genin protomotor bölgesindeki aktivasyon değişikliği kontrol edilir.

Bu çalışmada biz ATM aktivitesi düşürülmüş hücrelerde hipoksik koşullarda HIF-1α promotorundaki değişimi test ettik. HIF-1α inaktivasyonu sağlanmış ve hipoksik koşullarda kültüre edilmiş hücrelerde TRIM29 reporter aktivitesi analiz edildi. TRIM29 inaktif hücrelerde TWIST1 reporter aktivitesi test edilmiştir. Reporter analizi için pGL3-kontrol plazmidi ve PGL3 promotor plazmid vektörleri kullanıldı. TRIM29 reporter plazmidi Dr. Limbao Ai tarafından klonlandı. TWIST1 reporter plazmidi Dr. Lua-Hai Wang tarafından klonlandı. HIF-1α reporter plazmidi (Addgene) satın alındı.



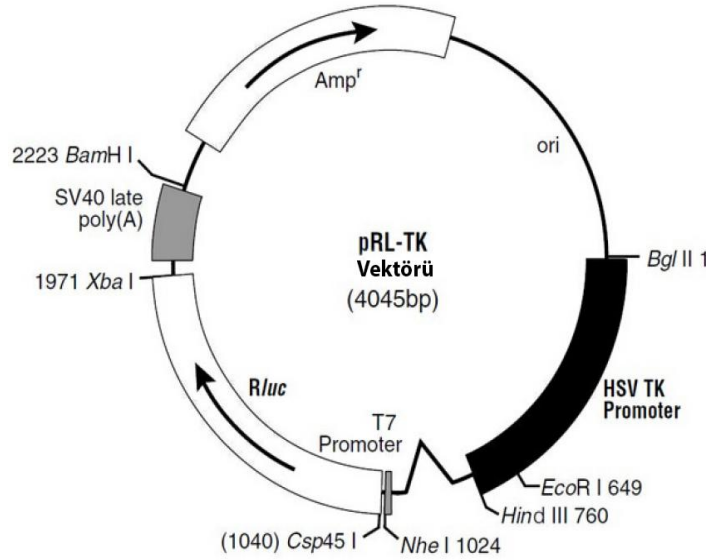
Şekil 3.5. pGL3 plazmid vektörünün haritası

pGL3-basic plazmidi Sentetik poli(A) transkripsiyon bloklama dizisinden sonra *Photinus pyralis* lusiferaz geni ve SV40 geç poli(A) sinyali yer almaktadır. Ori; Replikasyon başlama bölgesi, *Amp^r*; Ampisilin direnç genidir (Promega 2015).



Şekil 3.6. pGL3-promoter plazmid vektörünün haritası

pGL3-Promoter plazmidi sentetik poli(A) transkripsiyonel bloklama dizisini takiben sürekli lusiferaz ekspresyonunu sağlayan SV40 promotoru bulunmaktadır. *Photinus pyralis* lusiferaz geni ve SV40 geç poli(A) sinyali yer almaktadır. ori; Replikasyon başlama bölgesi, *Amp^r*; Ampisilin direnç genidir (Promega 2015).



Şekil 3.7. pRL-TK plazmid vektörünün haritası

pRL-TK plazmidi ori; Replikasyon başlama bölgesi, RLuc; *Renilla roniformis* lusiferaz geni, *Amp^r*; Ampisilin direnç genidir (Promega 2015).

3.2.11. Hipoksi uygulaması

Billups Rothenberg marka modüler inkübatör tankında %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ ortamında hücreler 2, 4, 8, 12, 16, 18 ve 24 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler toplandı ve analiz için hücre pelletleri elde edildi.

3.2.12. İyonize radyasyon uygulaması

Hücreler radyasyona maruz bırakılmadan önce %75 yoğunluğa ulaşana kadar %5 CO₂’de 37 °C’de kültüre edildi. Gammacell 1000 marka radyasyon cihazında Cs¹³⁷ kullanılarak 1 dk boyunca 10 Gy Gama (γ) radyasyonu uygulandı ve 18 saat sonra hücreler analiz için toplandı.

3.2.13. İlaç uygulaması

3.2.13.1. 5-aza-2’-deoksisitidin uygulaması

5-aza-2’-deoksisitidin spesifik bir DNA metil transferaz enzim inhibitörüdür. Hücreler ve hayvanlar için oldukça toksik bir maddedir (Christman 2002). Hücreler ilaç uygulamasından önce yeni plate’e aktarılır ve yaklaşık olarak %20 yoğunlukta olması beklenir.

5 µM 5-aza-2’-deoksisitidin (Sigma, St Louis, MO) hücre ortamına eklendi ve 1 gün boyunca hücreler tekrar kültüre edildi. Ertesi gün kültür iki kere PBS ile yıkandı, yeni besiyeri eklendi ve 2 gün daha kültüre edildi. 3 günlük 5-aza-2’-deoksisitidin uygulamasından sonra hücreler toplanır. 5 günlük 5-aza-2’-deoksisitidin uygulaması için hücreler eğer kültüre edilebilecek yoğunlukta ise kültüre devam edildi yoksa kültür yeni plate’e aktarılarak 5 µM 5-aza-2’-deoksisitidin tekrar eklendi ve 2 gün süreyle tekrar kültüre edilerek hücreler analiz için toplandı.

3.2.13.2. N-asetil sistein (NAC) uygulaması

N-asetil sistein (NAC) hücrede oluşan ROS’un azaltılması için çok yaygın olarak kullanılan bir antioksidan bileşiktir (Oka vd 2000). NAC Sigma firmasından satın alındı ve PBS ile seyreltildi. Hücre kültürüne hacim 10 mM ve 20 mM olacak şekilde eklendi. Hücre kültürü ortamına NAC eklendikten sonra hücreler 48 saat boyunca %5 CO₂’de 37 °C’de büyümeye bırakıldı. 48 saat sonunda hücreler toplandı ve analiz gerçekleştirildi. Stok NAC çözeltisi -20°C’de saklandı.

3.2.13.3. Sikloheksimid uygulaması

Sikloheksimid *Streptomyces griseus*’tan elde edilen hücresel fonksiyon ve sinyal iletiminde protein sentezinin rolünü göstermek için kullanılan protein sentezi inhibitörüdür (Liu vd 2010).

Stok Sikloheksimid 1000 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve her 1 ml besiyeri için 1 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Sikloheksimid eklendikten sonra hücreler 18 saat kültüre edilmiş ve daha sonra toplanarak uygun analiz gerçekleştirilmiştir.

Sikloheksimid uygulaması ve hipoksi uygulaması 18 saat boyunca 37 °C’de ve %1 O₂’de gerçekleştirilmiştir.

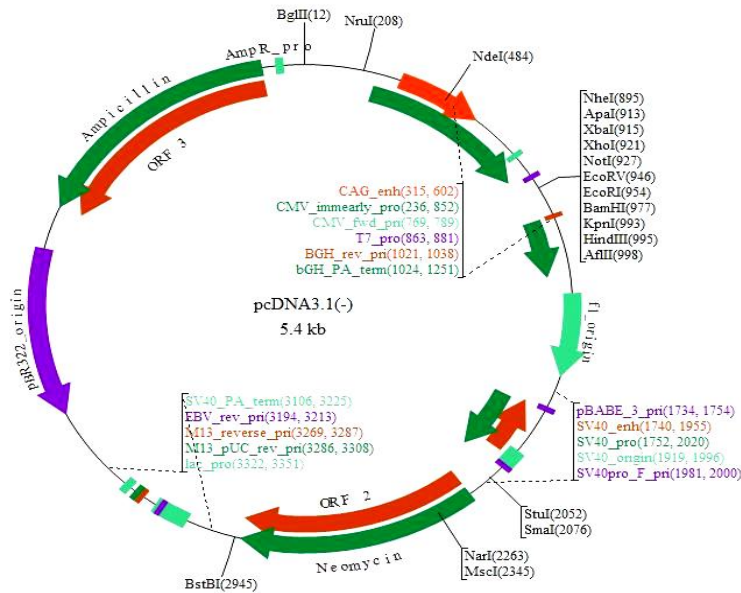
3.2.13.4. Aktinomisin D uygulaması

Aktinomisin D güçlü bir apoptozis uyarıcısıdır. Aktinomisin D DNA’ya bağlanır ve mRNA sentezini inhibe eder. Yüksek miktarda kullanılan Aktinomisin D (> 1 mg/ml) bütün RNA türlerinin sentezini inhibe ederken, düşük miktarda Aktinomisin D (< 100 ng/ml) tercihi olarak ribozomal RNA inhibisyonuna sebep olur (Kleeff vd 2000).

Stok Aktinomisin D 1000 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve her 1 ml besiyeri için 0,5 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Aktinomisin D eklendikten sonra hücreler 18 saat kültüre edilmiş ve daha sonra toplanarak uygun analiz gerçekleştirilmiştir. Aktinomisin D uygulaması ve hipoksi uygulaması 18 saat boyunca 37 °C’de ve %1 O₂’de gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Rekombinant protein ifadesi

SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri sürekli olarak rekombinant TRIM29 ve TWIST1 ifadesi için pcDNA3.1–HA–ATDC (Dr. E. Seto, Moffitt Cancer Center Tampa, FL) ve Myc–TWIST1–pCS2 (Dr. R. Maestro, CRO Aviano National Cancer Institute, Italy) plazmidleriyle TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific) aracılığıyla transfekte edildi. Transfeksiyon aşaması shRNA transfeksiyonu ile aynıdır. Kontrol olarak pcDNA3.1 ve Myc–GFP–pCS2 plazmidleri kullanıldı. Hücrelerin plazmidler ile transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler toplandı ve western blot analizi yapıldı.



Şekil 3.8. pcDNA3.1 kontrol plazmid vektörünün haritası

Bu plazmid Ampisilin ve Neomisin direnç geni taşımaktadır. CMV promotoru sürekli olarak gen ifadesini sağlar ve CMV promotorundan sonra MCS olarak

adlandırılan çoklu klonlama bölgesi bulunur. Hedef genler MCS bölgesine klonlanır (Snapgene 2015).

3.2.15. Gen klonlama

TRIM29 geni SKBr3 hücrelerinde Sanjana vd (2014) tarafından tanımlanan lentiCRISPRv2 (Addgene 52961) plazmidi kullanılarak mutasyona uğratıldı. *TRIM29* geninin 1. eksonunun açık okuma çerçevesi içerisinde bir rehber RNA seçildi. Bu işlem için online dizayn aracı kullanıldı (<http://crispr.mit.edu>).

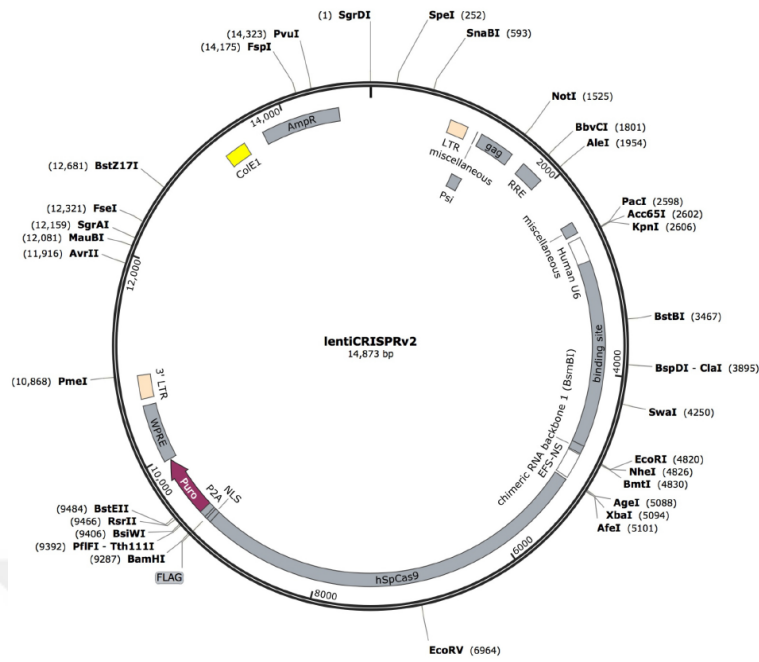
Seçilen bu bölge, Forward: 5'-CACCGGCCCCGCAAGTGTCCCGTGCA-3'; Reverse: 5'-AAACTGCAAGGGACACTTGCGCGCC-3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Boş lentiCRISPRv2 plazmidi ve PCR ürünleri BsmBI restriksiyon enzimi ile kesildi.

Restriksiyon endonükleaz kesim işlemi için 0,5 µl BsmBI, 2 µl enzim tamponu, 1 µl BSA, 1 µg/ml DNA ve 15,5 µl ddH₂O kullanılarak toplam reaksiyon 20 µl olacak şekilde reaksiyon kuruldu. Reaksiyon 37 °C'de su banyosunda 90 dk boyunca gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda ürünler %1 agaroz jelde yürütülerek kesim işleminin doğruluğu test edildi.

Thermo GeneJET jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden istenilen restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri izole edildi. Protokol şu şekilde uygulandı;

- Öncelikle boş ependorf tüpünün ağırlığı hesaplandı. Hedef ürünlerin bulunduğu jel bölgesi kesilerek ependorf tüpüne aktarıldı. Ağırlık tekrar ölçüldü kesilen jel parçasının ağırlığı kadar Binding tamponu eklendi.
- Jel tamamen çözülene kadar 50-60 °C'de bekletildi ve her 5 dk'lık süre içerisinde tüp çalkalanarak karışımın homojen olması sağlandı.
- Ependorf tüpünün içeriği GeneJET purifikasyon kolonunun içine aktarıldı ve 1 dk boyunca 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- 700 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 13000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. GeneJET purifikasyon kolonu 1 dk 13000 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 50 µl Elution tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.

Jelden saflaştırılan ürünler tekrar %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Elde edilen *TRIM29* rehber RNA bölgesi ve lentiCRISPRv2 plazmidi ligasyon işlemi ile birbirine bağlandı. Ligasyon işlemi için 2 µl *TRIM29* ürünü, 2 µl lentiCRISPRv2 plazmidi ürünü, 1 µl 10x Ligasyon tamponu, 0,5 Ligaz enzimi ve 4,5 µl ddH₂O kullanılarak PCR cihazında 16 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Ligasyon ürünleri %1 agaroz jelde yürütüldü ve rekombinant klonlar DNA sekans analizi ile tanımlandı. Elde edilen rekombinant plazmidler, plazmid transformasyonu ile metot kısmında belirtildiği üzere çoğaltıldı ve izole edildi. SKBr3 hücreleri rekombinant ve boş lentiCRISPRv2 ile transfekte edildi. Transfeksiyon işlemi RNAi kısmında belirtildiği şekilde Lipofectamin2000 aracılığı ile yapıldı ve transfekte olan hücreler Puromisin yardımı ile kültürde seçildi.



Şekil 3.9. Boş lentiCRISPRv2 kontrol plazmid vektörünün haritası

LentiCRISPRv2 plazmidi Ampisilin ve Puromisin direnç geni içerir (Snapgene 2015). Ayrıca 2 adet ekspresyon bölgesi içerir, bunlardan birincisi hSpCas9 ve diğeri rehber RNA'dır. Bu plazmid BsnBI kullanılarak kesilir ve aynı enzim ile kesilen rehber RNA U6 ve EFS genleri arasına klonlanır. Rehber RNA yardımı ile Cas9 enzimi hedef mRNA kodlayan bölgeyi tanıyarak ve bu bölge kesilip genomdan çıkarılır böylece plazmid ile enfekte edilen hücre ya da canlı organizma gen bakımından mutant hale gelir (Sanjana vd 2014).

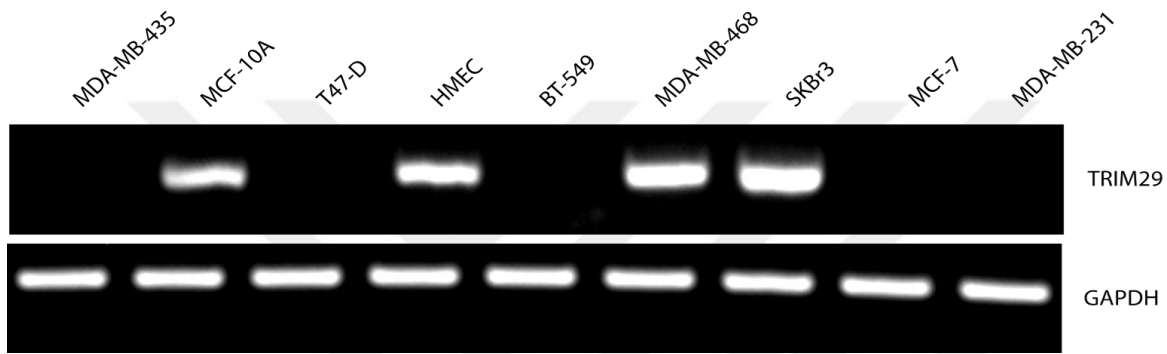
3.2.16. İstatistiksel analiz

ATM, TRIM29 ve TWIST1 seviyelerinin bu hastaların yaşam süresi ile olan ilişkisini analiz etmek için Kaplan Meier Plotter Breast Cancer web sitesinde bu genlere ait probe'ler ile analiz yapıldı. Eş zamanlı qRT-PCR sonucu elde edilen değerler Microsoft Excel programında hesaplandı ve her örnek için t testi yapılarak meydana gelen değişimlerin istatistiksel açıdan önemli olup olmadığı belirlendi. $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ değerleri kullanılarak istatistiksel açıdan önemli olduğu belirtildi. $p > 0,05$ ise istatistiksel açıdan önemli olmayan değişimleri ifade edecek şekilde kullanıldı. Aynı grup için elde edilen birden fazla değerlerin ortalaması alınıp bu değerler arasındaki standart sapma hesaplanarak her grafikte hata çubuğu olarak gösterildi.

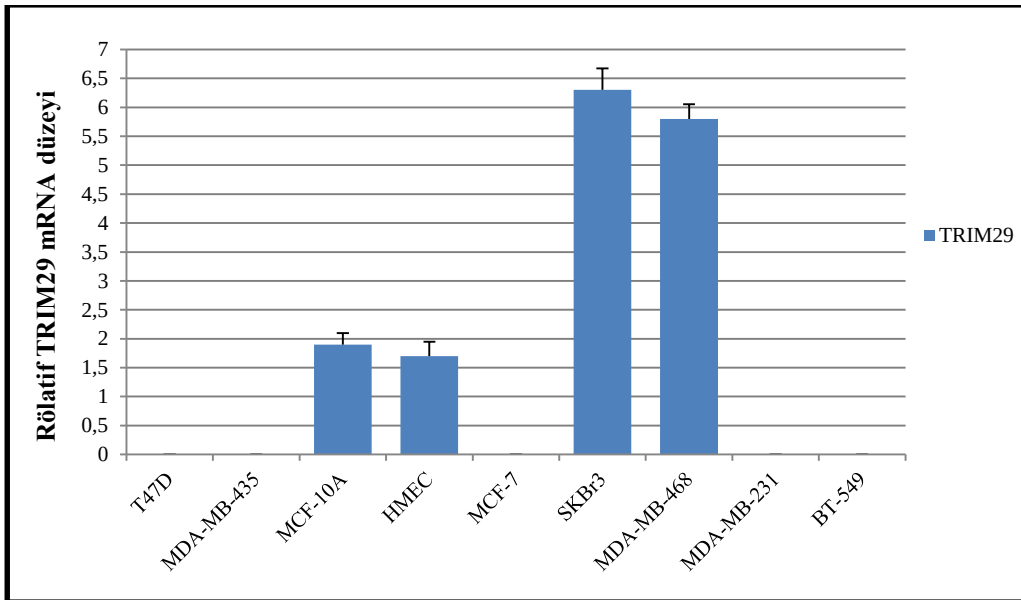
4. BULGULAR

4.1. Hücre Hatlarının *TRIM29* Geni Ekspresyonunun Belirlenmesi

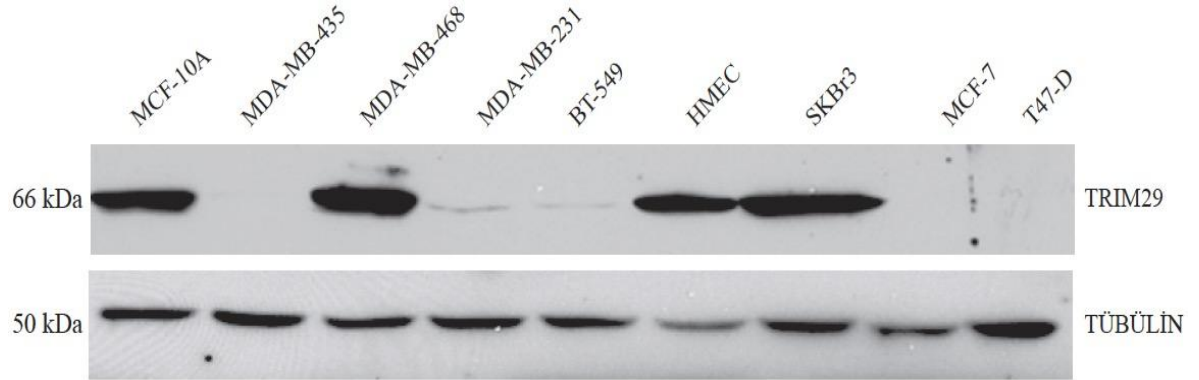
Çalışma kapsamında MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, T47-D, MCF-10, HMEC, SKBr3 ve BT-549 hücrelerinin *TRIM29* ekspresyonu profilleri test edilmiştir. *TRIM29* geninin farklı kanser gruplarında ekspresyonunun farklı olduğu bilinmektedir (Hatakeyama 2011). Meme kanseri hücre gruplarında ve normal meme epiteli hücresinde *TRIM29* gen ekspresyonu miktarları RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile test edildi. RT-PCR için GAPDH, eş zamanlı qRT-PCR için Aktin, western blot için ise kontrol olarak Tübülin kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde *TRIM29* mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları



Şekil 4.2. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde *TRIM29* mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

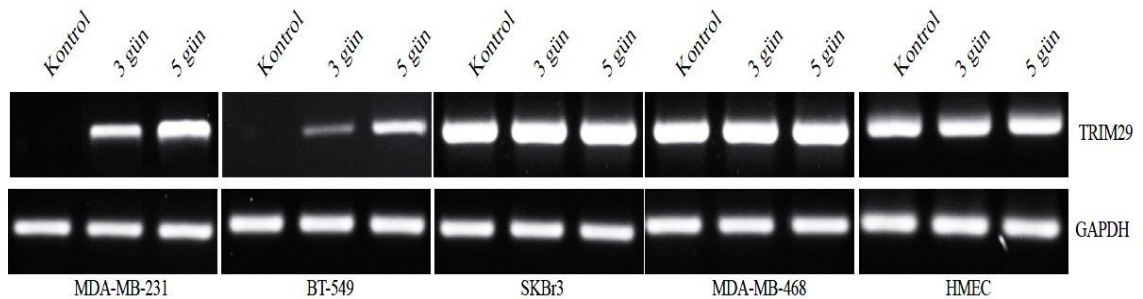


Şekil 4.3. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları

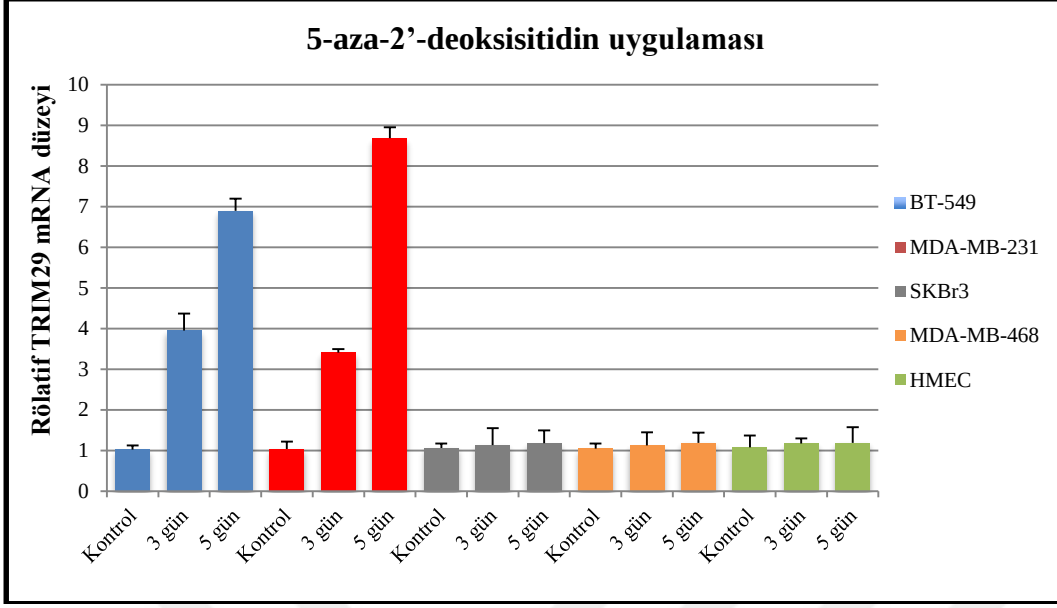
Eş zamanlı qRT-PCR, RT-PCR ve western blot sonuçları birbirini desteklemektedir. Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3 gösteriyorki meme kanseri hücre hatları olan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, T47-D ve BT-549 TRIM29 eksprese etmemektedir. SKBr3, MDA-MB-468 meme kanseri hücresi, HMEC meme epiteli hücresi ve ölümsüz MCF-10A hücrelerinin farklı seviyelerde TRIM29 ekspresyonuna sahip oldukları belirlenmiştir. SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre gruplarının MCF-10A ve HMEC hücrelerine kıyasla daha yüksek oranda TRIM29 ekspresyonuna sahip oldukları tespit edilmiştir.

4.1.1. 5-aza-2'-deoksisitidin uygulaması sonrası TRIM29 değişimi

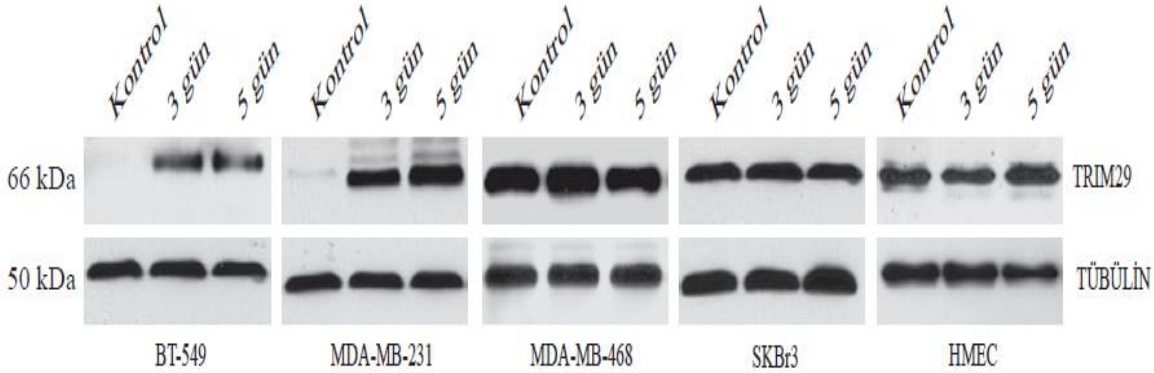
TRIM29'un bazı meme kanseri hücrelerinde tespit edilememesinden dolayı bu genin kanser hücrelerinde metilasyona uğradığını düşündük ve bir DNA metil transferaz inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidin kullanarak TRIM29 ekspresyonuna sahip olmayan MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerindeki, TRIM29 ekspresyonu değişimi test edildi. Kontrol olarak SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri için de 5-aza-2'-deoksisitidin kullanıldı ve TRIM29 ekspresyonu değişimi RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi.



Şekil 4.4. 3 ve 5 günlük 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları



Şekil 4.5. 3 ve 5 günlük 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



Şekil 4.6. 3 ve 5 günlük 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları

RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot sonuçlarının uyumlu olduğu gözlenmiştir. DNA metilasyonu inhibe edildiği zaman TRIM29 mRNA ekspresyonuna sahip olmayan BT-549 ve MDA-MB-231 hücrelerinde TRIM29 mRNA ekspresyonu normal düzeye ulaşmış ve buna bağlı olarak protein sentezi artmıştır. BT-549 hücrelerinde TRIM29 mRNA ekspresyonu ortalama 5,4 kat, MDA-MB-231 hücrelerinde ise ortalama 6 kat artmıştır ($p < 0,001$). SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde 5-aza-2'-deoksisitidin uygulamasından sonra TRIM29 mRNA ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli ($p > 0,05$) bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6). RT-PCR için GAPDH, eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için Tübülün kontrol olarak kullanılmıştır.

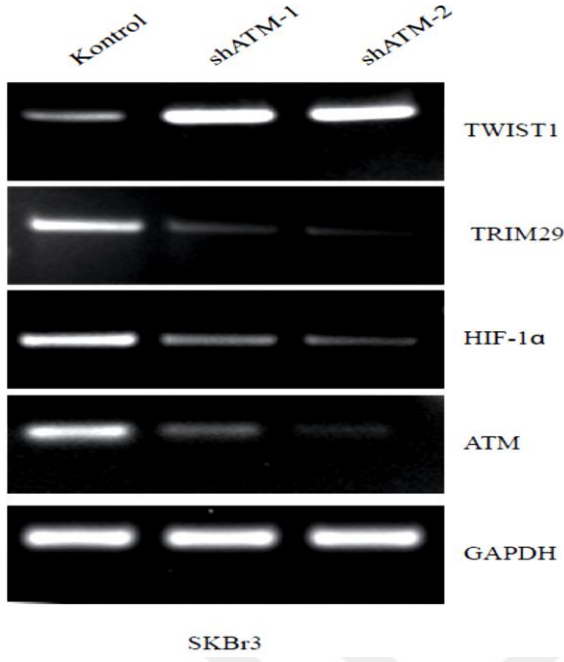
4.2. ATM Proteininin HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 Ekspresyonuna Etkisi

SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinin TRIM29 ekspresyonuna sahip olduğu belirlendikten sonra ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST bağlantısının kademeli olarak araştırılmasını yaptık. Biz çalışma kapsamında ATM tarafından aktive edilen NF- κ B ve HIF-1 α 'nın TRIM29 transkripsiyonunda görev alacağını düşündük. ATM/NF- κ B bağlantısı ise iyi şekilde bilinmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında ATM/NF- κ B bağlantısını araştırmadık. Çalışmamızda ATM inaktivasyonu sağlayarak HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 değişimini SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde test ettik. Ayrıca bu bağlantıda TRIM29 etkinliğini test etmek için TRIM29 eksprese etmeyen MDA-MB-231 hücrelerinde ATM inaktivasyonu sonucu HIF-1 α ve TWIST1 ekspresyonundaki değişimi test ettik.

Open Biosystem'den 5 farklı ATM shRNA plazmidi sipariş edildi. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC için ATM gen inaktivasyonu gerçekleştirildi. İlk deneme SKBr3 ile yapıldı ve kullanılan 5 shRNA'dan, 2 tanesinin en yüksek düzeyde inaktivasyon sağladığı belirlendi. Bütün shRNA aracılı ATM gen inaktivasyonu çalışmalarında bu 2 plazmid vektörü kullanıldı. Kullanılan shRNA plazmidleri, shATM-1 ve shATM-2 olarak isimlendirildi. ATM, TWIST1 ve TRIM29 değişimini RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile test ettik. HIF-1 α aktivasyon değişimi RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR ile test edildi. HIF-1 α proteinini normoksi halinde western blot ile belirlenemediği için bu aşamada HIF-1 α proteini için western blot yapılmamıştır (Bu durumun nedeni kuramsal bilgiler ve kaynak taramaları bölümünde açıklanmıştır Bkz. sayfa15-16). RT-PCR için GAPDH, eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için Tübülün kontrol olarak kullanılmıştır.

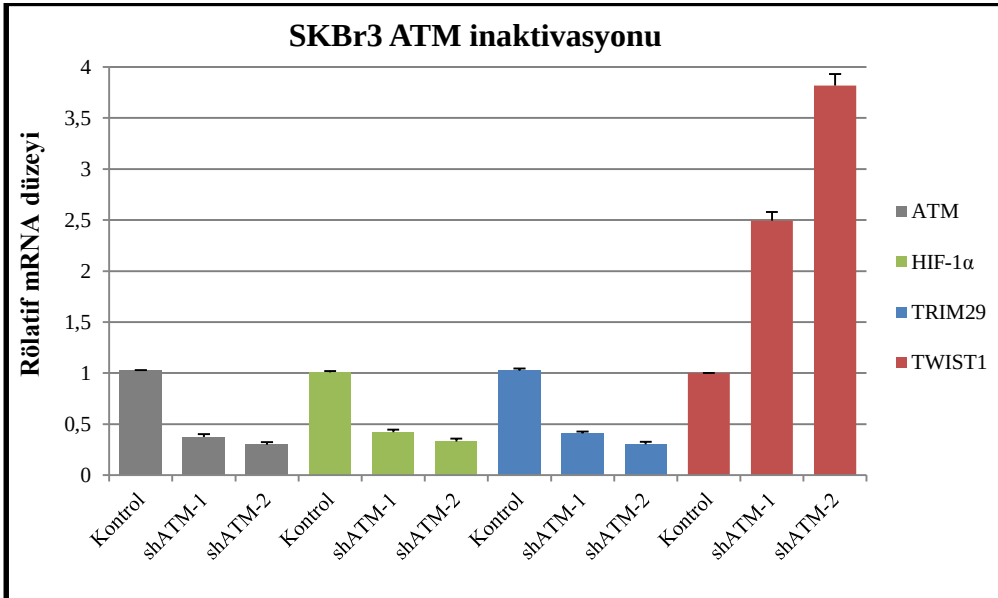
4.2.1. SKBr3 hücrelerinde ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

SKBr3 hücreleri çalışma kapsamında test edilen meme kanseri hücre grupları arasında en yüksek TRIM29 ekspresyonuna sahip meme kanseri hücresidir. SKBr3 hücrelerinde ATM inaktivasyonunun hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. ATM inaktivasyonu TWIST1 ekspresyonunu arttırmıştır.



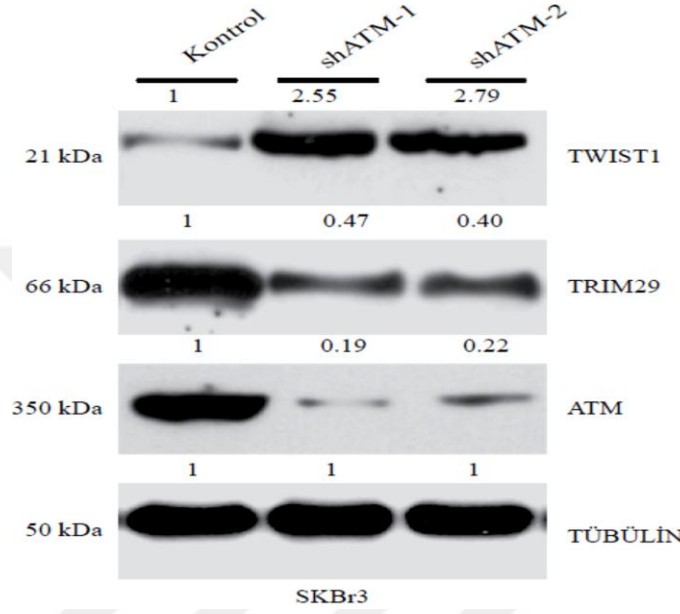
Şekil 4.7. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.7’de görülmektedir ki shATM-1 ve shATM-2 plazmid vektörleri ile ATM inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. *ATM* gen ekspresyonundaki azalmayı takiben hem HIF-1α hem de TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür. TWIST1 mRNA ekspresyonu ise artmıştır.



Şekil 4.8. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1α, TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shATM-1 grubu için ATM, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonunda yaklaşık %60'lık, shATM-2 için ise yaklaşık %70'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise shATM-1 de 2,5 kat, shATM-2 için 3,5 kattan daha fazla bir artış gözlemlenmiştir. Hem shATM-1 hem de shATM-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda ATM, TRIM29 ve HIF-1 α ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.8).

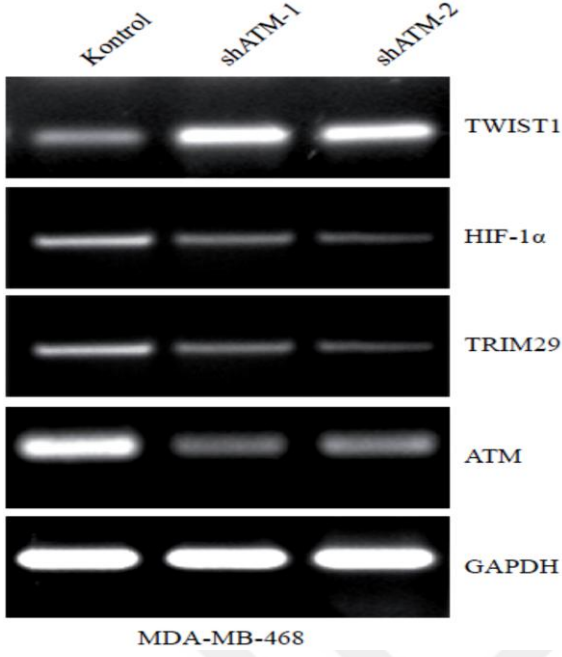


Şekil 4.9. SKBr3 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları, RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shATM-1 hem de shATM-2 için ATM ve TRIM29 protein ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir. TWIST1 protein miktarı ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.9'da verilmiştir.

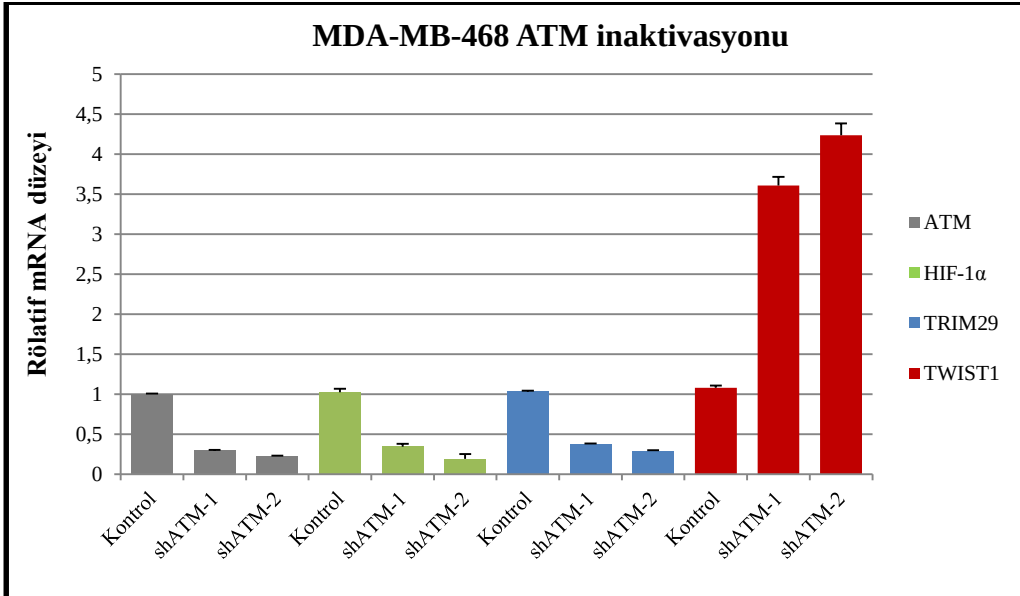
4.2.2. MDA-MB-468 hücrelerinde ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

MDA-MB-468 hücreleri, SKBr3'ten sonra en yüksek TRIM29 ekspresyonuna sahip meme kanseri hücresidir. MDA-MB-468 hücrelerinde de ATM inaktivasyonunun hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. ATM inaktivasyonu TWIST1 ekspresyonunu arttırmıştır.



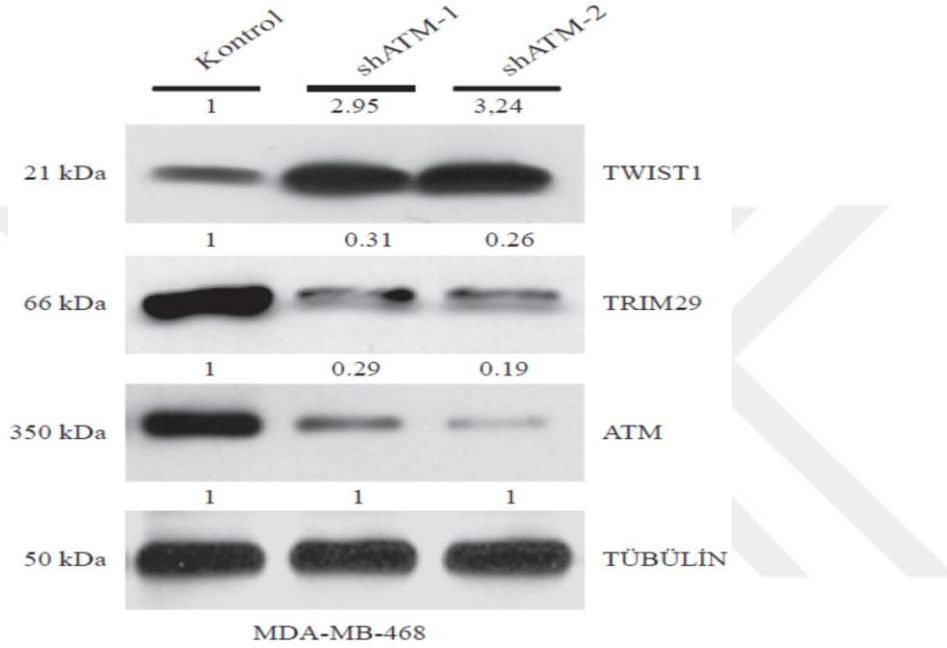
Şekil 4.10. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.10'da görülmektedir ki shATM-1 ve shATM-2 plazmid vektörleri ile ATM inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. *ATM* gen ekspresyonundaki azalmayı takiben hem HIF-1α hem de TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür. TWIST1 mRNA ekspresyonu ise artmıştır.



Şekil 4.11. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1α, TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shATM-1 grubu için ATM ve HIF-1 α mRNA ekspresyonunda yaklaşık %70'lik, shATM-2 için ise yaklaşık %80'lik bir düşüş gözlenmiştir. shATM-1 için TRIM29 mRNA ekspresyonunda yaklaşık %60'lık, shATM-2 için ise yaklaşık %70'lik bir düşüş gözlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise shATM-1 de 3,5 kat, shATM-2 için 4 kattan daha fazla bir artış gözlemlenmiştir. Hem shATM-1 hem de shATM-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda ATM, TRIM29 ve HIF-1 α ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.11).

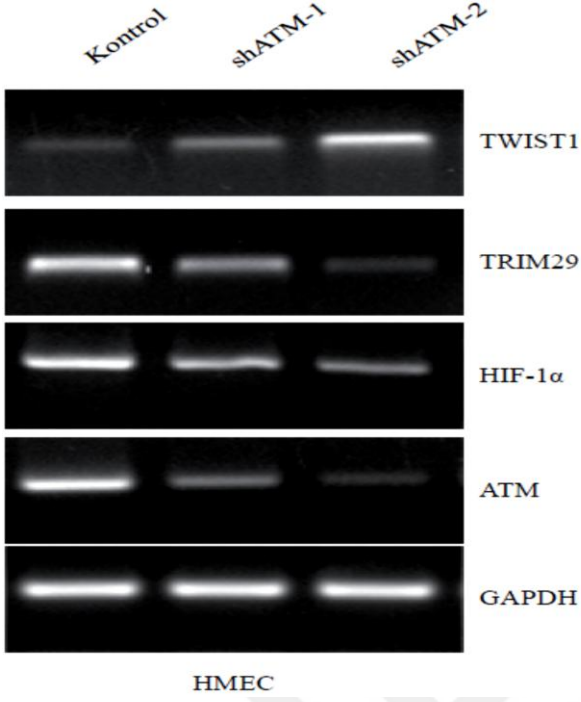


Şekil 4.12. MDA-MB-468 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları, RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shATM-1 hem de shATM-2 için ATM ve TRIM29 protein ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir. TWIST1 protein ekspresyonu miktarı ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.12'de verilmiştir.

