

BURCU SALMAN YAYLAZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MEME KANSERİNDE *DHRS2* GENİNİN ROL OYNADIĞI
MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN İNCELENMESİ

BURCU SALMAN YAYLAZ

DANIŞMAN
PROF. DR. NESLİHAN ABACI

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2024

İTHAF



Kardeşim Büşra'ya

TEŞEKKÜR

Benim için uzun ve bir o kadar öğretici olan doktora tez sürecimde bana güvenerek yolumu açan, kaybolduğumda yardımına koşan, desteğini ve güvenini hep hissettiğim biricik danışman hocam Prof Dr. Neslihan Abacı'ya ne kadar teşekkür etsem de yeterli olmayacaktır. Kendisiyle çalışmış olmak her zaman benim için bir gurur kaynağı olacaktır.

Laboratuvarda geçirdiğim sekiz sene boyunca bilgi birikiminden sıklıkla yararlandığım, kendisiyle çalışmaktan büyük bir keyif aldığım sevgili hocam Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci'ye bu süreçteki desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Sayın hocalarım Prof. Dr. Ahmet Gül ve Prof. Dr. Tamer Demiralp'e doktora sürecimde projelerine beni de katarak konfokal mikroskopta hayal edemeyeceğim deneyimleri kazandırdıkları için çok teşekkür ediyorum. Kendileriyle çalışmak benim için bir onurdur.

Ailemden daha fazla vakit geçirdiğim, mutluluğumu ve üzüntülerimi paylaştığım sevgili LAB2 üyelerine çok teşekkür ediyorum. Dr. Melda Sarıman, Dr. Zeliha Emrence ve Dr. Aris Çakiris'ten bana aktardıkları bilgi ve birikim için minnettarım. Aynı süreci paylaştığım diğer arkadaşlarım Dr. Elif Nur Bozdağ ve sevgili uzmanlarımız Şeyma Punar, Berk İleri, Damlanur Şakar, Büneyan Tüzün, Vahideh Zararajabi, Hümeysra Karaca, Büşra Karaçam, Sümbül Gezer ve Bahadır Kasap'a deney süreçlerimde ve doktora sürecinin getirdiği mental yükü baş edebilmemi sağladıkları için çok teşekkür ediyorum.

Sevgili dostlarım Meltem Akyol, Aybike Sena Ertuğrul, Pınar Büyükkaya'ya ihtiyaç duyduğum her anda yanımda oldukları ve destekleri için çok teşekkür ediyorum. İsimlerini saymaya sayfaların yetmeyeceği Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü bünyesinde ve özel hayatımda sohbetleriyle hoşça vakit geçirdiğim, motivasyon kaynağım olan tüm kıymetli arkadaşlarıma da teşekkürü borç bilirim.

Canım anneme, babama ve eşimin ailesine bu süreçteki anlayışlı ve motive edici tavırlarından ötürü çok teşekkür ediyorum.

Son olarak biricik eşim Faruk'a kendi değerimi ve yapabileceklerimi bana gösterdiği için, beni yüreklendirip bugünlere sevgisiyle taşıdığı için minnettarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: TDK-2021-37805) ve TÜSEB tarafından (Proje No:2022-ACİL-16720) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanserin Tanımı.....	2
2.1.1. Meme Kanseri	3
2.2. Hücre Döngüsü	8
2.2.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	9
2.2.2. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)	10
2.3. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE).....	11
2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	14
2.5. Hücre İnvazyonu ve Metastazı.....	17
2.6. SDR Ailesi ve Dehidrogenaz Redüktaz 2 (<i>DHRS2</i>) Geni	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Hücrelerin Seçimi ve Transfeksiyon İşlemleri.....	21
3.1.1. <i>DHRS2</i> Ekspresyon vektörü transfeksiyonu	22
3.1.2. <i>DHRS2</i> siRNA transfeksiyonu;.....	23
3.2. Gen İfadelerindeki Değişimlerin Kantitatif Olarak Ölçülmesi	24
3.2.1. RNA izolasyonu	24
3.2.2. cDNA sentezi	25
3.2.3. Eş zamanlı Kantitatif PZR (<i>Real-Time PCR</i>)	26
3.3. Hücre Döngüsü Analizleri	28
3.4. Hücre Ölümünün İncelenmesi (Apoptoz Deneyleri)	29
3.5. İleri Glikasyon Son Ürün Seviyelerinin Tespiti.....	29

3.6. Migrasyon (Yara İyileşme) Testleri.....	30
3.7. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Optimizasyon Sonuçları.....	32
4.2. Hücre döngüsü bileşenlerinin gen ifadeleri ve FUCCI analiz sonuçları.....	32
4.3. Hücrelerin inflamasyon ve Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz yanıtları	37
4.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri.....	42
4.5. Migrasyon Ölçümleri	44
4.6. Transkriptom verisi sonuçları	51
5. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	72
HAM VERİLER	82
FORMLAR	83
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	84

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Meme kanseri izlencelerinde ve mutasyon taramalarında incelenen gen listesi	6
Tablo 2: Kültür koşulları.....	21
Tablo 3: cDNA sentezi basamakları	25
Tablo 4: Kantitatif PZR karışımı için gerekli miktarlar.....	26
Tablo 5: Kantitatif PZR koşulları	26
Tablo 6: Kullanılan primerlerin listesi.....	27
Tablo 7: MCF10A hücreleri <i>DHRS2</i> siRNA ve <i>DHRS2</i> OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler	53
Tablo 8: MCF7 hücreleri <i>DHRS2</i> siRNA ve <i>DHRS2</i> OE*Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler	56
Tablo 9: T47D hücreleri <i>DHRS2</i> siRNA ve <i>DHRS2</i> OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler	58
Tablo 10: MDA-MB-231 hücreleri <i>DHRS2</i> siRNA ve <i>DHRS2</i> OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanseri alt tipleri ve dokuda yer aldığı bölgelerin gösterimi.....	4
Şekil 2: Hücre döngüsü ve kontrol noktası elemanları	9
Şekil 3: İleri glikasyon son ürünlerinin oluşum mekanizması.....	13
Şekil 4: Pirotoz yolağı.....	16
Şekil 5: Hücre metastasisinin evreleri	17
Şekil 6: Epitelyal mezenkimal geçişin evreleri (EMT).....	18
Şekil 7: <i>DHRS2</i> proteini ve etkileşimde olduğu diğer proteinler (StringDB verisi)	20
Şekil 8: <i>DHRS2</i> ekspresyon vektörü ve enzim kesim bölgeleri	23
Şekil 9: Floresan işaretli ubikinleyici hücre döngüsü indikatörü (FUCCI)	28
Şekil 10: Optimizasyon sonrasında deney gruplarındaki <i>DHRS2</i> gen ifade seviyeleri..	32
Şekil 11: MCF10A hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri.....	33
Şekil 12: MCF7 hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri	34
Şekil 13: T47D hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri.....	34
Şekil 14: MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri.....	35
Şekil 15: <i>DHRS2</i> siRNA grupları için FUCCI ışık yoğunluğu ölçümü	36
Şekil 16: <i>DHRS2</i> OE-Vektör grupları için FUCCI ışık yoğunluğu ölçümü.....	36
Şekil 17: MCF10A hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri.	38
Şekil 18: MCF7 hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri	38
Şekil 19: T47D hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri.....	39
Şekil 20: MDA-MB-231 hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri.....	39
Şekil 21: MCF10A hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri.....	40
Şekil 22: MCF7 hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri.....	41
Şekil 23: T47D hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri.....	41
Şekil 24: MDA-MB-231 hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri.....	42
Şekil 25: AGE <i>ELISA</i> sonuçlarının gruplardaki dağılımı	43
Şekil 26: <i>DHRS2</i> ifadesi değiştirilen gruplardaki AGE miktarının değişim oranları	44
Şekil 27: MCF10A deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri	45
Şekil 28: MCF10A hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri	45
Şekil 29: MCF10A hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri	46

Şekil 30: MCF7 deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri	46
Şekil 31: MCF7 hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri	47
Şekil 32: MCF7 hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri ..	47
Şekil 33: T47D deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri	48
Şekil 34: T47D hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri	48
Şekil 35: T47D hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri ...	49
Şekil 36: MDA-MB-231 deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri	49
Şekil 37: MDA-MB-231 hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri...	50
Şekil 38: MDA-MB-231 hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri	50
Şekil 39:Transkriptom analizinde ifadesi en çok değişen 50 gen.....	51
Şekil 40: Temel bileşen analizi (PCA) görüntüsü	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µL	Mikrolitre
7-AAD	7-aminaktinomisin D
AGE	İleri glikasyon son ürünü
APC	Anafaz teşvik edici kompleks
ATCC	Amerikan tıp kültür koleksiyonu
CDI	Siklin kinaz inhibitörü
CDK	Siklin bağımlı kinaz
cDNA	Komplementer DNA
CMV	Cytomegalovirüs
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
E. Coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epidermal mezenkimal transisyon
ER	Östrojen reseptör
FBS	Fetal bovine serum