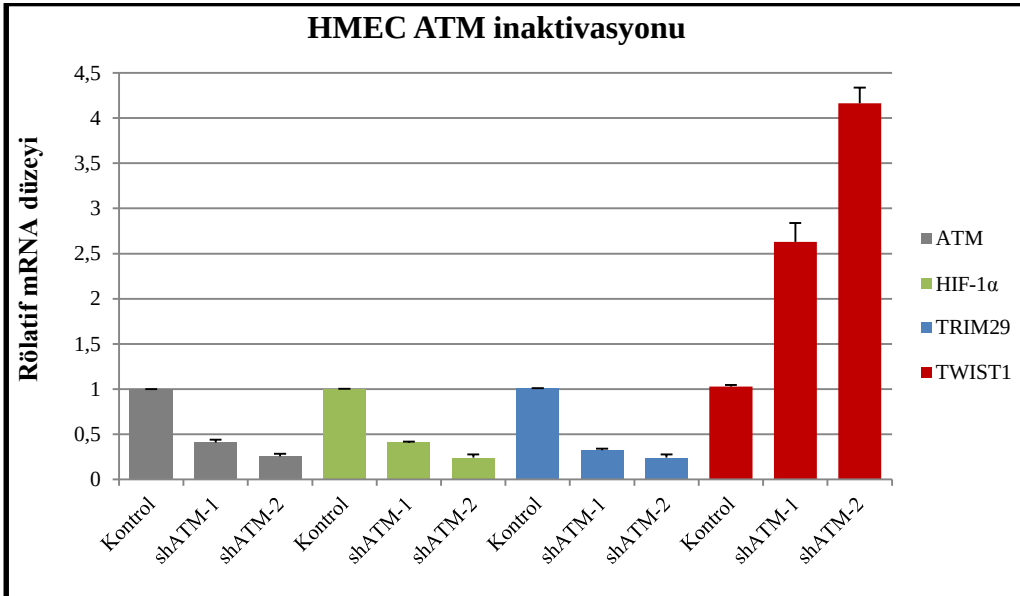
4.2.3. HMEC hücrelerinde ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

HMEC hücreleri kanser hücresi değildir. Kanser hücreleri ile birlikte birde normal hücrelerde TRIM29 ekspresyonunu analiz etmek için HMEC hücrelerinde ATM inaktivasyonu sağlanıp, hedef genlerin değişimi analiz edilmiştir. HMEC hücrelerinde de ATM inaktivasyonunun hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde olduğu gibi ATM inaktivasyonu sağlanmış HMEC hücrelerinde de TWIST1 ekspresyonu artmıştır.



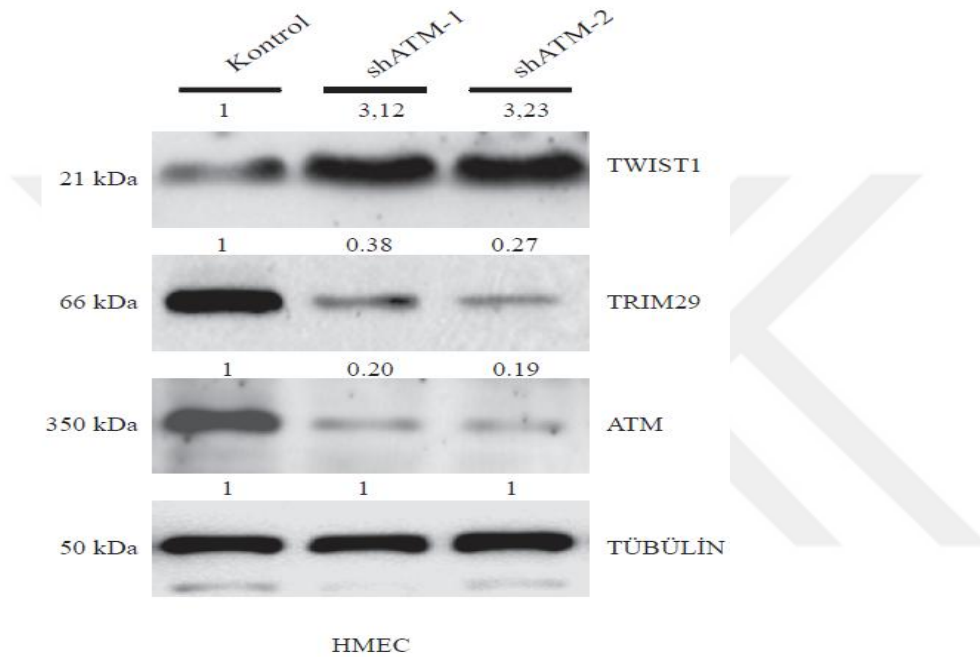
Şekil 4.13. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.13'te görülmektedir ki shATM-1 ve shATM-2 plazmid vektörleri ile ATM inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. *ATM* gen ekspresyonundaki azalmayı takiben hem HIF-1α hem de TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür. TWIST1 mRNA ekspresyonu ise artmıştır.



Şekil 4.14. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1α, TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shATM-1 grubu için ATM ve HIF-1 α mRNA ekspresyonunda yaklaşık %60'lık, shATM-2 için ise yaklaşık %80'lik bir düşüş gözlenmiştir. shATM-1 için TRIM29 mRNA ekspresyonunda yaklaşık %70'lik, shATM-2 için ise yaklaşık %80'lik bir düşüş gözlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise shATM-1 de 2,5 kat, shATM-2 için 4 kattan daha fazla bir artış gözlemlenmiştir. Hem shATM-1 hem de shATM-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda ATM, TRIM29 ve HIF-1 α mRNA ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.14).

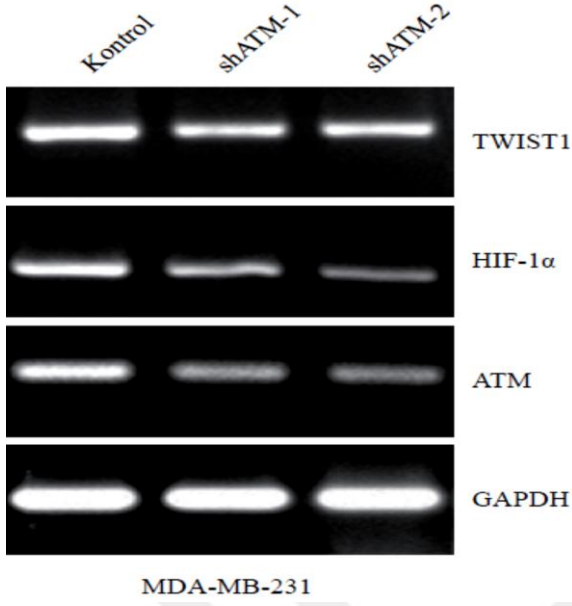


Şekil 4.15. HMEC hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları, RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shATM-1 hem de shATM-2 için ATM ve TRIM29 protein ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir. TWIST1 protein miktarı ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.15'te verilmiştir.

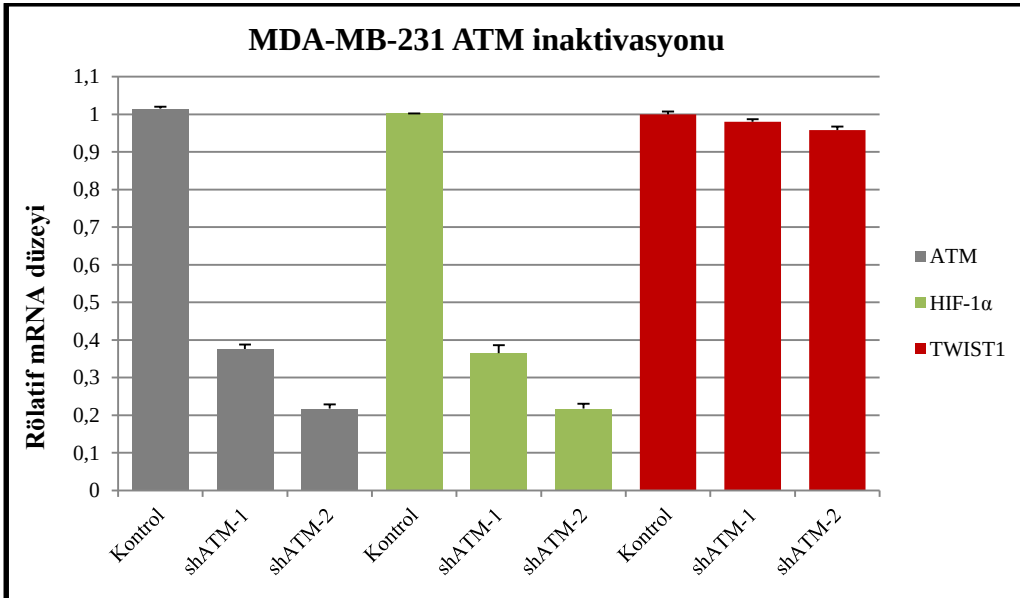
4.2.4. MDA-MB-231 hücrelerinde ATM, HIF-1 α ve TWIST1 bağlantısı

MDA-MB-231, TRIM29 ekspresyonuna sahip olmayan kanser hücresidir. TRIM29 eksprese eden meme kanseri ve normal meme epiteli hücrelerinde ATM, TRIM29, TWIST1 bağlantısını inceledikten sonra, TRIM29 eksprese etmeyen meme kanseri hücresi MDA-MB-231 için ATM, HIF-1 α ve TWIST1 arasındaki bağlantıyı araştırdık. MDA-MB-231 hücrelerinde de ATM inaktivasyonu HIF-1 α ekspresyonunu azaltmıştır. ATM ekspresyonunun azalması TWIST1 üzerine istatistiksel açıdan önemli bir etki yapmamıştır.



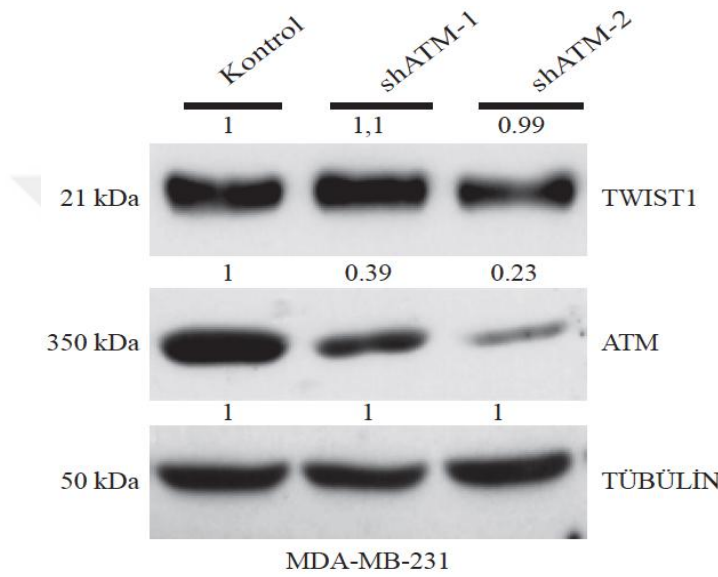
Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.16’da görülmektedir ki shATM-1 ve shATM-2 plazmid vektörleri ile ATM inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. ATM mRNA ekspresyonundaki azalmayı takiben HIF-1α mRNA ekspresyonu bazal seviyede düşmüştür. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben ATM, HIF-1α ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

3 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shATM-1 ve shATM-2 grupları için ATM mRNA ekspresyonunda yaklaşık %60'tan fazla bir azalma gözlenmiştir. HIF-1 α mRNA ekspresyonunda ise shATM-1 için %60'tan fazla, shATM-2 için yaklaşık %80'lik düşüş gözlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise hem shATM-1 hem de shATM-2 için istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir. Hem shATM-1 hem de shATM-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda ATM ve HIF-1 α mRNA ekspresyonu azalmıştır. TWIST1 ekspresyonundaki değişim ise istatistiksel açıdan önemli değildir ($p > 0,05$) (Şekil 4.17).



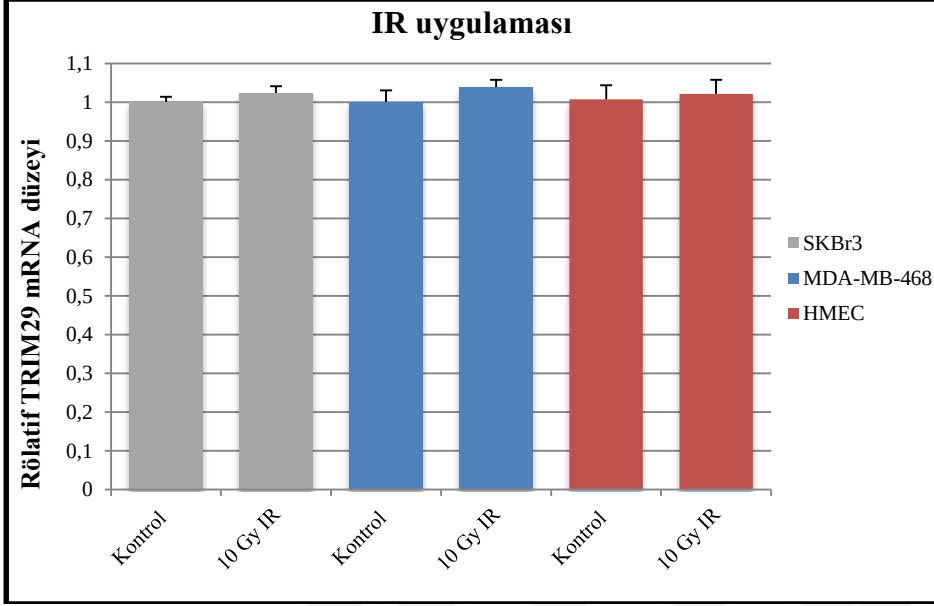
Şekil 4.18. MDA-MB-231 hücre grubunda ATM inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları, RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shATM-1 hem de shATM-2 grupları için ATM inaktivasyonu sonucu ATM protein ekspresyonu azalmıştır. Bunu takibinde TWIST1 protein ekspresyonunda önemli bir değişim olmamıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.18'de verilmiştir.

4.2.5. İyonize radyasyonun TRIM29 üzerine etkisi

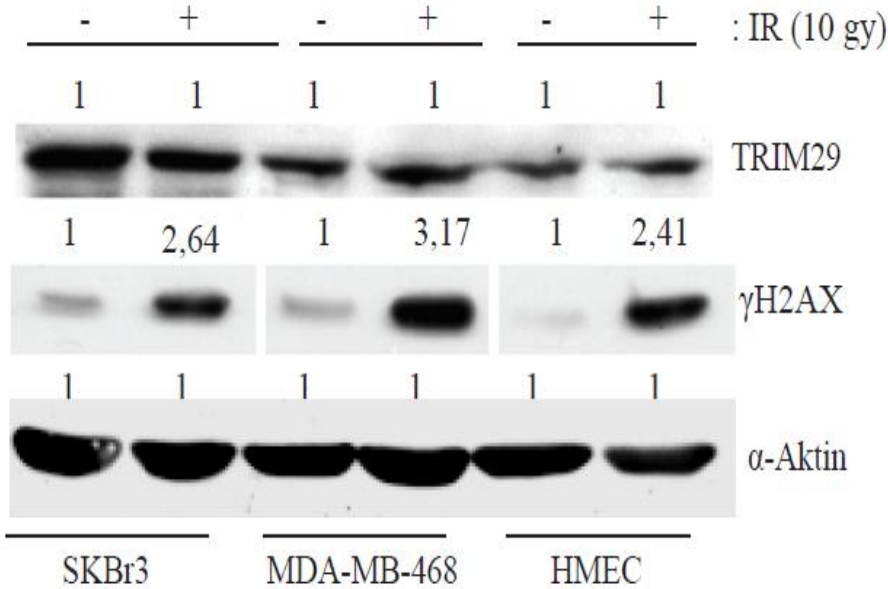
Literatür özetinde bahsedildiği üzere ATM iyonize radyasyon sonrası meydana gelen DNA çift kol kırıklarının tamirinde görev alan bir protein kinazdır (Bakkenist ve Kastan 2003). ATM inaktivasyonunun TRIM29 ekspresyonunu azaltması sebebiyle iyonize radyasyonun TRIM29 üzerine etkisini araştırmak istedik. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri 10 saniye boyunca 10 Gy radyasyona maruz bırakıldı ve 18 saat inkübasyondan sonra eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile TRIM29 ekspresyonu değişimi test edildi. γ H2AX bir histon protein ailesi üyesidir ve DNA hasarı belirteci olarak kullanılır (Celeste vd 2002).

γ H2AX uygulanan radyasyonun kontrolünü sağlamak için kontrol olarak western blot analizi için kullanılmıştır. GAPDH eş zamanlı qRT-PCR, α -Aktin western blot analizi için kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.19. IR uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

IR sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli herhangi bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. IR uygulaması sonrası TRIM29 ve γ H2AX protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları

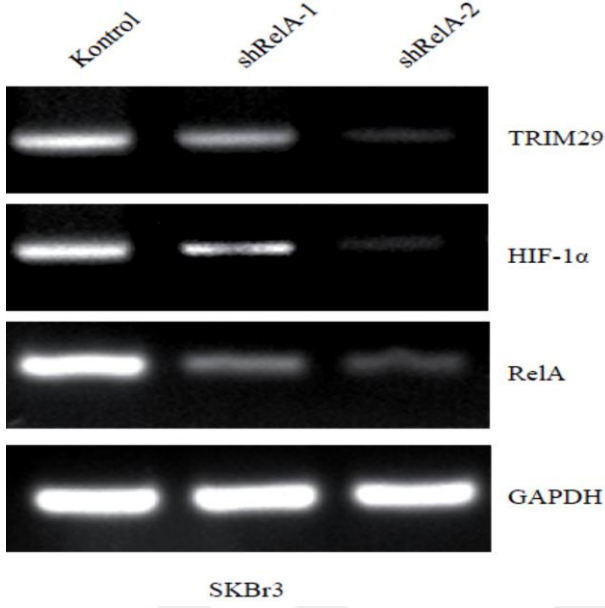
Western blot analizi sonucu TRIM29 protein ekspresyonunda IR uygulaması sonrası herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol olarak kullanılan γ H2AX protein ekspresyonu ise kontrole kıyasla IR uygulaması sonrası artmıştır. Photoshop programı ile elde edilen band sinyali analizi sonuçları Şekil 4.20’de verilmiştir.

4.3. NF- κ B Proteininin HIF-1 α ve TRIM29 Üzerine Etkisi

Literatür özetinde bahsedildiği gibi NF- κ B, ATM proteini tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür (Rosato vd 2009). ATM’nin TRIM29 ekspresyonunda etkili olduğunu anladıktan sonra bunu hangi transkripsiyon faktörü aracılığı ile yaptığını ve bu yolla hangi hücresel mekanizmaların etkili olduğunu araştırmak istedik. ATM tarafından aktive edilen ve birbiriyle bağlantılı NF- κ B ve HIF-1 α transkripsiyon faktörlerini hedef olarak belirledik. İlk olarak NF- κ B’nin HIF-1 α ve TRIM29 ile bağlantısını araştırdık. RelA, NF- κ B alt birimidir ve NF- κ B aktivasyonu için elzemdir (Pahl 1999). Çalışma kapsamında SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri için RelA inaktif hücreler oluşturuldu. Bunun için Open Biosystem’den 5 farklı shRNA spariş edildi. En iyi inaktivasyon sağlanan iki adet shRNA plazmidi kullanıldı ve bunlar shRelA-1 ve shRelA-2 olarak isimlendirildi. RelA inaktif hücrelerde RelA, TRIM29 ekspresyonu RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. RelA inaktivasyonunun HIF-1 α ekspresyonuna etkisi RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi. Literatür özetinde belirtildiği üzere normal koşullarda HIF-1 α proteinini O₂ bağımlı mekanizma ile parçalandığı için, bu protein normoksi halinde western blot ile çoğu zaman belirlenemez. Bu nedenle bu aşamada HIF-1 α proteini için western blot yapılmamıştır. NF- κ B, TWIST1 ilişkisi önceden çalışıldığı için bu aşamada ayrıca TWIST1 değişimi analiz edilmedi. RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH, western blot analizi için α -Aktin kontrol olarak kullanılmıştır.

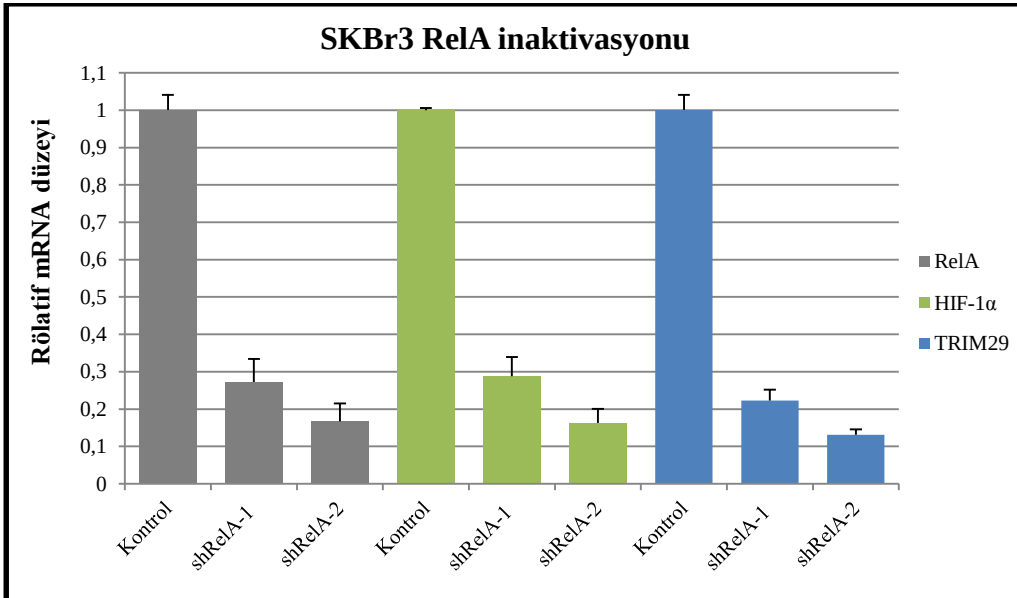
4.3.1. SKBr3 hücrelerinde NF- κ B, HIF-1 α ve TRIM29 bağlantısı

SKBr3 hücrelerinde RelA inaktivasyonu hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilemiştir. shRelA-2 grubu için daha yüksek oranda inaktivasyon sağlanmıştır.



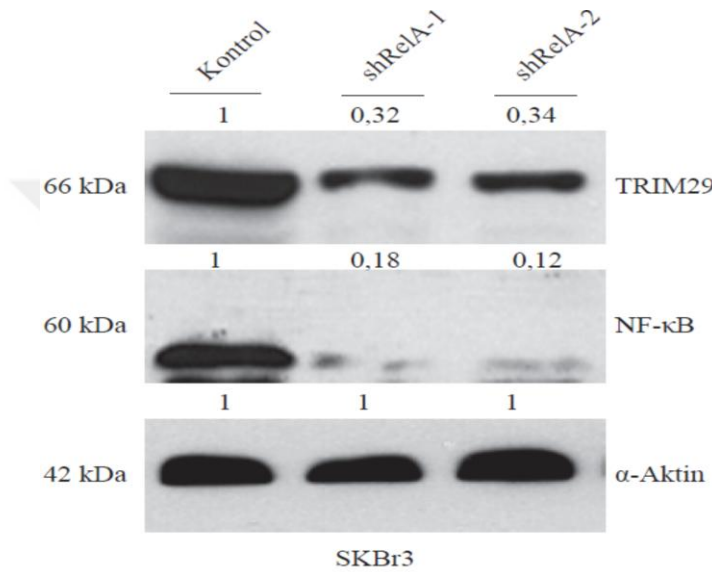
Şekil 4.21. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.21’de görülmektedir ki shRelA-1 ve shRelA-2 plazmid vektörleri ile RelA inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. shRelA-2 plazmidini ile SKBr3 hücreleri için daha yüksek inaktivasyon sağlanmıştır. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubundaki RelA mRNA ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür.



Şekil 4.22. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

3 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları tek grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shRelA-1 grubu için RelA mRNA ekspresyonunda yaklaşık %70'lik bir azalma gözlenmiştir, shRelA-2 için ise %80'den daha fazla bir azalma belirlenmiştir. HIF-1 α mRNA ekspresyonunda ise shRelA-1 için yaklaşık %75, shRelA-2 için %80'den fazla bir düşüş gözlenmiştir. shRelA-1 grubunda TRIM29 mRNA ekspresyonunda yaklaşık %80'lik, shRelA2 grubunda ise yaklaşık %90'lık bir azalma belirlenmiştir. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.22).

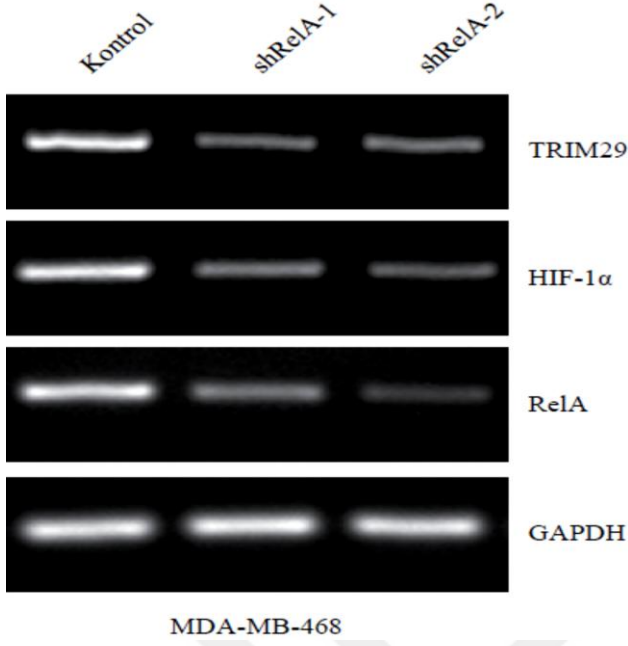


Şekil 4.23. SKBr3 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grupları için RelA inaktivasyonu sonucu NF-κB protein ekspresyonu azalmıştır. Bunu takibinde TRIM29 protein ekspresyonunda azalmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.23'te verilmiştir.

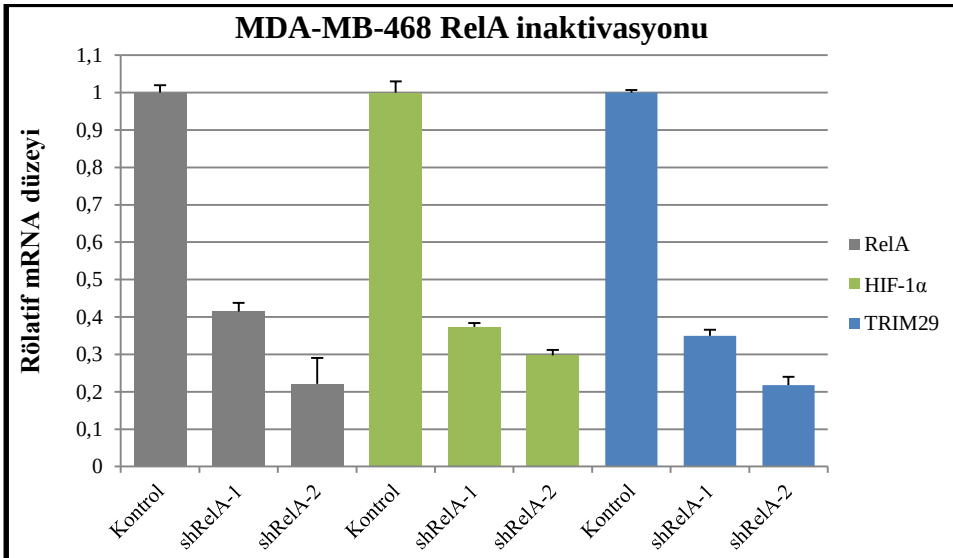
4.3.2. MDA-MB-468 hücrelerinde NF-κB, HIF-1 α ve TRIM29 bağlantısı

MDA-MB-468 hücrelerinde RelA inaktivasyonu hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilemiştir. shRelA-2 grubu için daha yüksek oranda inaktivasyon sağlanmıştır.



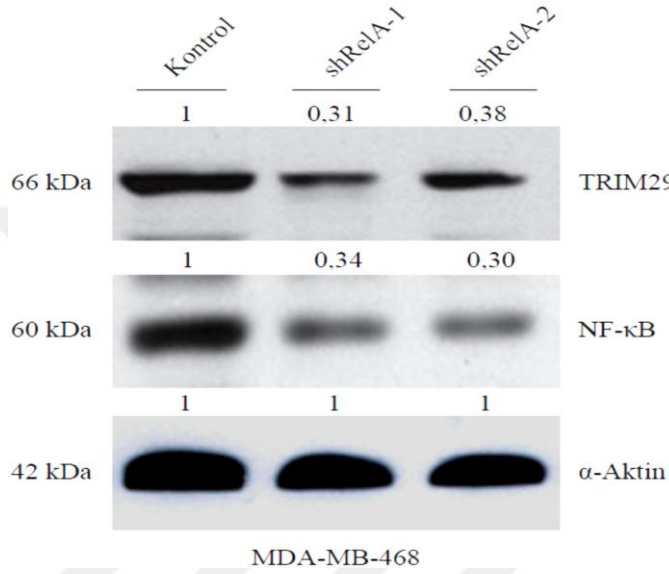
Şekil 4.24. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.24'te görülmektedir ki shRelA-1 ve shRelA-2 plazmid vektörleri ile RelA inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 plazmidini ile MDA-MB-468 hücreleri için yüksek oranda inaktivasyon sağlanmıştır. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubundaki RelA mRNA ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür.



Şekil 4.25. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

3 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları tek grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shRelA-1 grubu için RelA mRNA ekspresyonunda yaklaşık 60'lık bir azalma gözlenmiştir, shRelA-2 için ise yaklaşık 80'lik azalma belirlenmiştir. HIF-1 α mRNA ekspresyonunda shRelA-1 için yaklaşık %65'lik, shRelA-2 için %70'lik düşüş gözlenmiştir. shRelA-1 grubunda TRIM29 mRNA ekspresyonunda yaklaşık 65'lik, shRelA2 grubunda ise yaklaşık %80'lik bir azalma belirlenmiştir. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.25).

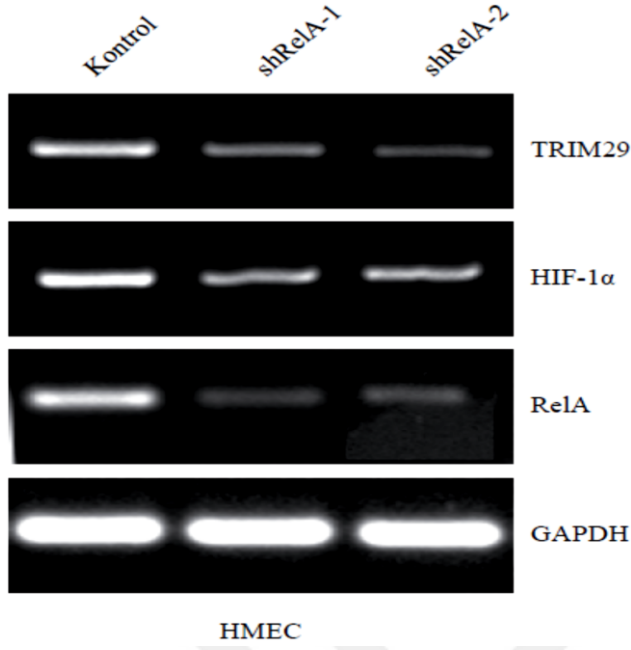


Şekil 4.26. MDA-MB-468 hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grupları için RelA inaktivasyonu sonucu NF-κB protein ekspresyonu azalmıştır. Bunu takiben TRIM29 protein ekspresyonunda azalmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.26'da verilmiştir.

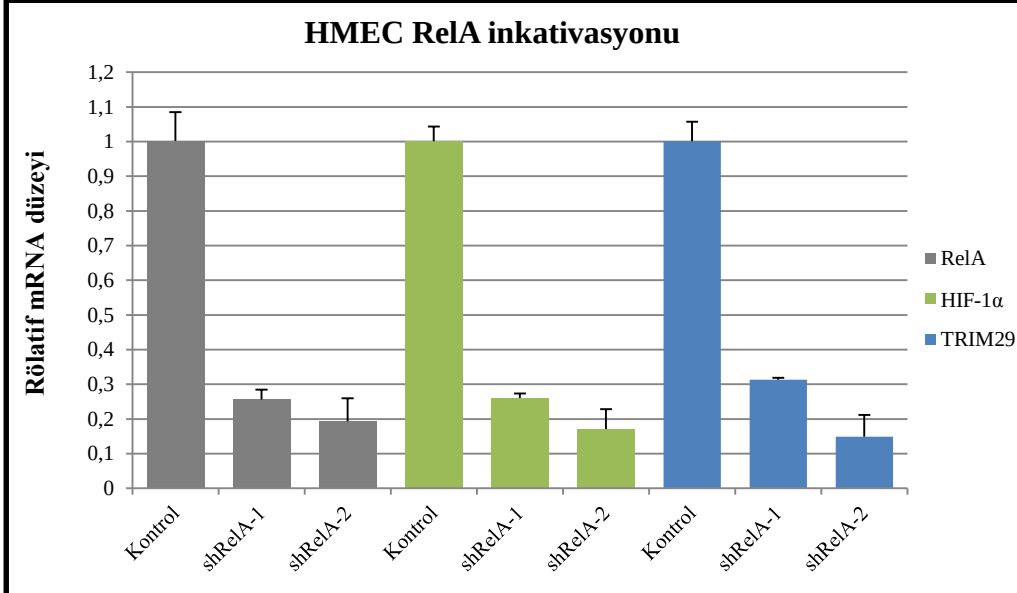
4.3.3. HMEC hücrelerinde NF-κB, HIF-1 α ve TRIM29 bağlantısı

HMEC hücrelerinde NF-κB inaktivasyonu hem HIF-1 α hem de TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilemiştir. shRel-1 ve shRel2 için hemen hemen eşit oranda inaktivasyon sağlanmıştır.



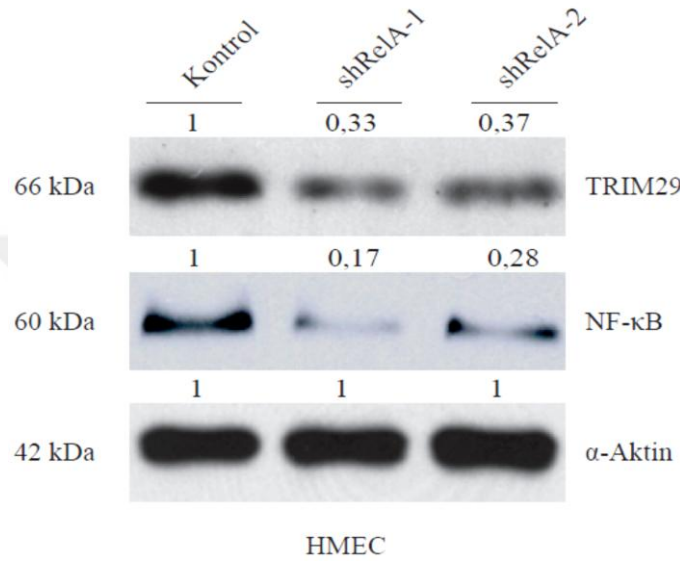
Şekil 4.27. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

Şekil 4.27’de görülmektedir ki shRelA-1 ve shRelA-2 plazmid vektörleri ile RelA inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 plazmid ile HMEC hücreleri için yüksek oranda inaktivasyon sağlanmıştır. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubundaki RelA mRNA ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonları bazal seviyede düşmüştür.



Şekil 4.28. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben RelA, HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

3 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları tek grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. shRelA-1 ve shRelA-2 için RelA mRNA ekspresyonunda %70'ten fazla azalma gözlenmiştir. HIF-1 α için shRelA-1 için yaklaşık %75'lik, shRelA-2 için yaklaşık %85'lik düşüş gözlenmiştir. shRelA-1 grubunda TRIM29 mRNA ekspresyonunda %70'lik, shRelA2 grubunda ise %80'den fazla bir azalma belirlenmiştir. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.28).

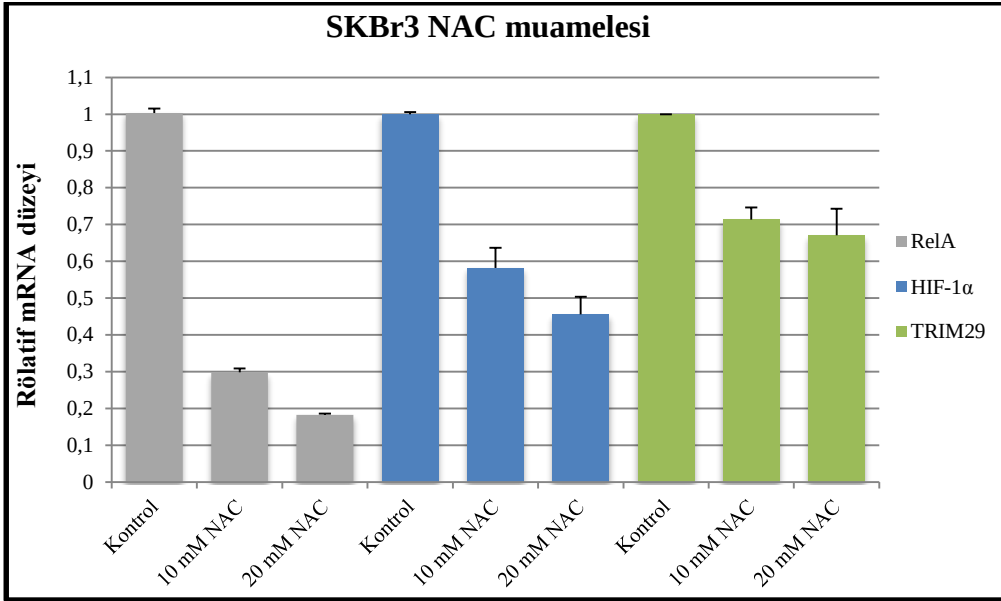


Şekil 4.29. HMEC hücre grubunda RelA inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shRelA-1 hem de shRelA-2 grupları için RelA inaktivasyonu sonucu NF-κB protein ekspresyonu azalmıştır. Bunu takibinde TRIM29 protein ekspresyonu da azalmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.29'da verilmiştir.

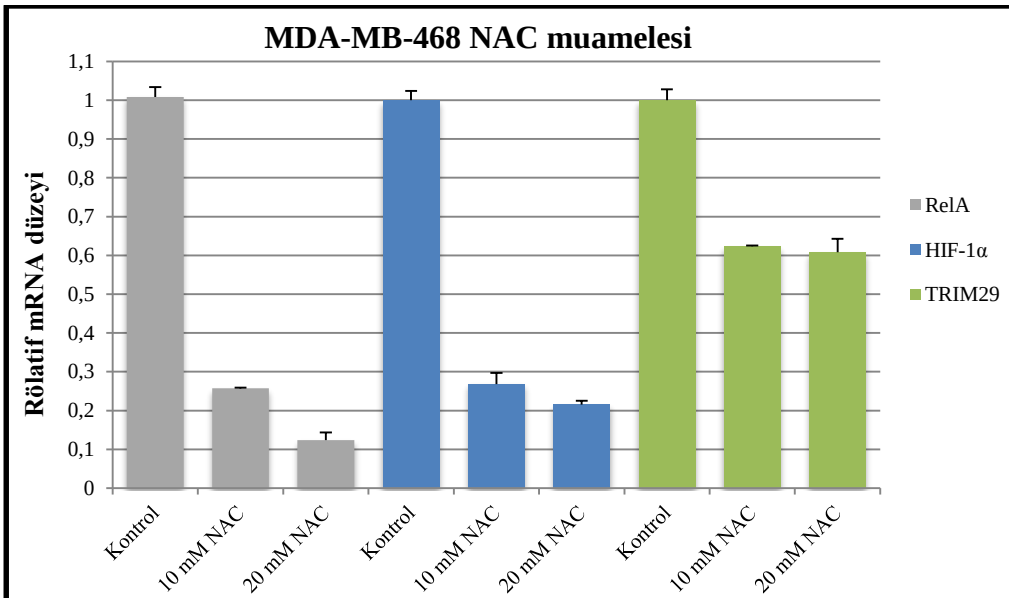
4.3.4. NAC uygulamasının HIF-1 α ve TRIM29 ekspresyonuna etkisi

NF-κB mRNA seviyesindeki azalmayı takiben HIF-1 α ve TRIM29 seviyelerinin azalmasından dolayı bu yolak üzerine antioksidan kullanımının nasıl etki edeceğini araştırmak istedik. Çünkü Alpay vd (2015) hücrelerin yüksek dozda NAC (N-asetil sistein)'ye maruz bırakılmalarının NF-κB transkripsiyonel aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri kültür ortamına NAC eklenerek kültüre edildi. Daha sonra RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimleri eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi. GAPDH eş zamanlı qRT-PCR analizi için kontrol olarak kullanıldı.



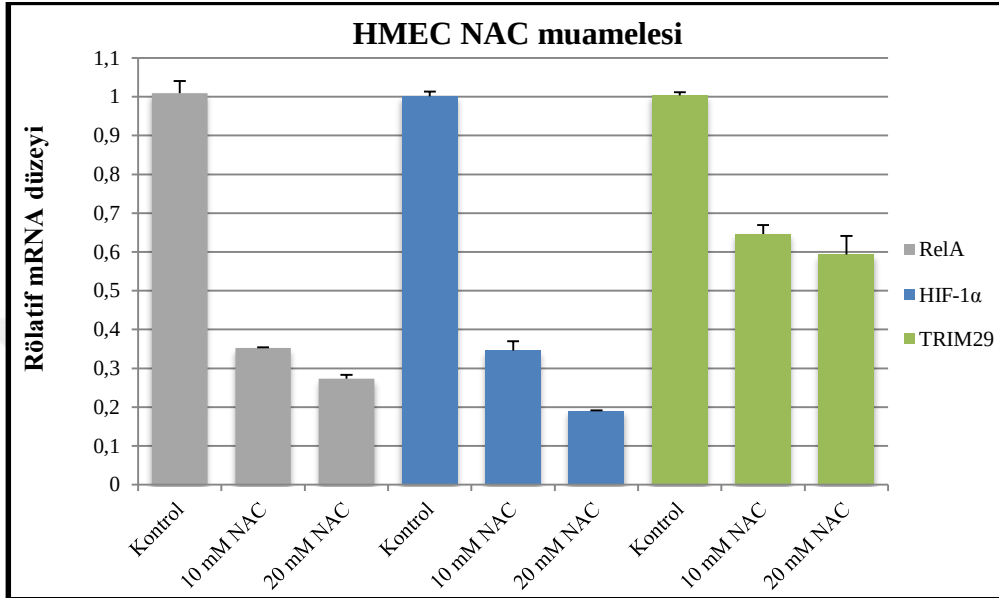
Şekil 4.30.SKBr3 hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

SKBr3 hücrelerinde NAC uygulamasını takiben RelA, HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu azalmıştır. NAC uygulaması sonrası RelA mRNA ekspresyonu ortalama yüzde %80 azalmıştır. HIF-1α mRNA ekspresyonu ortalama %50 oranında azalmıştır. TRIM29 mRNA ekspresyonu ise ortalama %30 oranında azalma olmuştur. Meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.31. MDA-MB-468 hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

MDA-MB-468 hücrelerinde NAC uygulamasını takiben NF- κ B, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonu azalmıştır. NAC uygulaması sonrası NF- κ B mRNA ekspresyonu ortalama yüzde %85 azalmıştır. HIF-1 α mRNA ekspresyonu ortalama % 80 oranında azalmıştır. TRIM29 mRNA ekspresyonu ise ortalama % 40 oranında olmuştur. Meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.31).



Şekil 4.32. HMEC hücre grubunda NAC uygulaması sonrası RelA, HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

HMEC hücrelerinde NAC uygulamasını takiben RelA, HIF-1 α ve TRIM29 bazal mRNA ekspresyonu azalmıştır. NAC uygulaması sonrası RelA mRNA ekspresyonu ortalama yüzde %70 azalmıştır. HIF-1 α mRNA ekspresyonu ortalama % 75 oranında azalmıştır. TRIM29 mRNA ekspresyonu ise ortalama % 40 oranında olmuştur. Meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.32).