HER2	Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 2
kDa	Kilodalton
LB	LB besiyeri
M fazı	Mitoz fazı
MEM	Minimum esansiyel media
MET	Mezenkimal epidermal transisyon
miRNA	Mikrorna
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcırna
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH	Nikotiamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotiamid adenin dinükleotit fosfat
nm	Nanometre
NT	Nontargeting (hedefsiz)
NTC	Non trasfected cells (Transfeksiyon yapılmamış hücreler)
OE-Vektör	Ekspresyon arttırıcı vektör
PBS	Fosfat tamponlu salin
PPC	Hücre başına partikül sayısı
PR	Progesteron reseptör

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAGE	AGE reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
S fazı	Sentez fazı
sa	Saat
SDR	Kısa dehidrogenaz redüktaz (short dehydrogenase reductase,)
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SOC	Katabolit baskılı süper optimal besiyeri
TNF	Tümör nekroz faktör
UV	Ultraviyole ışın

ÖZET

Salman Yaylaz, B. (2024) Meme Kanserinde *DHRS2* Geninin Rol Oynadığı Moleküler Mekanizmaların İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Meme kanseri ülkemizde kadınlarda sıklıkla karşılaşılan bir malignitedir. Postmenopozal dönemdeki hormon değişiklikleri ve mutasyon yükünün de etkisiyle ileri yaş grubunda sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Ailesel geçişli meme kanserleri ise BRCA1/2 mutasyonları üzerinden takip edilmekte ve hastalar daha genç yaşta tanı almaktadır. Kanserin bu heterojenliği nedeniyle yeni biyobelirteçlere tanı ve tedavide ihtiyaç duyulmaktadır. Tez çalışmamızda hücre içerisindeki mekanizmaları tam aydınlatılmamış ancak hücrelerin regülasyonunda önemli olabileceğini düşündüğümüz *DHRS2* geninin olası etkilerini transkriptomik ve fonksiyonel yaklaşımlar kullanarak inceledik. MCF10A, T47D, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında *DHRS2*'nin hücre içerisindeki miktarı siRNA ve OE-vektör aracılığı ile manipüle edilmiştir. Akabinde hücre döngüsü, *Kaspaz 3/7* aracılı apoptoz ölçümleri, migrasyon ve ileri glikasyon son ürünlerinin tespiti yapılmıştır. Transkriptom verilerini doğrulamak amacıyla *DHRS2* ile etkileşimde bulunduğunu düşündüğümüz spesifik genlerin ekspresyonlarını kantitatif PZR yöntemi ile doğruladık. Bulgularımız doğrultusunda *DHRS2* miktarı arttığında *p21* miktarını arttırdığı ve bu sebeple hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutulduğu, *Siklin D* ve *Siklin E* ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca transkriptom verilerimizin sonucunda hücre membran moleküllerinin ve düzenleyicilerinin *DHRS2* seviyesinden etkilendiği ve mezenkimal benzeri özellik kazandığı gösterilmiştir. Yine transkriptom verilerimizden ve *Kaspaz* aktivitesi ölçümlerinin ardından *DHRS2*'nin inflamatuvar cevapta ve piroptozun indüklenmesinde rol alabileceği düşünülmüştür. *DHRS2* mitokondriyal bir protein olmasına karşın hücre içerisindeki çeşitli mekanizmaları düzenleme yeteneğine sahiptir. Meme kanseri özelinde yaptığımız bu çalışmamızda proliferasyon, invazyon ve metastaz, immün sistemi regülasyonu gibi birden çok mekanizmada *DHRS2*'nin *p53* bağımlı ve bağımsız etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, *DHRS2*, Transkriptom, Proliferasyon, İnflamasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TDK-2021-37805) ve TÜSEB tarafından (Proje No:2022-ACİL-16720) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Salman Yaylaz, B. (2024). Investigation of Molecular Mechanisms Involved by *DHRS2* Gene in Breast Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Doktora Tezi. İstanbul.

Breast cancer is a malignancy frequently encountered in women in our country. It occurs sporadically in the older age group due to hormone changes in the postmenopausal period and mutation burden. Familial inherited breast cancers are followed up based on BRCA1/2 mutations and patients are diagnosed at a younger age. Due to this heterogeneity of cancer, new biomarkers are needed in diagnosis and treatment. In our thesis study, we examined the possible effects of *DHRS2* gene, whose mechanisms in the cell have not been fully elucidated but which we think may be important in the regulation of cells, using transcriptomic and functional approaches. In MCF10A, T47D, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines, the amount of *DHRS2* in the cell was manipulated by siRNA and OE-vector. Subsequently, cell cycle, Caspase 3/7-mediated apoptosis measurements, migration and advanced glycation end products were detected. In order to verify the transcriptome data, we confirmed the expression of specific genes that we thought interacted with *DHRS2* by quantitative PCR. In line with our findings, we observed that when the amount of *DHRS2* increased, the amount of *p21* increased and therefore the cell cycle was kept in the G0/G1 phase and the expression of Cyclin D and Cyclin E increased. In addition, as a result of our transcriptome data, it was shown that cell membrane molecules and regulators were affected by *DHRS2* level and gained mesenchymal-like properties. Our transcriptome data and caspase activity measurements suggest that *DHRS2* may play a role in inflammatory response and induction of pyroptosis. Although *DHRS2* is a mitochondrial protein, it has the ability to regulate various mechanisms within the cell. In our breast cancer-specific study, it was revealed that *DHRS2* has *p53*-dependent and independent effects in multiple mechanisms such as proliferation, invasion and metastasis, and immune system regulation.

Key Words: Breast cancer, *DHRS2*, Transkriptomics, Proliferation, Inflammation.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. (Project No. TDK-2021-37805) and TÜSEB (Proje No:2022-ACİL-16720).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığının hazırladığı halk sağlığı raporlarında meme kanseri hızının son beş yıl içerisinde artmış olduğu görülmektedir. Dünyada ve ülkemizde her geçen gün daha fazla kadının meme kanseri teşhisi alması, meme kanseri araştırmalarını da hızlandırmıştır. Meme kanseri beş alt tipten oluşan, hormon ve büyüme reseptörlerinin bu sınıflandırmada kullanıldığı bir kanser türüdür. İyi prognoz gösteren Luminal A alt tipi en sık görülen türüdür. Metastaz yapabilme kapasitesi yüksek olan diğer alt gruplar Luminal B ve bazal benzeri üçlü negatif gruptur. Moleküler mekanizmalarının hala tam olarak aydınlatılamamış olması ve tanı, takip ve tedavide belirli genlerin incelenmesi hastalar için yeterli olamamaktadır. Bu limitasyonların aşılabilmesi için moleküler anlamda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *DHRS2* geni hücre içerisinde çeşitli mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynayan bir genidir. *LEF1*, *MYB*, *p53* gibi gen ifadelerinin kontrolünden sorumlu olan genler *DHRS2* seviyelerini düzenler veya yanıt oluştururlar. Hücredeki *p53* düzenleyicisi *MDM2* ligaz aktivitesinin yine *DHRS2*'ye bağlı olduğu gösterilmiştir. Metabolik stres reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve akabinde DNA hasarına neden olmaktadır. Meme kanseri için DNA tamir genlerindeki mutasyonlar büyük önem taşımaktadır. *DHRS2* ise oksidoredüktaz aktivitesi bulunan, redoks faaliyetlerine katılarak hücre içi ROS stresini azaltan bir genidir. Aynı zamanda meme dokusunun adipoz dokuya olan yakınlığı nedeniyle hücrelerin lipid metabolizmaları da tümör oluşumunda değişikliğe uğramaktadır. Lipid metabolizmasında da aktif rolü olduğunu düşündüğümüz *DHRS2*'nin tüm bu mekanizmalar göz önüne alındığında meme kanseri çalışmalarında kendisine daha fazla yer bulması kaçınılmazdır. Yaptığımız doktora tez çalışmasında *DHRS2* gen ifadesi değişimlerinin farklı meme kanseri hücre hatlarında nasıl cevaplar oluşturacağı araştırılmıştır. Hormon reseptörlerinin ve hücredeki *p53* mutasyon durumunun etkisini incelemek adına MCF10A, MCF7, T47D ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerdeki farklılıklar baz alınarak *DHRS2*'nin hücre proliferasyonu, migrasyonu, apoptoz eğilimi, inflamatuvar yanıtı şeker metabolizmasındaki ikincil ürünler üzerindeki etkisi transkriptom yaklaşımı ve fonksiyonel çalışmalar aracılığı ile bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı

Kanser genel tanımı itibariyle bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine yayılan bir hastalıktır. Normal şartlarda hücreler vücudun ihtiyaçlarını karşılamak için yeni hücreleri oluşturmak amacıyla büyür ve hücre bölünmesi olarak adlandırılan bir mekanizma ile çoğalır. Hücreler yaşlandığında ise ölür ve yerlerini yeni hücreler alır. Bu süreç bozulduğunda anormal veya hasarlı hücreler ortadan kaldırılması gerekirken çoğalmaya devam ederler ve doku bütünlüğünü bozabilirler. Bulundukları dokunun bütünlüğünü bozmalarının dışında başka dokulara da yayılabilirler ve oraya yerleşerek yeniden çoğalma sürecini başlatabilirler. Bölünme kontrolü bozulmuş hücrelerin tamamı kötü huylu tümörler oluşturmaz. Aynı zamanda dokudaki tüm hücre değişiklikleri de kanser olarak adlandırılamaz. Hiperplazi, displazi ve neoplaziler patolojik incelemelerde normal olarak görünen hücre yapılarıdır. Neoplaziler kanserin ilk işaretçisi olarak görülür ve invaziv özellik göstermezler, düzenli kontrol edilmeleri gerekmektedir (1).

Kanser genetik bir hastalıktır. Hücrelerimizin çalışma şeklini, özellikle bölünme konusundaki yeteneğini kontrol eden genlerdeki birtakım değişiklikler sonucu meydana gelmektedir. Genetik değişimlerin en büyük kaynağı karsinojenlerdir. DNA'ya zarar veren karsinojenler kimyasal veya ışımlar (UV, x-ray) şeklinde olabilir. Hücrelerde yıllar içerisinde biriken mutasyon yükü genomik dengesizliğe neden olur. Bu mutasyonların tamamı kansere neden olmaz ancak süreci başlatıcı mutasyonlarla birleştiğinde hücreler bu mutasyonları bölünerek kendinden köken alan diğer hücrelere aktarırlar. Bu şekilde genomunda mutasyon taşıyan çok sayıda hücre dokularda birikmeye başlar ve nodülleri diğer bir adıyla tümörü oluşturur. Bu mutasyonlara ek olarak çevresel faktörlere bağlı olan epigenetik değişimler de kanser sürecine katkı sağlar. Bu oluşumlar devam ederken tümör çevresi de yeniden düzenlenir ve kanserin yayılabilmesi veya korunabilmesi için immün sistem hücreleri ve bağ doku hücreleri yeniden programlanır. Tümör çevresinin şekillenmesinde öncül (primer) kanser hücresinin tümör çevresine salgıladığı moleküllerin önemli bir yeri vardır. Bu moleküllerin arasında sitokinler olarak adlandırılan immün sistem hücrelerini uyaran moleküllerin yanısıra ekstraselüler matriks yapısının şekillenmesini sağlayan ve tümör

dokusuna besin ve oksijen taşınımını sağlayan yeni kan damarlarının oluşmasını sağlayan moleküller de bulunur. Kansere olarak adlandırdığımız tümörler malign tümörler olarak adlandırılır ve bu tümörlerin çevre dokulara gidip yerleşebilme özellikleri vardır. Bu invazyon durumu kanser hücresinin en ayırt edici özelliklerinden biridir. Metastatik tümörler ise kanser hücrelerinin kan veya lenf dolaşımına girerek başka dokulara geçip oraya yerleşme ve çoğalma özelliği gösteren hücrelerden oluşur. Genel olarak en çok yayılım gösteren kanserler en zor yok edilebilen kanser türleri olmaktadır (2–4).

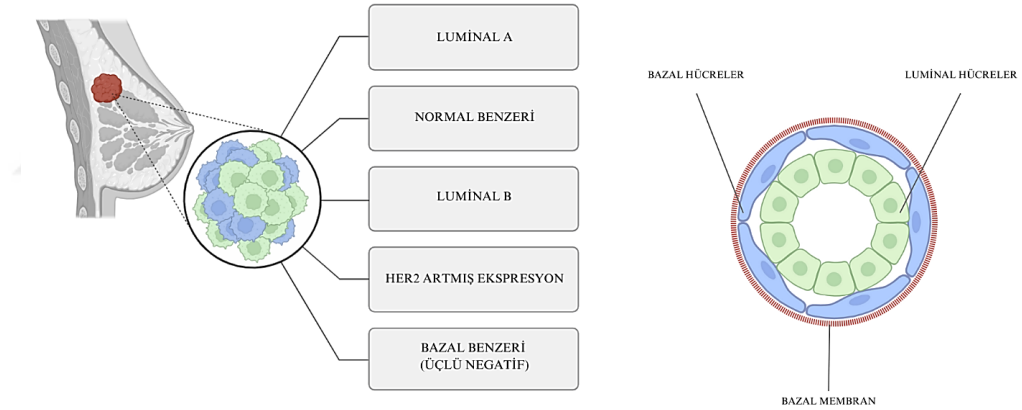
Kanser adlandırmalarında primer kanser hücresinin köken aldığı doku kullanılır. Karsinoma epitel hücrelerinin oluşturduğu tümörlerdir ve kanserlerin yaklaşık %85'ini oluşturur. Karsinomadan sonra gelen kanser türleri ise miyeloma, lösemiler ve lenfomalardır. Sarkomalar bağ dokusu veya kas dokusundan köken alır ve sinir sisteminden köken alan kanserle beraber sıklığı daha azdır. Kanserler köken aldığı doku haricinde ilk ortaya çıktıkları organ ile de isimlendirilirler ve yüzden fazla tipi bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 verilerine göre dünyada en sık görülen kanser türleri sırasıyla meme (2,26 milyon), akciğer (2,21 milyon), kolon ve rektum (1,93 milyon), prostat (1,41 milyon), cilt (1,20 milyon) ve mide (1,09 milyon) kanseridir. Kanser kaynaklı ölümler listesi ise farklı bir sıralama ile ilerlemektedir; akciğer (1,80 milyon), kolon ve rektum (916 bin), karaciğer (830 bin), mide (769 bin) ve son olarak meme kanseri (685 bin). Sıralamanın bu şekilde değişmesinde yeni teşhis ve tedavi yöntemleri önemli roller oynamaktadır.

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri anormal meme hücrelerinin kontrolsüz çoğalarak tümör yapısını oluşturması ile sonuçlanan bir hastalıktır. Erken teşhis edilmediği takdirde vücudun diğer organlarına sıçrayarak ölümcül bir hal alabilmektedir. Kadınlarda en sık görülen kanserdir ve ülkemizdeki insidansı 2018 yılında 100.000 kadında 48,6'dır (5). Cinsiyete ek olarak, yaş, obezite, alkol ve sigara kullanımı, ailede meme kanseri öyküsü ve postmenopozal hormon tedavisi kullanımı bu kanser için bir risk faktörüdür. Ailesel meme kanseri öyküsü hastalık riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. Ancak tüm meme kanserleri ailesel geçişli değildir ve sporadik olabilir. Meme kanserinin ilk evrelerinde bazı semptomlar gözlenebilir ve bu semptomlar kanserin erken teşhisi için oldukça önemlidir. Memede sertlik veya nodül, dış görünüşündeki farklılıklar (büyüklük, şekil,

kızarıklık, akıntı), meme ucu ve etrafındaki derideki değişimler ve akıntılar belirtilen semptomlara örnek olarak gösterilebilir (6,7).

Meme kanseri oldukça heterojen bir kanserdir. Yıllar içerisinde alt tiplerinin sınıflandırılması tedavi açısından önem kazanmıştır. Sınıflandırmanın ilk yıllarında geleneksel histopatolojik yöntemler kullanılmıştır. Bu sınıflandırma bazı kanser hastaları için fazla tedaviye maruz kalma, bazı hastalar için ise tedavi alsalar bile hastalığa yenik düşmesine neden olmaktaydı. Perou ve Sorle'nin ekibi günümüzde kullanılan moleküler sınıflandırmanın öncüleridir. Östrojen reseptörü ve HER2 büyüme faktörü reseptörü bu sınıflandırmanın temelidir ve günümüzde bu temel üzerine diğer moleküler faktörler eklenmiştir. Luminal, HER2 aşırı ifadesi, bazal benzeri intrinsik alt gruplar östrojen reseptörü ve HER2 reseptörü ile karakterizedir. Perou ve arkadaşları beş intrinsik alt grup tanımlamıştır. Bu alt gruplar ve reseptör ifadeleri Şekil 1'de gösterilmiştir (8–10).