4.4. HIF-1 α Proteininin TRIM29 ve TWIST1 Üzerine Etkisi

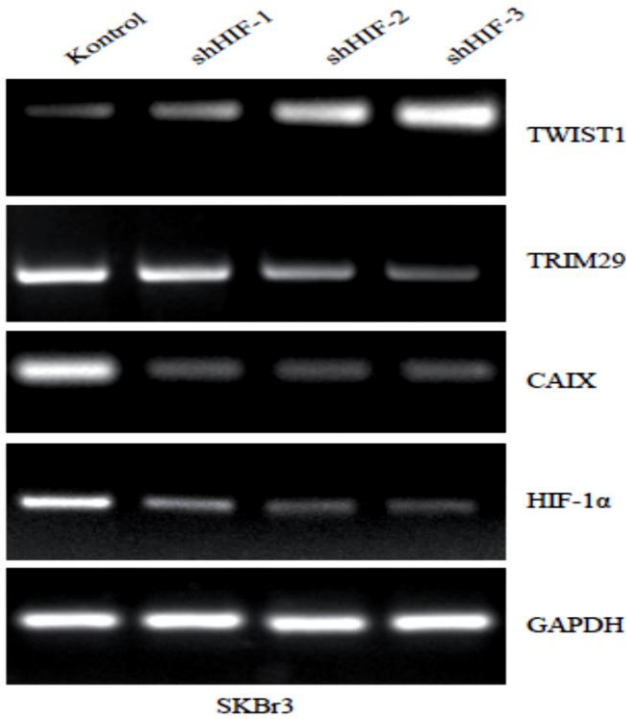
Hem ATM hem de NF- κ B inaktivasyonunun TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediğini belirledikten sonra bu bağlantıda HIF-1 α proteininin rolünü araştırdık. Ayrıca önceden tanımlanmış HIF-1 α , TWIST1 bağlantısını meme kanseri hücrelerinde çalıştık. Biz HIF-1 α inaktivasyonunu sağlayarak TRIM29 ve TWIST1 değişimini SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde test ettik. Ayrıca bu bağlantıda TRIM29 etkinliğini test etmek için TRIM29 ekspresyonu gözlenmeyen MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu sonucu TWIST1 ekspresyonundaki değişimi test ettik.

Open Biosystem'den 5 farklı HIF-1 α shRNA plazmidi sipariş edildi. SKBr3, MDA-MB-468, HMEC ve MDA-MB-231 için HIF-1 α gen inaktivasyonu

gerçekleştirildi. İlk deneme SKBr3 ile yapıldı ve kullanılan 5 shRNA'dan, 3 tane en yüksek düzeyde inaktivasyon sağlayan shRNA vektör belirlendi. RT-PCR sonuçlarını test etmek bu 3 plazmid vektörü kullanıldı. Eş zamanlı qRT-PCR ve western blot sonuç değerlendirmeleri en iyi inaktivasyon sağlayan 2 shRNA kullanılarak yapıldı. Kullanılan shRNA plazmidleri, shHIF-1, shHIF-2 ve shHIF-3 olarak isimlendirildi. TRIM29 ve TWIST1 değişimini RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile test ettik. HIF-1 α aktivasyon değişimi RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR ile test edildi. HIF-1 α proteinini normoksi halinde western blot ile belirlenemediği için bu aşamada HIF-1 α proteini için western blot yapılmamıştır. RT-PCR için GAPDH, eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca önceki çalışmalarda HIF-1 α hedef geni olarak bilinen CAIX (Wykoff vd 2000), RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR testleri için kontrol olarak kullanılmıştır.

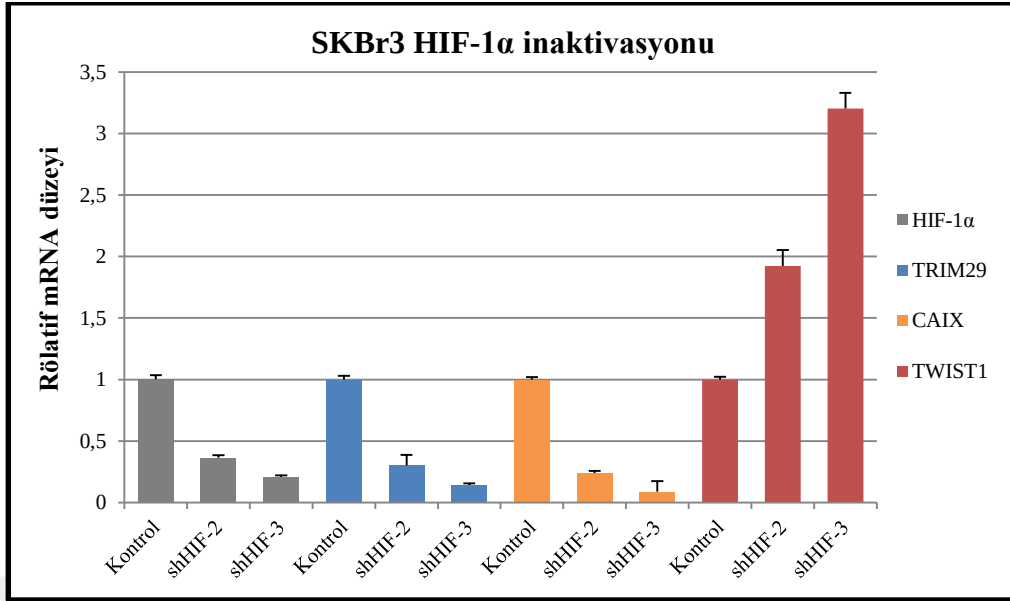
4.4.1. SKBr3 hücrelerinde HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

SKBr3 hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir, diğer yandan TWIST1 ekspresyonunu arttırmıştır.



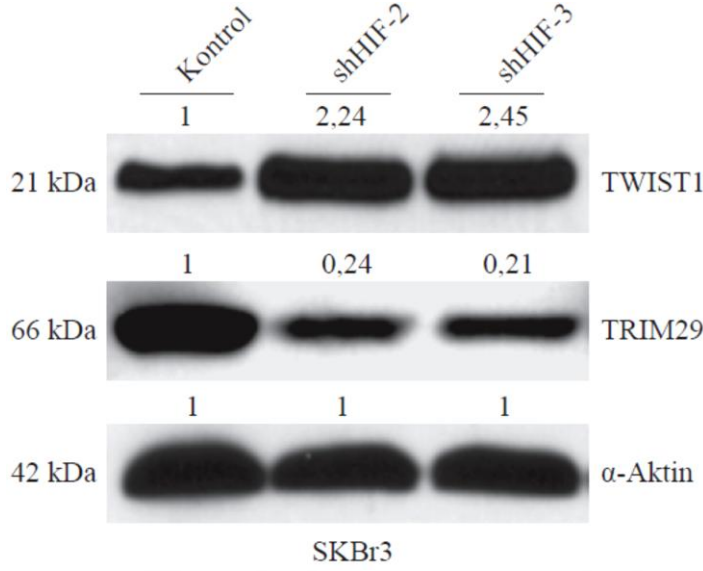
Şekil 4.33. SKBr3 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

RT-PCR sonuçları incelendiği zaman kullanılan 3 shRNA plazmidinde HIF-1 α inaktivasyonunun sağlandığı görülmektedir. Bunu takiben HIF-1 α , CAIX ve TRIM29 mRNA ekspresyonları azalmıştır. TWIST1 mRNA ekspresyonu ise artmıştır. En iyi inaktivasyon shHIF-3 grubunda elde edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.34. SKBr3 hücre grubunda HIF-1α inaktivasyonunu takiben HIF-1α, TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. Eş zamanlı qRT-PCR shHIF-2 ve shHIF-3 örnekleri için analiz edilmiştir. shHIF-2 için HIF-1α, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonlarında yaklaşık %70'lik bir azalma gözlenmiştir. shHIF-3 için HIF-1α mRNA ekspresyonu yaklaşık %80, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonlarında ise %90'lık azalma elde edilmiştir. shHIF-2 için TWIST1 ekspresyonunda 1,9 katlık, shHIF-3 için ise 3,2 katlık bir artma söz konusudur. Hem shHIF-2 hem de shHIF-3 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda HIF-1α, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.34).

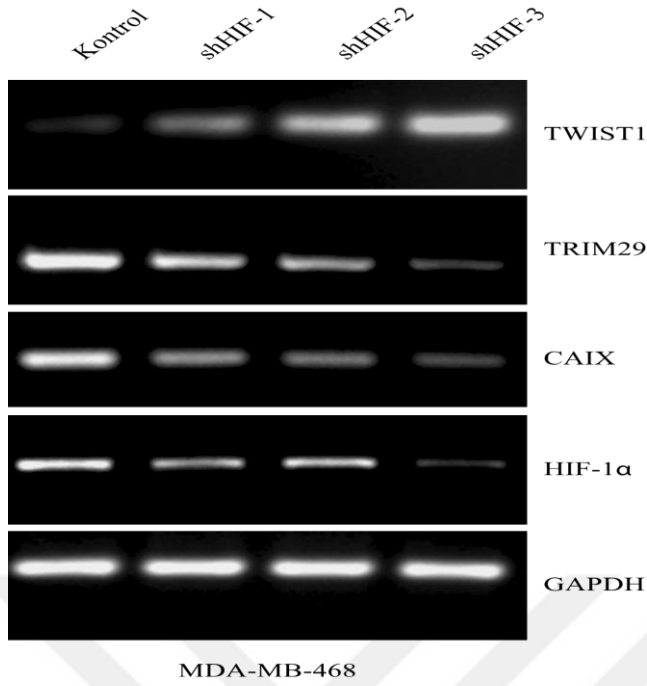


Şekil 4.35. SKBr3 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Hem shHIF-2 hem de shHIF-3 grupları için HIF-1 α inaktivasyonu sonucu TRIM29 protein ekspresyonu azalmıştır. TWIST1 protein ekspresyonu ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.35'te verilmiştir.

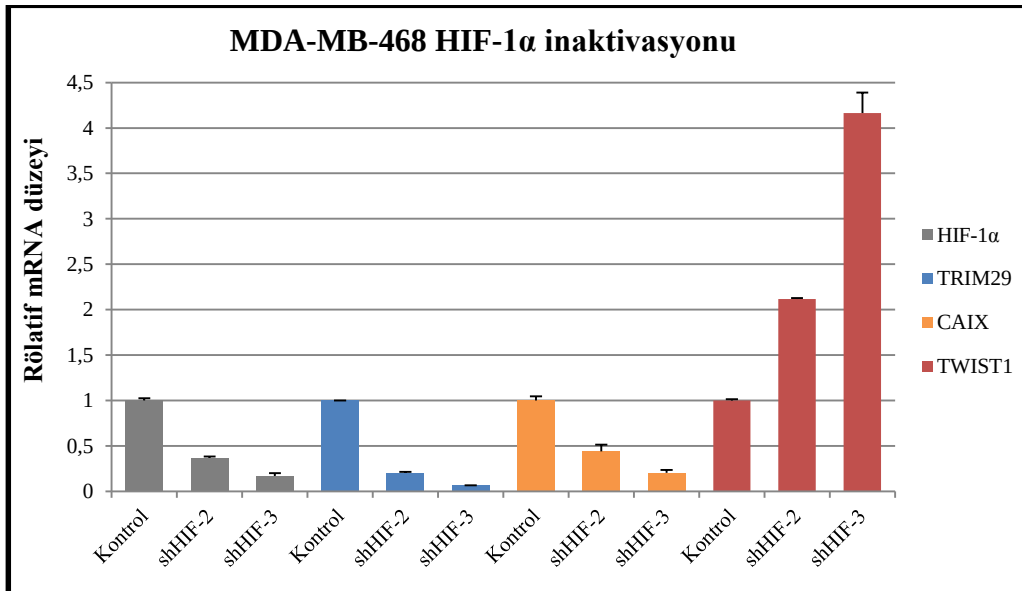
4.4.2. MDA-MB-468 hücrelerinde HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

MDA-MB-468 hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir, diğer yandan TWIST1 ekspresyonunu arttırmıştır. En iyi HIF-1 α inaktivasyonu shHIF-3 ile sağlanmıştır.



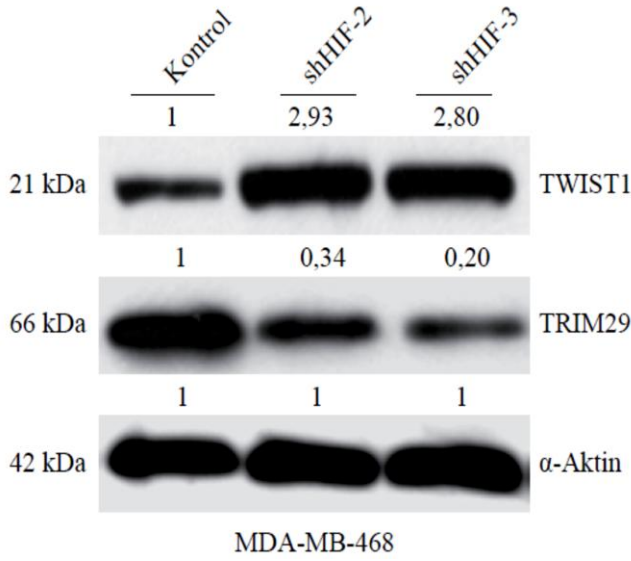
Şekil 4.36. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

RT-PCR sonuçları incelendiği zaman kullanılan 3 shRNA plazmidi içinde HIF-1 α inaktivasyonunun sağlandığı görülmektedir. Bunu takiben HIF-1 α , CAIX ve TRIM29 mRNA ekspresyonları azalmıştır. TWIST1 mRNA ekspresyonu ise artmıştır. En iyi inaktivasyon shHIF-3 grubunda elde edilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.37. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. Eş zamanlı qRT-PCR shHIF-2 ve shHIF-3 örnekleri için analiz edilmiştir. shHIF-2 için HIF-1 α mRNA ekspresyonunda yaklaşık %70'lik, shHIF-3 için ise yaklaşık %85'lik azalma gözlenmiştir. TRIM29 mRNA ekspresyonu shHIF-2 için %85, shHIF-3 için ise %90'dan daha fazla miktarda düşmüştür. shHIF-2 grubunda CAIX mRNA ekspresyonu yaklaşık %60, shHIF-3 için ise %80 oranında azalmıştır. shHIF-2 için TWIST1 mRNA ekspresyonunda 2,1 katlık, shHIF3 için ise 4,2 katlık bir artma söz konusudur. Hem shHIF-2 hem de shHIF-3 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.37).

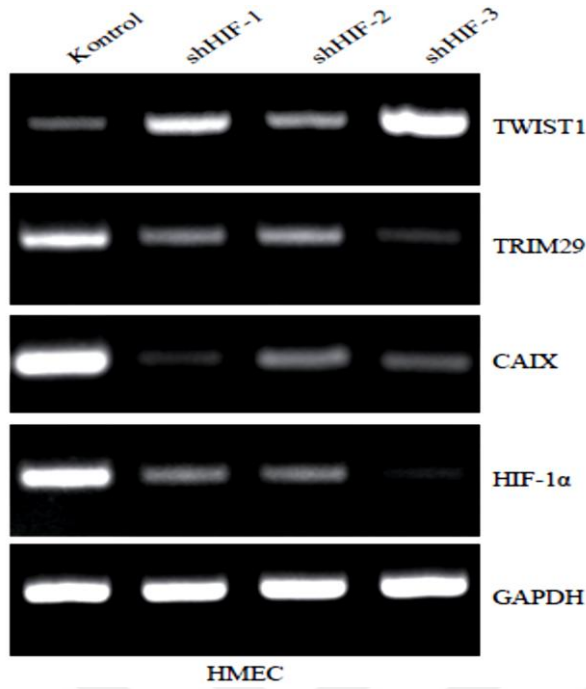


Şekil 4.38. MDA-MB-468 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. TRIM29 protein ekspresyonu HIF-1 α inaktivasyonu sonrası azalmıştır. TWIST1 protein ekspresyonu ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.38'de verilmiştir.

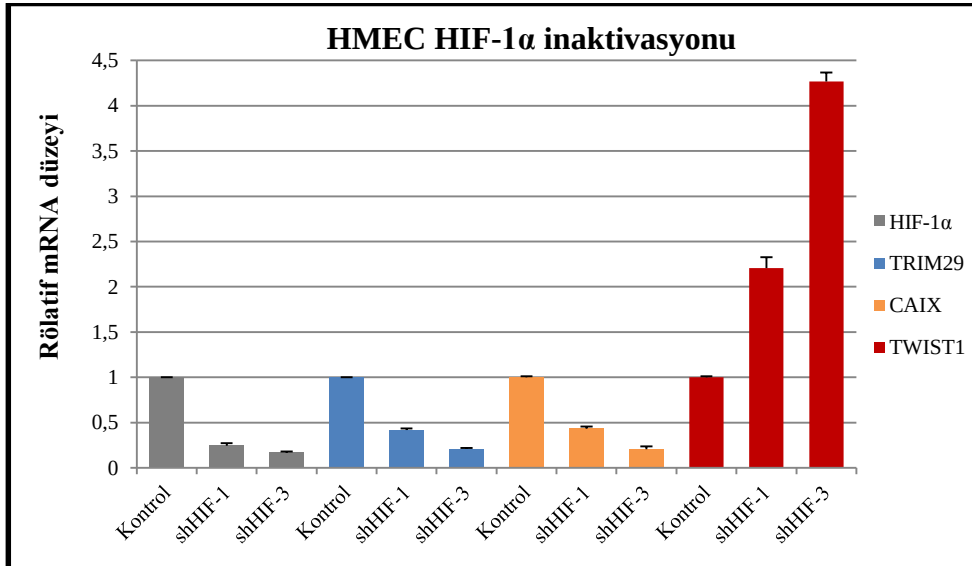
4.4.3. HMEC hücrelerinde HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 bağlantısı

HMEC hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu TRIM29 ekspresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir, diğer yandan TWIST1 ekspresyonunu arttırmıştır. HMEC hücre grubu için yüksek HIF-1 α inaktivasyonu shHIF-1 ve shHIF-3 plazmid vektörleri ile elde edilmiştir.



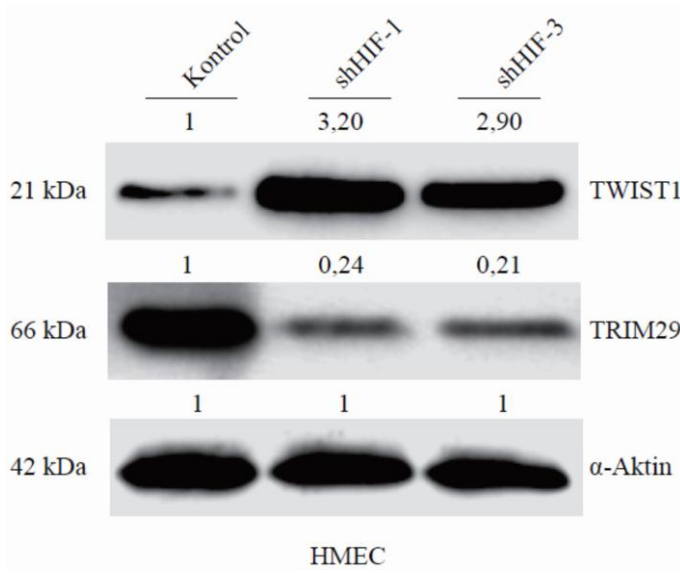
Şekil 4.39. HMEC hücre grubunda HIF-1α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

HMEC HIF-1α inaktivasyonu için kullanılan vektörlerden shHIF-1 ve shHIF-3'ten yüksek oranda inaktivasyon elde edilmiştir. HIF-1α mRNA ekspresyonundaki azalmayı takiben CAIX ve TRIM29 mRNA ekspresyonları azalmıştır. TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.39).



Şekil 4.40. HMEC hücre grubunda HIF-1α inaktivasyonunu takiben HIF-1α, TRIM29, CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

4 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. Eş zamanlı qRT-PCR shHIF-1 ve shHIF-3 örnekleri için analiz edilmiştir. shHIF-1 için HIF-1 α mRNA ekspresyonunda %70'den fazla, shHIF-3 için ise %90'lık azalma gözlenmiştir. TRIM29 mRNA ekspresyonu shHIF-1 için %60, shHIF-3 için ise %80 düşmüştür. shHIF-1 grubunda CAIX mRNA ekspresyonu %60'tan fazla, shHIF-3 için ise %80 oranında azalmıştır. shHIF-1 için TWIST1 mRNA ekspresyonunda 2,2 katlık, shHIF-3 için ise 4,2 katlık bir artma söz konusudur. Hem shHIF-1 hem de shHIF-3 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu azalmış, bunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır (Şekil 4.40).

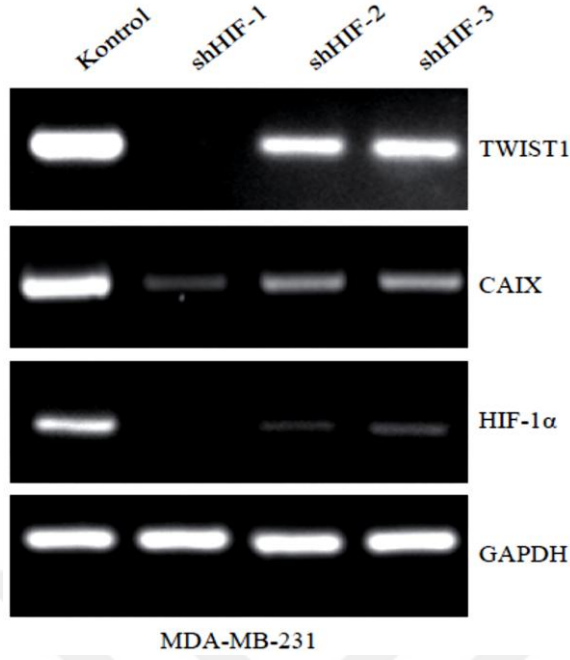


Şekil 4.41. HMEC hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. TRIM29 protein ekspresyonu HIF-1 α inaktivasyonu sonrası azalmıştır. TWIST1 protein ekspresyonu ise artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.41'de verilmiştir.

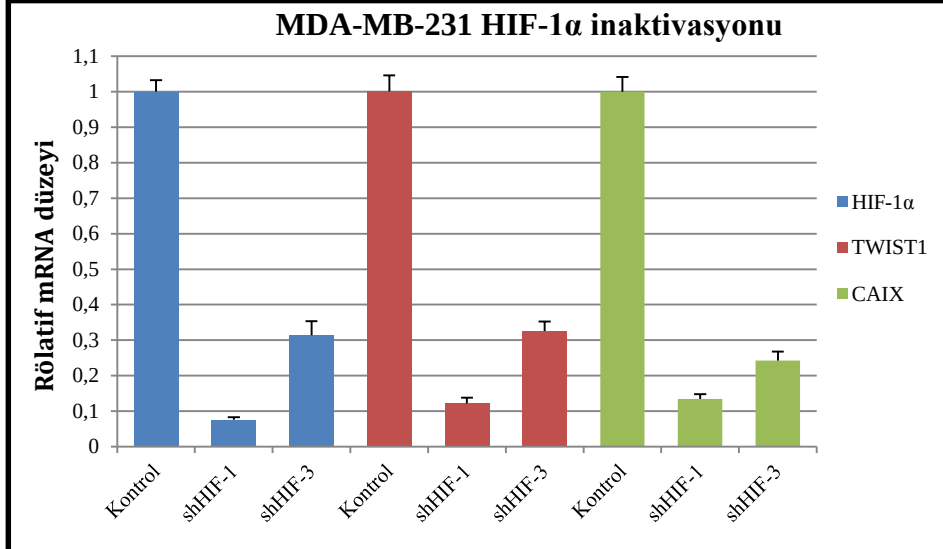
4.4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 α ve TWIST1 bağlantısı

TRIM29 ekspresyonunun HIF-1 α tarafından kontrol edildiğini ve HIF-1 α inaktivasyonunun TWIST1'i pozitif olarak etkilediğini anladıktan sonra, TRIM29 yokluğunda bu bağlantının nasıl gerçekleştiğini anlamak için MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu sonucu TWIST1 ekspresyonu RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi.



Şekil 4.42. MDA-MB-231 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

HIF-1 α inaktivasyonu sonucu TRIM29 eksprese eden hücrelerdekinin aksine TWIST1 mRNA ekspresyonu azalmıştır. En iyi inaktivasyon shHIF-1 grubunda elde edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan HIF-1 α hedef geni *CAIX* mRNA ekspresyonunda azalmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.43. MDA-MB-231 hücre grubunda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

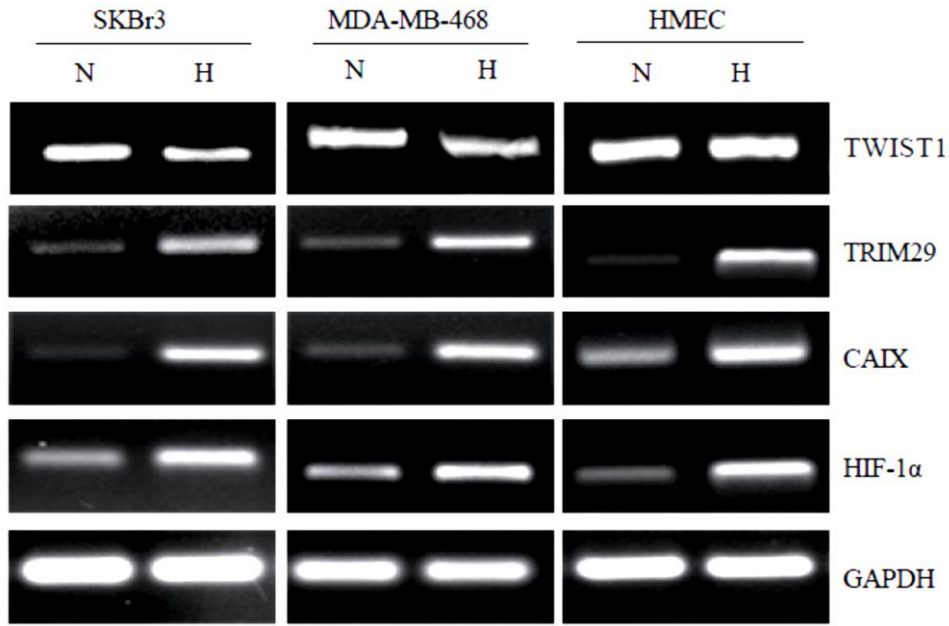
3 farklı gene ait eş zamanlı qRT-PCR sonuçları aynı grafikte verilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları, RT-PCR sonuçları ile uyumludur. Eş zamanlı qRT-PCR shHIF-1 ve shHIF-3 örnekleri için analiz edilmiştir. shHIF-1 için HIF-1 α mRNA ekspresyonunda %90'dan fazla, shHIF-3 için ise %70'lik azalma gözlenmiştir. shHIF-1 grubunda CAIX mRNA ekspresyonu yaklaşık %90, shHIF-3 için ise %70 oranında azalmıştır. shHIF-1 için TWIST1 mRNA ekspresyonu yaklaşık %90, shHIF-3 için ise %75 oranında azalmıştır. Hem shHIF-1 hem de shHIF-3 grubunda eş zamanlı qRT-PCR testi sonrasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) miktarda HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.43).

4.5. Hipoksi'nin TRIM29 ve TWIST1 Üzerine Etkisi

HIF-1 α inaktivasyonunun TRIM29 ekspresyonunu azalttığı ve TWIST1 seviyesini arttırdığını ortaya çıkardıktan sonra HIF-1 α artışının bu bağlantıyı nasıl etkilediğini araştırdık. Bunun için SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksik koşullarda TRIM29 ve TWIST1 değişimini araştırdık. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hipoksik koşullarda TWIST1 değişimini test ettik. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri hipoksiye maruz bırakıldı. RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile HIF-1 α , TRIM29, TWIST1 ve CAIX ekspresyonu değişimleri test edildi. TWIST1 ekspresyonunun TRIM29 yokluğunda nasıl gerçekleştiğini anlamak için TRIM29 eksprese etmeyen MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri hipoksiye maruz bırakıldı. TWIST1 ekspresyonu değişimi eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. İlk aşamada hipoksi uygulaması 18 saat boyunca %1 O₂'de 37°C'de gerçekleştirildi. Grafikler oluşturulurken bazı kısaltmalar kullanıldı. MDA-MB-468 hücreleri için "468", MDA-MB-231 hücreleri için "231", hipoksi için "Hip" ve normoksi için ise "Nor" kısaltmaları kullanılmıştır. RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH, western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanılmıştır.

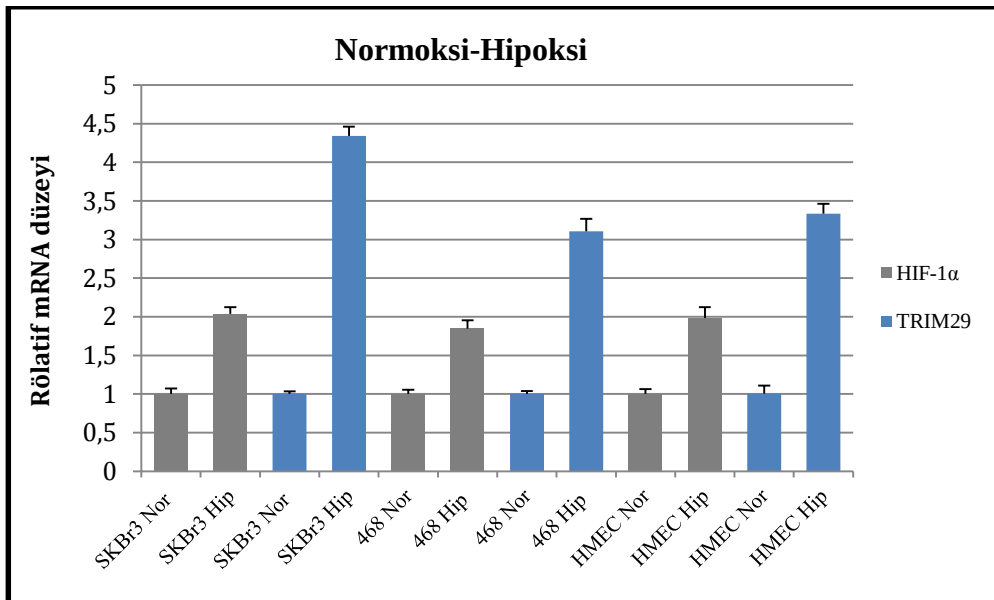
4.5.1. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksi uygulamasının TRIM29-TWIST1 üzerine etkisi

Literatürde hipoksi sırasında HIF-1 α mRNA düzeyi değişimi ile ilgili farklı bilgiler bulunmaktadır. Biz bu çalışmada SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC için HIF-1 α , TRIM29, CAIX ve TWIST1 ekspresyonu değişimlerini analiz ettik.



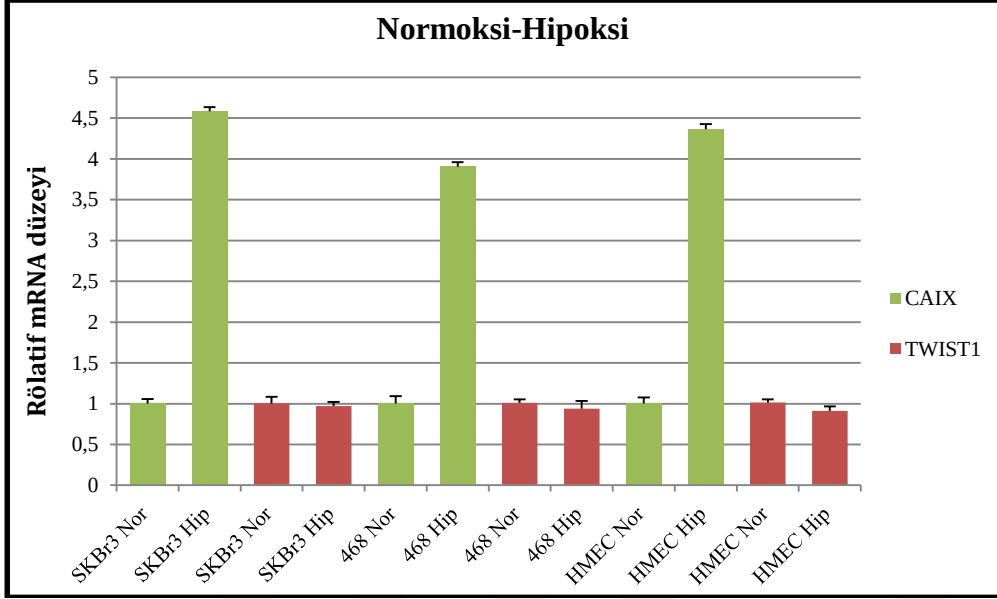
Şekil 4.44. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef genlerin mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları

HIF-1α, CAIX ve TRIM29 mRNA ekspresyonlarında hipoksi uygulaması sonrası, normoksik koşullara kıyasla artış gözlenmiştir. TWIST1 mRNA seviyesinde herhangi bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.44).



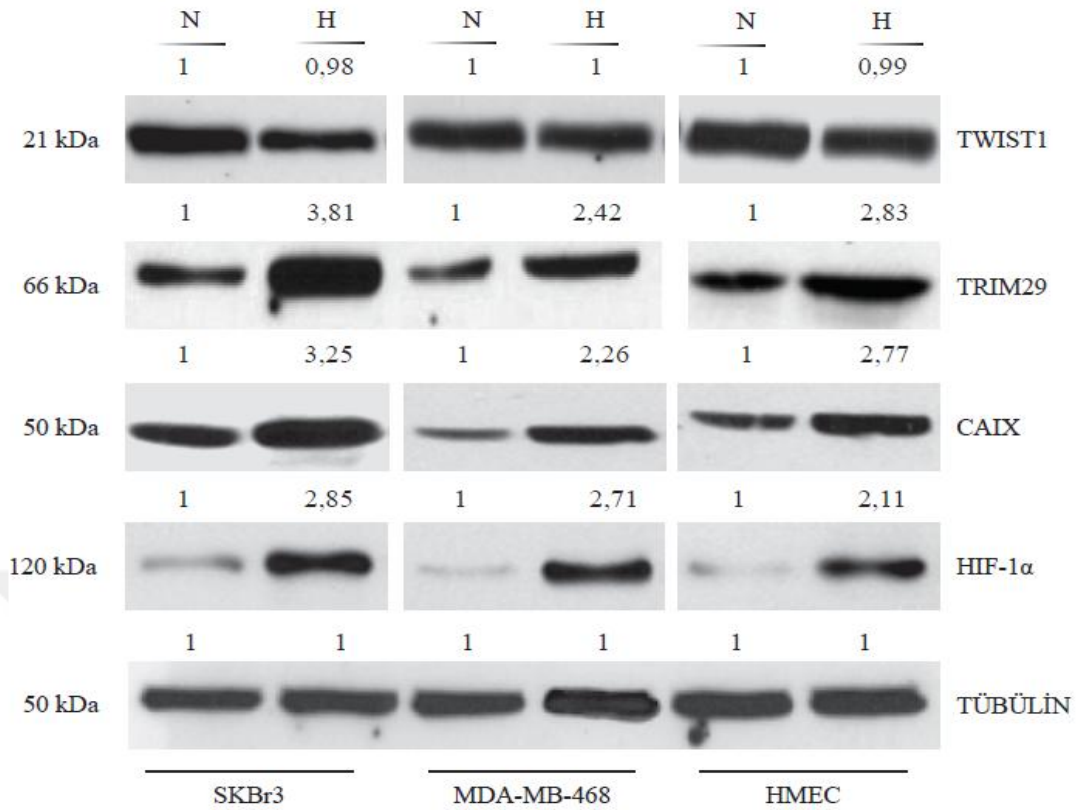
Şekil 4.45. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1α ve TRIM29 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Grafik incelendiği zaman hipoksi uygulaması sonrası SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TRIM29 mRNA ekspresyonu artmıştır. SKBr3 hücrelerinde 4 kattan fazla, MDA-MB-468 hücrelerinde 2,5 kattan fazla ve HMEC hücreleri için 3 kattan fazla TRIM29 mRNA ekspresyonu artışı gözlenmiştir. HIF-1 α mRNA ekspresyonu da SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri için yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Bu çalışmada meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde hipoksi sırasında HIF-1 α ve TRIM29 mRNA ekspresyonunun istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) seviyede arttığını belirledik (Şekil 4.45).



Şekil 4.46. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Hipoksik koşulların doğru olarak uygulandığını test etmek için, HIF-1 α 'nın yanı sıra HIF-1 α tarafından hipoksi sırasında ekspresyonu uyarılan CAIX geninin mRNA ekspresyonu da test edildi. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde hipoksik koşullarda CAIX mRNA ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonunda ise istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.46).

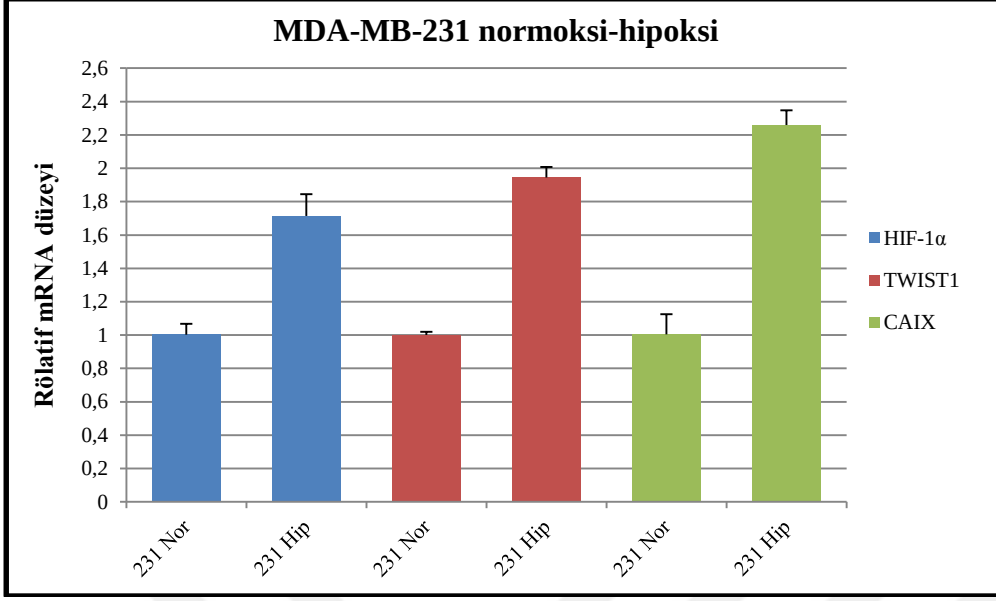


Şekil 4.47. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Kontrol olarak test edilen HIF-1 α ve CAIX protein ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. TRIM29 protein ekspresyon artışı RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR analizi sonuçları ile uyumludur. Hipoksik koşullarda TRIM29 protein ekspresyonunda SKBr3 için 3,8 kat, MDA-MB-468 için 2,4 kat ve HMEC için 2,8 kat artış belirlenmiştir. TWIST1 protein ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.47’de verilmiştir.

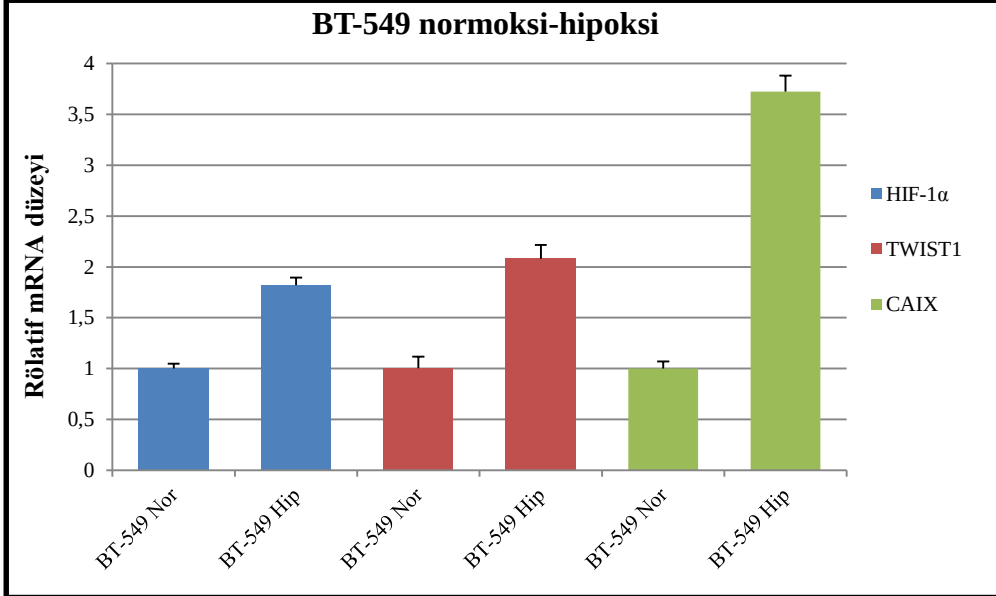
4.5.2. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde hipoksi uygulamasının TWIST1 ekspresyonu üzerine etkisi

Literatür özetinde belirtildiği gibi HIF-1 α ’nın hipoksik koşullarda TWIST1 ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir (Yang vd 2008). Ancak, TRIM29 eksprese eden hücrelerle yaptığımız çalışmada hipoksi sırasında TWIST1 ekspresyonunda herhangi bir değişim belirlenmedi. Bu sebeple TRIM29 eksprese etmeyen MDA-MB-231 ve BT-549 hücreleri hipoksiye maruz bırakılarak HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX ekspresyonu değişimi eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. Eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH, western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanılmıştır.



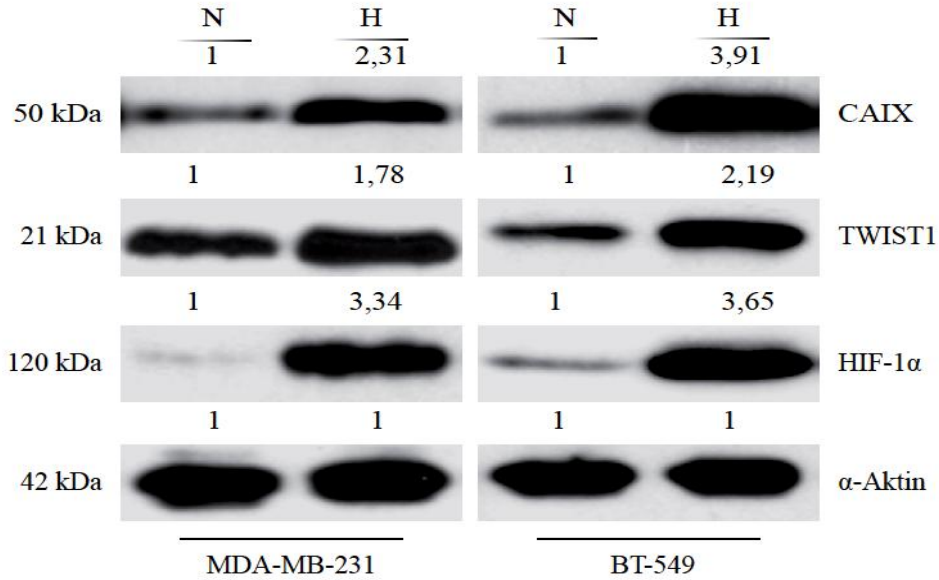
Şekil 4.48. MDA-MB-231 hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Grafik incelendiği zaman MDA-MB-231 hücreleri için hipoksi durumunda HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonlarının arttığı görülmektedir. Bütün artışlar istatistiksel açıdan ($p < 0,001$) önemlidir (Şekil 4.48).



Şekil 4.49. BT-549 hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonundaki değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Grafik incelendiği zaman BT-549 hücreleri için hipoksi durumunda HIF-1 α , TWIST1 ve CAIX mRNA ekspresyonlarının arttığı görülmektedir. Bütün artışlar istatistiksel açıdan ($p < 0,001$) önemlidir (Şekil 4.49).

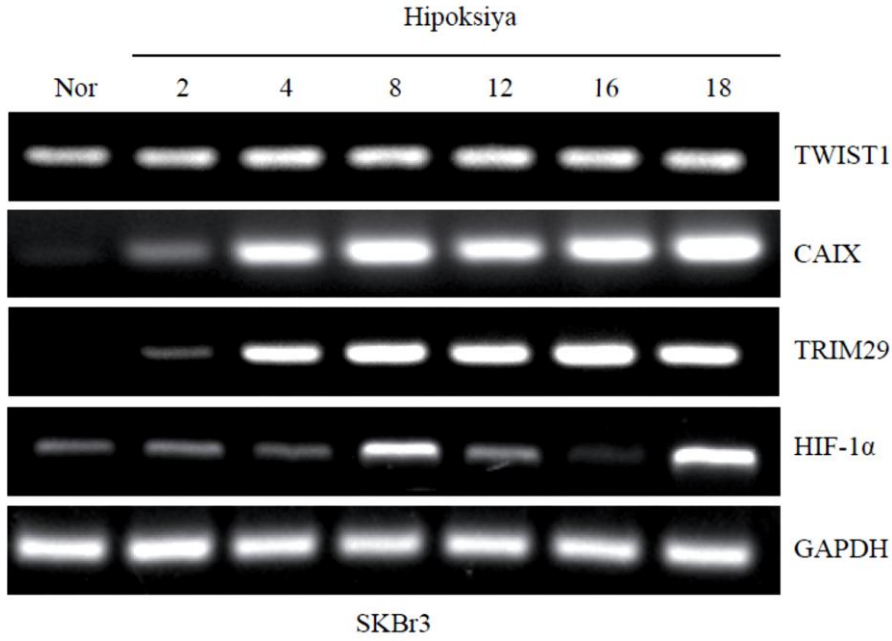


Şekil 4.50. MDA-MB-231 ve BT-549 hücre grubunda normoksi ve hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

HIF-1 α ve CAIX kontrol olarak kullanılmıştır ve hipoksi uygulanmasından sonra protein ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. TWIST1 protein ekspresyonu, TRIM29 eksprese eden hücrelerin aksine artış göstermiştir (Bkz. Şekil 4.47). Hipoksik koşullarda TWIST1 protein ekspresyonunda artışları eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.50’de verilmiştir.