Şekil 1: Meme kanseri alt tipleri ve dokuda yer aldığı bölgelerin gösterimi

HER2 yönünden zengin meme kanseri alt tipi tüm meme tümörlerinin %15 ila 20'sini oluşturmaktadır. Bu tümörler östrojen reseptörü negatif ve HER2'nin aşırı ifade edilmesi ile karakterizedir. HER2 ekspresyonuna ek olarak HER2 ile ilişkili yollardaki genlerin ve proliferasyon ilişkili genlerin artmış ifadesi veya 17q12 kromozom bölgesindeki HER2 amplikonları da görülmektedir. Kötü prognoz ile ilişkilendirilen bu alt tipte özellikle karaciğer, akciğer ve kemik başta olmak üzere artmış metastaz riski ile öne çıkmaktadır. Luminal grupta ekspresyonu yüksek olan genlerin yerine bu grupta *FGFR4* ve *EGFR* gibi büyüme faktörü genlerinin ifadeleri daha yüksektir (11).

Bazal benzeri meme kanseri grubu tüm olguların %10-20'sini oluşturur. Bazal benzeri fenotip bazal/myoepitelyal hücreler tarafından ifade edilen genlerin artmış ekspresyonu ile karakterizedir ve östrojen reseptörü ve HER2 ekspresyonu bulunmaz ancak büyük bir bölümünde *TP53*'ün çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonları vardır. *RB1* ve *BRCA1* delesyonları ve *MYC* amplifikasyonları da içerir. Bu tümör, genetik heterojenlik nedeniyle çeşitli prognoz seviyeleri gösterebilir. Tedavisi en zorlu olan grupların başında gelen üçlü negatif (östrojen, progesteron ve HER2 reseptörü negatif olan) meme kanserleri de bu alt tip içerisinde sınıflandırılmaktadır (12).

Luminal meme kanserleri östrojen reseptörüyle ilişkili genler ile birbirlerinden ayrılırlar. Luminal A tümörleri tüm meme karsinomlarının yaklaşık %40'ını oluşturur ve proliferasyon genlerinin düşük seviyelerde ifade edilmesiyle bilinirler. Histokimyasal boyamalarda östrojen ve progesteron reseptörlerinin yüksek ifadesi görülürken HER2 reseptörü ifadesi görülmez. Bu alt tipte *PIK3CA* mutasyonları sıklıkla görülür ancak relaps ve hastalığın nüks oranı oldukça düşüktür. Luminal B tümörleri heterojen bir dağılım gösterir ve tüm meme kanseri vakalarının %25'ini oluşturur. Luminal B tümörleri A'nın tersine yüksek proliferasyon gen ifadesine sahiptir. Düşük seviyede östrojen ve progesteron ekspresyonunun yanı sıra HER2 reseptör taşıyıcılığı pozitifdir ve *PIK3CA* geni değil de *TP53* genindeki mutasyon oranı daha yüksektir. Luminal A grubu ile kıyaslandığında daha kötü bir uzun dönem etkisi bulunmaktadır. Sıklıkla kemik metastazları görülmektedir. Luminal grup tümörleri genellikle hormon tabanlı terapiler ile tedavi edilmektedir (13,14).

Kanser sadece tümör hücresinden ibaret değildir. Malign yapılaşmayı toplu olarak belirleyen birtakım değişimlerle ilişkili yerel bir ekosistemdir. Bu değişimler büyüme sinyal yollarının sürekli aktif halde tutulması, büyümeyi engelleyici sinyallere duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçış, sınırsız bölünme, anjiyogenez, doku invazyonu ve metastaz gibi yeteneklerdir. Epidemiyolojik çalışmalar sonucu belirlenen ve her gün maruz kaldığımız kimyasalların yanı sıra, kanserleşme riskini arttıran bir diğer önemli nokta ise hücrelerin taşıdığı mutasyon yükleridir. Meme kanseri için en çok taraması yapılan genler ailesel geçiş genleri de olan *BRCA1* ve *BRCA2*'dir. Meme kanseri için yapılan sayısız çalışmada birçok somatik ve germline mutasyon tespit edilmiştir, bu genler ve mutasyon bilgileri Tablo 1'de verilmiştir. En

sık mutasyona rastlanan genler ise *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *PTEN*, *CCND1*, *ERBB2* (*HER2*), *FGFR1* ve *GATA3* genleridir (15).

Tablo 1: Meme kanseri izlencelerinde ve mutasyon taramalarında incelenen gen listesi

<i>GEN SEMBOLÜ</i>	<i>MUTASYON ÇEŞİDİ</i>	<i>GENOMİK LOKASYON</i>
<i>BRCA1</i>	Germline/Somatik	17q21.31
<i>TP53</i>	Germline/Somatik	17p13.1
<i>BRCA2</i>	Germline/Somatik	13q12.1
<i>PIK3CA</i>	Somatik	3q26.32
<i>MYC</i>	Somatik	8q24.21
<i>PTEN</i>	Germline/Somatik	10q23.31
<i>CCND1</i>	Somatik	11q13.3
<i>ERBB2</i>	Somatik	17q12
<i>ERBB3</i>	Somatik	12q13.2
<i>FGFR1</i>	Somatik	8p11.23
<i>FGFR2</i>	Germline/Somatik	10q26.13
<i>GATA3</i>	Somatik	10p14
<i>AKT2</i>	Somatik	19q13.2
<i>ARID1B</i>	Somatik	6q25.3
<i>CASP8</i>	Germline/Somatik	2q33.1
<i>CDKN1B</i>	Somatik	12p13.1
<i>MAP3KI</i>	Germline/Somatik	5q11.2
<i>MAP3KI3</i>	Somatik	3q27.2
<i>NCOR1</i>	Somatik	17p12-p11
<i>SMARCD1</i>	Somatik	12q13.12
<i>TBX3</i>	Somatik	12q24.21
<i>RB1</i>	Somatik	13q14.2
<i>ESR1</i>	Somatik	6q25.1
<i>FOXA1</i>	Somatik	14q21.1
<i>CDH1</i>	Germline/Somatik	16q22.1
<i>APOPBE3B</i>	Somatik	22q13.1

<i>PALB2</i>	Germline/Somatik	16p12.2
<i>ATM</i>	Germline/Somatik	11q22.3
<i>CHEK2</i>	Germline/Somatik	22q12.1
<i>RAD51</i>	Germline	15q15.1
<i>RAD51C</i>	Germline/Somatik	17q22
<i>MSH2</i>	Germline/Somatik	2p21
<i>BARD1</i>	Germline/Somatik	2q35
<i>STK11</i>	Germline/Somatik	19q13.3
<i>BRIP1</i>	Germline/Somatik	17q23.2
<i>MALAT1</i>	Somatik	11q13.1
<i>HOTAIR</i>	Somatik	12q13.13
<i>MEG3</i>	Somatik	14q32.2
<i>H19</i>	Somatik	11p15.5

Tümörün büyümesi ve ilerlemesini devam ettirebilmesi için bazı özellikleri kazanması gerekmektedir. Kanserin işaretçileri olarak adlandırılan bu özellikler tümörleşme süreci hakkında bize bilgi vermektedir. Bu özellikler aşağıda listelenmiştir.

- Proliferatif sinyallemenin sürdürülmesi
- Büyüme baskılayıcılardan kaçınma
- Bağışıklık hücrelerinin yıkımından kaçınmak
- Replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme
- Tümörleşmeyi teşvik eden inflamasyon
- İnvazyon ve metastaz aktivasyonu
- Anjiyogenezi indüklemek
- Genom kararsızlığı ve mutasyon
- Hücre ölümüne direnmek
- Hücresel enerjilerin deregülasyonu
- Fenotipik plastisitenin açılması

- Mutasyon sonucu olmayan epigenetik yeniden programlama
- Hücre yaşlanması
- Polimorfik mikrobiyomlar

Kanserleşme sürecindeki bu işaretçilerin belirlenmesi ile kanser çalışmaları belirli alanlara yönelmiştir. Kanser çalışmalarının büyük çoğunluğu ilaç hedefi olabilecek mekanizmalarla ilgilidir. Hücre bölünmesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesi bu mekanizmaların başında gelmektedir (3,4,10).

2.2. Hücre Döngüsü

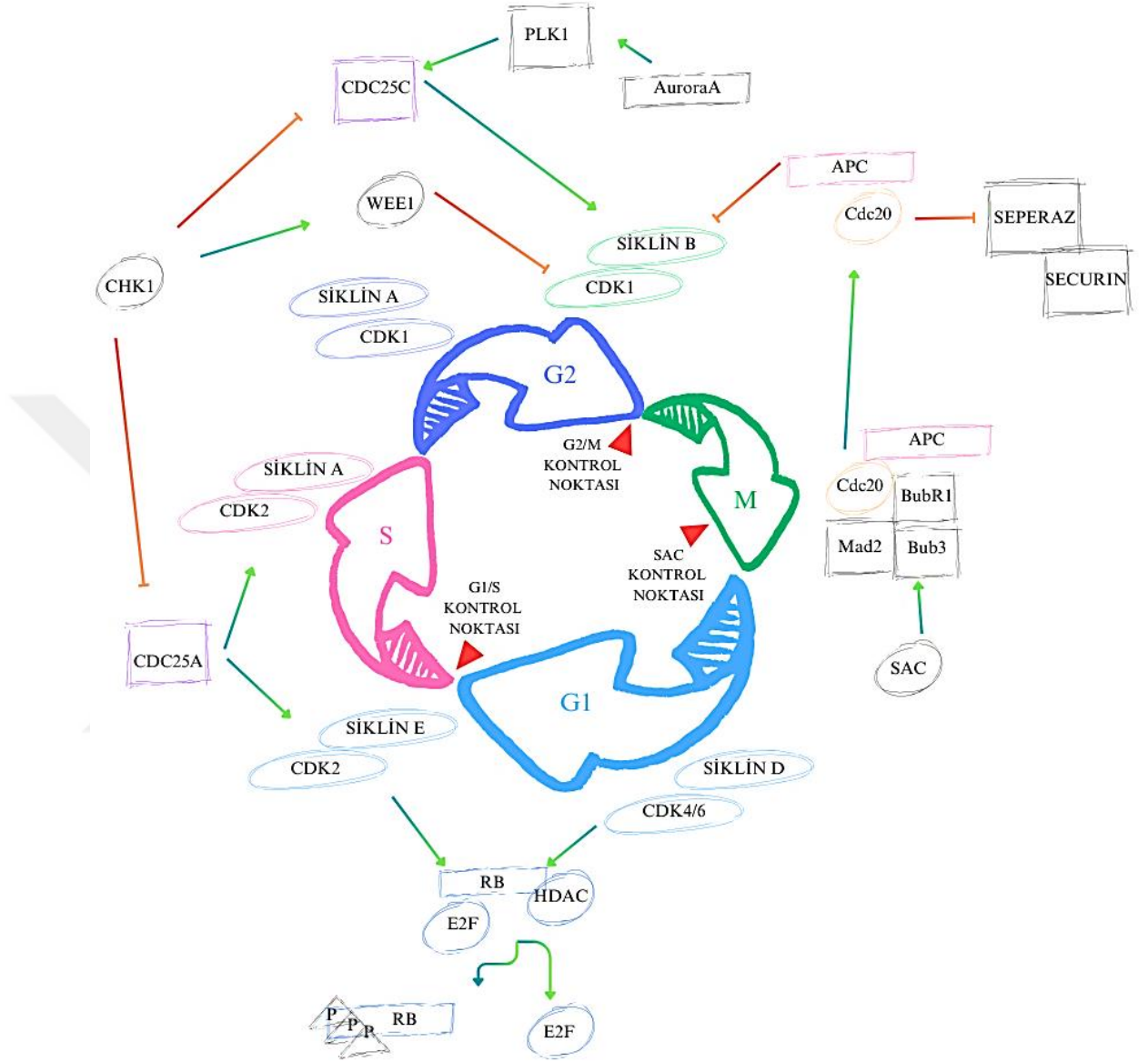
Hücre döngüsünün temel görevi DNA'nın kopyalanıp oluşan iki genetik olarak aynı iki hücreye ayrılmasıdır (segregasyon). Bu süreç hücre döngüsünün iki elzem bölümü ile açıklanmaktadır. Kromozom duplikasyonu S fazı dediğimiz sentez fazında gerçekleşmektedir. Bu fazı gerçekleşme süresi tüm döngü süresinin yarısına tekabül etmektedir. Sentez fazından sonra kromozom ayrılması ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği faz ise M, mitoz fazıdır. Mitoz fazında ise iki önemli olay gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi çekirdek bölünmesi diğeri ise hücrenin kendisini ikiye ayırdığı ve sitokinez olarak adlandırılan sitoplazmik bölünmedir. M fazı profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak dört alt gruba ayrılmaktadır (2).

Profaz evresinde kardeş kromatitler bir araya gelirler ve çekirdek zarının ortadan kaybolmasıyla beraber iğ ipliklerine tutunurlar. Ardından metafaz evresinde her bir kardeş kromatit iğ ipliklerine birbirlerine zıt yönde olacak şekilde bağlanır ve hücrenin ekvator düzleminde sıralanırlar. Kardeş kromatitlerin arasındaki bağların kopup zıt kutuplara çekilmesi ise anafaz evresinde gerçekleşmektedir. Telofaz evresinde ise ayrılan kromatitlerin çekirdek içerisinde paketlenmesi evresidir. Sitokinez hücrenin ikiye ayrılmasını sağlar ve oluşan bu hücreler iki çekirdekten birine sahip olmuş olur.

Bu iki büyük fazın dışında ökaryotik hücrelerde gap fazı denilen fazlar da mevcuttur. G1 fazı hücre bölünmesinden tekrar S fazına geçene kadarki süreçtir. G2 fazı ise S fazından M fazına geçiş fazıdır. G1, S ve G2 fazı aynı zamanda interfaz evresi olarak da adlandırılır (2).

C- ve D-tipi siklinler G1 (Gap 1) fazı boyunca hücre döngüsüne girişi kontrol eder, S (DNA Sentezi) fazına girişi kontrol eden E-tipi siklinlerdir, DNA replikasyonunu ve G2 fazı boyunca ilerlemeyi kontrol eden A-tipi siklinlerdir ve mitoz

(M) girişin ve kromozom ayrışmasının ana düzenleyicileri olarak B-tipi siklinler görev almaktadır(16).



Şekil 2: Hücre döngüsü ve kontrol noktası elemanları

2.2.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü kontrol sistemi daha çok hücre döngüsündeki sıralı olayları tetikleyen bir zamanlayıcı olarak işlev görür. Bu sistem birbirine bağlı her biri hücre döngüsündeki görevi özelleşmiş, biyokimyasal olaylara dayanmaktadır. Biyokimyasal anahtarlar birçok önemli özelliğin doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmaktadır. Buna ek olarak hücre döngüsündeki bir süreçte aksama olması durumunda iç ve dış sinyal

yolaklarını aktifleştirerek bu aksamının giderilmesini, eğer giderilemiyorsa da döngünün durdurulması yönünde hücrel mekanizmaları aktif hale getirirler (17,18).

Ökaryotik hücrelerin birçoğunda kontrol sistemi döngünün belirli noktalarındadır. G1 kontrol noktası hücrenin döngüye girip girmemesi ve kromozom duplikasyonunun başlaması kararının verildiği yerdir. G2/M geçiş kontrol noktası kromozomların ekvatorda düzgün bir dizilimine izin veren yerdir. Genetik materyalin replikasyonunda veya kardeş kromatitlerin oluşumundaki hatalar bu kontrol noktasında tespit edilir. Oluşacak yeni hücrelerdeki genetik materyalin doğru bir şekilde ayrılmasında büyük önemi vardır. Üçüncü kontrol noktası ise metafaz-anafaz geçişi kontrol noktasıdır. Mitozun tamamlanması ve sitokinezin olması için gerekli uyarım bu noktadan sağlanır (2).

Hücre döngüsü kontrol sisteminin ana bileşenleri protein kinaz ailesine ait olan siklin-bağımlı kinazlardır (CDK). Döngü boyunca bu kinazların miktarı hücre içerisinde artma ve azalma gösterir. CDK'ları düzenleyen proteinler ise siklinler olarak bilinir. CDK'lar işlev gösterebilmesi için adından da anlaşılacağı üzere kinaz aktivitesi bulunmayan siklinlerle bağ kurmak zorundadır. Siklin proteinlerinin döngüsel değişimleri hücre döngüsünün hangi aşamada olduğu ile ilgili bilgi vermektedir. Siklinler üç ana gruba ayrılırlar; G1/S siklinleri, S siklinleri ve M siklinleri. Siklin-CDK kompleksleri döngünün sadece bir periyodunda görev almaz, birden fazla döngü fazında farklı işlevler gösterebilir.