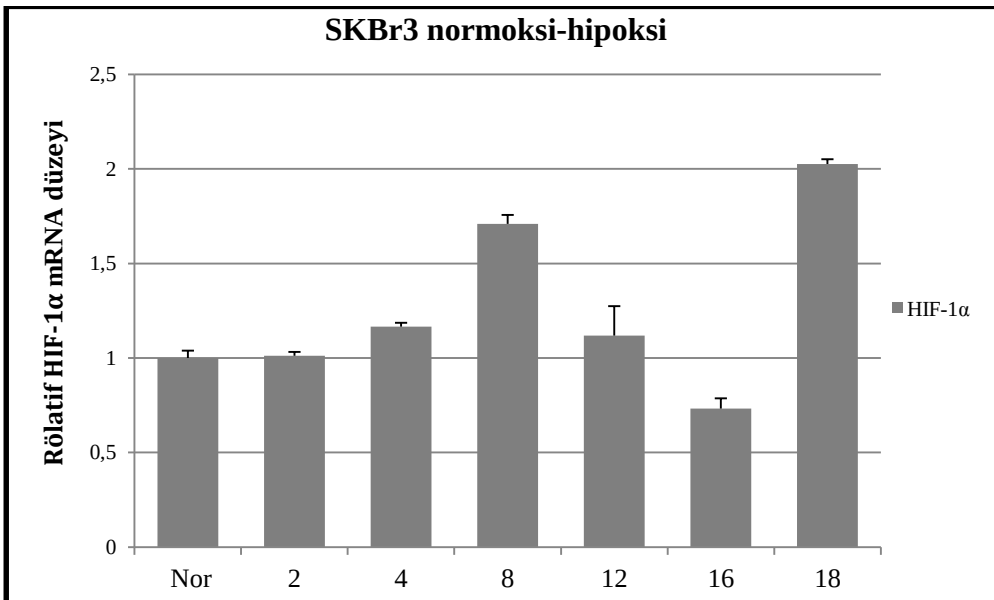
4.5.3. Hipoksi süresinin TRIM29 ve TWIST1 ekspresyonuna etkisi

SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde hipoksi uygulamasının TRIM29 ekspresyonunu artırdığını, TWIST1’in ise değişmediğini belirledikten sonra uygulanan hipoksi süresinin etkisini araştırdık. Bunun için SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri %1 O₂, 37°C’de 2, 4, 8, 12, 16, 18 ve 24 saat boyunca inkübe edildi. RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR ile HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimleri analiz edildi. Western blot testi ile HIF-1 α ve TRIM29 protein ekspresyonları değişimi analiz edildi. CAIX RT-PCR analizinde hipoksik gen ekspresyon kontrolü için kullanıldı. GAPDH RT-PCR için, Aktin eş zamanlı qRT-PCR için ve α -Aktin ise western blot için kontrol olarak kullanıldı.

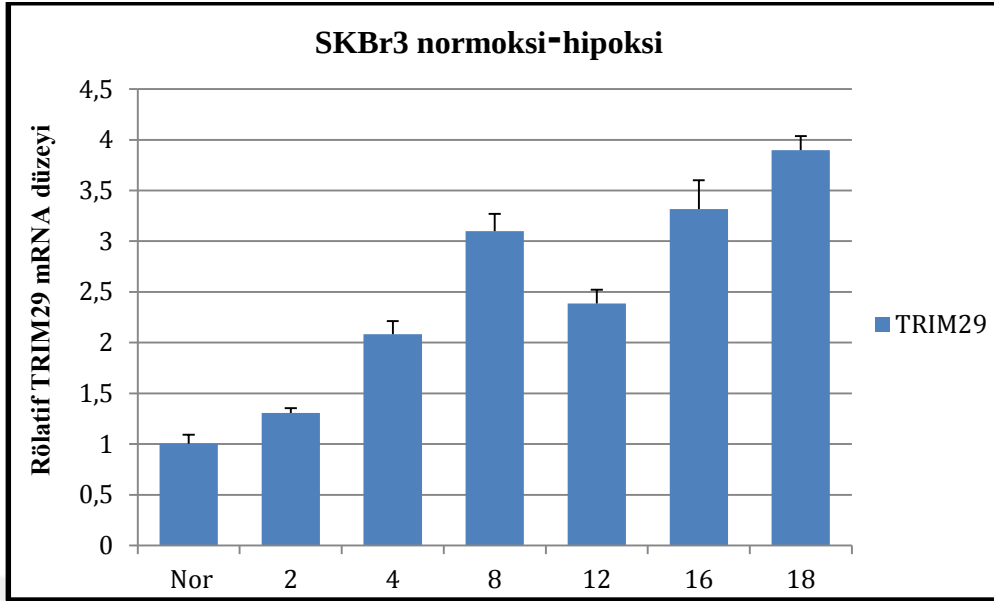


Şekil 4.51. SKBr3 hücre grubunda farklı sürelerde hipoksi uygulamasını takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

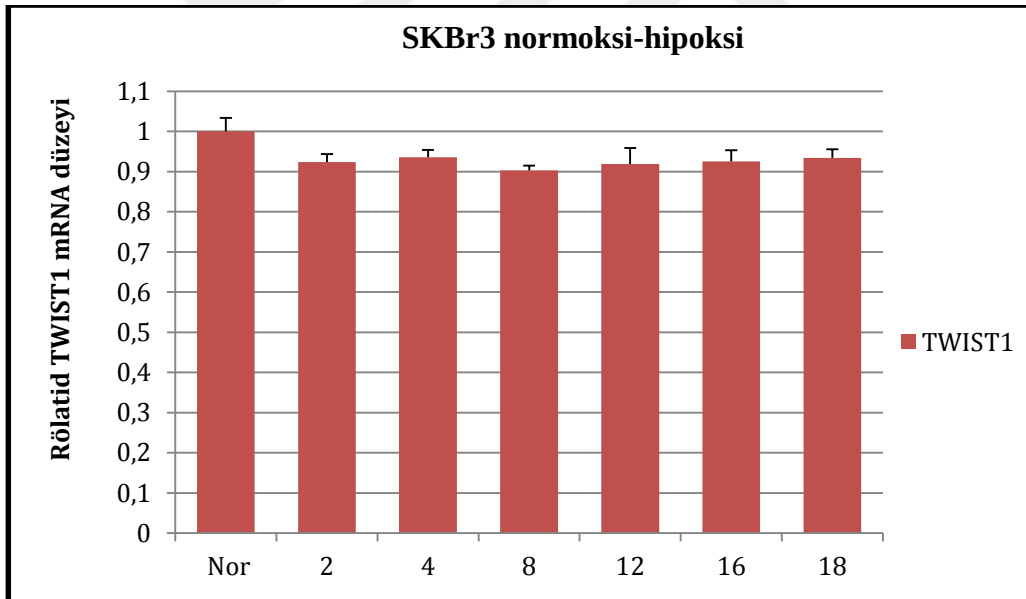
Şekil 4.51 incelendiği zaman TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonları normoksik koşullara kıyasla kademeli olarak arttığı görülmektedir. HIF-1α mRNA ekspresyonu ise 8. ve 18. saatlerde en yüksek olduğu görülmektedir. 16. saatte HIF-1α mRNA ekspresyonunda küçük bir azalma belirlenmiştir. TWIST1 mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla değişmemiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.52. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1α mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



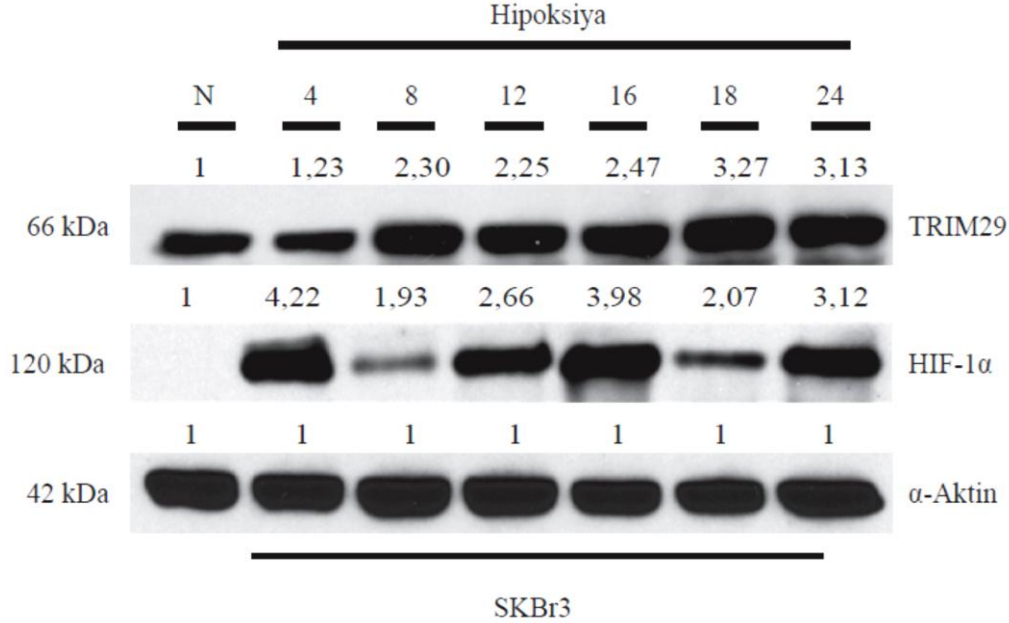
Şekil 4.53. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



Şekil 4.54. SKBr3 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

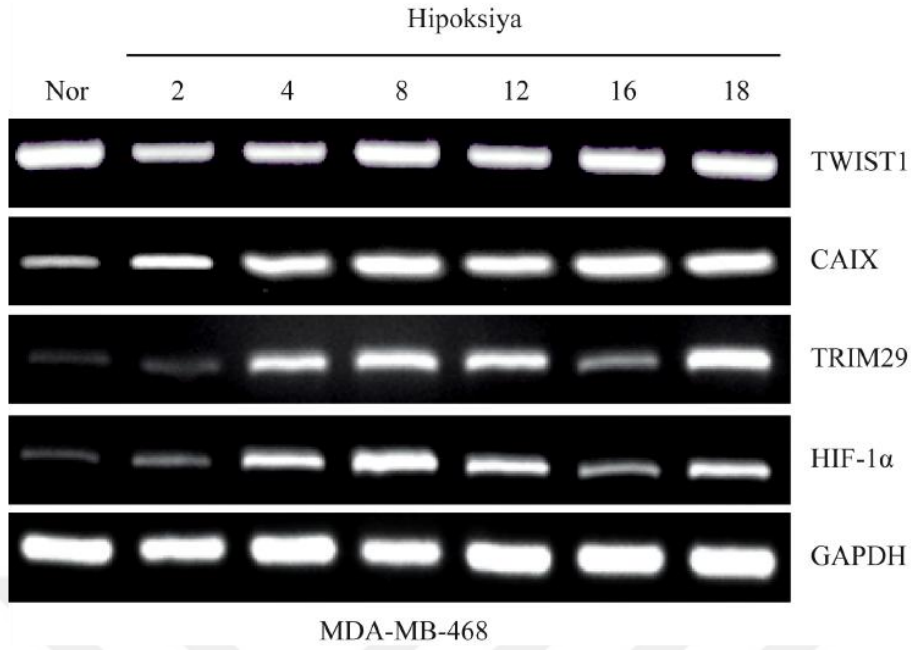
CAIX geni kontrol olarak kullanıldığı ve RT-PCR sonuçlarında ekspresyon artışı açıkça görüldüğü için, bu gen için ayrıca eş zamanlı qRT-PCR analizi yapılmamıştır. SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1'e mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları RT-PCR sonuçları ile uyumludur. HIF-1 α mRNA ekspresyonu 4, 8, 12 ve 18 saatlik hipoksi uygulamasında artmış, 16 saatlik hipoksi uygulamasında azalmıştır (Şekil 4.52).

TRIM29 mRNA ekspresyonu hipoksi uygulamasının her aşamasında artış göstermiştir. 4, 8, 12, 16 ve 18 saatlik hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu artışı istatistiksel açıdan ($p < 0,001$), 2 saatlik hipoksi uygulaması sırasında gerçekleşen TRIM29 mRNA ekspresyonu artışı da istatistiksel açıdan ($p < 0,05$) önemlidir (Şekil 4.53). TWIST1 mRNA ekspresyonundaki hipoksi uygulaması sonrası meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemli değildir ($p > 0,05$) (Şekil 4.54).



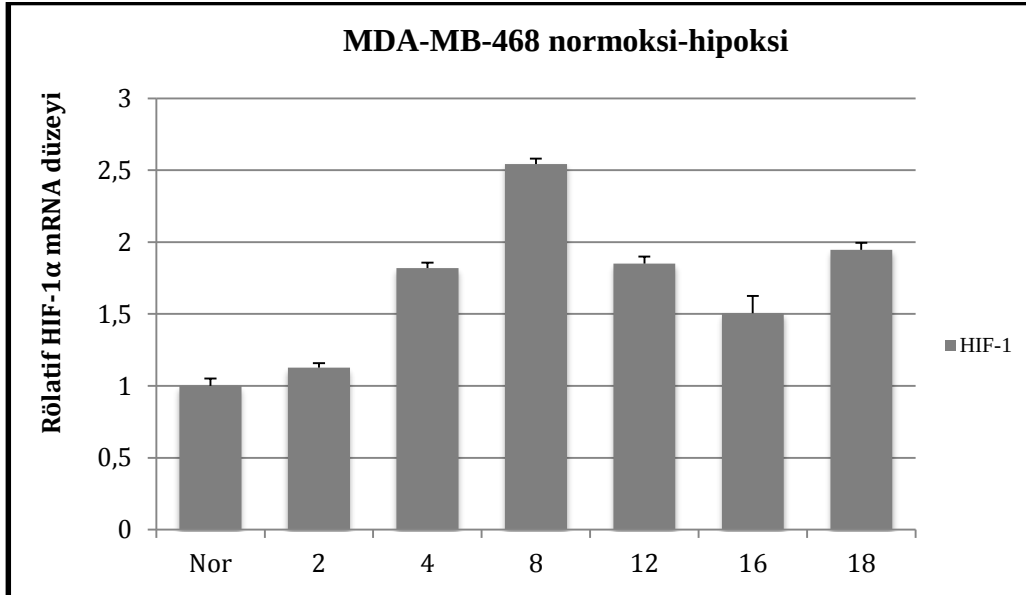
Şekil 4.55. SKBr3 hücre grubunda normoksi ve farklı sürelerde uygulanan hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

TWIST1 mRNA seviyesi SKBr3 hücrelerinde hipoksi sırasında değişmediği için farklı süreli hipoksi testi için ayrıca TWIST1 western blot analizi yapılmadı. Şekil 4.55 incelendiği zaman uygulanan hipoksi süresi artıkça TRIM29 protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. HIF-1α protein ekspresyonu normoksik koşullara kıyasla bütün hipoksik koşullarda değişik seviyelerde artış göstermiştir. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.55'te verilmiştir.

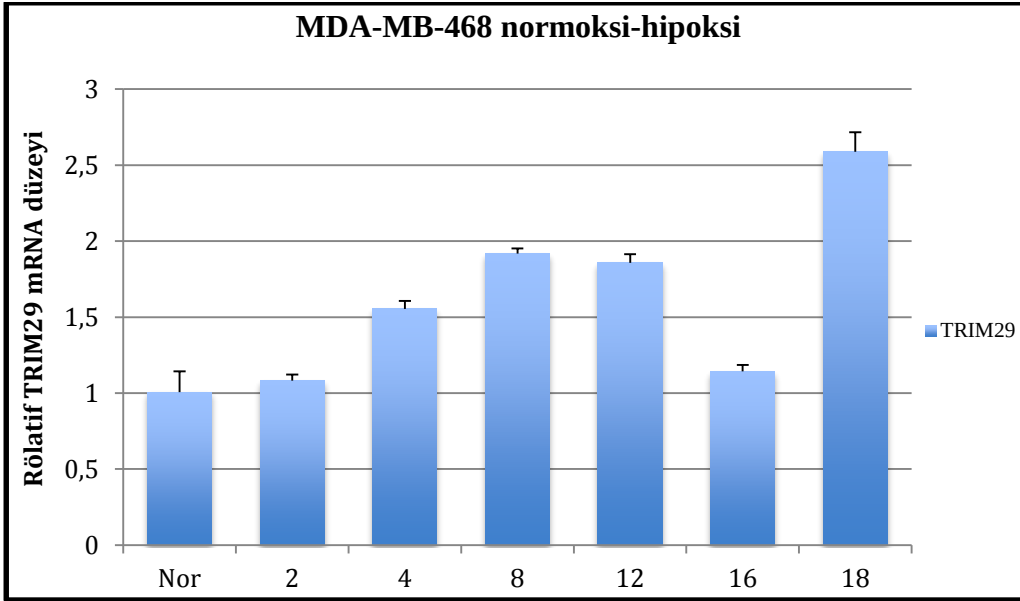


Şekil 4.56. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı sürelerde hipoksi uygulamasını takiben hedef genlerdeki mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

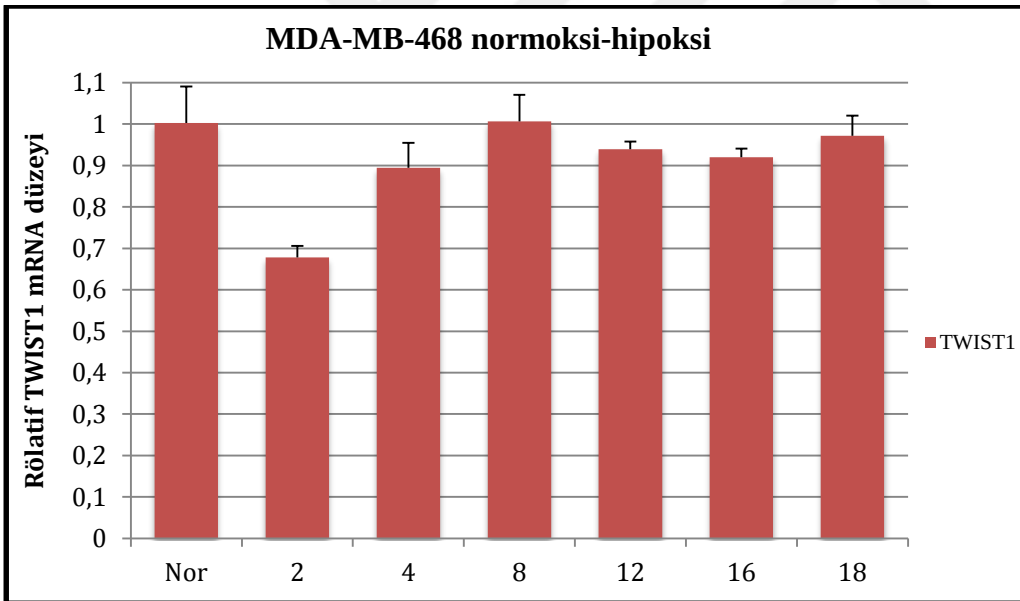
MDA-MB-468 hücrelerinde farklı sürelerde uygulanan hipoksi CAIX ve TRIM29 mRNA ekspresyonunu 2. saatten sonra arttırmıştır. TWIST1 ise 2. saatte düşmüş, 8. saatte tekrar normal seviyesine yükseldiği tespit edilmiştir. HIF-1α mRNA ekspresyonu ise sürekli olarak, farklı oranlarda artmıştır (Şekil 4.56).



Şekil 4.57. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1α mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



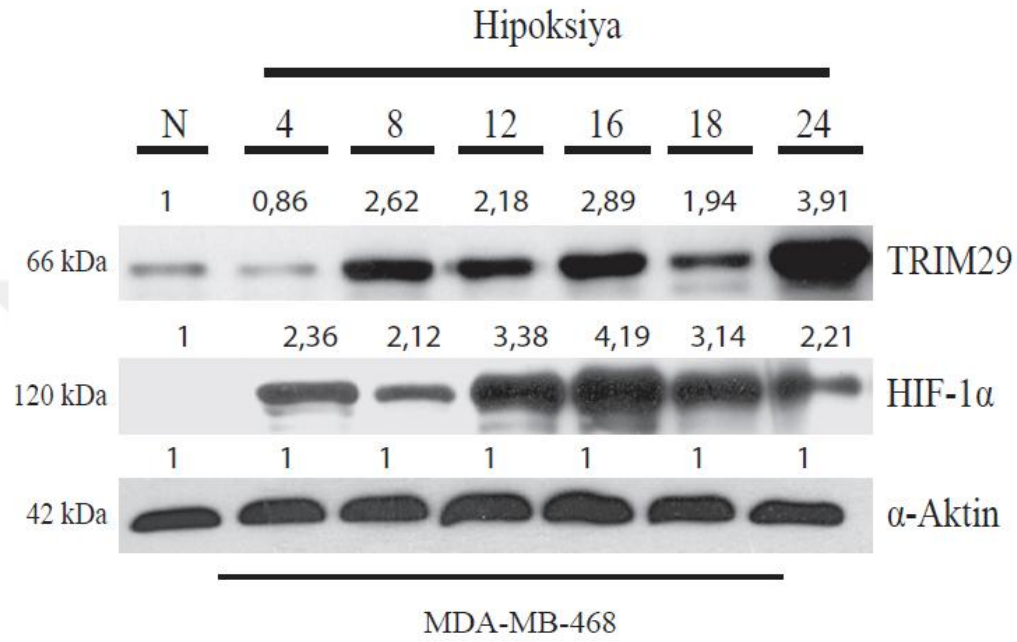
Şekil 4.58. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



Şekil 4.59. MDA-MB-468 hücre grubunda farklı süreli hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

CAIX geni kontrol olarak kullanıldığı ve RT-PCR sonuçlarında ekspresyon artışı açıkça görüldüğü için, bu gen için ayrıca eş zamanlı qRT-PCR analizi yapılmamıştır. MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α , TRIM29 ve TWIST1'e değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları RT-PCR sonuçları ile uyumludur. HIF-1 α mRNA ekspresyonu hipoksi uygulaması sırasında bütün zaman aralıklarında artış göstermiştir (Şekil 4.57). TRIM29 mRNA ekspresyonu

hipoksi uygulamasının her aşamasında artış göstermiştir. Sadece 2 saatlik hipoksi uygulamasındaki TRIM29 mRNA ekspresyon artışı istatistiksel açıdan önemli değildir ($p > 0,05$). 4, 8, 12, 16 ve 18 saatlik hipoksi uygulaması boyunca gözlemlenen TRIM29 mRNA ekspresyonu artışı istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.58). TWIST1 mRNA ekspresyonundaki değişimlerden 2 saatlik hipoksi uygulaması sonrası meydana gelen değişim istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) diğer değişimler istatistiksel açıdan önemli değildir ($p > 0,05$) (Şekil 4.59).



Şekil 4.60. MDA-MB-468 hücre grubunda normoksi ve farklı sürelerde uygulanan hipoksi sırasında hedef protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

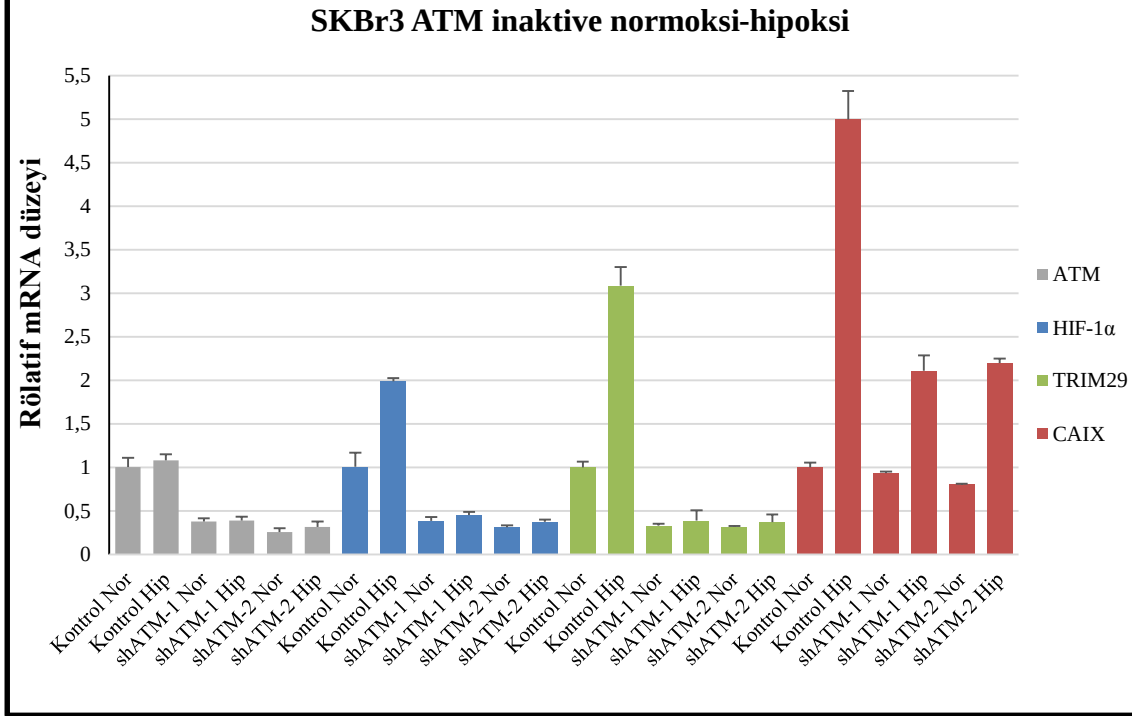
TWIST1 mRNA seviyesi SKBr3 hücrelerinde hipoksi sırasında yüksek oranda değişmediği için farklı süreli hipoksi testi için ayrıca TWIST1 western blot analizi yapılmadı. Şekil 4.60 incelendiği zaman uygulanan 4 saat dışındaki hipoksi uygulamaları süresi arttıkça TRIM29 protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. En yüksek artış 24 saatlik hipoksi uygulaması sonrası elde edilmiştir. HIF-1α protein ekspresyonu normoksik koşullara kıyasla bütün hipoksik koşullarda artış göstermiştir. En büyük protein ekspresyonu artışı 16. saatte elde edilmiştir. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.60'ta verilmiştir.

4.6. Hipoksik HIF-1α ve TRIM29 Ekspresyonunun Kontrolü

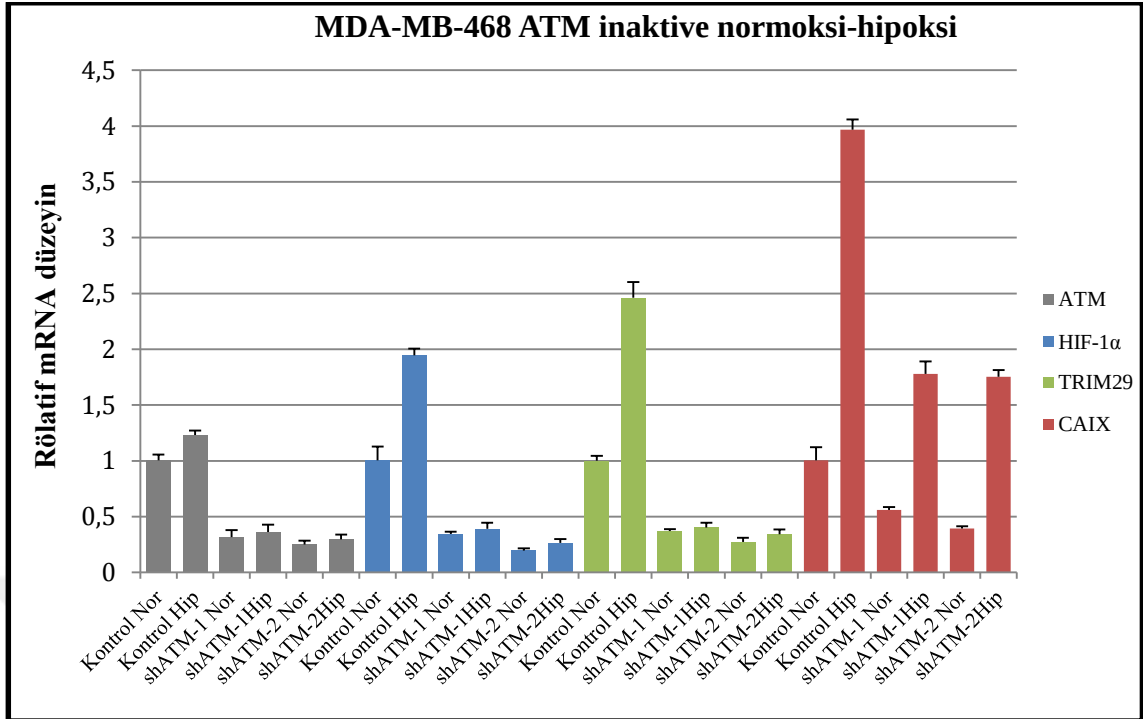
4.6.1. ATM inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1α ve TRIM29 değişimi

Hipoksik koşullar altında TRIM29 ekspresyonunun arttığını belirledikten sonra bu kontrolün hipoksi boyunca ATM ya da HIF-1α'dan hangisi aracılığı ile yapıldığını araştırdık. Bunun için ATM ve HIF-1α inaktivasyonu sağladığımız SKBr3 ve MDA-

MB-469 hücreleri %1 O₂'de, 37°C'de 18 saat boyunca hipoksik tankta kültüre edildi. ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimi eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi. ATM inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α ve TRIM29 protein ekspresyonu değişimini görmek için western blot analizi yapıldı. Ayrıca HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücelere hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonu değişimi eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. Eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanıldı.

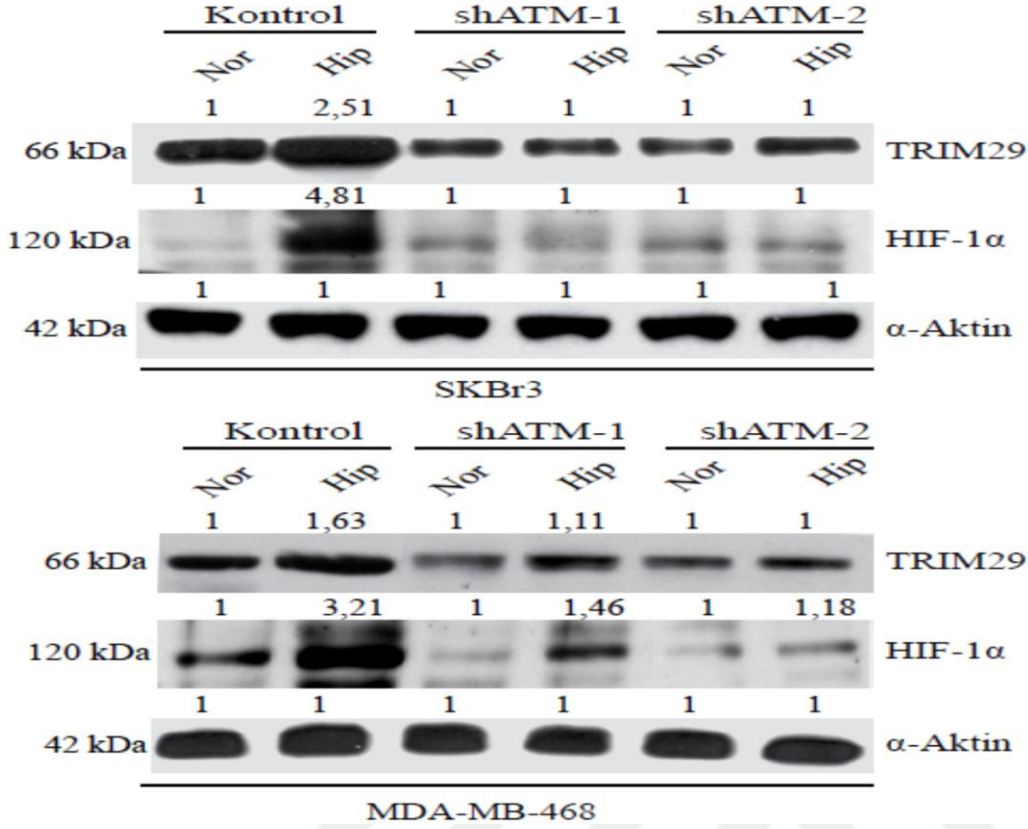


Şekil 4.61. SKBr3 ATM inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla ATM, HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



Şekil 4.62. MDA-MB-468 ATM inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla ATM, HIF-1α, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Bu deney sırasında çalışmanın başlangıç aşamalarında elde edilmiş ATM inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücreleri kullanılmıştır. İki hücre grubu içinde kontrol gruplarına kıyasla, shATM-1 ve shATM-2 gruplarında düşük miktarda ATM, HIF-1α ve TRIM29 ekspresyonuna sahip oldukları tekrar belirlenmiştir. Ayrıca ATM inaktivasyonu sonrası CAIX ekspresyonunun da normal koşullardaki shATM-1 ve shATM-2 için azaldığı görülmüştür. Kontrol gruplarında normoksi ve hipoksi koşullarındaki HIF-1α, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimleri, çalışma sırasında normoksi-hipoksi koşulları için elde edilen sonuçlar ile uyumludur. HIF-1α, TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu hipoksik koşullarda kontrol grubuna kıyasla hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 hücreleri için artmıştır. Her iki hücre grubu içinde shATM-1 ve shATM-2 sonuçları incelendiği zaman ATM inaktivasyonunun hipoksinin hem HIF-1α hem de TRIM29 mRNA ekspresyonu artışını engellediği görülmektedir. shATM-1 ve shATM-2 gruplarının normoksi ve hipoksi grupları için HIF-1α ve TRIM29 ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli bir değişim görülmemektedir ($p > 0,05$). shATM-1 ve shATM-2 için CAIX hipoksik koşulları incelendiği zaman ise, CAIX için hipoksik koşullarda hem shATM-1 hem de shATM-2 grubu için istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) ekspresyon artışı olduğu görülmüştür (Şekil 4.61 ve 4.62).

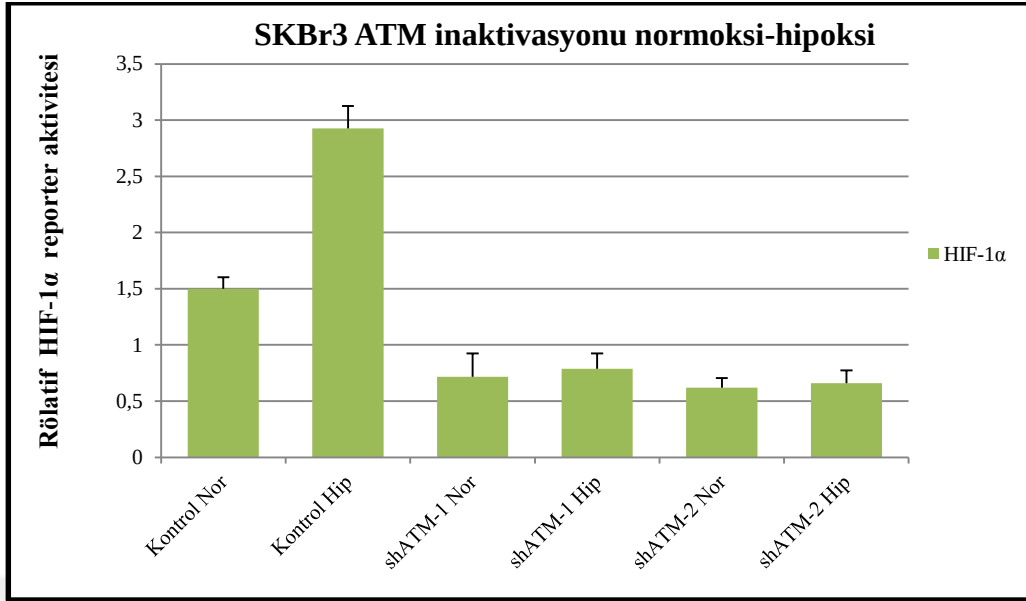


Şekil 4.63. SKBr3 ve MDA-MB-468 ATM inaktif hücrelerde Hipoksi sonrası HIF-1α ve TRIM29 protein miktarlarındaki ekspresyon değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

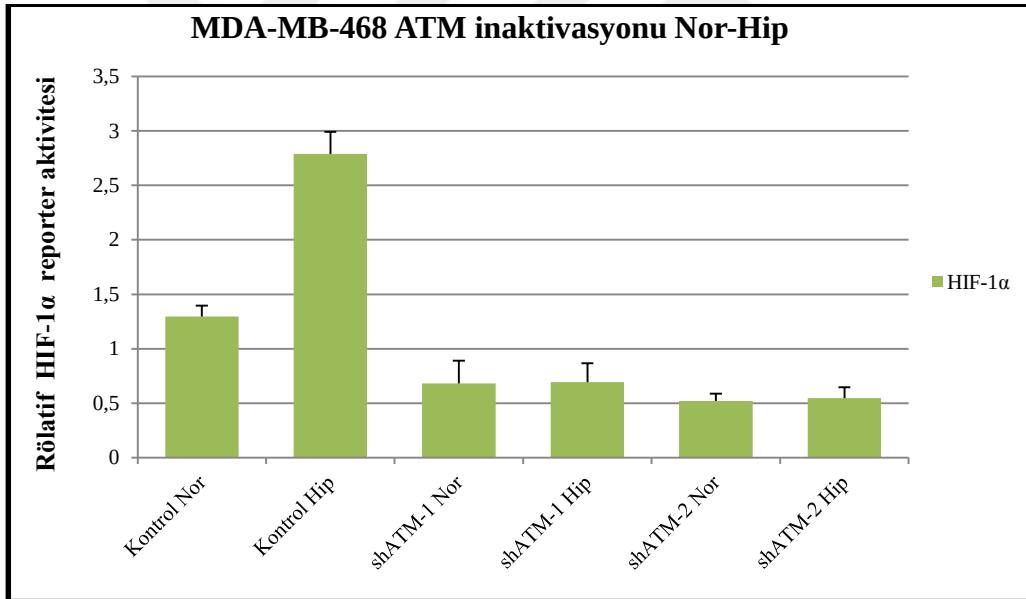
Western blot sonuçları incelendiği zaman her iki hücre grubu içinde kontrol gruplarında normoksi durumuna kıyasla hem TRIM29 hem de HIF-1α protein ekspresyonunda artış görülmektedir. ATM inaktivasyonu sağlanmış shATM-1 ve shATM-2 grupları için TRIM29 ifadesi normoksi durumuna kıyasla hipoksi uygulaması sonrası değişmemiştir. MDA-MB-468 shATM-1 HIF-1α blotu hariç diğer HIF-1α blotlarında normoksiye kıyasla hipoksi uygulaması sonrası HIF-1α protein ekspresyonu değişmemiştir (Şekil 4.63).

4.6.2. ATM inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1α reporter aktivitesi

HIF-1α mRNA ve protein ekspresyonunun ATM inaktif hücrelerde hipoksik koşullarda değişmediği ortaya koyduktan sonra SKBr3 ve MDA-MB-468 ATM inaktif hücrelerdeki HIF-1α reporter aktivitesini tayin etmek için reporter assay yapıldı. Bunun için ATM inaktif hücreler HIF-1α reporter plazmidi ile transfeke edildi ve hücreler %1 O₂'de, 37°C'de 18 saat boyunca hipoksik tankta kültüre edildi.



Şekil 4.64. SKBr3 ATM inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α reporter aktivitesi değişimi



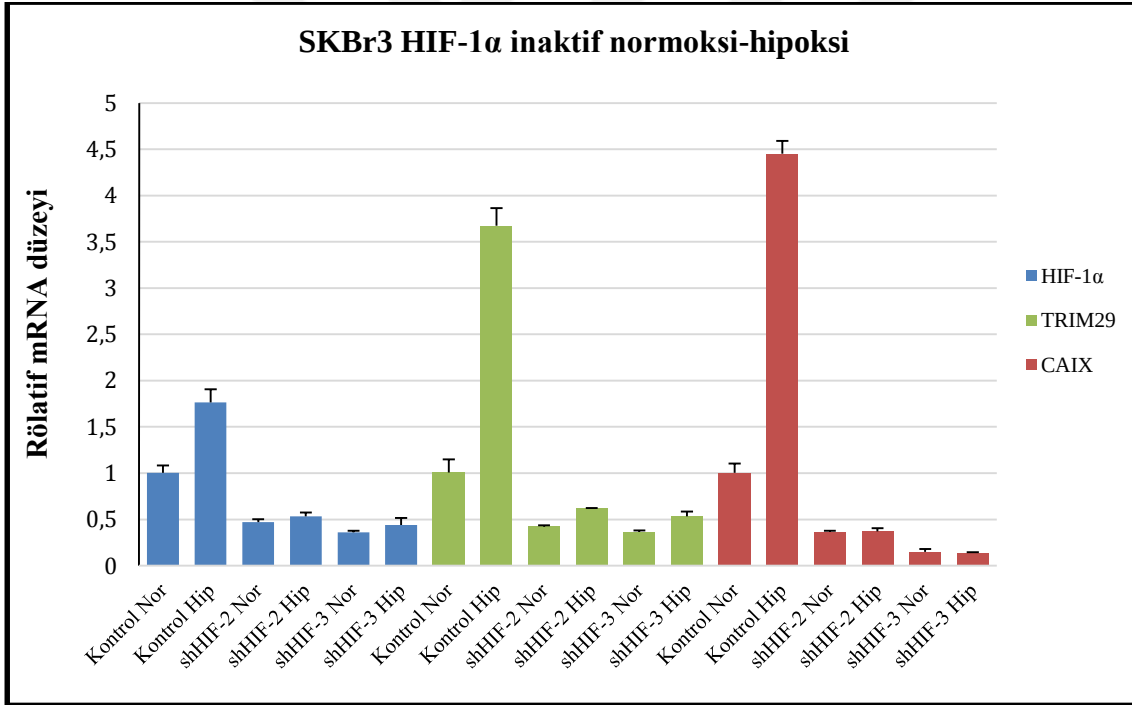
Şekil 4.65. MDA-MB-468 ATM inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α reporter aktivitesi değişimi

Grafikler incelendiği zaman hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 hücreleri için shATM-1 ve shATM-2 gruplarında HIF-1 α reporter aktivitesinin düştüğü görülmektedir. Kontrol gruplarında hipoksi uygulaması sonrası her iki hücre grubunda da normoksiye kıyasla HIF-1 α reporter aktivitesi artış göstermiştir. Bu artış SKBr3 hücreleri için 1,9 kat, MDA-MB-468 hücreleri için 2,2 kat olarak gerçekleşmiştir. shATM gruplarında ise normoksi durumunda HIF-1 α reporter aktivitesi azalmıştır. Bu azalma SKBr3 için ortalama 2,3 kat, MDA-MB-468 hücreleri içinse 2,2 olarak gerçekleşmiştir. Kontrol gruplarında hipoksik ve normoksik koşullarda HIF-1 α reporter

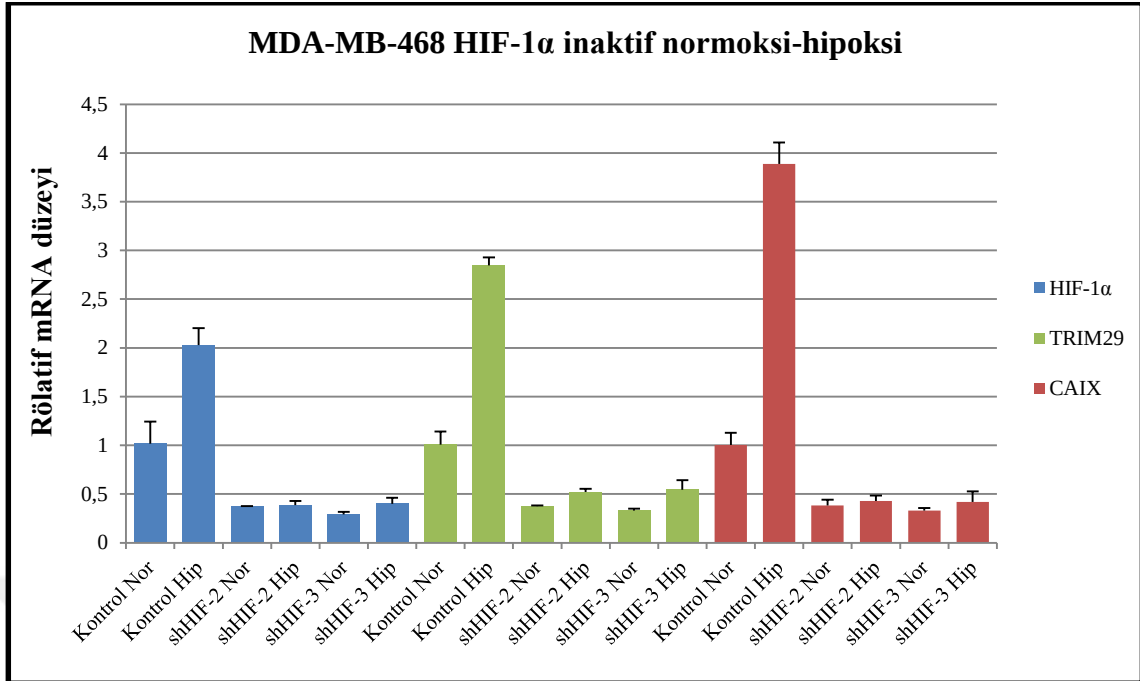
aktivitesinde meydana gelen değişim istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$). Normoksik shATM-1 ve shATM-2 için HIF-1 α reporter aktivitesinde meydana gelen düşüş istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$). Her iki hücre grubunda da shATM hipoksi gruplarında, normoksiye kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.64 ve 4.65).