2.2.2. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)

Bunlar arasında CDK1, 2, 4 ve 6, kanser hücrelerinde oldukça bozulmuş bir süreç olan hücre döngüsü ilerlemesinde önemli roller oynar. CDK'ların aktivasyonu, düzenleyici siklinlerinin sentezine ve degradasyonuna bağlıdır. Büyüme faktörleri G1 fazına girişi başlatır ve *CDK4* veya *CDK6* ile etkileşime giren *Siklin D1*, *D2* ve *D3*'ün aktivasyonunu indükler. Artan *Siklin D* *CDK4/6* aktivitesi, retinoblastoma proteininin (pRB) fosforilasyonu ve *p53*'ün inaktivasyonu ile sonuçlanarak *E2F*'nin *pRB-E2F* kompleksinden salınmasına neden olur. Bu salınım, besin maddelerinin düşük mevcudiyeti tespit edildiğinde hücre döngüsünü durduran kısıtlama G1 kontrol noktasının inaktivasyonuna yol açar. *Siklin E-CDK2*'nin aktivasyonu S fazına giriş için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlar. *Siklin A-CDK2* S fazında ve *Siklin A-CDK1* G2 fazında ilerlemeyi sağlar ve *Siklin B-CDK1* geç G2'den mitoz çıkışına kadar

ilerlemeyi düzenler. Diğer kinazlar, özellikle Polo benzeri kinaz 1 (*PLK1*) ve Aurora kinaz A/B, mitoz, kromozom ayrımı ve sitokinez yoluyla ilerleme için kritik öneme sahiptir (19).

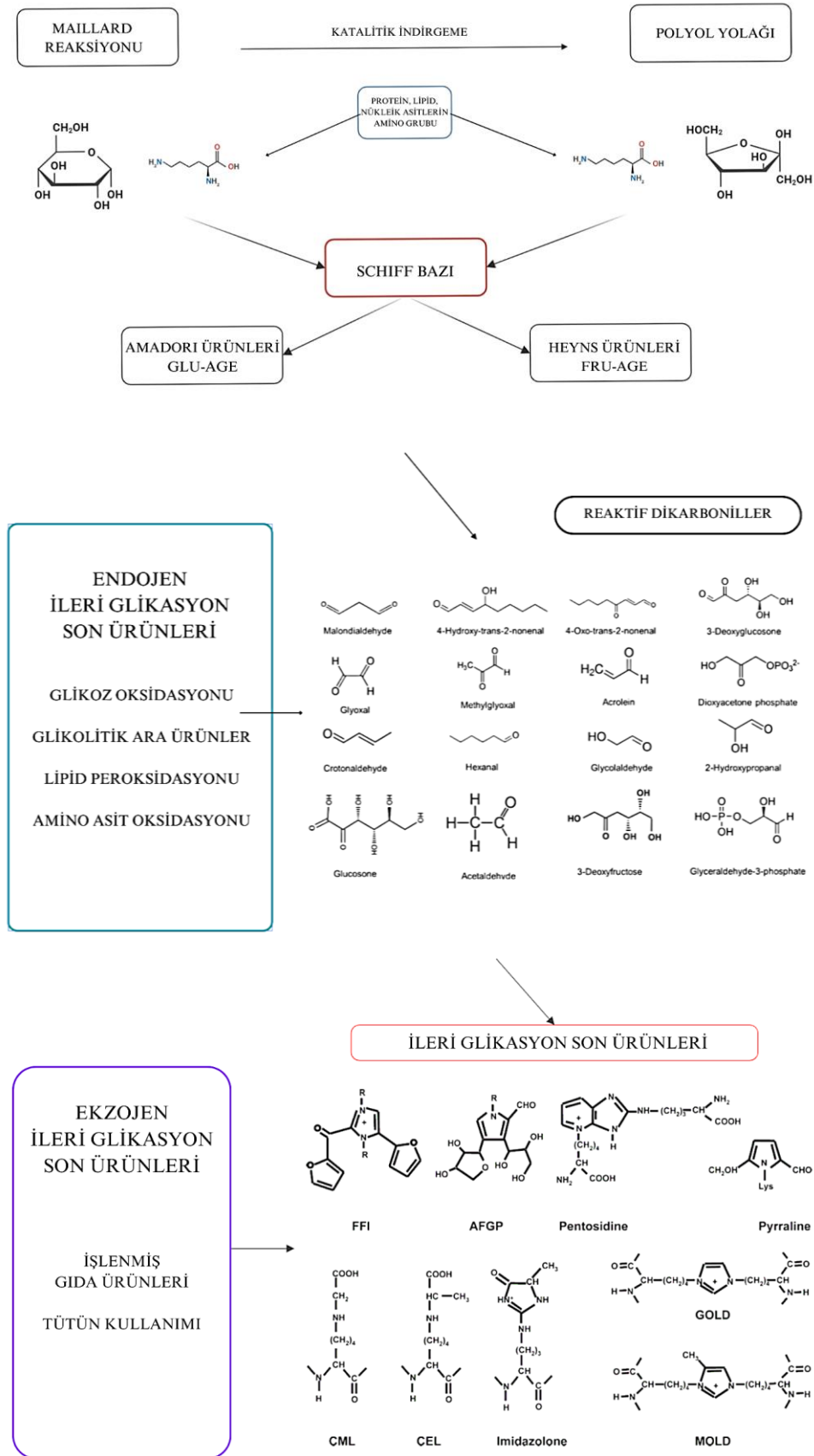
Hücre döngüsünün bu geri döndürülemez ilerleyişi, siklinlerin iki E3 proteazomal ligaz, anafaz teşvik edici kompleks/siklozom (*APC/C*) ve *Skp1/Cullin/F-box (SCF)* tarafından belirli zamanlarda kademeli olarak biriktirilmesi ve aniden yok edilmesinden kaynaklanmaktadır. CDK aktiviteleri ayrıca iki inhibitör ailesi (CKI'ler) tarafından da inhibe edilir, özellikle *CDK4* ve *CDK6*'ya spesifik olarak bağlanan *INK4* ailesi (*p16*, *p15*, *p18* ve *p19*) ve tüm ana CDK'ları inhibe eden *WAF1/CIP/KIP* ailesi (*p21*, *p27* ve *p57*). Ayrıca, CDK'lar fosforilasyonla, özellikle de *Wee1* ve *Myt1* tarafından fosforile edilen CDK1 ile inhibe edilebilir ve mitozu girişi askıya alır. Bu *CDK1* inaktivasyonu, *Wee1*'i parçalayan *Cdc25* fosfataz ve *SCF-b-TrCP* tarafından tersine çevrilir (19,20).

2.3. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE)

Kanserleşme sürecindeki bir diğer önemli işaretçi ise kanser hücrelerinin enerji metabolizmalarını yeniden düzenleyebilmeleridir. Enerji metabolizması normal koşullarda anabolik büyümenin devamı, besin kıtlığı durumunda ise hücre sağkalımının desteklenmesi, metabolitlerin oluşturduğu hücre içi stresin engellenmesi için redoks sistemlerinin güçlendirilmesi için düzenlenir. Hücresel enerji metabolizmasının bir diğer önemi onkogen aktivasyonu ve kinaz aktivitelerinin devamı için hücreye fazladan enerji sağlamaktır. Son yıllarda tümör davranışını tahmin etme ve tümör ilerleyişinin temel yollarını bloke etmede metabolizmanın yeniden programlanması veya onkometabolit olarak adlandırılan kanser hücrelerinde belirgin bir şekilde miktarı artan metabolitler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Kanserde en bilinen metabolik yolak düzenlenmesi Warburg etkisi olarak da isimlendirilen normal hücrelerin hipoksi durumunda verdiği tepki olan aerobik glikolizdir (3). Günümüzde kanser hücrelerinin aerobik glikoliz durumu onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcıların kaybı, PI3K yolağının aşırı aktivasyonu ve metabolik öncüllerin anabolik yollar için kullanıma hazır olmaları ile açıklanmıştır. Hücrelerin çok miktarda şeker tüketmesi kanser hücrelerinin takibinde radyoaktif takip imkânı sağlamaktadır. Glikoz oksidasyonu aracılığıyla enerji üretimi yapılan birçok çalışmada ortaya koyulmuştur (21). Bu denli yüksek glikoz tüketimi sonucunda ortaya çıkan ikincil metabolitler hücre içerisinde ya

diğer bileşenlere dönüştürülür ya da birikmeye başlar. Hücrelerde biriken bu metabolitler bir süre sonra hücrelere zararlı hale gelmeye başlar. Dışarıdan besinler aracılığı ile alınan ve/veya hücredeki enerji üretimi ile ortaya çıkan metabolitler hücre içerisindeki serbest proteinlere, nükleik asitlere, lipidlere bağlanarak makromoleküller oluştururlar. Bu makromoleküller hücre içerisindeki stresi arttırdığı gibi dolaşım sistemine katılarak diğer organlara ulaşp onlara da hasar verebilmektedir. İleri glikasyon son ürünleri (Advanced Glycation End Products, AGE) olarak adlandırılan reaktif moleküller şeker rezidülerinin lipid, protein veya nükleik asitler gibi makromoleküllerle bir araya gelmesi ile oluşur. Glikasyon karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir (22,23).