4.6.3. HIF-1 α inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda TRIM29 değişimi

HIF-1 α inaktivasyonunun TRIM29 ekspresyonunu azalttığını ve hipoksik koşullarda artmış HIF-1 α ekspresyonunun TRIM29 ekspresyonunu arttırdığını belirledikten sonra, HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde hipoksik koşullar altında TRIM29 ekspresyonu değişimini araştırdık. SKBr3 ve MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücreler %1 O₂'de, 37°C'de 18 saat boyunca hipoksik tankta kültüre edildi. HIF-1 α , TRIM29 ve kontrol olarak CAIX mRNA ekspresyonu değişimleri eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi. TRIM29 protein ekspresyonu değişimi western blot ile analiz edildi. Eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH, western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanıldı.

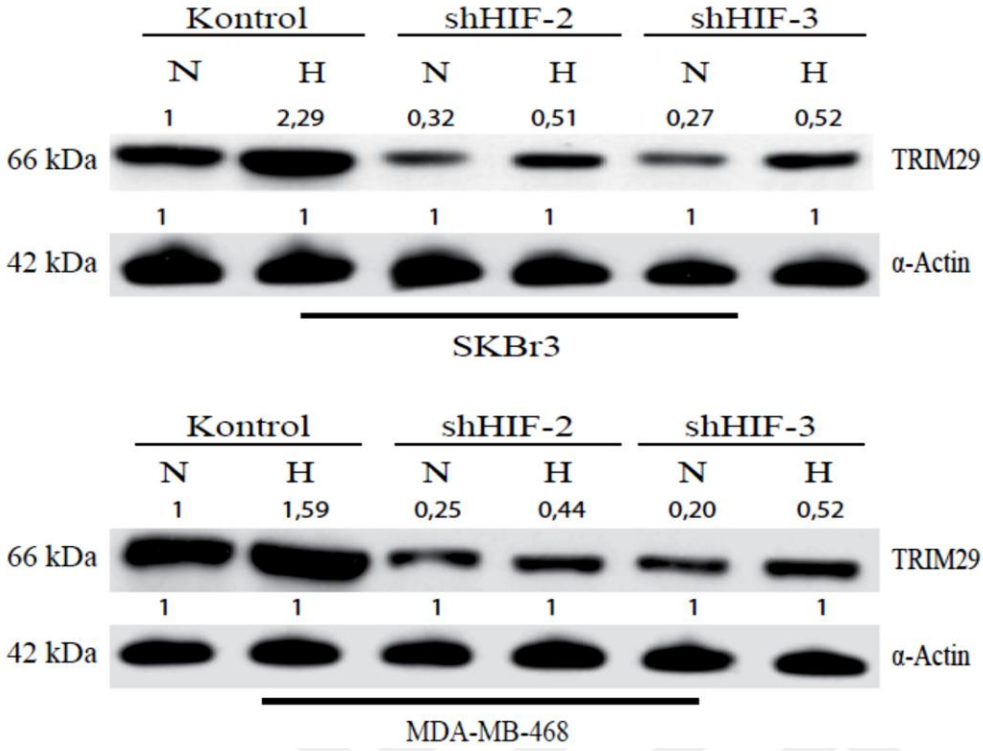


Şekil 4.66. SKBr3 HIF-1 α inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



Şekil 4.67. MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonu değişimini gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 hücreleri için normal koşullarda HIF-1 α inaktivasyonunu takiben HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonları azaldığı tekrar belirlenmiştir. Kontrol gruplarında normoksiye kıyasla, hipoksik koşullarda HIF-1 α , TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonları artmıştır. SKBr3 shHIF-2 ve shHIF-3 hipoksi uygulanmış gruplarda normoksiye kıyasla istatistiksel açıdan önemli ölçüde TRIM29 mRNA ekspresyonu artışı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). SKBr3 shHIF-2 ve shHIF-3 hipoksi uygulanmış gruplarda istatistiksel açıdan önemli olmayacak kadar HIF-1 α mRNA ekspresyonu artışı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Aynı gruplarda CAIX mRNA ekspresyonunda istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$). MDA-MB-468 shHIF-2 ve shHIF-3 hipoksi uygulanmış gruplarda normoksiye kıyasla istatistiksel açıdan önemli ölçüde TRIM29 mRNA ekspresyon artışı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). MDA-MB-468 shHIF-2 ve shHIF-3 hipoksi uygulanmış gruplarda istatistiksel açıdan önemli olmayacak kadar HIF-1 α mRNA ekspresyonu artışı belirlenmiştir ($p > 0,05$). MDA-MB-468 shHIF-2 ve shHIF-3 hipoksi uygulanmış gruplarda istatistiksel açıdan önemli olmayacak kadar CAIX mRNA ekspresyonu artışı belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.66 ve 4.67).

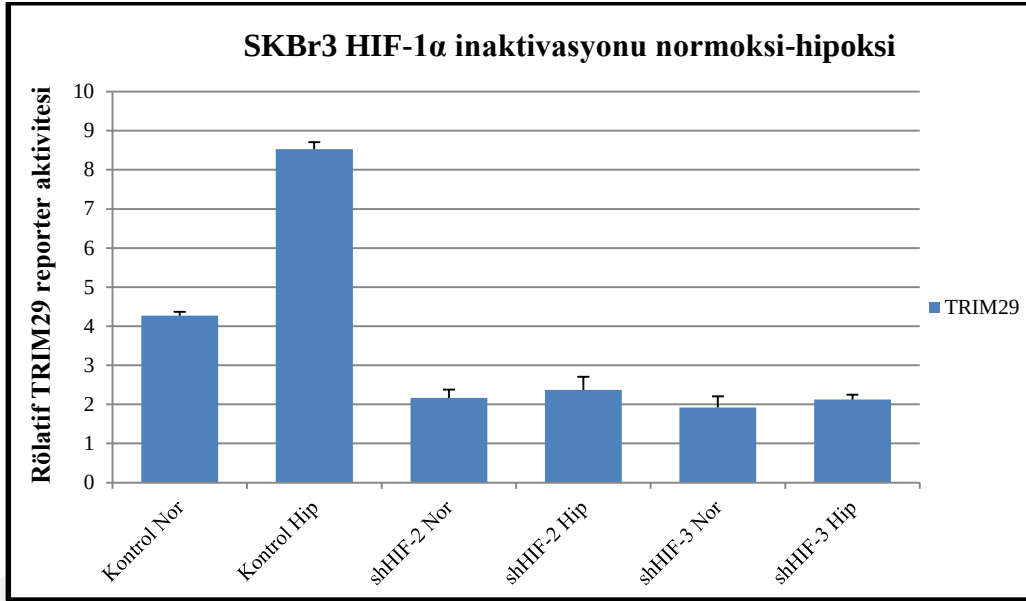


Şekil 4.68. SKBr3 ve MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

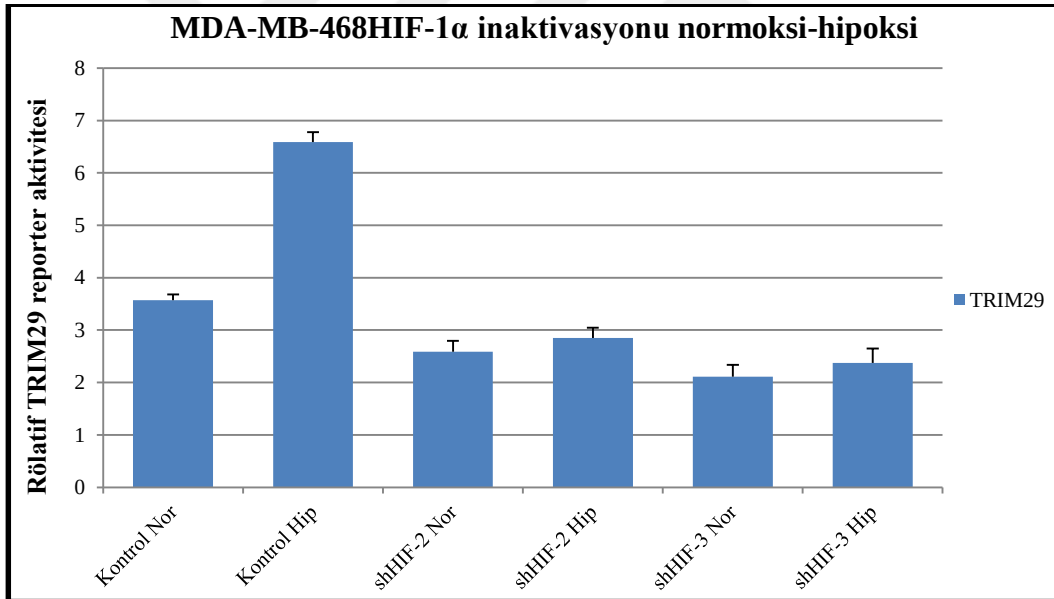
SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 protein ekspresyonu kontrol grubu hipoksik uygulaması sonrası, normoksik duruma kıyasla artmıştır. Hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 shHIF-2 ve shHIF-3 gruplarında hipoksik uygulama sonrası, normoksiye kıyasla küçük miktarda TRIM29 protein ekspresyonu artışı gözlenmiştir. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.68’de verilmiştir.

4.6.4. HIF-1 α inaktif SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik koşullarda TRIM29 reporter aktivitesi

HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 reporter plazmidi aracılığı ile bu genin reporter aktivitesi tayin edildi. Hipoksi için “Hip”, normoksi için ise “Nor” kısaltmaları kullanılmıştır.



Şekil 4.69. SKBr3 HIF-1 α inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla TRIM29 reporter aktivitesi değişimi



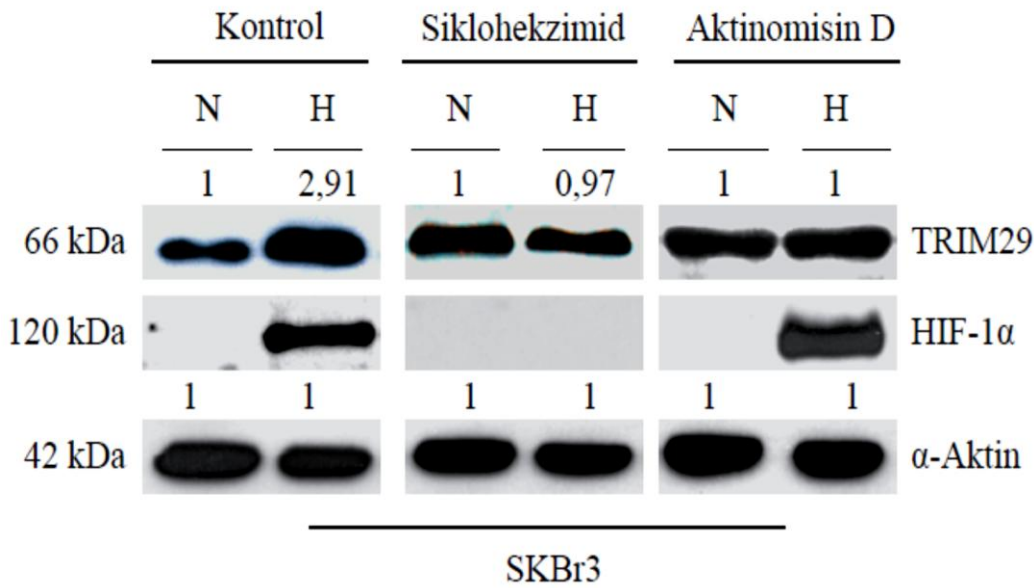
Şekil 4.70. MDA-MB-468 HIF-1 α inaktif hücrelerde hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla TRIM29 reporter aktivitesi değişimi

TRIM29 reporter aktivitesi için yapılan deney göstermiştir ki hipoksik koşullarda TRIM29 reporter aktivitesi normoksik koşullara göre artmıştır. Bu artış SKBr3 hücreleri için 2 kattan fazla olmuştur, MDA-MB-468 hücreleri için ise bu artış 1,8 kat olarak gerçekleşmiştir. Her iki hücre grubu için shHIF gruplarında normoksi durumunda TRIM29 reporter aktivitesi azalmıştır. Bu azalış SKBr3 hücreleri için yaklaşık %60, MDA-MB-468 hücreleri için %50 olarak gerçekleşmiştir. Meydana gelen bu değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) Hipoksiye maruz bırakılan shHIF

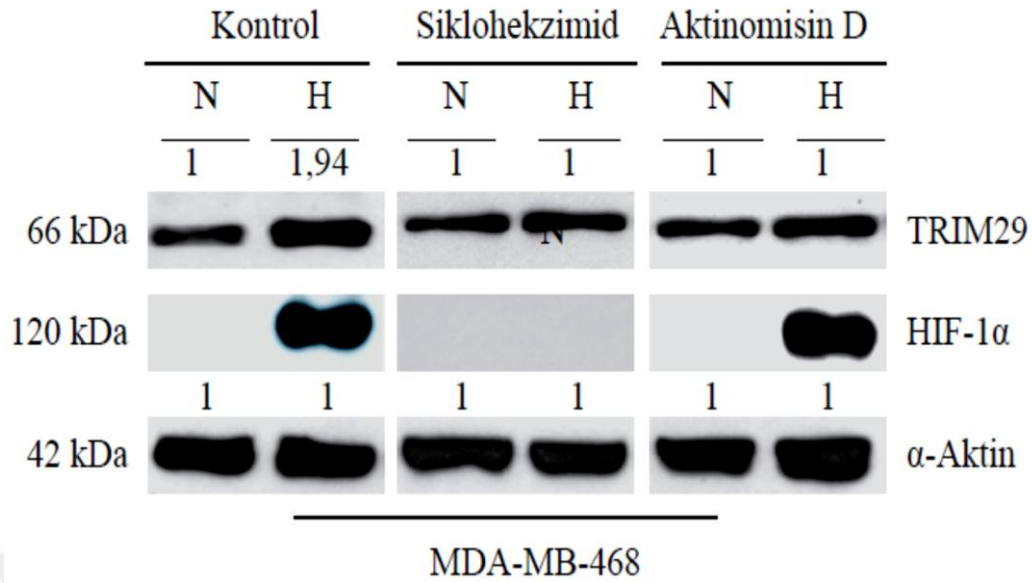
gruplarının TRIM29 reporter aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.69 ve 4.70).

4.7. Hipoksik TRIM29 Ekspresyon Artışının Transkripsiyonel ve Translasyonel Testi

Hipoksik TRIM29 ekspresyonunun transkripsiyonel mi yoksa translasyonel olarak mı kontrolünün gerçekleştiğini anlamak için SKBr3 ve MDA-MB-468 hücreleri Aktinomisin D ve Sikloheksimid uygulaması yapıp daha sonra %1 O₂, 37°C’de 18 saat boyunca hipoksi tankında inkübe edilmiştir. Daha sonra western blot analizi ile HIF-1 α ve TRIM protein ekspresyonu değişimleri analiz edildi.



Şekil 4.71. SKBr3 hücrelerinde Sikloheksimid ve Aktinomisin D uygulaması sonrası uygulanan hipoksinin, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 ve HIF-1 α protein ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi



Şekil 4.72. MDA-MB-468 hücrelerinde Sikloheksimid ve Aktinomisin D uygulaması sonrası uygulanan hipoksinin, normoksi durumuna kıyasla TRIM29 ve HIF-1α protein ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

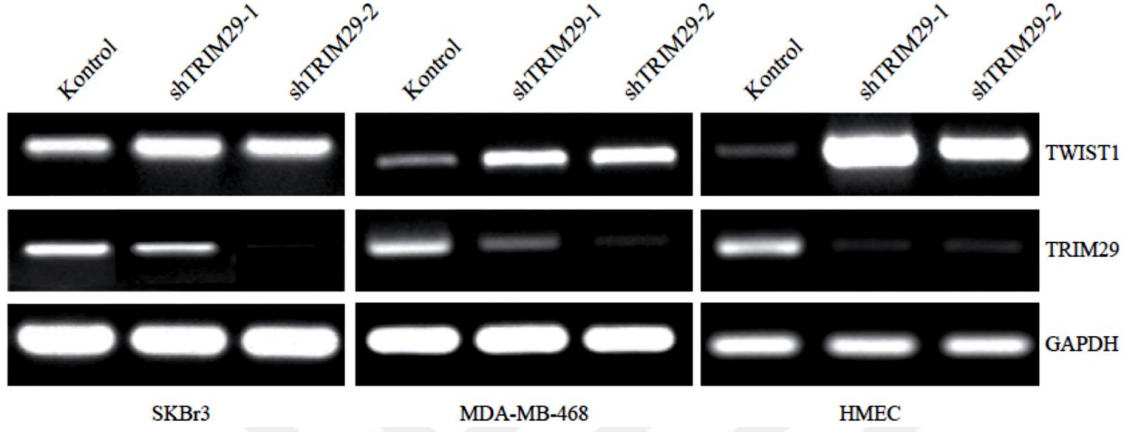
Sikloheksimid bir protein sentezi inhibitörüdür ve Aktinomisin D ise mRNA sentezi inhibitörü olarak deneysel çalışmalarda kullanılır. Şekil 4.71 ve 72 incelendiği zaman Sikloheksimid uygulaması sonrası, hipoksik koşullarda kültüre edilmiş SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde herhangi bir HIF-1α protein ekspresyonu belirlenmemiştir. Aktinomisin D uygulaması ise HIF-1α protein ekspresyonuna her iki hücre grubu içinde herhangi bir etki yapmamıştır. Hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla TRIM29 protein ekspresyonu artışı tekrar belirlenmiştir. Ancak hem Sikloheksimid hem de Aktinomisin D uygulanmış ve hipoksiye maruz bırakılmış SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 protein ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.71 ve 4.72’de verilmiştir.

4.8. TRIM29 ve TWIST1 Bağlantısı

4.8.1. TRIM29 inaktivasyonunun TWIST1 üzerine etkisi

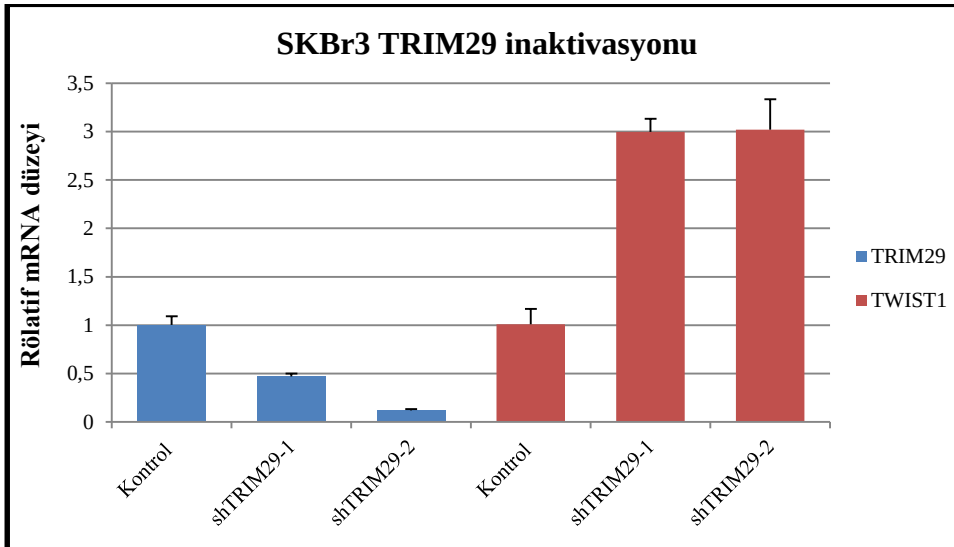
ATM ve HIF-1α inaktivasyonu sonucu, TRIM29 ekspresyonunun azalması bunu takiben TWIST1 ekspresyonunun arttığının anlaşılması üzerine bu bağlantıda doğrudan TRIM29 inaktivasyonunun TWIST1 üzerine nasıl etki yapacağını araştırdık. Bunun için 5 adet TRIM29 shRNA plazmidi kullanıldı. Bunlardan en iyi inaktivasyon sağlanan iki tanesi kullanıldı ve shTRIM29-1 ve shTRIM29-2 olarak isimlendirildi. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası TRIM29 ve TWIST1 değişimi RT-PCR, eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. Rekombinant olarak uyarılmış TRIM29 ve TWIST1 protein artışlarının iki gen üzerine etkisini araştırmak için SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri, HA-TRIM29 ve Myc-TWIST1 içeren plazmidler ile transfekte edildi. Protein ve mRNA miktarı değişimleri

analiz edildi. TRIM29 inaktivasyonu işlemi uygulanan hücrelerdeki gözlenen morfolojik değişimleri analiz etmek için mezenkimal ve epitelial belirteçlerin ekspresyon değişimi eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edildi. TRIM29 inaktive edilmiş hücrelerde TWIST1 reporter aktivitesi, reporter assay testi ile analiz edildi. RT-PCR için GAPDH, eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanılmıştır.

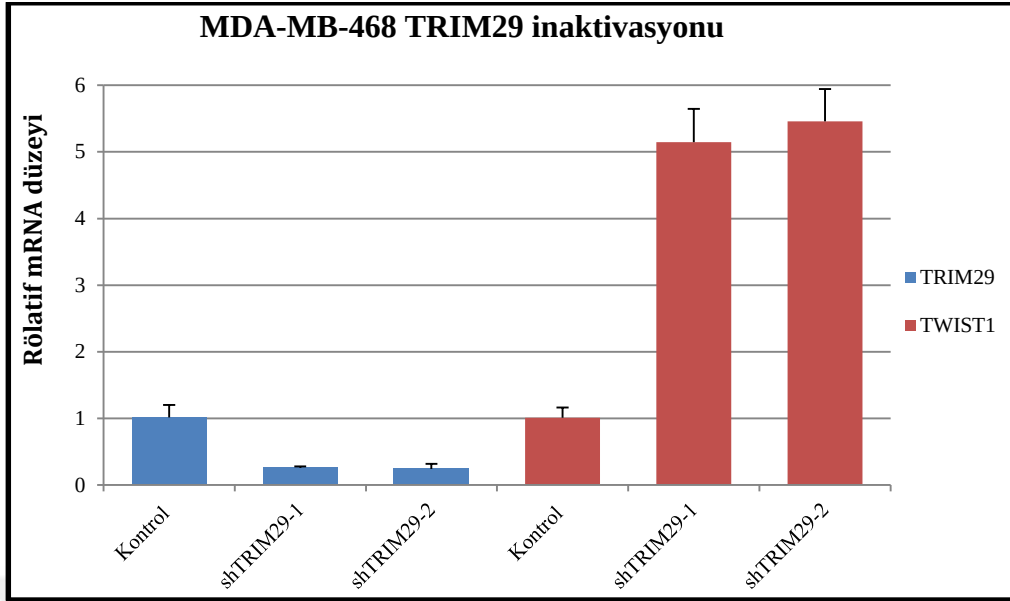


Şekil 4.73. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu takiben TWIST1 mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren RT-PCR sonuçları

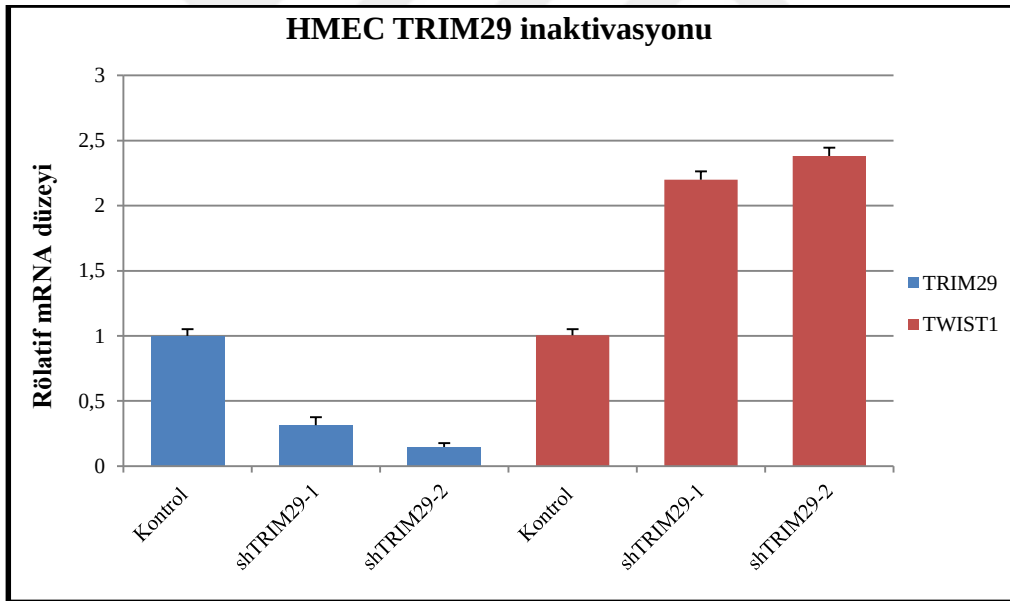
Şekil 4.73 incelendiği zaman TRIM29 inaktivasyonu sağlanan SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücre gruplarında TWIST1 mRNA ekspresyonunun arttığı görülmektedir. En iyi inaktivasyon bütün hücre grupları için shTRIM29-2 plazmidi ile sağlanmıştır.



Şekil 4.74. SKBr3 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

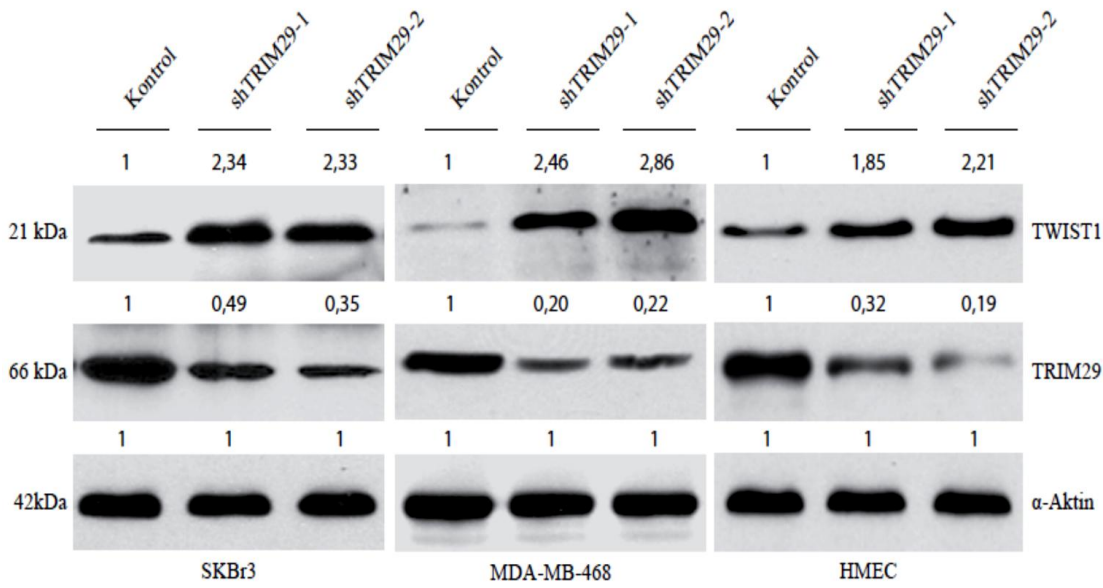


Şekil 4.75. MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları



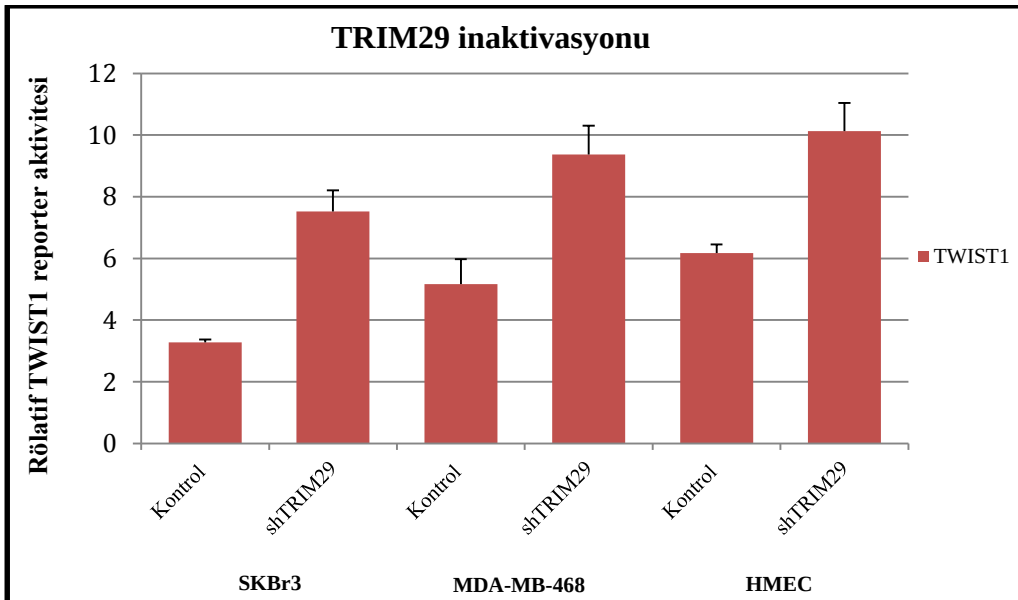
Şekil 4.76. HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Eş zamanlı qRT-PCR grafikleri incelendiği zaman, RT-PCR sonuçları ile eş zamanlı qRT-PCR sonuçlarının uyumlu olduğu görülmektedir. TRIM29 inaktivasyonunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır. TWIST1 mRNA ekspresyonu artışı SKBr3 için ortalama 3 kat, MDA-MB-468 hücreleri için 5 kat ve HMEC hücreleri için 2 kattan fazla olarak belirlenmiştir. Bütün değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.74, 4.75 ve 4.76).



Şekil 4.77. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları RT-PCR ve eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. TRIM29 inaktivasyonunu takiben TRIM29 protein miktarı azalmış ve TWIST1 protein ekspresyonu artmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.77’de verilmiştir.



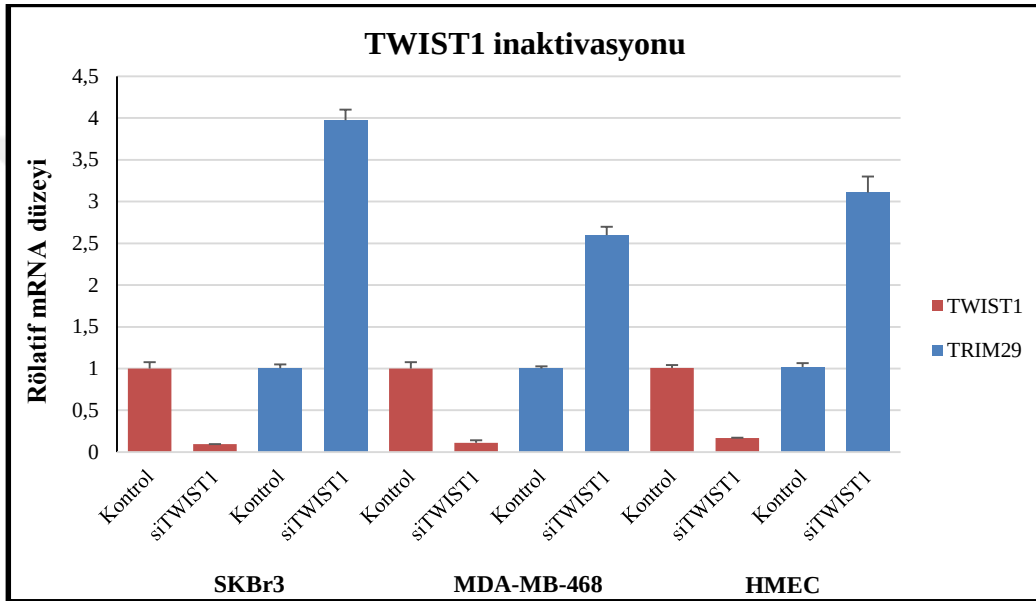
Şekil 4.78. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC TRIM29 inaktif hücrelerde TWIST1 reporter aktivitesi

Şekil 4.78 incelendiği zaman TRIM29 inaktif bütün hücrelerde TWIST1 reporter aktivitesinin arttığı görülmektedir. Bu artış SKBr3 hücreleri için 2,3 kat, MDA-MB-468

hücreleri için 1,6 kat ve HMEC hücreleri için 1,6 kat olarak belirlenmiştir. Meydana gelen bütün değişiklikler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).

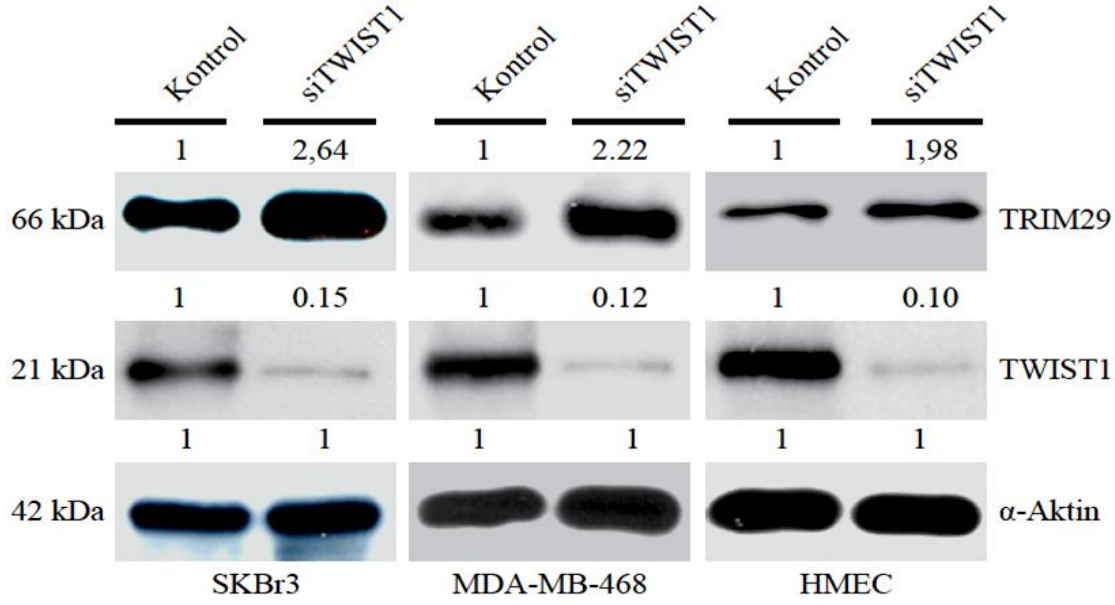
4.8.2. TWIST1 inaktivasyonunun TRIM29 üzerine etkisi

TRIM29 inaktivasyonunun TWIST1 ekspresyonunun pozitif yönde etkilediğini anladıktan sonra, TWIST1 inaktivasyonunun TRIM29 üzerine nasıl bir etki yapacağını araştırmak istedik. Bunun için kimyasal olarak sentezlenen siRNA'lar kullanıldı. TWIST1 inaktivasyonundan sonra TWIST1 ve TRIM29 ekspresyonu değişimleri eş zamanlı qRT-PCR ve western blot analizleri ile test edildi. Eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH ve western blot için α -Aktin kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 4.79. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TWIST1 inaktivasyonunu takiben TWIST1 ve TRIM29 mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Eş zamanlı qRT-PCR sonuçları siTWIST1'in çok yüksek oranda TWIST1 inaktivasyonu gerçekleştirdiğini göstermektedir. TWIST1 mRNA ekspresyonundaki azalmayı takiben TRIM29 mRNA ekspresyonu artmaktadır. Bu artış SKBr3 hücreleri için yaklaşık 4 kat, MDA-MB-468 hücreleri için 2,5 kat ve HMEC hücreleri için 3 kat olarak gözlenmiştir. Meydana gelen bütün değişiklikler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Şekil 4.79).

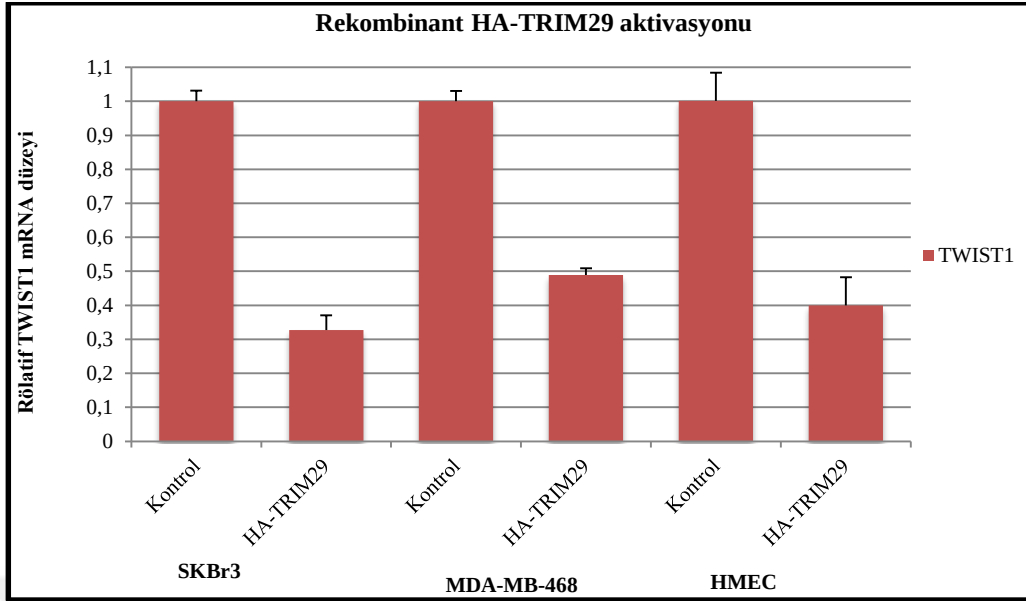


Şekil 4.80. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TWIST1 inaktivasyonu sonrası TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Western blot sonuçları eş zamanlı qRT-PCR sonuçları ile uyumludur. TWIST1 inaktivasyonunu takiben TWIST1 protein miktarı azalmış ve TRIM29 protein ekspresyonu artmıştır. Değişen protein bant büyüklükleri, Photoshop ile analiz edilerek, değerler Şekil 4.80’de verilmiştir.

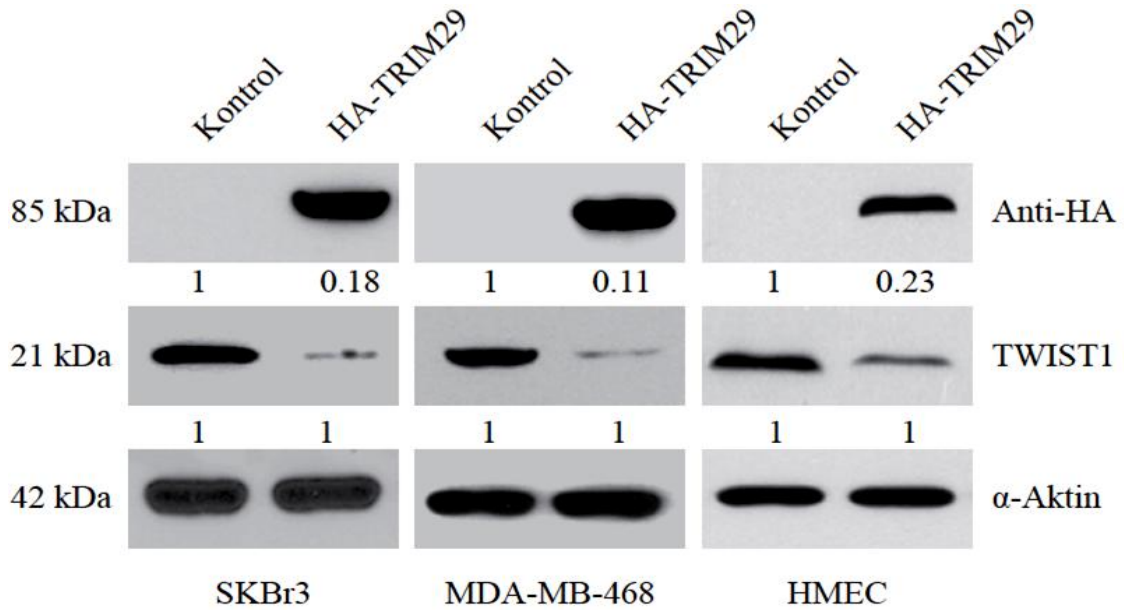
4.8.3. Rekombinant protein ekspresyonunun TRIM29 ve TWIST1 üzerine etkisi

SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde uyarılmış HA-TRIM29 protein artışının TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Aynı zamanda SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde uyarılmış Myc-TWIST1 ekspresyonunun TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH ve western blot için α-Aktin kontrol olarak kullanıldı.



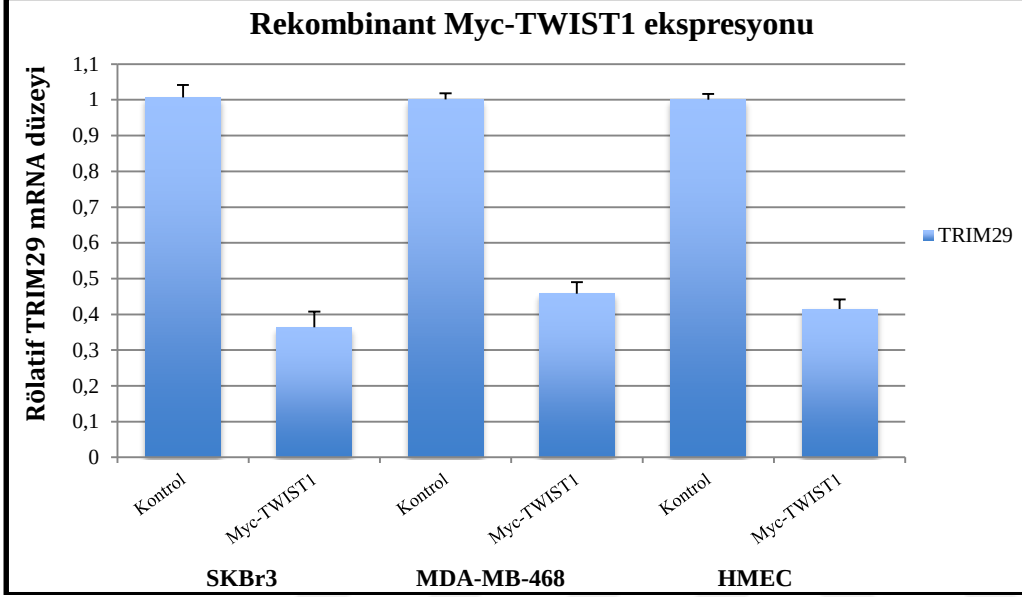
Şekil 4.81. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant HA-TRIM29 protein ekspresyonunu takiben TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

HA-TRIM29 protein miktarının artışı TWIST1 mRNA ekspresyonunu azaltmıştır. TWIST1 mRNA ekspresyonu bütün hücre gruplarında %50'den daha fazla düşmüştür (Şekil 4.81). Meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).