Glikasyon süreci yoğunlaşma, yeniden düzenlenme, fragmentasyon ve oksidatif reaksiyonların kaynağı olan Maillard ve Polyol reaksiyonları ile birlikte oldukça kompleks bir süreçtir. Bu ürünler glikoliz sırasında glikoz veya fruktoz gibi şekerlerin yıkılması ile ortaya çıkan reaktif karbonil türlerinin enzimatik olmayan yollar ile başta proteinler olmak üzere lipid ve DNA'ya bağlanabilmektedir. Karbonhidratlar esansiyel metabolitlerin üretimi için hücre içerisinde yıkıma uğrarlar. Metabolitler serbest amino gruplarıyla etkileşime girerek reaktif karbonil türlerini oluştururlar. Reaktif karbonil türleri ise AGE öncülleridir ve AGE üretimine katkı sağlamak amacıyla oksidasyon, dehidrasyon, polimerizasyon ve oksidatif parçalanmaya uğrayabilirler. Proteinlere bağlanması ise bu polipeptitlerde bulunan pozitif yüklü ve hidrofilik özellikte olan lizin ve arjinin aminoasitleri aracılığı ile olmaktadır. İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumu ve birikimi proteinlerin fonksiyonları için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. AGE'ler proteinler arası çapraz bağ oluşumuna katkı sağlayabilir; özellikle kolajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinler arasında, proteinlerin yüklerini değiştirerek bağlanma afinitelerini ve üç boyutlu yapısını bozabilir, böylece o proteinlerin işlevlerini yitirmesine neden olurlar. AGE oluşumunda kümülatif bir şeker kullanımı vardır, bu nedenle diyabetli hastalarda çapraz bağ oluşumu oldukça sık görülmektedir (24). Birçok çalışmada AGE moleküllerinin oluşumu diyabet ve dolaylı olarak obezite ile ilişkilendirilmiştir. Besinler yolu ile alınan AGE'lerin %10-30'u bağırsaklarda emilime uğramaktadır ve bunun yalnızca üçte biri idrar ile vücuttan atılmaktadır. İleri glikasyon son ürünlerinin yıllar içindeki birikimi ise organ hasarları ile sonuçlanmaktadır (25,26).



Şekil 3: İleri glükasyon son ürünlerinin oluşum mekanizması

AGE öncüllerinin hücre içi homeostazı AGE üretimini arttırmak için bozduğu ve bu nedenle reaktif oksijen türlerinin miktarının hücre içinde arttığı gösterilmiştir. Oksidatif DNA hasarının kanserdeki önemi bilinmektedir ancak nedenleri tam olarak çözümlenmemiştir. Oksidatif stres seviyelerinde döngüsel bir artışa yol açan AGE ve ROS arasında gözlemlenen besleme döngüsü, kanserle ilişkili DNA hasarı için kritik sonuçlara sahip olabileceği düşünülmektedir, ancak AGE aracılı DNA hasarının oksidatife bağımlı ve bağımsız etkileri henüz değerlendirilmemiştir.

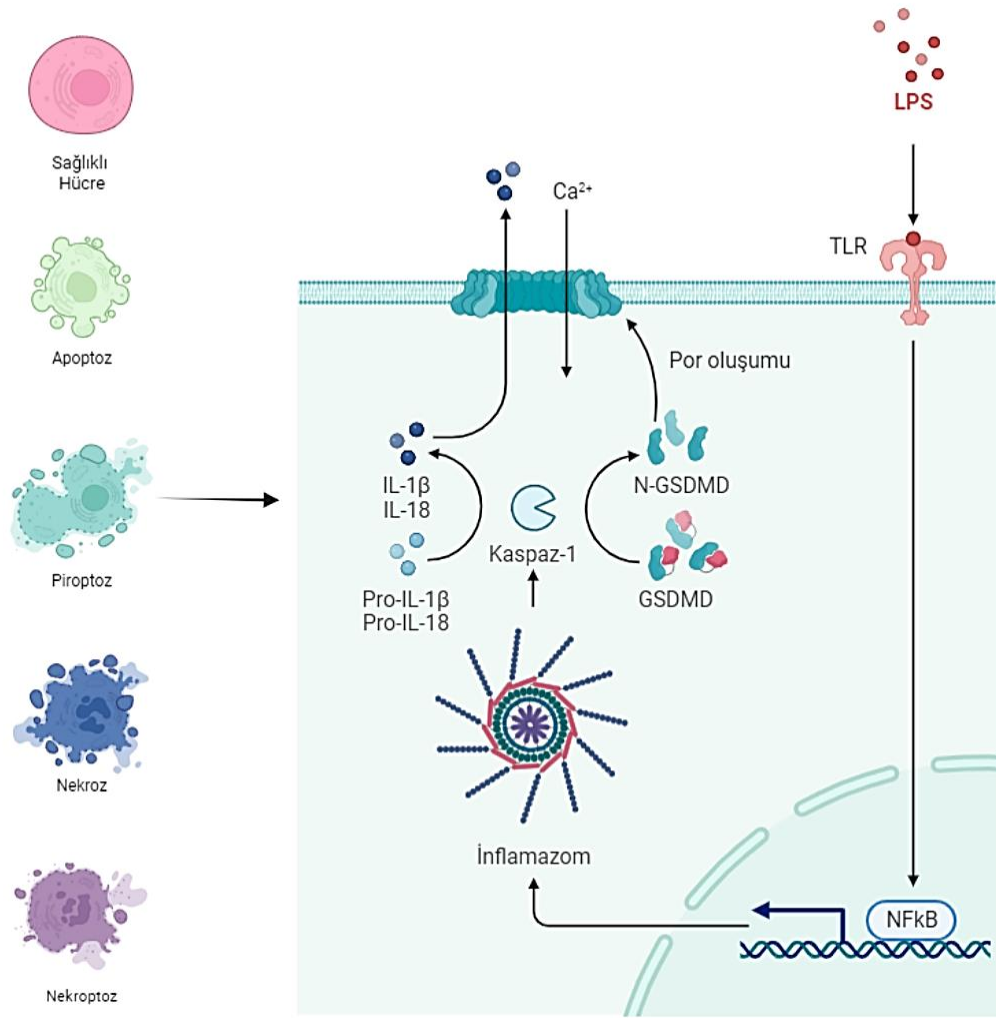
AGE molekülleri aynı zamanda hücrenin sinyal iletim kaskatında da önemli roller oynamaktadır. Hücrelerin birçok transmembran reseptörleri tarafından tanınırlar ve sinyal iletimini başlatırlar. Bu reseptörlerden en iyi bilineni AGE reseptörü olarak isimlendirilen *RAGE (Advanced Glycation End Products Receptors)*'lerdir. *RAGE* immunglobulin ailesine ait bir reseptördür ve embriyonik gelişim sırasında hücrelerde oldukça yüksek miktarlarda bulunurlar. Normal hücrelerde ise immün cevabın düzenlenmesi, dentritik hücre mobilizasyonu, T hücre düzenlemesi, kök hücre göçü gibi rolleri bulunmaktadır. Sağlıklı hücrelerde düşük seviyelerde ifade edilirken kronik hastalıklarda ve kanserde yüksek bulunmuştur. *RAGE* aktivasyonu bir AGE molekülünün ligand olarak bağlanarak sinyal iletimini başlatmasıdır. Kanserde stres cevap yollarının aktivasyonu ile *RAGE* aktivasyonu benzer mekanizmalar aracılığı ile olmaktadır (27).

2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Çok hücreli canlıların büyüme ve gelişmesi sadece hücre bölünmesine değil aynı zamanda hücre ölümüne de bağlıdır. Hücre ölümü normal şartlarda programlı bir yok oluş durumudur ve apoptoz olarak isimlendirilir. Çok hücreli gelişmiş organizmalarda ihtiyaca veya organizmanın karşılaştığı etkene yanıt verecek şekilde, apoptoz dışında birçok hücre ölüm mekanizması vardır. Nekroz başta olmak üzere, netosis, piroptoz, otofaji, mitofaji, ferroptoz bu mekanizmalara örnek gösterilebilir (2).