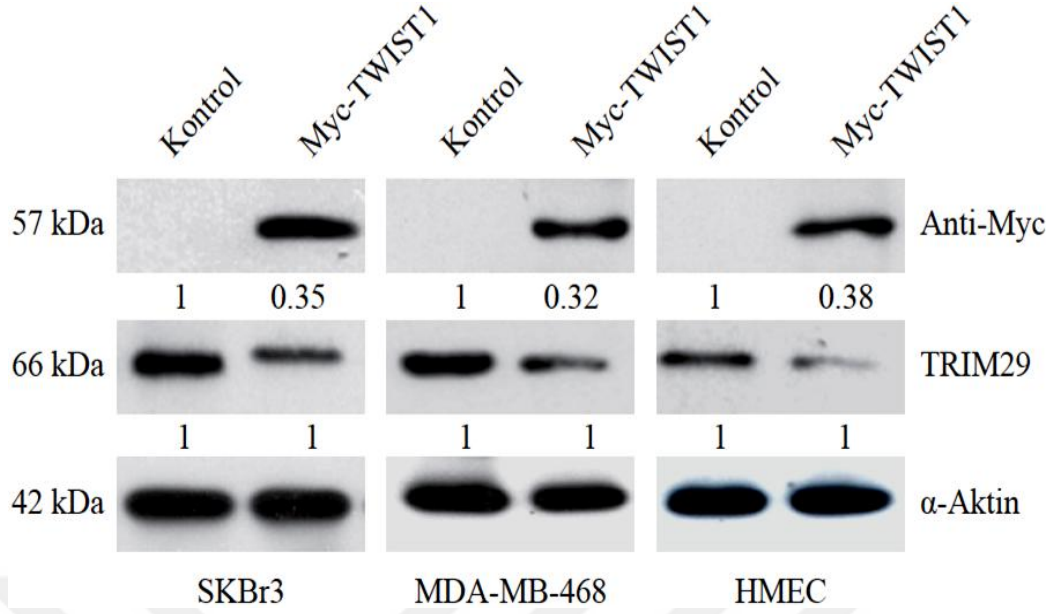
Şekil 4.82. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant HA-TRIM29 protein ekspresyonunu takiben TWIST1 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Hücreler normal koşullarda HA-TRIM29 içermezler. HA-TRIM29 içeren plazmid ile transfekte edilen hücreler bu proteini eksprese ederler. Şekil 4.82 incelendiği zaman bütün hücrelerde, HA-TRIM29 ile transfekte edildikten sonra bu proteinin ekspresyonunun arttığı görülmektedir. HA-TRIM29 artışını takiben TWIST1 protein ekspresyonunu azaltmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.82’de verilmiştir.



Şekil 4.83. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant Myc-TWIST1 protein ekspresyonunu takiben TRIM29 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Rekombinant Myc-TWIST1 protein ekspresyonu artışı TRIM29 mRNA ekspresyonunu azaltmıştır. Bütün hücrelerde %50’den fazla oranda azalma elde edilmiştir (Şekil 4.83). Meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).

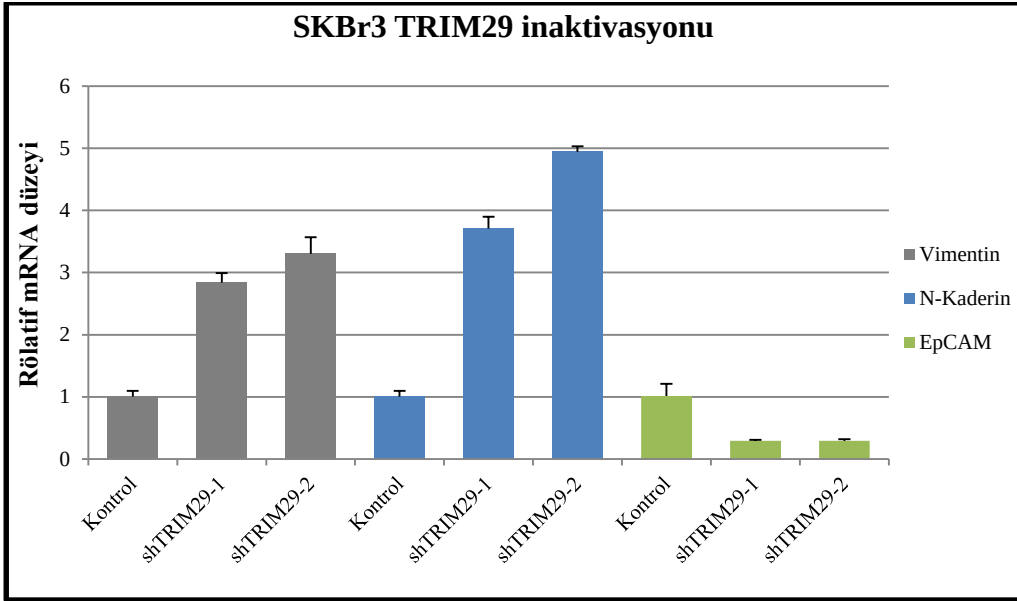


Şekil 4.84. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant Myc-TWIST1 protein ekspresyonunu takiben TRIM29 protein ekspresyonu değişimini gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

Hücreler normal koşullarda Myc-TWIST1 içermezler. Myc-TWIST1 içeren plazmid ile transfekte edilen hücreler bu proteini eksprese ederler. Şekil 4.84 incelendiği zaman bütün hücrelerde, Myc-TWIST1 ile transfekte edildikten sonra bu proteinin ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Myc-TWIST1 artışı takiben TRIM29 protein ekspresyonu azalmıştır. Photoshop programıyla yapılan bant büyüklüğü analizi sonucu elde edilen bant kıyaslamaları Şekil 4.84'te verilmiştir.

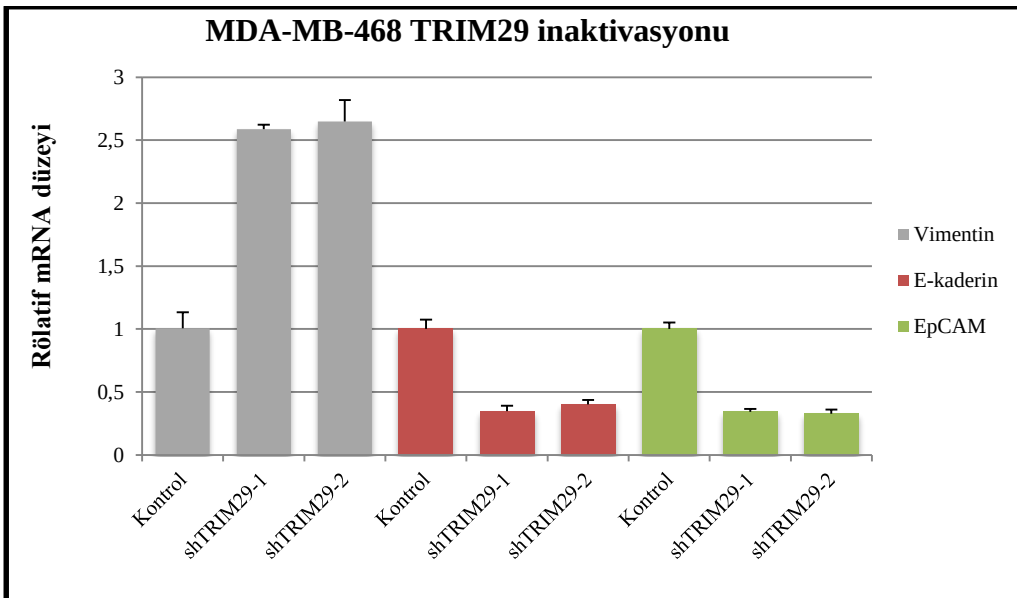
4.8.4. Epitelial-Mezenkimal belirteçlerin TRIM29 inaktif hücrelerde değişimi

N-kaderin ve Vimentin mezenkimal hücre belirteci, E-kaderin ve EpCAM ise epitelial hücre belirteçleridir. TRIM29 inaktivasyonu sağlanan SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde bu genlerin ekspresyon değişimi düzeyleri eş zamanlı qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Eş zamanlı qRT-PCR için GAPDH kontrol olarak kullanılmıştır.



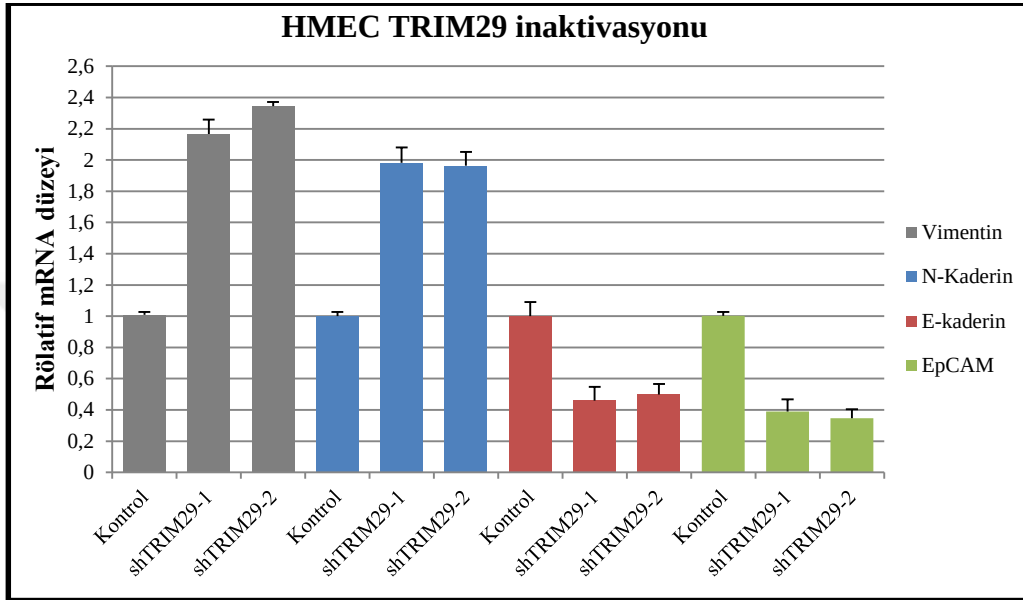
Şekil 4.85. SKBr3 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

SKBr3 TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde ve kontrol grubunda herhangi bir E-kaderin ekspresyonu belirlenememiştir. Vimentin mRNA ekspresyonu shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna kıyasla ortalama 3 kat artmıştır. N-kaderin mRNA ekspresyonu shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna kıyasla ortalama 4,3 kat artış göstermiştir. EpCAM mRNA ekspresyonu ise her iki shTRIM29 grubu için yaklaşık %70 oranında azalmıştır (Şekil 4.85). Bütün değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).



Şekil 4.86. MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

MDA-MB-468 TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde ve kontrol grubunda herhangi bir N-kaderin mRNA ekspresyonu belirlenememiştir. Vimentin ekspresyonu shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna göre ortalama 2,5 kat artmıştır. E-kaderin mRNA ekspresyonu, shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna kıyasla ortalama % 68 azalmıştır. EpCAM mRNA ekspresyonu ise her iki shTRIM29 grubu için %65'ten daha fazla oranında azalmıştır (Şekil 4.86). Bütün değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).

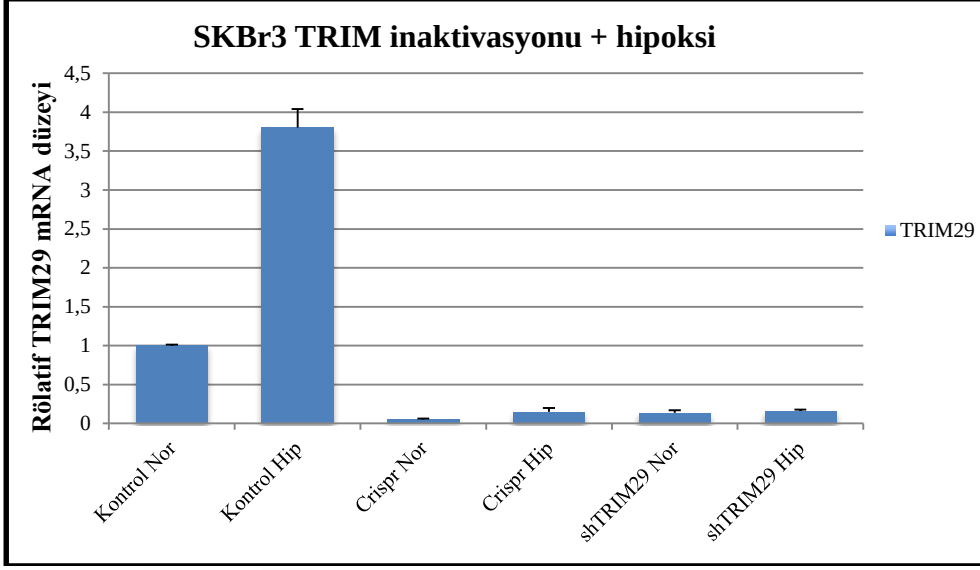


Şekil 4.87. HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası hedef genlere ait mRNA ekspresyon değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

HMEC TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde Vimentin mRNA ekspresyonu shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna kıyasla ortalama 2,2 kat artmıştır. N-kaderin mRNA ekspresyonu shTRIM29 gruplarında kontrol grubuna kıyasla ortalama yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. EpCAM ve E-kaderin mRNA ekspresyonları ise %50'den daha fazla azalmıştır (Şekil 4.87). Bütün değişimler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,001$).

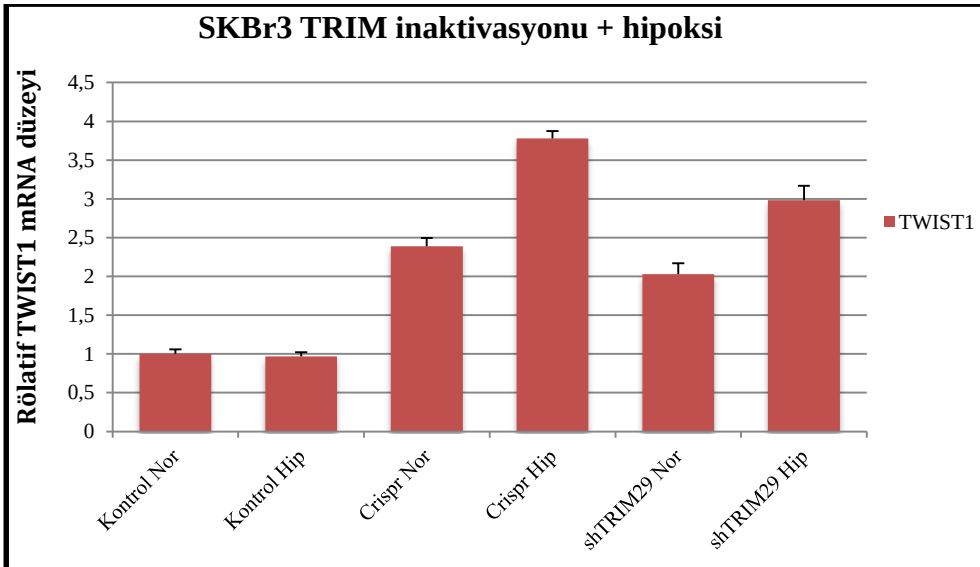
4.8.5. TRIM29'un hipoksik TWIST1 ekspresyonuna etkisi

TWIST1 ve TRIM29 arasındaki antagonist ilişkinin bilinmesi ve hipoksi koşulları altında literatürde belirtilenin aksine TWIST1 ekspresyonunun değişmemesi üzerine, TRIM29'un bu durumdaki etkisini araştırmak istedik. Bu sebeple SKBr3 TRIM29 knockdown hücreleri ve Crispr mutasyon plazmidi kullanılarak elde edilen SKBr3 TRIM29 mutasyonlu hücreler hipoksiye maruz bırakılarak TWIST1 ekspresyonu değişimi eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. Kontrol olarak TRIM29 değişimi eş zamanlı qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi. Eş zamanlı qRT-PCR için Aktin ve western blot için ise α -Aktin kontrol olarak kullanıldı.



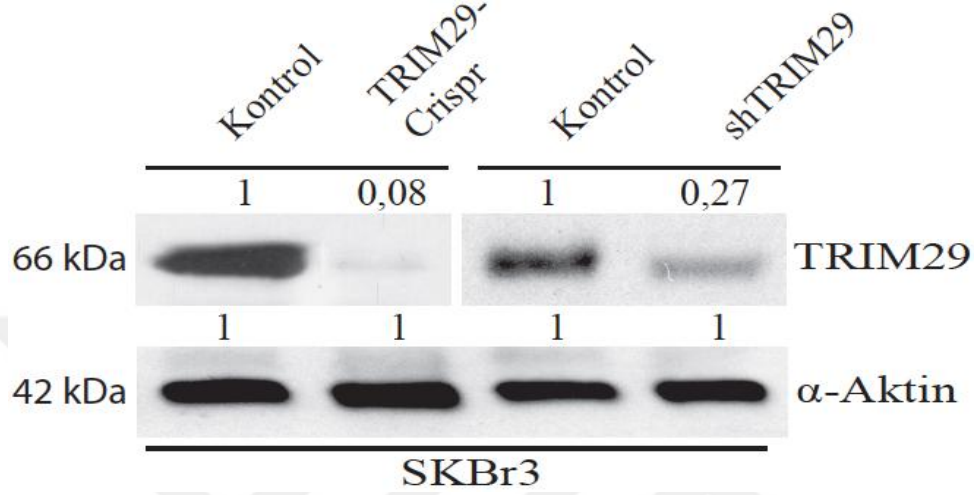
Şekil 4.88. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Önceden belirtildiği gibi bu grafikte de görülmektedir ki kontrol grubunda normal koşullara kıyasla hipoksik koşullar altında TRIM29 mRNA ekspresyonu artmaktadır. Bu grafikte de kontrol grubuna kıyasla hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu düzeyi 3,8 kat artmıştır ($p < 0,001$). Hem Crispr hem de shTRIM29 gruplarında yüksek oranda TRIM29 inaktivasyonu görülmektedir. Bu grupların hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu seviyelerinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.88).

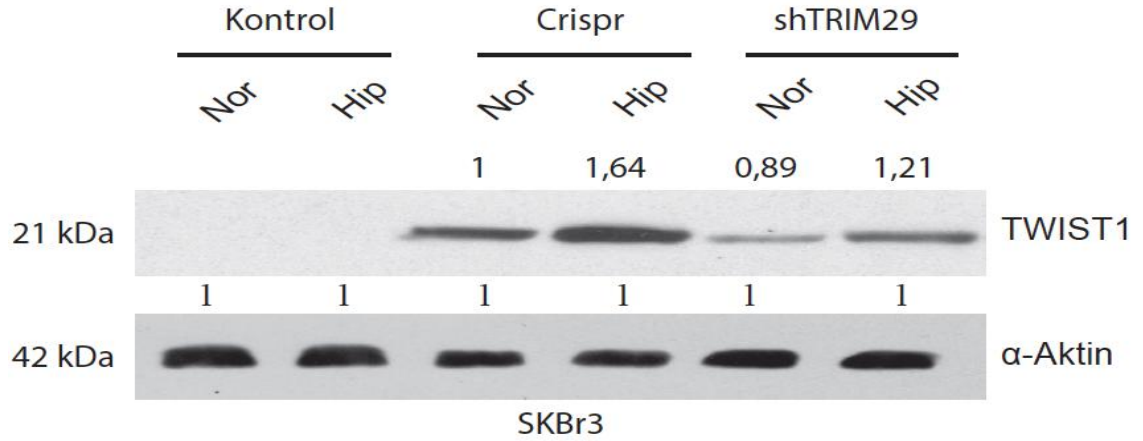


Şekil 4.89. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 mRNA ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren eş zamanlı qRT-PCR sonuçları

Grafik incelendiği zaman kontrol grupları için TWIST1 mRNA ekspresyonunda normoksi ve hipoksi durumları arasında bir fark olmadığı görülmektedir. TRIM29 inaktivasyonu sonrası ise hem Crispr grubunda hem de shTRIM29 grubunda normoksi için TWIST1 mRNA ekspresyonu artmıştır. Bu iki gruba hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 mRNA ekspresyonu normoksi koşullarına göre istatistiksel açıdan önemli ölçüde ($p < 0,001$) artmıştır (Şekil 4.89).



Şekil 4.90. SKBr3 Crispr ve shTRIM29 gruplarında TRIM29 protein ekspresyonunu gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

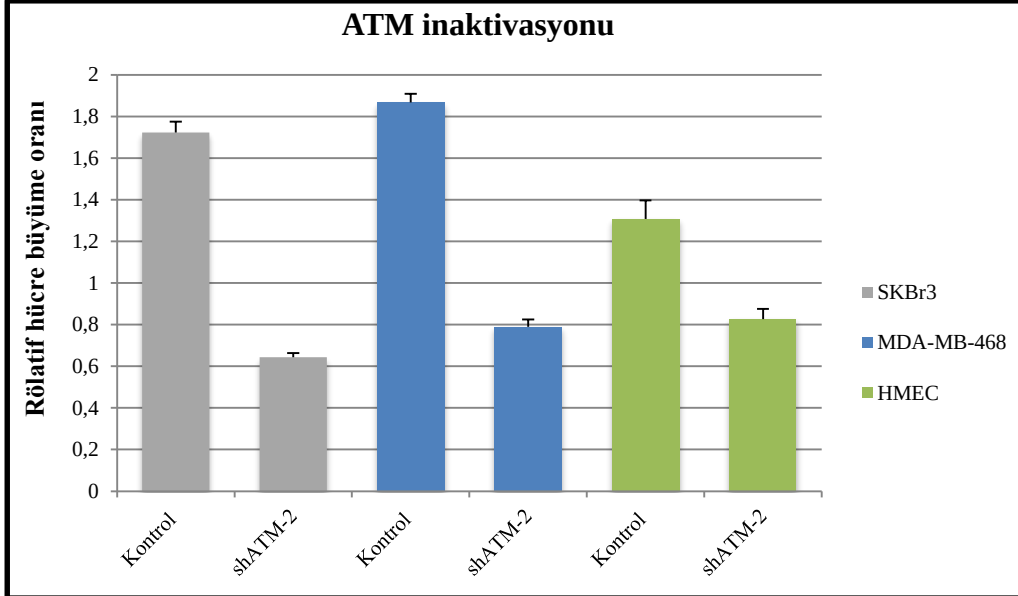


Şekil 4.91. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış SKBr3 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 protein ekspresyonu değişim miktarlarını gösteren western blot sonuçları ve bant sinyali değişimi

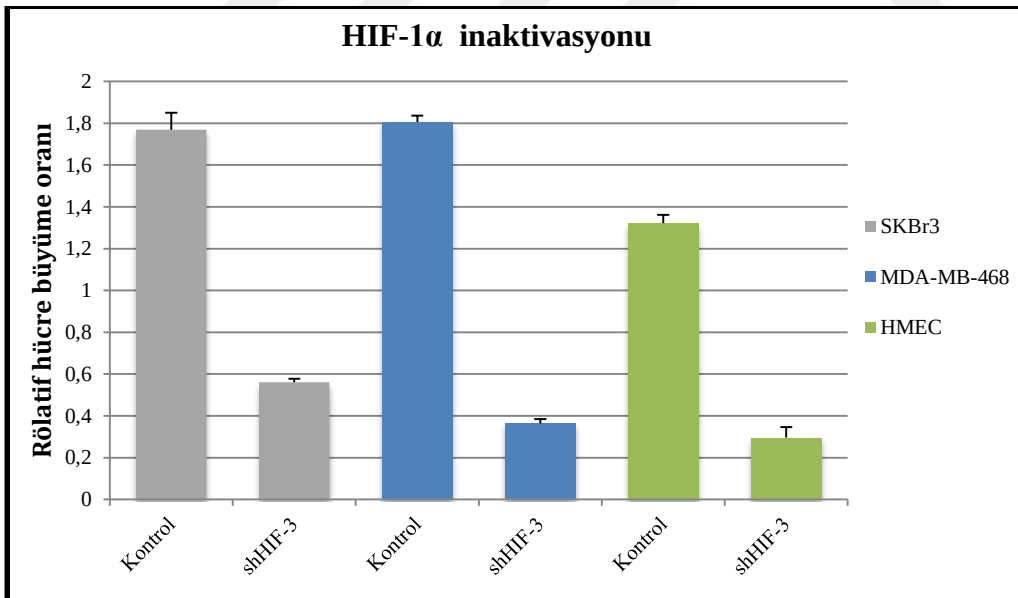
Şekil 4.90 incelendiği zaman yüksek oranda TRIM29 inaktivasyonu sağlandığı görülmektedir. Kontrol gruplarında normoksi durumunda TWIST1 ekspresyonu gözlenmemiştir. TRIM29 inaktivasyonu sonrası TWIST1 protein ekspresyonu artmıştır. Ayrıca TRIM29 inaktif gruplara uygulanan hipoksi, TWIST1 seviyesini ekstra olarak arttırmıştır. Photoshop programı ile elde edilen western blot bant kıyaslamaları Şekil 4.91’de verilmiştir.

4.9. Gen İnaktivasyonu Sonrası Hücrelerin Büyüme Oranları Değişimleri

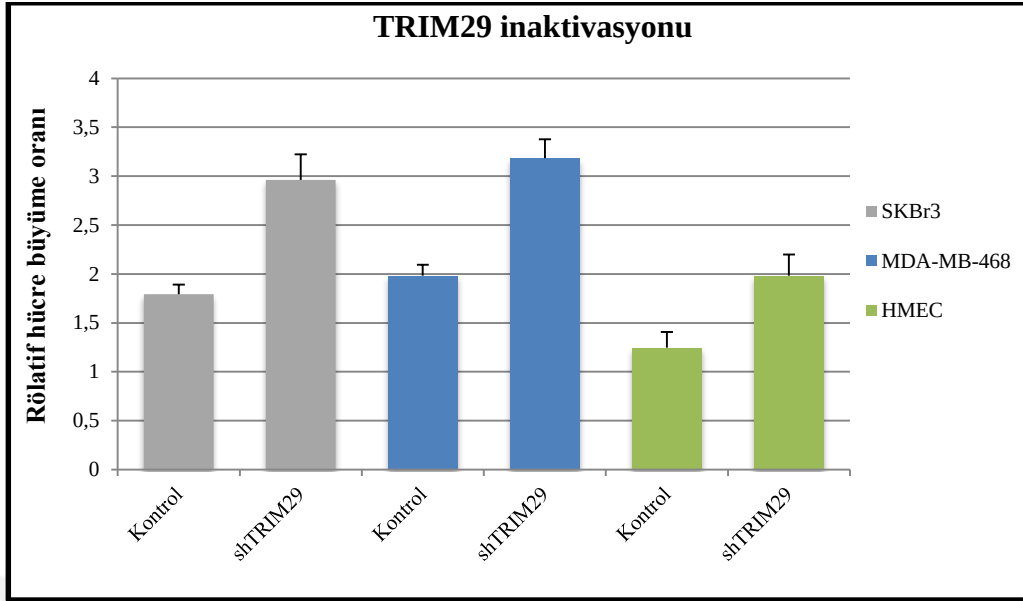
Gen inaktivasyonu sağlanmış ATM, HIF-1 α ve TRIM29 SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri için hücre büyüme oranları MTT analizi ile test edildi.



Şekil 4.92. ATM inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları



Şekil 4.93. HIF-1 α inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları

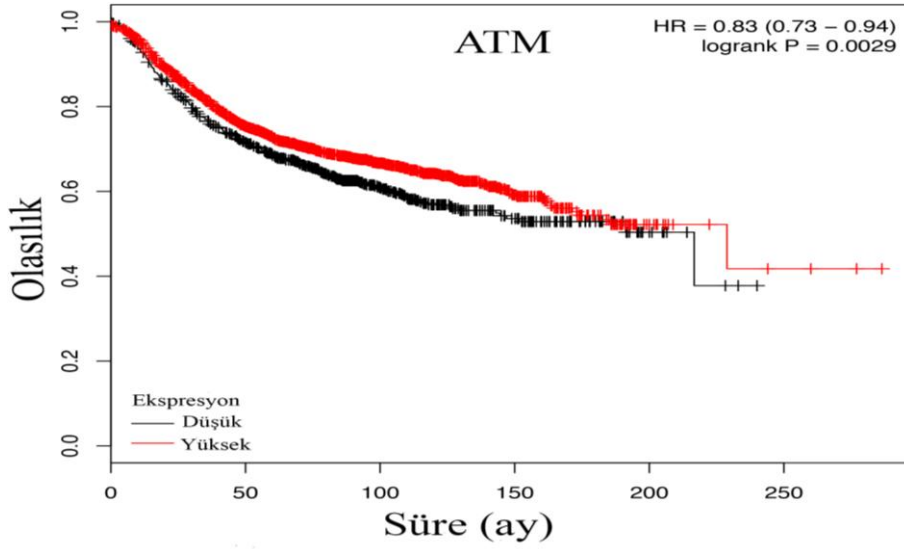


Şekil 4.94. TRIM29 inaktivasyonu sağlanan hücrelerde büyüme oranı değişimini gösteren MTT sonuçları

Her hücre grubu için en iyi inaktivasyon sağlanan shRNA grubu için MTT testi yapılmıştır. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde ATM ve HIF-1 α inaktivasyonu sonrası hücrelerin büyüme oranları istatistiksel açıdan önemli oranda ($p < 0,001$) düşmüştür. ATM inaktivasyonu sağlanan SKBr3 hücrelerinde büyüme oranı 2,8 kat, MDA-MB-468 hücrelerinde 2,3 kat, HMEC hücrelerinde 1,5 kat azalmıştır (Şekil 4.92). HIF-1 α inaktivasyonu sağlanan SKBr3 hücrelerinde hücre büyüme oranı 3,1 kat, MDA-MB-468 hücrelerinde 5 kat, HMEC hücrelerinde ise 4,5 kat azalmıştır (Şekil 4.93). TRIM29 inaktivasyonu sağlanan hücrelerde ise hücre büyüme oranları artmıştır. TRIM29 inaktivasyonu sağlanan SKBr3 hücrelerinde hücre büyüme oranı 1,6 kat, MDA-MB-468 hücrelerinde 1,6 kat ve HMEC hücrelerinde 1,5 kat artmıştır (Şekil 4.94).

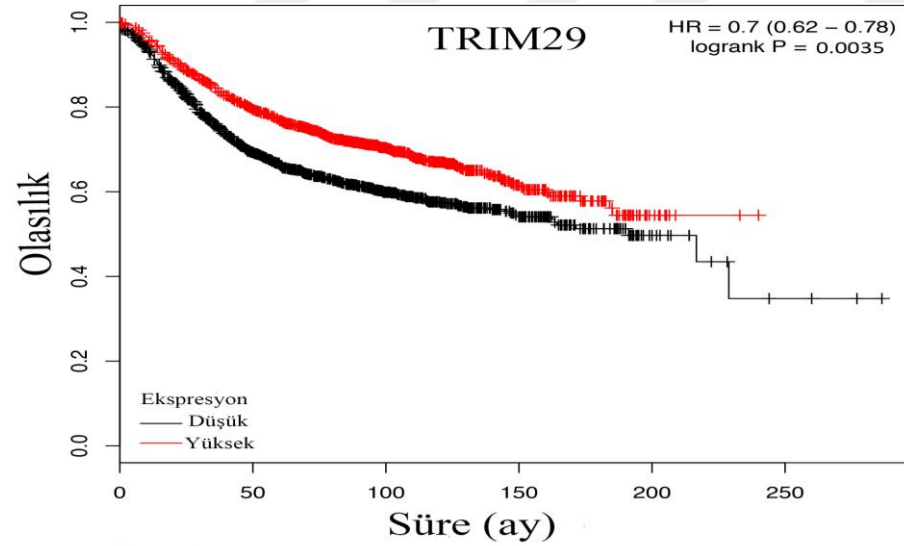
4.10. ATM, TRIM29 ve TWIST1 Ekspresyonu Düzeylerinin Meme Kanseri Hastaların Ömür Uzunluğuna Olan Etkisi

Bu analizi yapmak için online olarak hizmet veren Kaplan Meier Plotter internet sitesindeki veriler kullanıldı. Bu internet sitesi meme kanserli ve diğer bazı kanser türlerine sahip bireylere ait farklı genlerin ifade düzeyleri ve bireylerin yaşam sürelerine ait verileri içermektedir. Analiz gerçekleştirilirken her gene ait en iyi sonuç veren prob üzerinden veriler değerlendirilmiştir. Elde edilen grafik verileri bu veri bankası tarafından oluşturulmuştur. Meme kanserli bireylerde ATM, TRIM29 ve TWIST1 genine ait problemler kullanılarak, bu genlerin ekspresyon düzeyi değişimlerinin meme kanseri hastalarının yaşam süresini nasıl etkilediğini gösteren grafikler elde edildi (Kaplan Meier 2015).



Şekil 4.95. Meme kanseri hastalarında ATM ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik

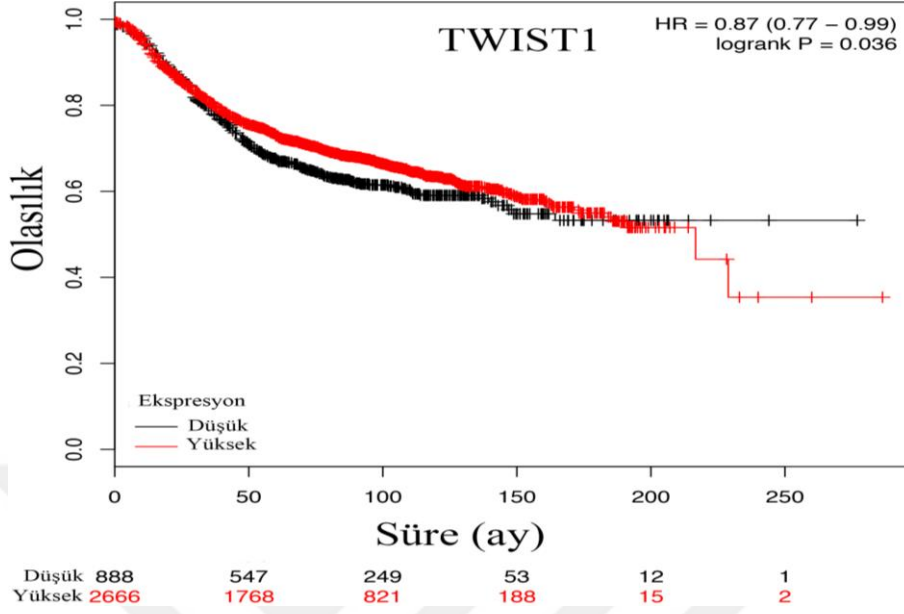
Şekil 4.95'te verilen grafik incelendiğinde elde edilen verilerin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,01$). Veriler meme kanseri hastalarında ATM ekspresyonunun miktarı azaldıkça yaşam süresinin de kısaldığını göstermektedir.



Şekil 4.96. Meme kanseri hastalarında TRIM29 ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik

Şekil 4.96'da verilen grafik incelendiğinde elde edilen verilerin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,01$). Veriler meme kanseri hastalarında

TRIM29 ekspresyonunun miktarı azaldıkça yaşam süresinin de kısaldığını göstermektedir.



Şekil 4.97. Meme kanseri hastalarında TWIST1 ekspresyonu değişiminin ömür uzunluğuna etkisini gösteren grafik

Şekil 4.97’de verilen grafik incelendiğinde elde edilen verilerin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Veriler meme kanseri hastalarında TWIST1 ekspresyonunun miktarı azaldıkça yaşam süresinin arttığını göstermektedir. Artmış TWIST1 ekspresyonu meme kanseri hastaları için daha kısa yaşam süresini ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

ATM proteininin hücrel stres olayları boyunca oluşan DNA hasar tamiri mekanizmasındaki rolü bilinmektedir. Ataksi-Telanjiectazili hastalarda ATM proteininin mutasyona uğradığı ve bu bireylerde meme kanseri oluşum riskinin daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Ahmed ve Rahman 2006). Bu sebeple *ATM* tümör baskılayıcı bir gen olarak kabul görmektedir. Ancak ATM proteininin meme kanseri oluşum mekanizması üzerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. ATM birçok farklı protein ile ilişkiye geçip çok farklı hücrel yanıt mekanizmasının oluşumunda rol alır. TRIM29 ise TRIM ailesi üyesi olup birçok kanser türünde farklı ekspresyon profili çizmektedir (Hatakeyama 2011). Yaptığımız çalışmalar neticesinde TRIM29'un BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435 ve T47-D meme kanseri hücrelerinde ekspresyonuna rastlanmamıştır. Aksine SKBr3, MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda TRIM29 ekspresyonu belirlendi. Ayrıca insan meme epiteli hücre grubu HMEC ve malign olmayan MCF-10A hücrelerinde ise SKBr3 ve MDA-MB-468'e kıyasla daha düşük oranda TRIM29 ekspresyonu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3).

DNA metilasyonu, malignite sürecinde birçok tümör baskılayıcı genin baskılanmasını sağlayan bir epigenetik değişimdir. Kanserli hücrelerde birçok gen metilasyona uğramıştır (Baylin 2005). TRIM29 ekspresyonuna sahip olmayan MDA-MB-231 ve BT-549 meme kanseri hücrelerine bir DNA metil transferaz inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidin ile 3 ve 5 gün boyunca uygulandıktan sonra bu hücrelerde TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. TRIM29 ekspresyonuna sahip olan SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde ise 5-aza-2'-deoksisitidin uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6). Bu sebeple TRIM29'un BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435 ve T47-D meme kanseri hücrelerinde metilasyona uğradığını ve epigenetik olarak susturulduğunu belirlemiş olduk.

Hosoi vd (2006) ilk defa TRIM29'un baskılanmasının malign fenotip ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, TRIM29'un meme kanseri için tümör baskılayıcı bir protein olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle diğer bir tümör baskılayıcı protein olan ATM'nin *TRIM29* geni ekspresyonu üzerindeki kontrol mekanizmasının araştırılması gerekmektedir. Diğer önemli bir nokta ise, TWIST1 onkogenik proteininin meme kanserindeki ekspresyonunun artmasıydı. Bu durumun ATM ve TRIM29 azalışı ile bağlantılı olacağını düşünerek, TWIST1 ekspresyonunun ATM ve TRIM29 ile ilişkisi çalışmamızda araştırıldı. Meme kanseri hücrelerinde azalan TRIM29 ve artmış TWIST1 ekspresyonu kontrolünün ATM ile olan ilişkisinin ortaya çıkarılması ATM'nin meme kanseri oluşum mekanizmasındaki rolünün anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

Wang vd (2014) tarafından yapılan çalışmada TRIM29 ekspresyonunun pankreas kanserinde aşırı ifade edildiği ve TRIM29 ekspresyon artışının ATM aracılı olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Literatürde ATM-TWIST1 bağlantısı ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde ATM inaktivasyonunu takiben TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun azaldığını, TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun ise arttığını belirledik (Bkz. Şekil 4.7, 4.8,

4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14. ve 4.15). Bu veriler doğrultusunda TRIM29 bazal mRNA ve protein ekspresyonunun meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde ATM bağımlı olduğunu ortaya koymuş olduk. TRIM29 eksprese eden hücrelerde, ATM inaktivasyonunun bir onkogen olan TWIST1 ekspresyonunu arttırdığını gözlemledik. Bu çalışma ile ilk defa ATM-TWIST1 bağlantısını ortaya koymuş olduk.

TWIST1 ekspresyonunun ATM inaktif ve TRIM29 ekspresyonuna sahip hücrelerde artması üzerine bu durumun TRIM29 ekspresyonuna sahip olmayan hücreler için nasıl olduğunu araştırmak istedik. TRIM29 eksprese etmeyen MDA-MB-231 hücrelerinde ATM inaktivasyonu sağlandı ve TWIST1 ekspresyonu değişimi analiz edildi. TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun MDA-MB-231 ATM inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde istatistiksel açıdan önemli herhangi bir değişime uğramadığı bulundu (Bkz. Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18). Bu durum kanımızca, TWIST1 ekspresyonunun doğrudan ATM ile değil, ATM tarafından aktive edilen TRIM29 ekspresyonuna bağlı olarak kontrol edilmesiyle açıklanabilir. MDA-MB-231 hücrelerinde ATM inaktivasyonu sonrası TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun değişmemesi ise bu hücrelerde TWIST1 ekspresyonu üzerinde doğrudan ATM-HIF-1 α bağlantısının etkisi dışında, farklı bir yolak ile TWIST1 ekspresyonunun düzenleniyor olabileceğini göstermektedir. Bu konunun ayrıca araştırılması gerekmektedir.

Pandita vd (2000) yaptıkları çalışmada ATM proteininin iyonize radyasyon sonucu aktive olduğunu göstermişlerdir. Sho vd (2011) TRIM29 ekspresyonunun UV radyasyon sonrası arttığını göstermişlerdir. Wang vd (2014) TRIM29 proteininin iyonize radyasyon sonucu ekspresyonunun arttığını ve pankreas kanseri hücrelerinin iyonize radyasyona karşı direnç oluşturmada önemli olduğunu göstermişlerdir. Bu sebeple çalışmamızda TRIM29 ekspresyonuna sahip SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerine iyonize radyasyon uygulanarak TRIM29 değişimi analiz edilmiştir. Ancak TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunda iyonize radyasyon uygulaması sonrası herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.19 ve 4.20). Bu sonuçlar TRIM29'un meme kanseri ve meme epiteli hücreleri için iyonize radyasyonun etkisi ile değişime uğramadığını göstermiştir. Sonuç olarak, bu durum TRIM29'un kanserin köken aldığı dokuya göre farklı görev üstlenmesiyle ya da iyonize radyasyonun ATM protein miktarını değiştirmeden ATM'nin aktif hale gelmesini sağlamasıyla açıklanabilir.

Veriler ışığında diğer önemli nokta ise, ATM protein kinazın TRIM29 ekspresyonunu hangi transkripsiyon faktörü aracılığı ile yaptığının anlaşılmasıdır. Bu amaçla çalışmamızda ATM tarafından aktive edilen HIF-1 α ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin TRIM29 ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. ATM proteininin NF- κ B kontrolü ile ilgili birçok çalışma sunulmuştur. ATM proteininin HIF-1 α üzerindeki etkisi ise iki farklı çalışmada farklı sonuçlar halinde sunulmuştur: Ousset vd (2010) ATM inaktivasyonunun HIF-1 α aktivasyonunu hipoksik koşullarda arttırdığını, Cam vd (2010) ise ATM proteininin HIF-1 α ekspresyonu için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda ATM inaktivasyonu sağladığımız SKBr3, MDA-MB-468, HMEC ve MDA-MB-231 hücrelerinde bazal HIF-1 α mRNA ekspresyonunun azaldığını saptadık (Bkz. Şekil 4.7, 4.8, 4.10, 4.11, 4.13, 4.14, 4.16 ve 4.17). Bu nedenle çalışmamızın sonuçları literatürdeki bu ikilemin düzeltilmesine katkı sağlayacaktır. NF- κ B ve HIF-1 α bağlantısını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Oysa, HIF-1 α ve NF- κ B'nin

TRIM29 ile bağlantısını gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tang vd (2013) TRIM29 inaktivasyonunun NF- κ B aktivasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Ancak NF- κ B transkripsiyonunun TRIM29 ekspresyonu üzerine etkisinden bahsedilmemiştir. Bu etkiyi incelemek için öncelikle NF- κ B inaktivasyonu sağlanmış SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri elde edildi. Kontrol olarak HIF-1 α mRNA ekspresyonu değişimi analiz edildi ve bütün hücre grupları için NF- κ B inaktivasyonu sonrası bazal HIF-1 α mRNA düzeyinin azaldığı belirlendi. Meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde HIF-1 α bazal ekspresyonunun NF- κ B bağımlı olduğu gösterildi. Yine bütün NF- κ B inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde bazal TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29). Araştırmamız bu bakımdan NF- κ B-TRIM29 etkileşiminin ilk kez gösterilmesi açısından da önemlidir.

Araştırılmasının önemli olduğunu düşündüğümüz diğer bir konu NF- κ B'nin dışsal uyaranlar ile azaltılmasının TRIM29 üzerine nasıl etki yapacağı idi. Guo vd (2010) ROS tarafından oluşturulan oksidatif stresin ATM'yi aktive ettiğini bildirmişlerdir. Oka vd (2000) NAC uygulaması sonrası NF- κ B aktivitesinin azaldığını belirlemişlerdir. Alpay vd (2015) NAC uygulamasının ATM bağlantılı NF- κ B aktivasyonunun azalmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Chandel vd (1998) ve Chandel vd (2000) hipoksi sonrası hücrede oluşan ROS'un HIF-1 α aktivasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bu nedenle NAC uygulamasının TRIM29 ve HIF-1 α mRNA ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. NAC uygulaması sonrası azalan NF- κ B'nin hem HIF-1 α hem de TRIM29 bazal mRNA ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu gözlemlendik (Bkz. Şekil 4.30, 4.31 ve 4.32). Bu çalışma sonrası TRIM29 ve HIF-1 α bazal mRNA ekspresyonunun, NAC uygulaması ile NF- κ B miktarındaki azalmayı takiben azaldığı ortaya konmuştur. Veriler hücrel redoks durumunun ATM bağımlı ya da bağımsız yollar ile TRIM29 ekspresyonunu ve HIF-1 α aktivitesini uyarabileceğini göstermektedir. NF- κ B/TWIST1 bağlantısı iyi şekilde tanımlandığı için ayrıca üzerinde araştırma yapılmamıştır.

Birbiriyle bağlantılı bu yolaktaki diğer önemli basamak HIF-1 α 'dır. Çünkü hem ATM hem de NF- κ B inaktivasyonunun bu transkripsiyon faktörünün bazal mRNA seviyesini azalttığı çalışmamızda gösterilmiştir. HIF-1 α 'nın TRIM29-TWIST1 bağlantısına etkisi bu sinyal yolağındaki ortaya çıkarmak istediğimiz diğer soru işareti olmuştur. SKBr3, MDA-MB-468, HMEC ve MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 α inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hem TRIM29 hem de TWIST1 ekspresyonu değişimi analiz edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise TWIST1 ekspresyonu değişimi analiz edilmiştir. HIF-1 α inaktivasyonunun TRIM29 bazal mRNA ve protein ekspresyonunu azalttığı SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde gösterilmiştir. Bu veri HIF-1 α /TRIM29 bağlantısının ilk defa gösterilmesi açısından önemlidir. Bazal TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu ise SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde artmıştır. HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış MDA-MB-231 hücrelerinde bazal TWIST1 mRNA düzeyi azalmıştır (Bkz. Şekil 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42 ve 4.43). Yang vd (2008) ve Cho vd (2014) farklı kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda HIF-1 α inaktivasyonunun TWIST1 ifadesini azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda HIF-1 α inaktivasyonu sağladığımız MDA-

MB-231 hücrelerindeki TWIST1 ekspresyonunun düşüşü, literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olup, TRIM29 ifadesine sahip HIF-1 α inaktivasyonu sağladığımız hücrelerin de farklı bir TWIST1 ekspresyonu profiline sahip oldukları belirlenmiştir.

Bu aşamaya kadar yapılan çalışmalar ile azalmış ATM ve NF- κ B aktivitesinin, bazal seviyedeki HIF-1 α mRNA ekspresyonunu azalttığını saptadık. Hem bu durum hem de shRNA aracılı azalmış HIF-1 α inaktivitesini takiben TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun azaldığını ve azalan TRIM29'un TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu artışına neden olduğunu ortaya çıkardık.

Bu veriler ışığında HIF-1 α 'nın TRIM29 ekspresyonunda kilit rolünden yola çıkarak, artmış HIF-1 α ekspresyonunun bu yolağa nasıl etki yapacağını araştırdık. Bu nedenle SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerine hipoksi uygulaması yapıldı. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun arttığını belirledik. Kontrol olarak hipoksik koşullara cevap olarak ekspresyonu artan CAIX kullanıldı ve hipoksik koşullarda CAIX artışı bütün hücreler için gözlemlendi. HIF-1 α mRNA ekspresyonu seviyesi değişimi için literatürde farklı bilgiler bulunmaktadır. Chang vd (2003), Li vd (2006), Belaiba vd (2007) ve Conde vd (2012) yaptıkları çalışmalarda hipoksi durumunda hücrelerin HIF-1 α mRNA seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Bunun aksine Uchida vd (2004) ve Lin vd (2011) yaptıkları çalışmalarda hipoksi sırasında HIF-1 α mRNA ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir. Kelly vd (2003) ise HIF-1 α mRNA ekspresyonunun hücre çeşidine göre farklı eksprese olabileceğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamız ile SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve BT-549 meme kanseri hücresi ve HMEC meme epiteli olmak üzere beş farklı hücre grubunda hipoksi uygulamasından sonra, HIF-1 α mRNA seviyesinin arttığını belirledik; bazı meme kanseri ve meme epiteli hücreleri için hipoksi koşullarında HIF-1 α ekspresyonunun nasıl etkilendiğini de belirlemiş olduk.

Yang vd (2008) hipoksinin TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksi sonrası TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlemlenmedi. MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde ise hipoksi uygulaması sonrası TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonu artışını belirledik (Bkz. Şekil 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49 ve 4.50). Bu farklılığın nedeninin SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinin TRIM29 eksprese etmeleri olduğunu düşündük. TWIST1 onkogenik proteininin hipoksik koşullarda TRIM29 varlığında artışının durduğunu bilmek oldukça önemlidir. Çünkü, bilindiği üzere kanser hücreleri hipoksik koşulları sevmektedir. Meme kanseri dokularında hipoksik koşullarda onkogenik TWIST1 ekspresyonu artışı uyandırılmış TRIM29 artışı ile durdurulabilir.

Çalışmamız kapsamında ayrıca SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri için 2, 4, 8, 12, 16 ve 18 saatlik hipoksi uygulaması sonrası TRIM29, HIF-1 α , CAIX ve TWIST1 mRNA ekspresyonu değişimi gösterildi. TRIM29 ve CAIX mRNA ekspresyonunun hipoksi uygulaması boyunca arttığı belirlendi. SKBr3 hücrelerinde farklı zamanlarda uygulanan hipoksinin TWIST1 mRNA ekspresyonu üzerine istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. MDA-MB-468 hücrelerinde 2 saatlik hipoksi uygulaması TWIST1 mRNA ekspresyonunu azaltmış bunun takibinde 4 saat sonrası TWIST1 mRNA ekspresyonunun normal seviyeye

çıktığı belirlenmiştir. HIF-1 α mRNA ekspresyonu ise 8 ve 18. saatlerde en çok artışı gösterdiği belirlendi (Bkz. Şekil 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.56, 4.57, 4.58 ve 4.59).

SKBr3 ve MDA-MB-468 için 4, 8, 12, 16, 18 ve 24 saat hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 ve HIF-1 α protein ekspresyonu analiz edildi. Hipoksi uygulaması boyunca iki hücre grubunda da hem TRIM29 hem de HIF-1 α protein ekspresyonunun arttığı belirlendi. En yoğun TRIM29 protein ekspresyonu artışı SKBr3 hücreleri için 18, MDA-MB-468 için ise 24 saatlik hipoksi uygulamasında gözlemlendi. Hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 için en yoğun HIF-1 α protein ekspresyonu artışı 16 saatlik hipoksi uygulamasında gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.55 ve 4.60). Hücre hattına ve uygulanan hipoksi süresine bağlı olarak TRIM29 ve HIF-1 α ekspresyonundaki değişim hücreye özgü olarak hipoksik genlerin ekspresyonunun değişim göstermesi ile açıklanabilir. Literatürde de Cavadas vd (2015) tarafından yapılan çalışmada farklı sürelerde uygulanan hipoksinin, hipoksik genlerin mRNA ve protein ekspresyonuna etkisinin değişiklik gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmada iki farklı meme kanseri hücresi için farklı zamanlarda uygulanan hipoksinin TRIM29 ve HIF-1 α mRNA ve protein ekspresyonu değişimi üzerine etkisini ilk kez göstermiş olduk.

Hipoksik koşullar altında HIF-1 α 'nın yanı sıra HIF-2 α mRNA ve protein ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. HIF-2 α hipoksik koşullarda aktive olup, hipoksik birçok proteininin kontrolünde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (Hu vd 2003). Bu nedenle TRIM29 bazal ekspresyonuna bu transkripsiyon faktörünün etkisini incelemek için SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde HIF-2 α inaktivasyonu sağlandı. Ardından, TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimi analiz edildi. TRIM29 mRNA ekspresyonunda her hangi bir değişim gözlenmedi (Bkz. Ek-6).

Bencokova vd (2009) ATM'nin DNA hasarı oluşmadan hipoksi uygulaması ile aktif hale geldiğini bildirmişlerdir. Wang ve Semenza (1995) Hipoksinin HIF-1 α mRNA ve protein aktivitesini arttırdığını yaptıkları çalışma ile bildirmişlerdir. Bu bilgiler ışığında hipoksi uygulaması sırasında hem mRNA hem de protein ekspresyonu artan TRIM29'un, ATM'ye mi yoksa HIF-1 α 'ya mı bağımlı olduğunu araştırdık. Bu nedenle önceden elde ettiğimiz SKBr3 ve MDA-MB-468 ATM ve HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücreler hipoksiye maruz bırakılıp, TRIM29 ve HIF-1 α ekspresyonu değişimleri analiz edildi. ATM inaktivasyonu sağlanan hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla shATM gruplarında eş zamanlı qRT-PCR sonuçları için istatistiksel açıdan önemli HIF-1 α ve TRIM29 artışı gözlenmedi. Kontrol olarak analiz edilen CAIX için ise shATM normoksi ve hipoksi koşullarında istatistiksel açıdan önemli değişim gözlemlendi. Western blot sonuçları için sadece shATM-1 hipoksik grupta HIF-1 α blotu için gözle görülür ve istatistiksel açıdan önemli olan bir fark bulunmaktadır. Bu durum shATM-1 grubundaki ATM inaktivasyonunun shATM-2 grubuna kıyasla daha az olmasından kaynaklanmış olabilir. ATM inaktivasyonu düşmüş hücrelerde HIF-1 α reporter aktivitesinin azaldığı reporter assay ile belirlenmiştir. Bu gruplara uygulanan hipoksi sonrası ATM inaktivasyonu sağlanmış shATM gruplarında istatistiksel açıdan önemli bir HIF-1 α reporter aktivitesi değişimi gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.61, 4.62, 4.63, 4.64 ve 4.65). Bu durum hipoksi sırasında HIF-1 α ve TRIM29 artışının ATM bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuç Cam vd (2010) tarafından ifade edilen HIF-1 α aktivasyonu için ATM varlığının gerekliliği verileri ile uyumludur.

shATM gruplarında hipoksi uygulaması sonrası CAIX artışı ise, hipoksik upregülasyona uğrayan her genin farklı bir yolak tarafından kontrol ediliyor olabileceğini göstermektedir (Bkz. Şekil 6.61 ve 4.62). Bu durumu şöyle açıklayabiliriz, TRIM29 hipoksikde upregüle olmakta ve bu etki ATM kontrolünde HIF-1 α aracılı gerçekleşmektedir. Ancak hipoksi uygulaması sonrası ATM inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde CAIX upregülasyonunu belirlenmesi, CAIX upregülasyonu için HIF-1 α ile başka bir protein kinazın etkileşime geçiyor olabileceğini işaret etmektedir. Burada TRIM29 ekspresyonunun ATM/HIF-1 α etkileşimi ile düzenlendiğini, CAIX'un HIF-1 α ile bağlantılı başka bir yolak tarafından düzenleniyor olabileceğini göstermiş olduk.

SKBr3 ve MDA-MB-468 HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış shHIF-2 ve shHIF-3 gruplarında hipoksi uygulaması sonrası normoksiye kıyasla eş zamanlı qRT-PCR sonuçlarında istatistiksel açıdan önemli düzeyde TRIM29 değişimi gözlenmiştir. Aynı gruplar için western blot sonuçlarında TRIM29 protein ekspresyonunda küçük oranlarda artış belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.66, 4.67 ve 4.68). İki hücre grubunda kontrol ve shHIF grupları için, normoksi ve hipoksi koşullarındaki TRIM29 reporter aktivitesi, TRIM29 reporter assay plazmidi kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol grubunda hipoksik koşullarda normoksiye kıyasla TRIM29 reporter aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. shHIF gruplarında ise normoksi durumunda kontrol grubuna kıyasla TRIM29 aktivitesi azalırken, hipoksi uygulaması sonrası bu grupların TRIM29 reporter aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli bir artış belirlenememiştir (Bkz. Şekil 4.69 ve 4.70). HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmasına karşın TRIM29 ekspresyonundaki küçük fakat istatistiksel açıdan önemli bu artışın nedeni hücrede hala daha aktif olarak bulunan ATM proteini olabilir. Ayrıca eş zamanlı qRT-PCR sonuçları incelendiği zaman küçük oranlarda HIF-1 α mRNA ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Artan küçükte olsa mRNA ekspresyonu HIF-1 α protein miktarını arttırmış ve TRIM29 ekspresyonu bu yolla artmış olabilir. Bizim çalışmamız ile SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksik HIF-1 α ve TRIM29 artışı için ATM gerekliliğini göstermiş olduk. Aynı hücre gruplarında hipoksik TRIM29 artışı için HIF-1 α gerektiğini ayrıca bu bağlantıda ATM proteininin etkisinin daha yüksek olduğunu göstermiş olduk.

HIF-1 aktivitesinin, HIF-1 α proteininin post-translasyonel kontrolü yoluyla sağlandığı bilinmektedir (Huang vd 1998). Hipoksik HIF-1 α ve TRIM29 artışının SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde transkripsiyonel seviyede mi yoksa translasyonel seviyede mi kontrol edildiğini araştırmak istedik. Hücrelere protein ve mRNA sentez inhibitörleri uygulandı ve hipoksi uygulaması sonrası western blot analizi yapıldı. HIF-1 α mRNA ekspresyonunun durdurulması, HIF-1 α protein miktarının hipoksi boyunca artışına herhangi bir etkisinin olmadığını meme kanseri hücrelerinde gösterdik. Protein ekspresyonunun durdurulmasının ise mRNA sentezi devam etse dahi hipoksi uygulaması sonrası HIF-1 α protein varlığını engellediğini gözlemledik. TRIM29 ekspresyon artışının ise hem transkripsiyonel hem de translasyonel aşamada kontrol edildiğini göstermiş olduk. Hipoksi uygulaması sonrası TRIM29 protein ekspresyonu artışı için hem mRNA hem de protein ekspresyonu gerektiğini belirlemiş olduk (Bkz. Şekil 4.71 ve 4.72).

Bu aşamaya kadar elde ettiğimiz verileri özetleyecek olursak ATM HIF-1 α 'yı iki farklı şekilde etkilemektedir. Bunlardan birincisi normoksi koşullarında bazal HIF-1 α mRNA ekspresyonu için ATM gerekmektedir. İkincisi ise hipoksik koşullar altında

HIF-1 α mRNA ve protein ekspresyonu artışı için ATM proteini varlığına ihtiyaç vardır. Ayrıca normoksi koşullarında ATM proteinini HIF-1 α mRNA ekspresyonu NF- κ B aracılığı ile yapmaktadır. Bunun yanında HIF-1 α aracılı TRIM29 ekspresyonu artışında ATM proteini aktivasyonu şarttır. Bu çalışmamız ATM proteininin normoksi koşullardaki görevlerinin yanı sıra hipoksinin oluşturduğu hücrel yanıtarda da görev alabileceğini işaret etmektedir.

Büyüyen bir tümör içerisinde oluşan hipoksik kısımlara (oksijen varlığının kısıtlı olduğu tümör bölgeleri) karşı hücrel yanıt (anjiogenetik uyarılar) ileri tümörjenik ve metastatik değişimleri tetikler. Artmış HIF-1 α birçok kanser türünde belirlenmiştir (Semenza 2010). Hipoksik koşullarda HIF-1 α , VEGF (Buchler vd 2003) ve SDF-1 (Ceradini vd 2004) gibi damar gelişimini tetikleyen genlerin ekspresyonunu uyarır. Önceden bahsedildiği üzere idrar kesesi, kolorektal, akciğer ve pankreas kanserinin içinde bulunduğu bazı kanserlerde TRIM29 ekspresyon artışı daha agresif bir oluşum ile ilişkilidir. Bunun aksi yönde ise Nacht vd (1999) primer meme tümörlerinin yaklaşık %50'sinin, normal meme dokusuna kıyasla 10 kat daha az miktarda TRIM29 ekspresyonu ettiğini göstermişlerdir. Liu vd (2012a) ve Ai vd (2014) azalmış TRIM29 ekspresyonunun daha agresif meme kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular TRIM29'un köken aldığı kanser türüne göre onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak davranabileceğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında en son basamak olarak TRIM29-TWIST1 arasındaki doğrudan ilişkiyi araştırdık. Azalan TRIM29 ekspresyonunun, artmış TWIST1 ekspresyonunu işaret etmesi ve Ai vd (2014) tarafından açıklanan TRIM29, TWIST1 ilişkisinden yola çıkarak bu bağlantıyı yeniden test ettik. SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri ve HMEC meme epiteli hücresinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun arttığını gözlemledik (Bkz. Şekil 4.73, 4.74, 4.75 4.76 ve 4.77). TRIM29 inaktif hücrelerde ayrıca TWIST1 reporter aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.78). TWIST1 azalışının TRIM29 üzerine nasıl etki edeceğini görmek için TWIST1 inaktivasyonu sağlandı ve takibinde hem TRIM29 mRNA hem de protein ekspresyonunun arttığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.79 ve 4.80). Uyarılmış TRIM29 ve TWIST1 artışının gen ekspresyonları üzerine etkisini araştırmak için SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde rekombinant olarak hem TRIM29 hem de TWIST protein ekspresyonu artışı sağlandı. Uyarılmış TRIM29 protein ekspresyonu artışını takiben TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun düştüğü belirlendi (Bkz. Şekil 4.81 ve 4.82). Diğer taraftan uyarılmış TWIST1 protein ekspresyonu artışını takiben TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.83 ve 4.84).

TWIST1 bHLH transkripsiyon ailesi üyesidir ve farklı tümör hücrelerinde ifadesinin arttığı bilinmektedir. Bu transkripsiyon ailesinin üyeleri kanserleşme sürecinde epitelial mezenkimal dönüşümü tetiklerler. Bu nedenle artmış TWIST1 ekspresyonu metastatik fenotip ile ilişkilidir (Yang vd 2004). Bizim çalışmamızda azalan TRIM29 ifadesinin TWIST1 ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Artan TWIST1 varlığının EMT belirleyici genlerin ekspresyonunu nasıl etkilediğini görmek için TRIM29 inaktivasyonu sağlanan hücrelerde E-kaderin, N-kaderin, EpCAM ve Vimentin genlerinin ekspresyonu test edildi. Artmış Vimentin ve N-kaderin ekspresyonu, meme kanserinin de arasında bulunduğu birçok kanser türünde

belirlenmiştir (Nakajima vd 2004, Satelli ve Li 2011). E-kaderin normal epiteliyal hücrelerde eksprese edilir ve hücre-hücre bağlantısının düzenlenmesinde görev alır. E-kaderin ekspresyonunun lobüler tip tümörlerde azaldığı gösterilmiştir (Singhai vd 2011). EpCAM hücre-hücre bağlantısında görev alan diğer bir adhezyon proteindir ve epiteliyal birçok kanser türünde ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Osta vd 2004).

Bizim çalışmamızda SKBr3 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası Vimentin ve N-kaderin mRNA ekspresyonunun arttığı, EpCAM mRNA ekspresyonunun ise azaldığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.85). Bu hücre hattında E-kaderin mRNA ekspresyonu tespit edilememiştir. MDA-MB-468 hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası Vimentin mRNA ekspresyonu artarken, E-kaderin ve EpCAM mRNA ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.86). MDA-MB-468 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyonu tespit edilmemiştir. HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası Vimentin ve N-kaderin mRNA ekspresyonu artmış, EpCAM ve E-kaderin mRNA ekspresyonu ise azalmıştır (Bkz. Şekil 4.87). Bu sonuçlar TRIM29 inaktivasyonunun kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini arttırdığını ve normal epitel hücrelerinin ise epiteliyal mezenkimal dönüşüme uğradığını göstermektedir. Burada ilginç olarak TRIM29 inaktivasyonunun EpCAM ekspresyonunu azaltmasıdır. Metastatik meme kanserinde artmış EpCAM ifadesi iyi şekilde tanımlanmıştır (Osta vd 2004). TRIM29 inaktivasyonunu takiben bu gen ifadesinin artması beklenirken azalmıştır. Bu sebeple konunun daha ileri düzeyde araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Önceden de bahsettiğimiz üzere TRIM29 ekspresyonuna sahip hücrelerde hipoksik koşullar altında TWIST1 ekspresyonunun değişmediğini belirledik. Bu durumun sebebinin TRIM29 mu yoksa başka bir yolak mı olduğunu anlamak için SKBr3 hücrelerinde TRIM29 geni mutasyonu lentiCHRISPRv2 aracılığı ile gerçekleştirilip bu hücreler ile birlikte en iyi TRIM29 inaktivasyonu sağlanan shTRIM29 grubu hipoksiye maruz bırakıldı. TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun hem lentiCHRISPTv2 grubunda hem de shTRIM29 grubunda arttığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.88, 4.89, 4.90 ve 4.91). Bu bulgular bize TRIM29'un hipoksi tarafından uyarılan TWIST1 artışını engellediğini göstermektedir.

Tez kapsamında ATM, HIF-1 α ve TRIM29 inaktivasyonu sağlanan hücrelerde gözle görülen büyüme değişimlerini test etmek için MTT analizi yapılmıştır. ATM ve HIF-1 α inaktivasyonu sağlanan SKBr3, MDA-MB-468 kanseri hücreleri ile HMEC meme epiteli hücresinde hücre büyüme hızları düşmüştür (Bkz. Şekil 4.92 ve 4.93). Bu üç hücre grubunda TRIM29 inaktivasyonu sonrası hücre bölünme hızları artmıştır (Bkz. Şekil 4.94). Bu veriler ATM ve HIF-1 α 'nın hücre bölünmesi ve büyümesi için gerekli birçok yolak ile bağlantısından dolayı hücrelerin olduğundan daha yavaş bölünmelerine yol açtığını göstermektedir. TRIM29'un ise meme kanseri ve normal meme epiteli hücrelerinde, hücre büyümesinin kontrolünde önemli olduğunu göstermektedir.

Ye vd (2007) meme kanserli bireylerde azalmış ATM mRNA ekspresyonunun düşük hayatta kalma olasılığı ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Liu vd (2012a) düşük TRIM29'un daha agresif tümör özellikleri ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Galvan vd (2014) kolorektal kanserde artmış TWIST1 ekspresyonuna sahip hastalarda yaşam süresinin kısaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada Kaplan-Meier internet

sitesindeki 2015 güncel verileri kullanılarak ATM, TRIM29 ve TWIST1 ekspresyonu değişimlerinin meme kanseri hastalarında hayatta kalma sürelerini nasıl etkilediğini inceledik. Meme kanseri hastalarında azalmış ATM ve TRIM29 ekspresyonunun daha kısa hayatta kalma ile ilişkili olduğunu gösteren grafikleri elde ettik (Bkz. Şekil 4.95 ve 4.96). Diğer taraftan meme kanseri hastalarında artmış TWIST1 ekspresyonunun daha kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu sonucunu grafik ile gösterdik (Bkz. Şekil 4.97).

ATM, NF- κ B, HIF-1 α ve TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış bütün hücrelerin mikroskopik fotoğrafları çekildi. ATM, NF- κ B ve HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin fenotipinde bir değişim gözlenmedi (Bkz. Ek-2, 3 ve 4). TRIM29 inaktivasyonu sonucu ise hücrelerin fenotipinin değiştiğini belirledik (Bkz. Ek-5). Bu durum TRIM29 inaktivasyonu sonucu değişen Vimentin, E-kaderin, N-kaderin ve EpCAM gibi EMT belirteçlerinin etkisi sonucu ortaya çıkmış olabilir.

Meme kanseri ve diğer kanser çeşitleri için hedef odaklı tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Biyolojik tedavi yöntemlerinde kanserli hücrelerin gen aktivasyonu profillerinin bilinmesi önemlidir. Bu sebeple farklı kanser türlerindeki, kanserli hücreleri diğer hücrelerden ayıran özelliklerin ortaya çıkarılması kanser çalışmalarının temelini oluşturur. Ayrıca ortaya çıkarılan her bir yeni büyüme faktörü reseptörü, tümör baskılayıcı gen ve bunların bağlantı kurduğu diğer protein ve genler hakkındaki bilgi birikimi yeni fikirler ve yeni ilaçlar geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Çalışmamızda meme kanseri için tümör baskılayıcı protein olduğu düşünülen ATM ve TRIM29 arasındaki bağlantı meme kanseri ve meme epiteli hücrelerinde karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Ayrıca birçok kanser türünde aşırı ekspresyona uğrayan *TWIST1* geninin bu iki tümör baskılayıcı gen ile ilişkisi araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmanın meme kanseri ile mücadelede, hedef odaklı tedavi süreçlerine yarar sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında;

1. MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, T47-D, MCF-10, HMEC, SKBr3 ve BT-549 hücrelerinde *TRIM29* gen ekspresyon seviyeleri saptandı.
2. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde bazal seviyede HIF-1 α ve *TRIM29* mRNA ekspresyonu için ATM protein kinazın varlığının gerekli olduğu gösterildi. *TRIM29* protein ekspresyonu için ATM gerekliliği belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde bazal seviyede HIF-1 α ekspresyonu için ATM gerekliliği gösterildi. *TWIST1* ekspresyonu kontrolünün ATM kontrolünde *TRIM29* aracılığı ile yapıldığı belirlendi. ATM aktivite kaybının *TRIM29* eksprese eden hücrelerde *TWIST1* ekspresyonunu arttırdığı, *TRIM29* eksprese etmeyen hücrelerde ise ATM inaktivasyonunun *TWIST1* ekspresyonu üzerine bir etkisi olmadığı gösterildi.
3. *TRIM29* proteininin SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde IR tarafından oluşturulan hücresel strese karşı herhangi bir değişime uğramadığı belirlendi.
4. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde bazal seviyede HIF-1 α ve *TRIM29* ekspresyonu için NF- κ B proteininin işlevsel olması gerektiği gösterildi. NAC kullanılarak azaltılan hücresel stresin HIF-1 α ve *TRIM29* ekspresyonunu azalttığı belirlendi.
5. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde ATM'den bağımsız olarak azalan HIF-1 α ekspresyonunun, bazal *TRIM29* mRNA ve protein ekspresyonunu azalttığı belirlendi. *TRIM29* ifadesine sahip hücrelerde, HIF-1 α aktivite kaybının *TWIST1* mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığını bunun aksine *TRIM29* ifade etmeyen hücrelerde HIF-1 α ekspresyonunda azalmayı takiben *TWIST1* mRNA ekspresyonunun azaldığı gösterildi.
6. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde hipoksik koşullar altında artan HIF-1 α ekspresyonunu takiben *TRIM29* mRNA ve protein ekspresyonunun arttığı belirlendi. Hipoksik koşullarda *TWIST1* ekspresyonunun, *TRIM29* eksprese eden hücrelerde değişmediği gösterildi. *TRIM29* eksprese etmeyen hücrelerde *TWIST1* mRNA ve protein ekspresyonunun hipoksik koşullarda arttığı gösterildi.
7. SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde hipoksik *TRIM29* mRNA ve protein ekspresyonu artışının ATM ve HIF-1 α bağımlı olarak gerçekleştiği belirlendi. HIF-1 α reporter aktivitesinin hipoksik koşullarda ATM proteinine bağımlı olduğu gösterildi. Hipoksik CAIX artışının ATM'den bağımsız, HIF-1 α 'ya bağımlı olarak gerçekleştiği belirlendi.

8. SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde farklı zamanlarda hipoksi uygulamasının TRIM29 ve HIF-1 α 'nın mRNA ve protein ekspresyonunu nasıl etkilediği gösterildi. TWIST1 mRNA ekspresyonunun TRIM29 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde farklı zamanlı uygulanan hipoksiden nasıl etkilendiği gösterildi.
9. Hipoksik TRIM29 ekspresyon artışının hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede kontrol edildiği gösterildi.
10. TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunun SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerde arttığını, buna paralel olarak azalmış TWIST1 ekspresyonunun da TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonu artışını sağladığı gösterildi. Uyarılmış TRIM29 aktivasyonunun TWIST1 mRNA ve protein ekspresyonunu baskıladığı yine buna paralel olarak uyarılan TWIST1 aktivasyonunun TRIM29 mRNA ve protein ekspresyonunu baskıladığı gösterildi.
11. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde TRIM29 inaktivasyonu sonrası EMT belirteç genleri olarak bilinen Vimentin, E-kaderin, N-kaderin ve EpCAM ekspresyonlarının değiştiği gösterildi. TRIM29 inaktivasyonunun bu hücrelerde malin fenotipi tetiklediği belirlendi.
12. SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücrelerinde, ATM ve HIF-1 α inaktivasyonlarının bu hücrelerin büyüme hızını azalttığı belirlendi. Aynı hücre gruplarında TRIM29 inaktivasyonunun ise hücrelerin bölünme hızını arttırdığı belirlendi.
13. Azalmış ATM ve TRIM29 düzeyinin meme kanseri hastalarının hayatta kalma sürelerini kısalttığı belirlendi. Bunun aksine azalmış TWIST1'in ise meme kanseri hastalarının hayatta kalma sürelerini uzattığı belirlendi.

7. KAYNAKLAR

- AHMED, M. and RAHMAN, N. 2006. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*, 25: 5906-5911.
- AI, L., KIM, W., DEMIRCAN, B., DYER, L.M., BRAY, K.J., SKEHAN, R.R., MASSOLL, N.A. and BROWN, K.D. 2008. The transglutaminase 2 gene (*TGM2*), a potential molecular marker for chemotherapeutic drug sensitivity, is epigenetically silenced in breast cancer. *Carcinogenesis*, 29(3): 510-518.
- AI, L., SKEHAN, R.R., SAYDI, J., LIN, T. and BROWN, K.D. 2012. Ataxia-Telangiectasia, Mutated (ATM)/Nuclear Factor κ light chain enhancer of activated B cells (NF κ B) signaling controls basal and DNA damage-induced transglutaminase 2 expression. *J Biol Chem*, 287(22): 18330-18341.
- AI, L., WAN-JU, K., ALPAY, M., TANG, M., PARDO, C.E., HATAKEYAMA, S., MAY, W.S., KLABDE, M.P., HELDERMON, C.D., SIEGEL, E.M. and BROWN, K.D. 2014. TRIM29 suppresses TWIST1 and invasive breast cancer behavior. *Cancer Research*, 74(17): 4875-4887.
- ALLARD, S.T.M. 2008. Bioluminescent Reporter Genes. *Promega Notes*, 7: 1-8.
- ALPAY, M., BACKMAN, L.R.F., CHENG, X., DÜKEL, M., KIM, W.J., AI, L. and BROWN, K.D. 2015. Oxidative stress shapes breast cancer phenotype through chronic activation of ATM-dependent signaling. *Breast Cancer Res Treat.*, 151: 75-87.
- ALPÖZGEN, A.Z. 2013. Meme Kanseri Tedavisine İlişkin Üst Ekstremitte Sorunlarında Pilates Temelli Egzersizlerin Etkinliği. Doktora Tezi (yayınlanmamış), İstanbul Üniversitesi, 129s.
- ANGELE, S, and HALL, J. 1999. The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? *Mutation Research*, 462: 167-178.
- APOSTOLOU, P. and FOSTIRA, F. 2013. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Research International*, 2013: 1-11
- AVRAHAM, A., CHO, S.S., UHLMANN, R., POLAK, M.L., SANDBANK, J., KARNI, T., PAPPO, L., HALPERIN, R., VAKNIN, Z., SELLA, A., SUKUMAR, S. and EVRON, E. 2014. Tissue Specific DNA Methylation in Normal Human Breast Epithelium and in Breast Cancer. *Plos One*, 9(3): 1-8.
- BAKKENIST, C.J. and KASTAN, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421: 499-506.
- BANIN, S., MOYAL, L., SHIEH, S.y., TAYA, Y., ANDERSON, C.W., CHESSA, L., SMORODINSKY, N.I., PRIVES, C., REISS, Y., SHILOH, Y. and ZIV, Y.

1998. Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*, 281(5383): 1674-1677.
- BARDOS, J.I. and ASHCROFT, M. 2005. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1755: 107-120.
- BAYLIN, S.B. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2: 4-11.
- BEISHLINE, K., KELLY, C.M., OLOFSSON, B. A., KODURI, S., EMRICH, J., GREENBERG, R.A. and AZIZKHAN-CLIFFORD, J. 2012. Sp1 Facilitates DNA Double-Strand Break Repair through a Nontranscriptional Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*. 32(18): 3790–3799.
- BELAIBA, R.S., BONELLO, S., ZAHNINGER, C., SCHMIDT, S., HESS, J., KIETZMANN, T. and GORLACH, A. 2007. Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor κ B in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18: 4691-4697.
- BENCOKOVA, Z., KAUFMANN, M.R., PIRES, I.M., LECANE, P.S., GIACCIA, A.J. and HAMMOND, E.M. 2009. ATM activation and signaling under hypoxic conditions. *Molecular Cell Biology*, 29(2): 526-537.
- BHOUMIK, A., TAKAHASHI, S., BREITWEISER, W., SHILOH, Y., JONES, N. and RONAI, Z. 2005. ATM-Dependent Phosphorylation of ATF2 Is Required for the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 18: 577–587.
- BIGLIA, N., DEFABIANI, E., PONZONE, R., MARIANI, L., MARENCO, D. and SÌSMONDÌ, P. 2004. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocrine-Related Cancer*, 11: 69–83.
- BISWAS, D.K., SHI, Q., BAILY, S.I., STRICKLAND, L., GHOSH, S., PARDEE, A.B. and LGLEHART, D. 2004. NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *PNAS*, 101(27): 10137-10142.
- BOMBONATI, A. and SGROI, D. C. 2011. The molecular pathology of breast cancer progression. *Journal of Pathology*, 223: 307-317.
- BRANTLEY, D.M., CHEN, C.L., MURAOKA, R.S., BUSHDID, P.B., BRADBERRY, J.L., KITTRELL, F., MEDINA, D., MATRISIAN, L.M., KERR, L.D. and YULL, F.E. 2001. Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Regulates Proliferation and Branching in Mouse Mammary Epithelium. *Molecular Biology of Cell*, 12: 1445-1455.
- BRASIER, A.R., TATE, J.E. and HABENER, J.F. 1989. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*,

7(10): 1116-1122.

- BROWN, K.D., LATAKES, T.A., SHANGARYI, S., MANNINO, J.L., GIARDINA, J.F., CHEN, J and BASKARANI, R. 1999. Ionizing Radiation Exposure Results in Up-regulation of Ku70 via a p53/Ataxia-Telangiectasia-mutated Protein-dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9): 6651-6656.
- BUCHLER, P., REBER, H.A., BUCHLER, M., SHRINKANTE, S., BUCHLER, M.W., FRIESS, H., SEMENZA, G.L. and HINES, O.J. 2003. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 26(1): 56-64.
- BUCKLEY, M.F., SWEENEY, K.J., HAMILTON, J.A., SINI, R.L., MANNING, D.L., NICHOLSON, R.I., DEFAZIO, A., WATTS, C.K., MUSGROVE, E.A. and SHERLAND, R.L. 1993. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 8(8): 2127-2133.
- BURNETTE, W.N. 1981. Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2): 195-203.
- BURROUGHS, S.K., KALUZ, S., WANG, D., WANG, K. MEIR, E.G.V. and WANG, B. 2013. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Medicinal Chemistry*. 5(5): 553-572.
- BUSCEMI, G., SAVIO, C., ZANNINI, L., MICCICHE, F., MASNADA, D., NAKANISHI, M., TAUCHI, H., KOMATSU, K., MIZUTANI, S., KHANNA, K., CHEN, P. and DELIA, D. 2001. Chk2 Activation Dependence on Nbs1 after DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15): 5214-5222.
- BUSTIN, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.
- CANCERAVOIDMID. 2015. Breast Cancer. [Http://canceravoidmid.com/what-are-the-main-risk-factors-for-developing-breast-cancer](http://canceravoidmid.com/what-are-the-main-risk-factors-for-developing-breast-cancer).
- CAM, H., EASTON, J.B., HIGH, A. and HOUGHTON, P.J. 2010. mTORC1 Signaling under Hypoxic Conditions Is Controlled by ATM-Dependent Phosphorylation of HIF-1 α . *Molecular Cell*, 40: 509-520.
- CAO, Y., BONIZZI, G., SEAGROVES, T.N., GRETEN, F.R., JOHNSON, R., SCHMIDT, E.V. and KARIN, M. 2001. IKK α Provides an Essential Link between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression during Mammary Gland Development. *Cell*, 107(6): 763-775.

- CAO, Y. and KARIN, M. 2003. NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Bio Neoplasia*, 8(2): 215-223.
- CAVADAS, M.A.S., MESNIERES, M., CRIFO, B., MANRESA, M.C., SELFRIDGE, A.C., SCHOLZ, C.C., CUMMINS, E.P., CHEONG, A. and TAYLOR, C.T. 2015. REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Scientific Reports*, 5: 1-12.
- CELESTE, A., PETERSEN, S., ROMANIENKO, P.J., CHEN, H.T., SEDELNIKOVA, O.A., COPPOLA, V., REDON, C., OLARU, A. and NUSSENZWEIG, A. 2002. Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science*, 296(5569): 922-927.
- CENTER, M., SIEGEL, R. and JEMAL, A. 2011. Estimated Number of New Cancer Cases by World Area, 2008. *Global Cancer Facts & Figures*, 2: 1-52.
- CERADINI, D.J., KULKARNI, A.R., CALLAGHAN, M.J., TEPPER, O.M., BASTIDAS, N., KLEINMAN, M.E., CAPLA, J.M., GALIANO, R.D., LEVINE, J.P. and GURTNER, G.C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8): 856-864.
- CHANDEL, N.S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C.E., SIMON, M.C. and SCHUMACKER, P.T. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11715-11720.
- CHANDEL, N.S., MCCLINTOCK, D.S., FELICIANO, C.E., WOOD, T.M., MELENDEZ, J.A., RODRIGUEZ, A.M. AND SCHUMACKER, P.T. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 275: 25130-25138.
- CHANG, H., SHYU, K.G., WANG, B.W. and KUAN, P. 2003. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by cyclical mechanical stretch in rat vascular smooth muscle cells. *Clinical Science*, 105: 447-456.
- CHATURVEDI, P., ENG, W.K., ZHU, Y., MATTERN, M.R., MISHRA, R., HURLE, M.R., ZHANG, Z., ANNAN, R.S., LU, Q., FAUCETTE, L.F., SCOTT, G.F., LI, X., CARR, S.A., JOHNSON, R.K., WINKLER, J.D. and ZHOU, B.B. 1999. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18(28): 4047-4054.
- CHEN, Y., CHEN, C.F., RILEY, D.J., ALLRED, D.C., CHEN, P.L., VON HOFF, D., OSBORNE, C.K. and LEE, W.H. 1995. Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science*, 270(5237): 789-791.

- CHO, K.H., CHOI, M.J., JEONG, K.J., KIM, J.J., HWANG, M.H., SHIN, S.C., PARK, C.G. and LEE, H.Y. 2014. A ROS/STAT3/HIF-1 α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion. *The Prostate*, 74(5): 528-536.
- CHRISTMAN, J.K. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21: 5483 – 5495.
- CRAENE, B.D. and BERX, G. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, 13: 97-110.
- CRAWFORD, T.O. 1998. Ataxia telangiectasia. *Semin. Pediatr. Neurol.* 5: 287–294.
- COGSWELL, P.C., GUTTRIDGE, D.C., FUNKHOUSER, W.K., and JR BALDWIN, A.S. 2000. Selective activation of NF- κ B subunits in human breast cancer: potential roles for NF- κ B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, 19: 1123-1131.
- CONDE, E., ALEGRE, L., PONTE, B., RAMOS, E., SAIZ, A., JIMENEZ, C. and GARCIA-BERMEJO, M.L. 2012. Hypoxia Inducible Factor1-Alpha (HIF-1 Alpha) Is Induced during Reperfusion after Renal Ischemia and Is Critical for Proximal Tubule Cell Survival. *Plos One*, 7(3): 1-14.
- CONNELLY, L., BARHAM, W., ONISHKO, H.M., SHERRILL, T., CHODOSH, L.A., BLACKWELL, T.S. and YULL, F.E. 2011. Inhibition of NF-kappaB activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden. *Oncogene*, 30(12): 1402-1412.
- COOPER, G.M. and HAUSMAN, R.E. 2000. The Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates, Inc., 6, 741-748, Sunderland (MA).
- COYLE, Y.M. 2004. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84: 273–288.
- CURADO, M.P. 2011. Breast cancer in the world: Incidence and mortality. *Salud Publica Mex.*, 53(5): 372-384.
- DERY, M-A.C., MICHAUD, M.D. and RICHARD, D.E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 535-540.
- DITCH, S. and PAULL, T.T. 2011. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Cell Press*, 37(1): 15-22.
- DOWNWARD, J. 2003. Targetting RAS signaling pathways in cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3: 11-22.

- DUMITRESCU, R.G. and COTARLA, I. 2005. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005?. *J. Cell. Mol. Med.*, 9(1): 208-221.
- DUROCHER, D. and JACKSON, S. P. 2001. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?. *Curr Opin Cell Biol.*, 13(2): 225-231.
- EROĞLU, O. 2011. Meme Kanseri Hastalarında TWIST, RARB2 ve ESR1 Genlerinin Metilasyon Durumlarının Metilasyon Spesifik HRM (MS-HRM) Yöntemiyle İncelenmesi. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 158s.
- FINLAY, J., ROBERTS, C.M., LOWE, G., LOEZA, J., ROSSI, J.J. and GLACKIN, C.A. 2015. RNA-based TWIST1 inhibition via dendrimer complex to reduce breast cancer cellmetastasis. *Biomed Res Int.*, 382745: 1-12.
- FORD, D., EASTON, D.F., STRATTON, M., NAROD, S. and ZELADA-HEDMAN, M. 1998. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families, *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 676–689.
- FORRISTAL, C.E., WINKLER, I.G., NOWLAN, B., BARBIER, V., WALKINSHAW, G. and LEVESQUE, J.P. 2015. Pharmacologic stabilization of HIF-1 increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood*, 121(5): 759-769.
- FOSTER, S.A., WONG, D.J., BARRETT, M.T. and GALLOWAY, D.A. 1998. Inactivation of p16 in Human Mammary Epithelial Cells by CpG Island Methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4): 1791-1801.
- FREIHOFF, D., KEMPE, A., BESTE, B., WAPPENSCHMIDT, B., KREYER, E., HAYASHI, Y., MEINDL, A., KREBS, D., WIESTLER, O.D., VONDEIMLING, A. and SCHMUTZLER, R.K. 1999. Exclusion of a major role for the PTEN tumoursuppressor gene in breast carcinomas. *British Journal of Cancer*, 79(5/6): 754–758.
- GALVAN, J.A., HELBLING, M., KOELZER, V.H., TSCHAN, M.P., BERGER, M.D., HADRIC, M., SCHNRIGER, B. and ZLOBEC, L. 2014. TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(2): 874-885.
- GIBSON, U.E.M., HEID, C.A. and WILLIAMS, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6(10): 995-1001.
- GIORDANO, S.H., COHEN, D.S., BUZDAR, A.U., PERKINS, G. and HORTOBAGYI, G.N. 2004. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer*, 101: 51-57.

- GIRARD, P-M., RIBALLO, E., BEGG, A. C., WAUGH, A. and JEGGO, P. A. 2002. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene*, 21: 4191-4199.
- GOODRICH, D.W. and LEE, W-H. 1993. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *BBA Reviews on Cancer*, 1155: 43-61.
- GORT, E.H., GROOT, A.J., VAN DER WALL, E., VAN DIEST, P.J. and VOOIJS, M.A. 2008. Hypoxic Regulation of Metastasis via Hypoxia-Inducible Factors. *Current Molecular Medicine*, 8: 60-67.
- GUO, Z., KOZLOV, S., LAVIN, M.F., PERSON, M.D. and PAULL, T.T. 2010. ATM Activation by Oxidative Stress. *Science*, 330: 517-521.
- HALLAM, S., GOVINDARAJULU, S., HUCKETT, B. and BAHL, A. 2015. BRCA1/2 Mutation-associated Breast Cancer, Wide Local Excision and Radiotherapy or Unilateral Mastectomy: A Systematic Review. *Clinical Oncology*, 27: 527-535.
- HARARI, D. and YARDEN, Y. 2000. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102-6114.
- HARRISON, L. and BLACKWELL, K. 2004. Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy? *The Oncologist*, 9(5): 31-40.
- HATAKEYAMA, S. 2011. TRIM proteins and cancer. *Nature*, 11: 792-804.
- HEIDEN, M.G.V., CANTLEY, L.C. and THOMPSON, C.B. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930): 1029-1033.
- HOLLIDAY, D.L. and SPEIRS, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13 (4): 1-17.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. and HARRIS, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015): 49-53.
- HOSOI, Y., KAPP, L.N., MURNANE, J.P., MATSUMOTO, Y., ENOMOTO, A., ONO, T. and MIYAGAWA, K. 2006. Suppression of anchorage-independent growth by expression of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC. *Biochem Biophys Res Commun.*, 348(2): 728-734.
- HOWARD, T.D., PAZNEKAS, W.A., GREEN, E.D., CHIANG, L.C., MA, N., ORTIZ DE LUNA, R.I. and JABS, E.W. 1997. Mutations in *TWIST*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genetics*, 15: 36-41.

- HU, C.J., WANG, L.Y., CHODOSH, L.A., KEITH, B. and SIMON, C. 2003. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24): 9361-9374.
- HUANG, L.E., GU, J., SCHAU, M. and BUNN, F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemistry*, 95: 7987-7992.
- INGVARSSON, S. 1999. Molecular genetics of breast cancer progression. *Cancer Biology*, 9: 277-288.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M.M., FERLAY, J., WARD, E. and FORMAN, D. 2011. Global Cancer Statistics. *American Cancer Society*, 61: 69-90.
- KANNO, Y., WATANABE, M., KIMURA, T., NONOMURA, K., TANAKA, S. and HATAKEYAMA, S. 2014. TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta Histochemica*, 116(5): 708-712.
- KAPLAN MEIER-PLOTTER. 2015. <http://www.kmplot.com/analysis/>.
- KARAHAN, G. 2015. Analysis of 45s Rna Promoter Methylation and Expression of rRNA Transcripts in Breast Cancer. Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi, 145s.
- KARDAŞ, E.Z.E. 2015. Meme Kanserinde TGF-B1 Geni Kodon 10 T29C ve HER2 Geni ILE655 Val Polimorfizmlerinin Risk Faktörü Olarak Değerlendirilmesi ve TGF-B1 Serum Düzeyi İle İlişkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 70s.
- KARIN, M. and BEN-NERIAH, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.*, 18: 621-623.
- KASHIWABA, M., TAMURA, G. and ISHIDA, M. 1994. Aberrations of the APC gene in primary breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 120(12): 727-731.
- KAWASAKI, H., TAIRA, K. and IS, K.V. 2005. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle*, 4(3): 442-448.
- KE, Q. and COSTA, M. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, 70(5): 1469-1480.
- KELLY, B.D., HACKETT, S.F., HIRATO, K., OSHIMA, Y., CAI, Z., ROWAN, A., YAN, Z., CAMPOCHIARO, P.A. and SEMENZA, G.L. 2003. Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Circulation Research*, 93: 1074-1081.
- KHANNA, K.K., LAVIN, M.F., JACKSON, S.P. and MULHERN, T.D. 2001. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*, 8: 1052-1065.

- KIM, D.W., SOVAK, M.A., ZANIESKI, G., NONET, G., ROMIEU-MOREZ, R., LAU, A.W., HAFER, L.J., YASWEN, P., STAMPFER, M., ROGERS, A.E., RUSSO, J. and SONENSHEIN, G.E. 2000. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*, 21(5): 871-879.
- KIRAGAWA, R. and KASTAN, M.B. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 70: 99-109.
- KLEEFF, J., KORNMAN, M., SAWHNEY, H. and KORC, M. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer*, 86: 399-407.
- KOCER, H. 2014. Meme kanseri tipleri. <https://www.memesaglik.com/hastalarimiz-icin/-meme-sagligi-kitapligi-tipleri.html>.
- KOONG, A.C., CHEN, E.Y. and GIACCIA, A.J. 1994. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Research*, 54(6): 1425-1430.
- LEE, J.H. and PAULL, T.T. 2005. ATM activation by DNA doublestrand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308: 551-554.
- LEE, J.H. and PAULL, T.T. 2007. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26: 77741-7748.
- LEMPIAINEN, H. and HALAZONETIS, T.D. 2009. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J.*, 28(20): 3067–3073.
- LI, L.Z., ZHANG, C.Z., LIU, L.L., YI, C., LU, S.X., ZHOU, X., ZHANG, Z.J., PENG, Y.H., YANG, Y.Z. and YUN, J.P. 2014. miR-720 inhibits tumor invasion and migration in breast cancer by targeting TWIST1. *Carcinogenesis*, 35(2): 469-478.
- LI, N., SHARON, B., HONGHAI, O., LI, G.C., COURTOIS, G., SHILOH, Y., KARIN, M. and ROTMAN, G. 2001. ATM Is Required for Ikb Kinase (IKK) Activation in Response to DNA Double Strand Breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(12): 8898-8903.
- LI, Q.F., WANG, X.R., YANG, Y.W. and LIN, H. 2006. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Research*, 16: 548-558.
- LI, Y., WANG, W., YANG, R., WANG, T., SU, T., WENG, D., TAO, T., LI, W., MA, D. and WANG, S. 2012. Correlation of TWIST2 up-regulation and epithelial–mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 124: 112-118.

- LIAO, D. and JOHNSON, R.S. 2007. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis*, 26: 281-290.
- LIM, D-S., KIM, S-T., XU, B., MASER, R.S., LIN, J., PETRINI, J.H.J. and KASTAN, M.B. 2000. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 404: 613-617.
- LIN, Q., CONG, X. and YUN, Z. 2011. Differential Hypoxic Regulation of Hypoxia-Inducible Factors 1 α and 2 α . *American Association for Cancer Research*, 10: 757-765.
- LIN, Y., LIU, A.Y., FAN, C., ZHENG, H., LI, Y., ZHANG, C., WU, S., YU, D, HUANG, Z., LIU, F., LUO, Q., YANG, C.J. and OUYANG, G. 2015. MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. *Scientific Reports*, 5: 1-12.
- LIVAK, K.J. and SCHMITTGEN, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LIU, X., YANG, J.M., ZHANG, S.S., LIU, X.Y and LIU, D.X. 2010. Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. *BMC Cancer*, 10(684): 1-8.
- LIU, J., WELM, B., BOUCHER, K.M., EBBERT, M.T.W. and BERNARD, P.S. 2012a. TRIM29 Functions as a Tumor Suppressor in Nontumorigenic Breast Cells and Invasive ER+ Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 180(2): 839-847.
- LIU, W., SHEN, S-M., ZHAO, X-Y. and CHEN, G-Q. 2012b. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2): 165-178.
- MA, G., HE, J., YU, Y., XU, Y., MARTINEZ, J., LONARD, D.M. and XU, J. 2015. Tamoxifen Inhibits ER-negative Breast Cancer Cell Invasion and Metastasis by Accelerating Twist1 Degradation. *International Journal of Biological Sciences*, 11: 618-628.
- MANSFIELD, C.M., KOMANRNICKY, L.T., SCHWARTZ, G.F., ROSENBERG, A.L., KRISHNAN, L., JEWELL, W.R., ROSATO, F.E., MOSES, M.L., HAGHBIN, M. and TAYLOR, J. 1995. Ten-Year Results in 1070 Patients with Stages I and II Breast Cancer Treated by Conservative Surgery and Radiation Therapy. *Cancer*, 75(9): 2328-2336.
- MCCREADY, D., HOLLOWAY, C., SHELLEY, W., DOWN, N., ROBINSON, P., SINCLAIR, S. and MIRSKY, D. 2004. Surgical management of early stage invasive breast cancer: a practice guideline. *Cancer Journal of Surgery*, 48(3): 185-19.

- MCKINNON, P.J. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep*, 5: 772-776.
- MCMAHON, S.B., BUSKIRK, H.A.V., DUGAN, K.A., COPELAND, T.D. and COLE, M.D. 1998. The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins. *Cell*, 94(3): 363-374.
- MCPHERSON, K., STEEL, C.M. and DIXON, J.M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7261): 624-628.
- MIYAMOTO, S. 2011. Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Research*, 21: 116-130.
- MOLL, U.M., RIOU, G. and LEVINE, A.J. 1992. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15): 7262-7266.
- MOORE, C.B., GLUTHRIE, E.H., HUANG, M.T.H. and TAXMAN, D.J. 2010. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol.*, 629: 141-158.
- MORRELL, D. CROMARTIE, E. and SWIFT, M. 1986. Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst.*, 77(1): 89-92.
- MORRISON, T.B., WEIS, J.J. and WITTEWER, C.T. 1998. Quantification of lowcopy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24(6): 954-962.
- NACHT, M., FERGUSON, T.T., ZHANG, W., PATROZIELLO, J.M., COOK, B.P., GAOP, Y.H., MAGUIRE, S., RILEY, D., COPPOLA, G., LANDES, G.M., MADDEN, S.L. and SUKUMAR, S. 1999. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Research*, 59(21): 5464-5470.
- NAKAJIMA, S., DOI, R., TOYODA, E., TSUJI, S., WADA, M., KOIZUMI, M., TULACHAN, S.S., ITO, D., KAMI, K., MORI, T., KAWAGUCHI, Y., FUJIMOTO, K., HOSOTANI, R. and IMAMURA, M. 2004. N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10: 4125-4133.
- NAPOLITANO, L.M. and MERONI, G. 2012. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life*, 64(1): 64-71.
- NASS, S.J. and DICKSON, R.B. 1997. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 44: 1-22.

- NOGUCHI, K., OKUMURA, F., TAKAHASHI, N., KATAOKA, A., KAMIYAMA, T., TODO, S. and HATAKEYAMA, S. 2011. TRIM40 promotes neddylation of IKK γ and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*, 32(7): 995-1004.
- OESTERREICH, S. and FUQUA, S.A.W. 1999. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 6: 405-419.
- OHMIYA, Y. 2014. Cell Based and Imaging. Biomedical Research Institute National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Report No: 305-8566 (yayınlanmamış), Japan.
- OKA, S., KAMATA, H., KAMATA, K., YAGISAWA, H. and HIRATA, H. 2000. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Letters*, 472: 196-202.
- OKUTUR, S.K. 2011. HER2 Pozitif Metastatik Meme Kanseri PTEN, p27 ve PI3K Ekspresyonunun Prediktif ve Prognostik Önemi. Doktora Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, 117s.
- OLDENBURG, R.A., MEIJERS-HEIJBOER, H., CORNELISSE, C.J. and DEVILEE, P. 2007. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63: 125-149.
- OSBORNE, C., WILSON, P. and TRIPATHY, D. 2004. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist*, 9(4): 361-377.
- OSTA, W.A., CHEN, Y., MIKHITARIAN, K., MITAS, M., SALEM, M., HANNUN, Y.A., COLE, D.J. and GILLANDERS, W.E. 2004. EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer Research*, 64(16): 5818-5824.
- OUSSET, M., BOUQUET, F., FALLONE, F., BIARD, D., DRAY, C., VALET, P., SALLES, B. and MULLER, C. 2010. Loss of ATM positively regulates the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) through oxidative stress. *Cell Cycle*, 9(14): 2814-2822.
- ÖZMEN, V. 2009. Breast Cancer in the World and Turkey. *J. Breast Health*, 4: 7-12.
- PAHL, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18(49): 6853-6866.
- PANDITA, T.K., LIEBERMAN, H.B., LIM, D.S., DHAR, S., ZHENG, W., TAYA, Y. and KASTAN, M.B. 2000. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene*, 19: 1386-1391.

- PFAFFL, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002-2007.
- PHAM, C.G., BUBICI, C., ZAZZERONI, F., KNABB, J.R., PAPA, S., KUNTZEN, C. and FRANZOSO. 2007. Upregulation of Twist-1 by NF- κ B Blocks Cytotoxicity Induced by Chemotherapeutic Drugs. *Molecular and Cellular Biology*, 27(11): 3920-3935.
- PHAROAH, P.D.P., DAY, N.E., DUFFY, S., EASTON, D.F. and PONDER, P.A.J. 1997. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 71: 800-809.
- PLATZER, M., ROTMAN, G., BAUER, D., UZIEL, T., SAVITSKY, K., BARSHIRA, A., GILAD, S., SHILOH, Y. and ROSENTHAL, A. 1997. Ataxia-Telangiectasia Locus: Sequence Analysis of 184 kb of Human Genomic DNA Containing the Entire ATM. *Genome Res.*, 7: 592-605.
- PORTER, P.L. 2009. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex*, 51(2): 141-146.
- PRICE, P., SIKORA, K. and LLLIDGE, T. 2008. Treatment of Cancer. Hodder Arnold, London, 1517p.
- PROMEGA. 2015. pGL3 Luciferase reporter vectors. <https://worldwide.promega.com>.
- QIN, Q., XU, Y., HE, T., QIN, C. and XU, J. 2012. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research*, 22: 90-106.
- RAYMOND, W. and RUDDON, M.D. 2007. Cancer Biology. Oxford University Press, New York, 423p.
- RENWICK, A., THOMPSON, D., SEAL, S., KELLY, P., CHAGTAI, T., AHMED, M. and RAHMAN, N. 2006. ATM mutations that cause ataxiatelangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetic*. 38: 873-875.
- REYMOND, A., MERONI, G., FANTOZZI, A., MERLA, G., CAIRO, S., LUZI, L. and BALLABIO, A. 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo Journal*. 20: 2140-51.
- RIUS, J., GUMA, M., SCHACHTRUP, C., AKKASOGLU, K., ZINKERNAGEL, A.S., NIZET, V., JOHNSON, R.S., HADDAD, G.G. and KARIN, M. 2008. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*, 453: 807-811.
- ROSATO, R.R., KOLLA, S.S., HOCK, S.K., ALMENARA, J.A., PATEL, A., AMIN, S., ATADJA, P., FISHER, P.B., DENT, P. and GRANT, S. 2009. Histone Deacetylase Inhibitors Activate NF- κ B in Human Leukemia Cells through an

- ATM/NEMO-related Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(13): 10064-10077.
- SANJANA, N.E., SHALEM, O. and ZHANG, F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 11: 783-784.
- SATELLI, A. and LI, S. 2011. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.*, 68(18): 3033-3046.
- SCHRAMM, A., DE, G.N., WIDSCHWENDTER, P., FINK, V. and HUOBER, J. 2015. Targeted Therapies in HER2-Positive Breast Cancer -a Systematic Review. *Breast Care*, 10(3): 173-178.
- SEMENZA, G.L. 2010. Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics. *Oncogene*, 29(5): 625-634.
- SHILOH, Y. and KASTAN, M.B. 2001. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.* 83: 209–254.
- SHILOH, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3: 155-168.
- SHILOH, Y. and ZIV, Y. 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 197-210.
- SHO, T., TSUKIYAMA, T., SATO, T., KONDO, T., CHENG, J. TAKASHI, S., ASAKA, M., HATAKEYAMA, S. 2011. TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochim Biophys Acta.*, 1813(6): 1245-1253.
- SHORT, K.M. and COX, T.C. 2006. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(13): 8970-8980.
- SINGHAI, R., PATIL, V.W., JAISWAL, S.R., PATIL, S.D., TAYADE, M.B. and PATIL, A.V. 2011. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci.*, 3(5): 227-233.
- SINGLETERY, K.W. and GAPSTUR, S.M. 2001. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, 286(17): 2143-2151.
- SINGLETERY, E. 2003 Rating the risk factors for breast cancer. *Annals of Surgery*, 237(4): 474-482.
- SNAPGENE. 2015. Plasmid Files. <https://www.snapgene.com>.

- SOVAK, M.A., BELLAS, R.E., KIM, D.W., ZANIESKI, G.J., ROGERS, A.E., TRAISH, A.M. and SONENSHEIN, G.E. 1997. Aberrant Nuclear Factor- κ B/Rel Expression and the Pathogenesis of Breast Cancer. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.*, 100(12): 2952–2960.
- STEEG, P.S. and ZHOU, Q. 1998. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 52(1): 17-28.
- STEWART, S.A., DYKXHOORN, D.M., PALLISER, D., MIZUNO, H., YU, E.Y., AN, D.S., SABATINI, D.M., CHEN, I.S., HAHN, W.C., SHARP, P.A., WEINBERG, R.A. and NOVINA, C.D. 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9(4): 493-501.
- STOREY, A., THOMAS, M., KALITA, A., HARWOOD, C., GARDIOL, D., MANTOVANI, F., BRUER, J., LEIGH, I.M., MATLASHEWSKI, G. and BANKS, L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature*, 393: 229-234.
- SUN, H., DAI, X. and HAN, B. 2014. TRIM29 as a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma. *Disease Markers*, 2014: 1- 7.
- SWIFT, M., MORREL, D., MASSEY, R.B. and CHASE, C.L. 1991. Incidence of Cancer 161 Families Affected by Ataxia Telangiectasia. *N Engl J Med*, 325: 1831–1836.
- T'ANG, A., VARLEY, J.M., CHAKRABORTY, S., MURPHREE, A.L. and FUNG, Y.K. 1988. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*, 242(4876): 263-266.
- TANG, Z.P., DONG, Q.Z., CUI, Q.Z., PAPAVALASSILIOU, P., WANG, E.D. and WANG, E.H. 2013. Ataxia-telangiectasia group D complementing gene (ATDC) promotes lung cancer cell proliferation by activating NF- κ B pathway. *Plos One*, 8(6): 1-12.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Dairesi Başkanlığı. 2006. 2004-2006 Yılları Türkiye Kanseri İnsidansı. [Http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf](http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf).
- THOMPSON, A.M., MORRIS, R.G., WALLACE, M., WYLLIE, A.H., STEEL, C.M. and CARTER, D.C. 1993. Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *Br J Cancer*, 68(1): 64-68.
- THOMPSON, D., DUEDA, S., KIRNER, J., MCGUFFOG, L., LAST, J., REIMAN, A., BYRD, P., TAYLOR, M. and EASTON, D.F. 2005. Cancer Risks and Mortality in Heterozygous ATM Mutation Carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 97: 813-822.

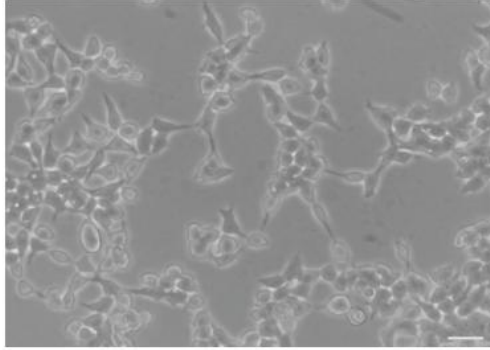
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. and GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9): 4530-4354.
- TRUJILLO, K.M., YUAN, S-S.F., LEE, E. and SUNG, P. 1998. Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and p95. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(34): 21447-21450.
- TSANG, V.C.W., HANCOCK, K. and SIMONS, A.R. 1984. Calibration of prestained protein molecular weight standards for use in the "Western" or enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques. *Analytical Biochemistry*, 143(2): 304-307.
- TURNA H. 2006. Erken Evre Meme Kanserinde Adjuvan Kemoterapi ve Hormonal Tedavi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi; 54: 105-109.
- UCHIDA, T., ROSSIGNOL, F., MATTHAY, M.A., MOUNIER, R., COUETTE, S., CLOTTE, E. and CLERICI, C. 2004. Prolonged Hypoxia Differentially Regulates Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression in Lung Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15): 14871-14878.
- UDEN, P.V., KENNETH, N.S. and ROCHA, S. 2008. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochemical Journal*, 412(3): 477-484.
- UDER, S., GEORGE, H. and BOEDEKER, B. 2011. Next Generation RNA Interference. *LSI*, 6(2): 1-6.
- VAUPEL, P. and MAYER, A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2): 225–239.
- VESUNA, F., DIEST, P.V., CHEN, J.H. and RAMAN, V. 2008. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(2): 235-241.
- VOGELSTEIN, B., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., KERN, S.E., PREISINGER, A.C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A.M. and BOS. J.L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*, 319: 525–532.
- WANG, G.L. and SEMENZA, G.L. 1995. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(3): 1230-1237.
- WANG, L., YANG, H., PALMBOS, P.L., NEY, G., DELZT, T.A., COLEMAN, D. DAVIS, M., ZHANG, M., TANG, W. SIMEONE, D.M. 2014. ATM/MAPKAP kinase 2 mediates radioresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 74(6): 1778-1788.

- WARBURG, O.H. 1930. The Metabolism of Tumours (translated from the German edition by F. Dickens), London: Constable & Co. Ltd, 11–25.
- WELLINGS, S.R., JENSEN, H.M. and MARCUM, R.G. 1975. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(2): 231–273.
- WHITE, J., KEARINS, O., DODWELL, D., HORGAN, K., HANBY, A.M. and SPEIRS, V. 2011. Male breast carcinoma: increased awareness needed. *Breast Cancer Research*, 13(219): 1-7.
- WOOD, K. 2007. The bioluminescence advantage. *Promega Notes*, 96: 3-5.
- WU, Z.H., SHI, Y., TIBBETTS, R.S. and MIYAMOTO, S. 2006. Molecular Linkage Between the Kinase ATM and NF- κ B Signaling in Response to Genotoxic Stimuli. *Science*, 311: 1141-1146.
- WU, Z.H., WONG, E.T., SHI, Y., NIU, J., CHEN, Z., MIYAMOTO, S. and TERGAONKAR, V. 2010. ATM and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Molecular Cell*, 40(1): 75–86.
- WUERZBERGER-DAVIS, S.M., NAKAMURA, Y., SEUFZER, B.J. and MIYAMOTO, S. 2007. NF- κ B activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene*, 26: 641-651.
- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R. and HALL, M.N. 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124: 471-484.
- WYKOFF, C.C., BEASLEY, N.J., WATSON, P.H., TURNER, K.J., PASTOREK, J., SIBTAIN, A., WILSON, G.D., TURLEY, H., TALKS, K.L., MAXWELL, P.H., PUGH, C.W., PATCLIFFE, P.J. and HARRIS, A.L. 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Research*, 60(24): 7075-7083.
- YAMASHITA, A., KASHIMA, I. and OHNO, S. 2005. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta.*, 1754(1-2): 305-315.
- YANG, J., MANI, S.A., DONAHER, J.L., RAMASWAMY, S., ITZYKSON, R.A., COME, C., SAVAGNER, P., GITELMAN, I., RICHARDSON, A. and WEINBERG, R.A. 2004. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, 117(7): 927-939.
- YANG, M.H., WU, M.Z., CHIOU, S.H., CHEN, P.M., CHANG, S.Y., LIU, C.J., TENG, S.C. and WU, K.J. 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology*, 10(3): 295-305.

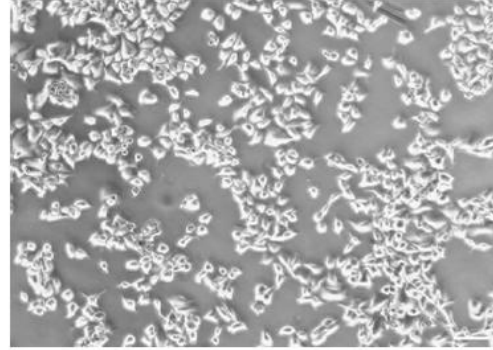
- YE, C., CAI, Q., DAI, Q., SHU, X., SHIN, A., GAO, Y. and ZHENG, W. 2007. Expression patterns of the *ATM* gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer*, 109(9): 1729-1735.
- YU, L., MU, Y., SA, N., WANG, H. and XU, W. 2013. Tumor necrosis factor α induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF- κ B signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer. *Oncology Reports*, 31(1): 321-327.
- YU, Y., ZHAO, Y., SUN, X-H., GE, J., ZHANG, B., WANG, X. and CAO, X-C. 2015. Down-regulation of miR-129-5p via the Twist1-Snail feedback loop stimulates the epithelial-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget*, 6(33): 34423-34436.
- YUAN, Z., VILLAGRA, A., PENG, L., COPPOLA, D., GLOZAK, M., SOTOMAYOR, E.M., CHEN, J., LANE, W.S. and SETO, E. 2010. The ATDC (TRIM29) Protein Binds p53 and Antagonizes p53-Mediated Functions. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12): 3004-3015.
- YUE, W., YAGER, J.D., WANG, J-P., JUPE, E.R. and SANTEN, R.J. 2013. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*, 78: 161-170.
- YUE, X., LIU, J. and FENG, Z. 2014. Tumor suppressor p53 and TRIM family proteins. *Cancer Cell and Microenvironment*, 1(6): 1-4.
- ZHENG, W., GUSTAFSON, D.R., MOORE, D., HONG, C.P., ANDERSON, K.E., KUSHI, L.H., SELLERS, T.A. and FOLSON, A.R. 1998. Well-Done Meat Intake and the Risk of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(22): 1724-1729.
- ZHONG, H., DE MARZO, A.M., LAGHNER, E., LIM, M., HILTON, D.A., ZAGZAG, D., BUECGLER, P., ISAACS, W.B., SEMENZA, G.L. and SIMONS, J.W. 1999. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1a in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Research*, 59: 5830-5835.
- ZHOU, B-B.S. and BARTEK, J. 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature Reviews Cancer*, 4: 216-225.

8. EKLER

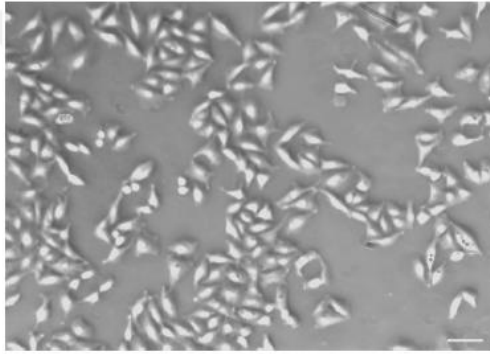
Ek-1. Çalışma kapsamında kültüre edilen hücrelerin mikroskopik görüntüleri



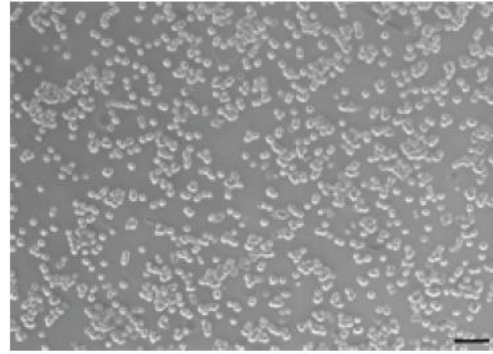
HEK-293FT



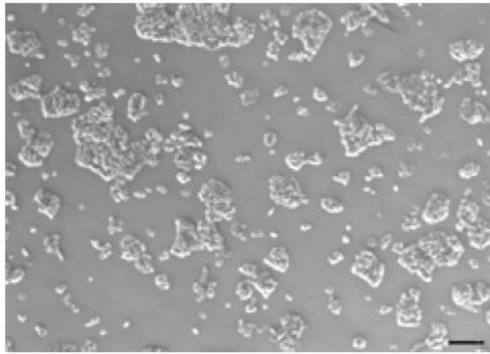
SKBr3



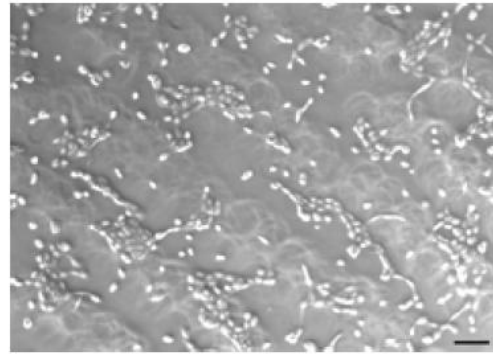
MDA-MB-231



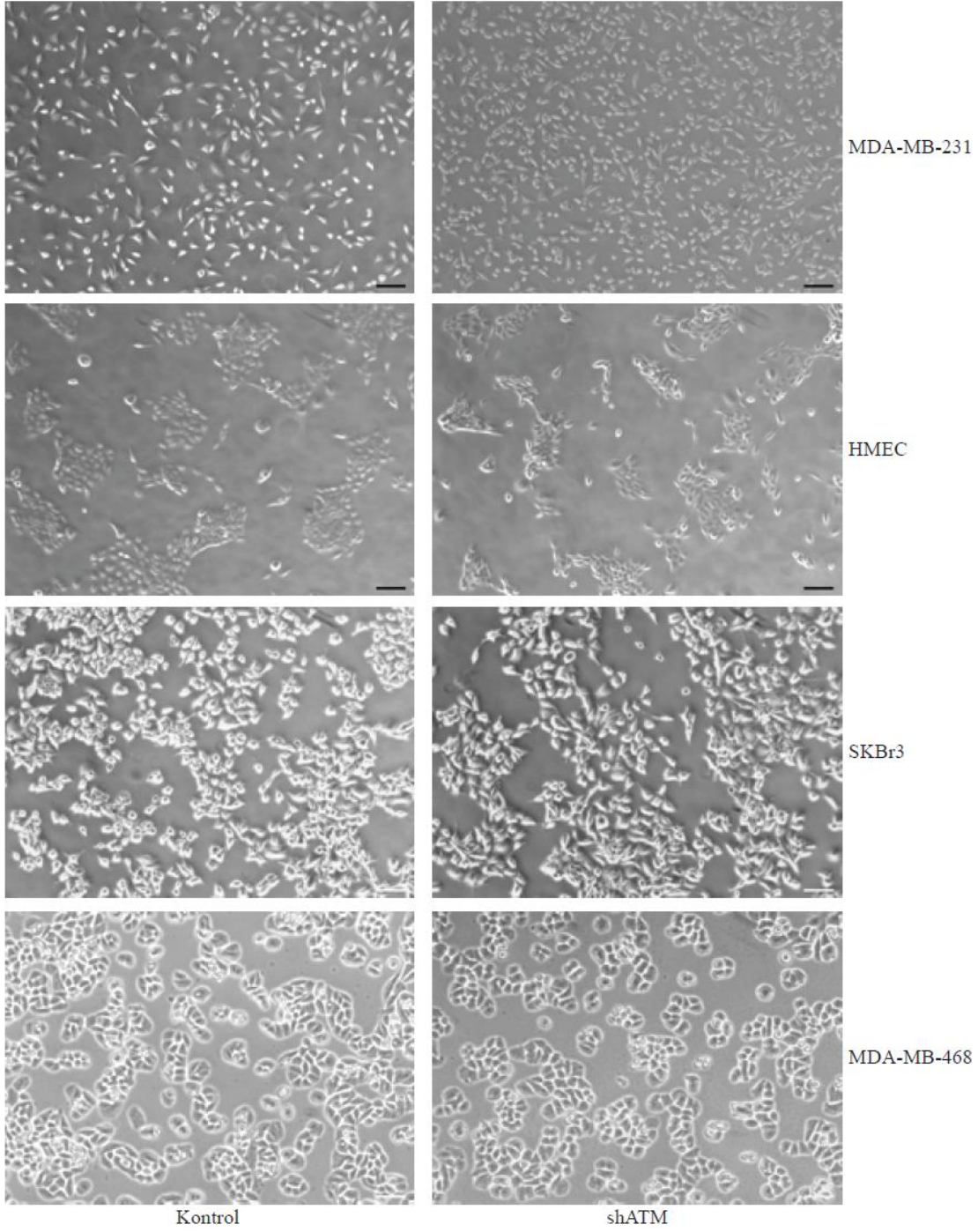
MDA-MB-468

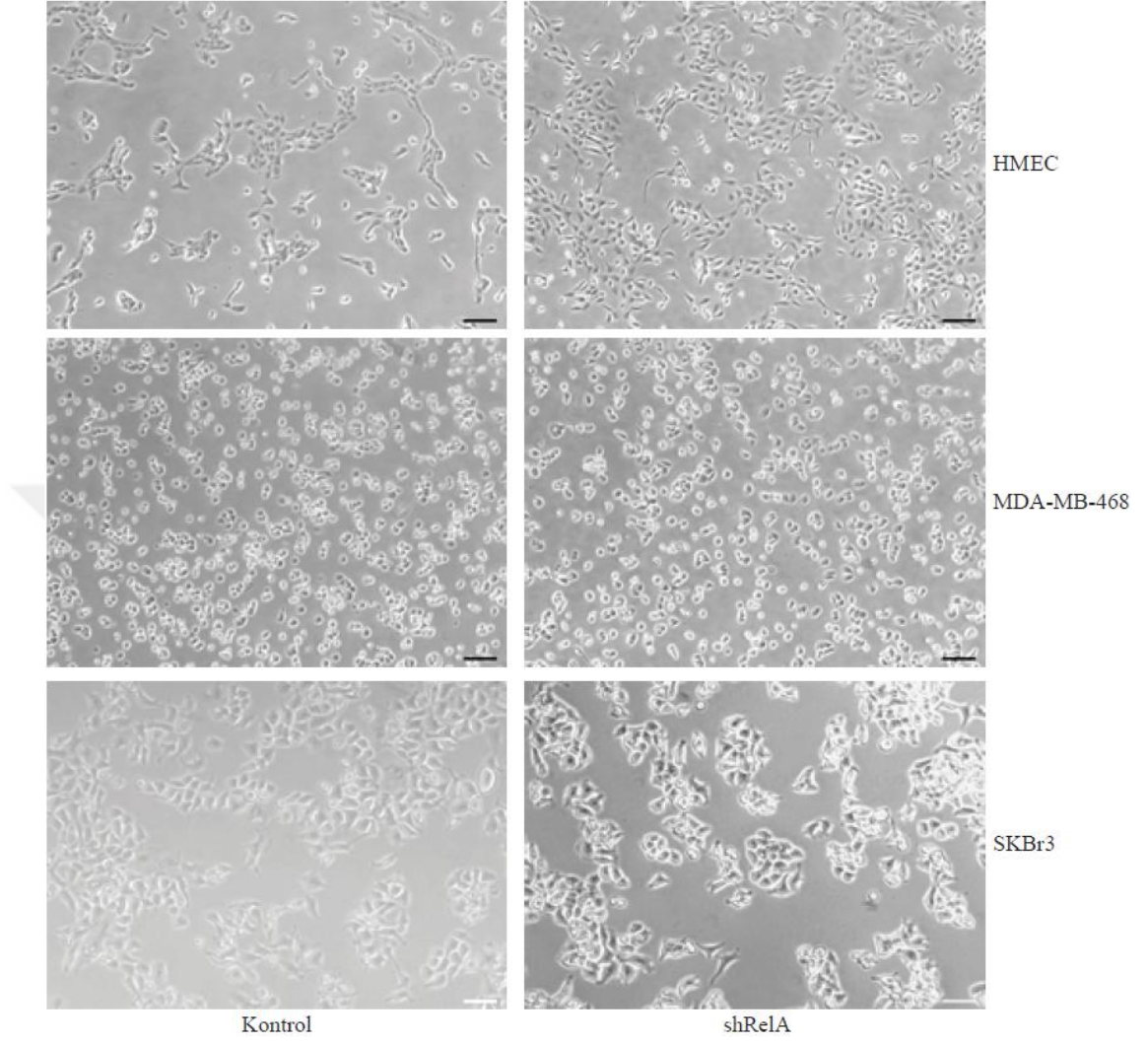


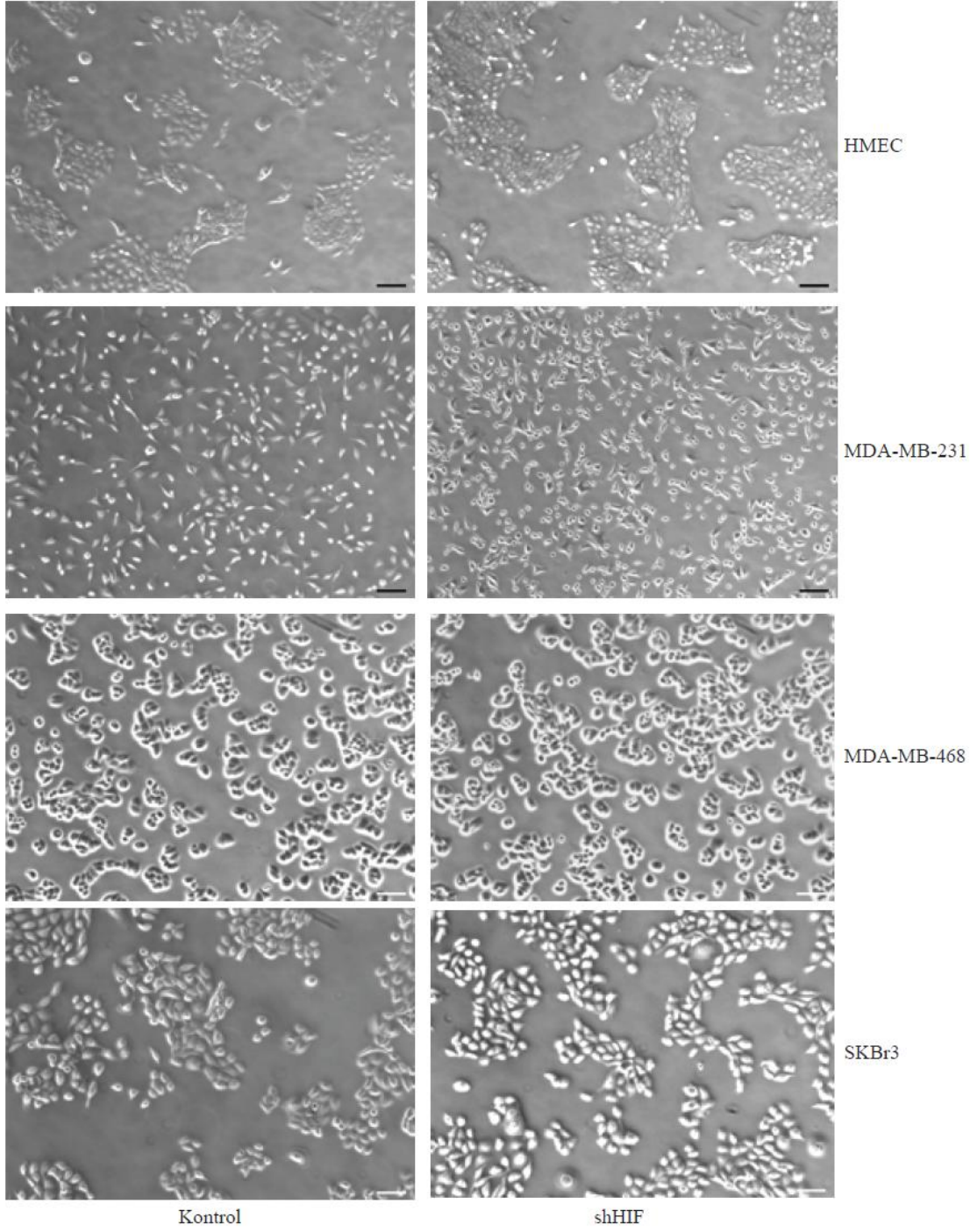
BT-549

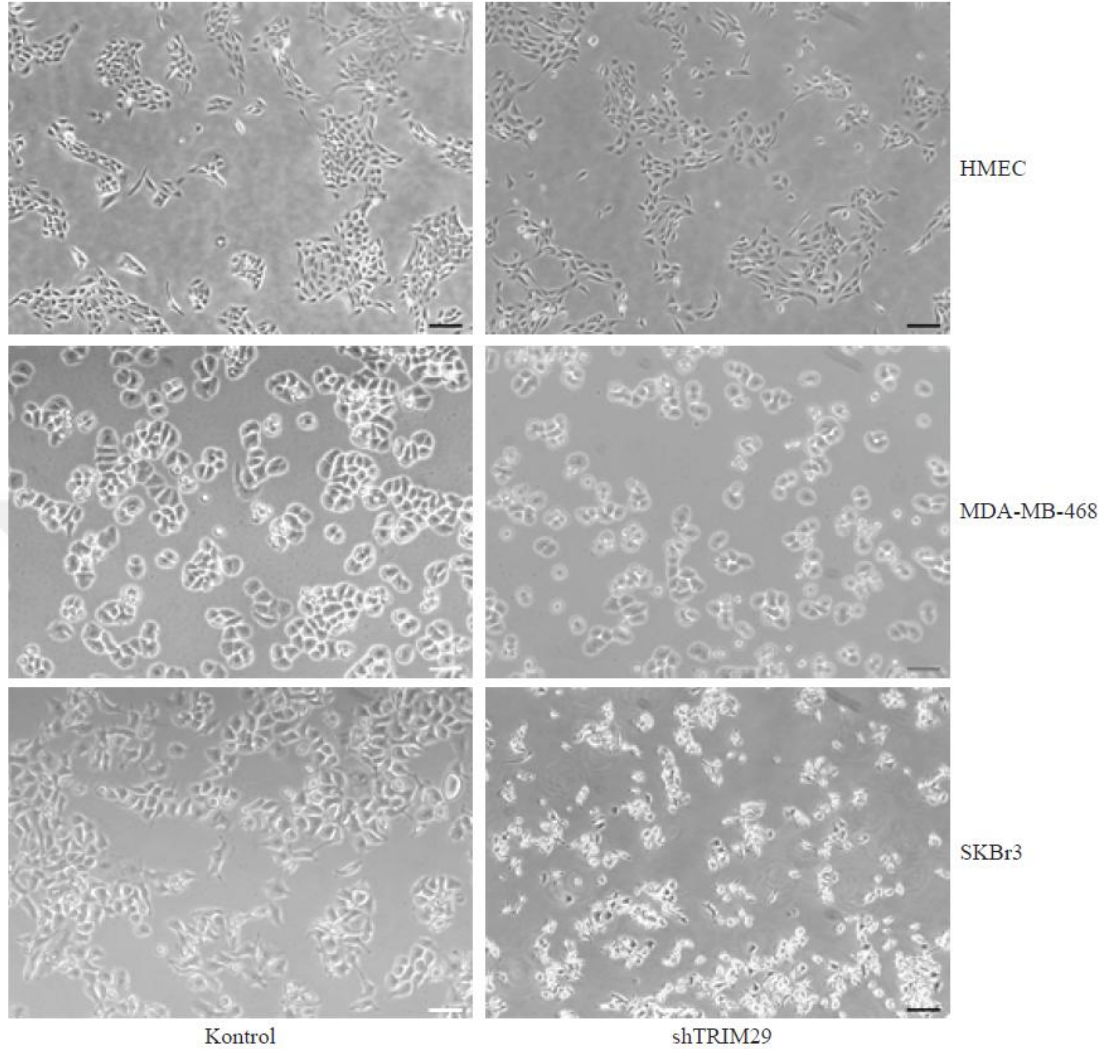


HMEC

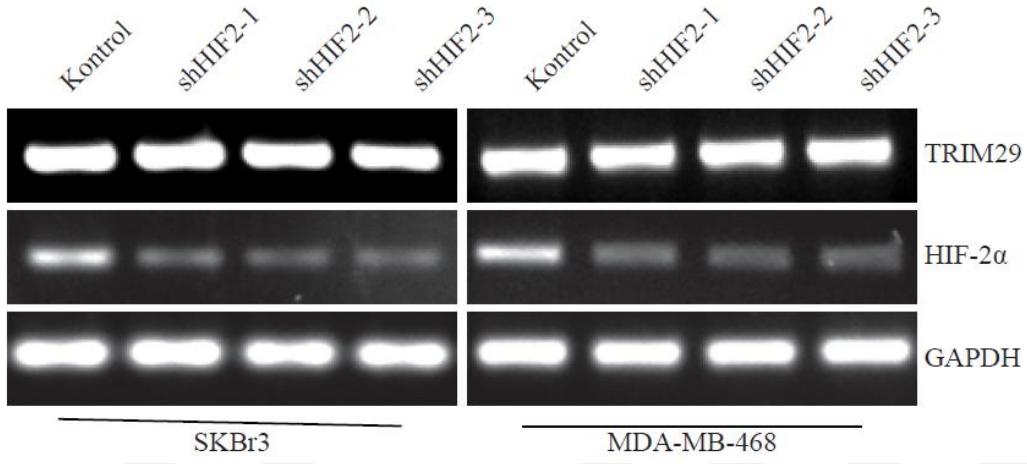
Ek-2. ATM inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri

Ek-3. NF- κ B inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri

Ek-4. HIF-1 α inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri

Ek-5. TRIM29 inaktivasyonu sağlanmış hücrelerin mikroskopik görüntüleri

Ek-6. HIF-2 α inaktivasyonu sonrası TRIM29 mRNA ekspresyonu değişimini gösteren RT-PCR sonuçları



ÖZGEÇMİŞ



Muzaffer DÜKEL 1984 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 2002 yılında girdiği İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünden 2007 yılında Biyoloji Öğretmeni olarak mezun oldu. Eylül 2008-Ocak 2011 yılları arasında, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı. 2008 yılından beri Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.