Apoptoz programlı bir hücre ölümü olmakla beraber; karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişimler sayesinde ayırt edilebilir. Biyokimyasal değişimler, komşu hücrelerin hedef hücreyi yemesini (fagositoz) ve sindirmesini kolaylaştırır. Apoptotik hücre küçülür, yoğunlaşır, çekirdek zarı erir ve kromozomlar küçük parçalara ayrılır. Sonrasında eğer hücre büyükse, hücre zarı kromozom parçalarını içine alacak şekilde apoptotik cisim olarak adlandırılan kesecikler oluşturmaya başlar. Hücre zarı ve

elemanları kimyasal olarak farklılaştığından komşu hücrelerin, genellikle makrofajların, bu apoptotik cisimleri tanınması ve ortadan kaldırması kolaylaşır (28). Apoptoz mekanizmaları hücre içi ve hücre dışı sinyaller olmak üzere iki farklı yoldan aktiveleştirilebilir. Hücre içinde ise apoptoz sinyali alındıktan sonra proteazlar bir sinyal kaskadını başlatırlar. Bu proteazlar aktif bölgelerinde sistein barındırır ve aynı zamanda hedef proteinlerini aspartik asit dizisinden keserler. Bu nedenden ötürü apoptozda rol alan proteazlara kaspaz (caspase; c-sistein, asp-aspartik asit) adı verilir. Kaspazlar hücrede inaktif formda bulunur ve apoptoz sırasında aktiveşirler. Hücrelerde iki tip kaspaz bulunur; apoptozu başlatıcı ve uygulayıcı kaspazlar. Başlatıcı kaspazlar diğer başlatıcılar ile birleşerek bir kompleks oluştururlar ve bu birleşme proteaz aktivasyonu ile sonuçlanır. Uygulayıcı kaspazların başlatıcılar ile aktiveştirilmesinden sonra hücre içerisinde hücreyi öldürmek amacıyla bir proteolitik akış başlatırlar (29). Hücre apoptotik sinyali ise mitokondriden ya da Fas ölüm reseptörü, TNF reseptörleri gibi tümör nekroz faktör reseptör ailesine ait reseptörleri aracılığıyla dışarıdan bir uyaran olarak alır. Hasar almış veya enfekte hücreler programlı bir ölüm ile yok olmazlar. Mekanik bir durum söz konusu olduğu için hücre parçalanır ve içerisindeki tüm bileşenleri ortama yayılır, bu nedenle bu bölgede bir inflamasyon görülmesi kaçınılmazdır. Bu tip hücre ölümleri nekroz olarak adlandırılır. Hücreler için bir diğer önemli ölüm mekanizması ise kaspazlar dışında inflamatuvar bileşenlerin de rol aldığı piroptozdur.



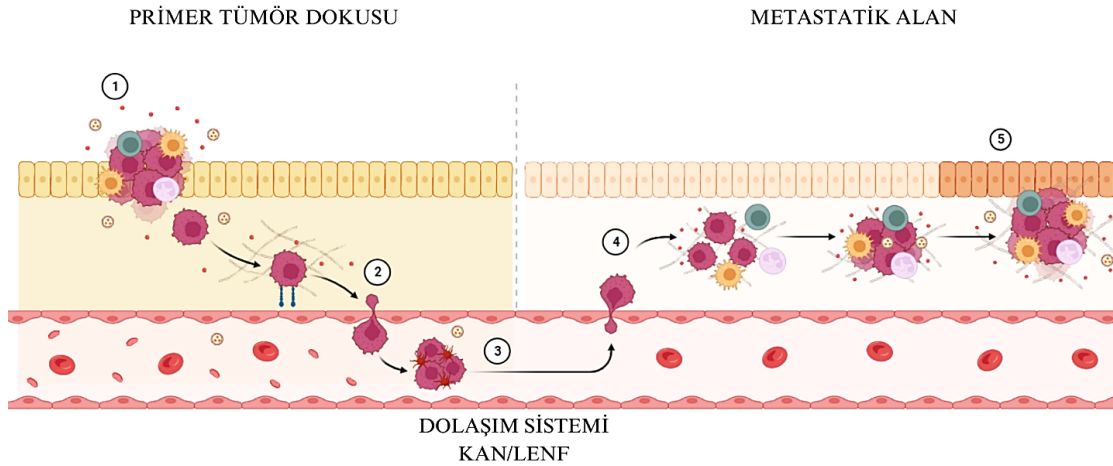
Şekil 4: Pirotoz yolağı

Piroptoz veya piroptozis, *Kaspaz 1* veya *Kaspaz 11* bağımlı programlı bir hücre ölümüdür ve membran bozulması ile karakterizedir. Kanseri ve kronik inflamasyon korelasyonu 19. yüzyıl itibarıyla bilinmektedir ve tümör dokusuna olan lökosit infiltrasyonunun fark edilmesi ile bulunmuştur. Kronik inflamasyon uzun vadede vasküler proliferasyonu ve birçok kanser göstergesini desteklemektedir. *Kaspaz 1*, *IL-1B* ve *IL18*'i aktifleştirerek hücre dışına salınmasını sağlar. Her iki proinflamatuvar proteinin birçok kanser türünde dikkat çekici bir şekilde miktarının arttığı gösterilmiştir. *IL-1B* proinflamatuvar sistemi başlatma kapasitesine sahipken, *IL18* ise interferon gama üretimi için oldukça önemlidir (30,31).

2.5. Hücre İnvazyonu ve Metastazı

Belirgin semptomları olmayan, gizlice ilerleyen ve yaşamsal faaliyetlere olan etkisi yüksek olan primer tümörler dışındaki primer oluşumların sadece %10'u kanserden ölümlere neden olduğu düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin bir diğer ayırıcı özelliği ise bulunduğu dokudan uzaklaşarak yeni bölgelere yerleşebilmesi ve orada yeni tümör yapıları oluşturabilmesidir. Kanser nedenli hayatını kaybeden kişilerde yapılan bir çalışmada bu kişilerin %90'ında primer tümör dışındaki uzak bölgelerde kanser benzeri yapılanmalar gözlemlenmiştir (32).

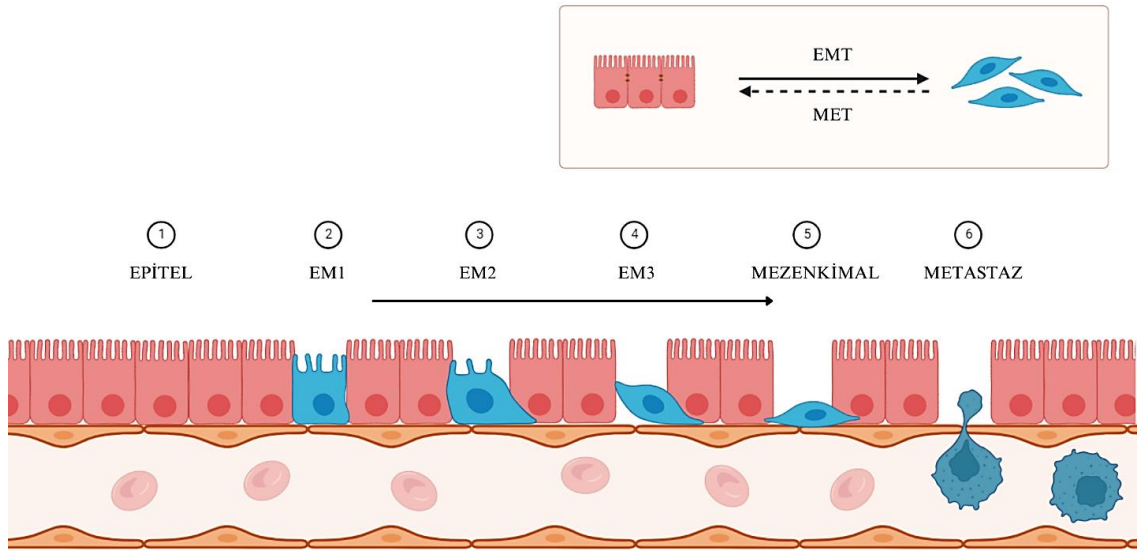
Kanser hücreleri morfolojik ve moleküler yapılarını manipülasyona uğratabilen hücrelerdir. Hücre topluluğunun ihtiyaçları arttıkça tümör çevresi ile etkileşimi daha fazla olur. İmmün sistem hücrelerini kullanarak inflamasyonu indüklemek anjiyogenez için ilk adımdır. Daha sonra hücreler yüzeydeki hücre-hücre etkileşimlerine yardımcı olan membran yapılarını değiştirmeye devam eder. Böylelikle hücre bulunduğu tümör dokusundan kopmayı başarmıştır. Dolaşım sistemi ile etkileşimi kanser hücrelerinin farklı bölgelere gidebilmesini sağlar. Bu taşınım ve yerleşim sırasıyla; invazyon, damar yapısına giriş, taşınım, damar yapısından çıkış, metastatik kolonizasyon ve anjiyogenez ile yeni damar yapılarının oluşumunu sağlama basamaklarını takip eder (1).



Şekil 5: Hücre metastazının evreleri

Hücreler invaziv hale geçebilmek için EMT sistemini kullanırlar. EMT, epitelyal mezenkimal geçiş, epitel hücrelerinin yüzey belirteçlerinin gen ekspresyonları stromal tümör mikroçevresi tarafından salınan faktörler ile baskılanır ve mezenkimal hücre

özelliği kazanabilmesi için vimentin, fibronektin gibi mezenkimal hücre belirteçlerinin ekspresyonlarını artırır. EMT embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde önemli işlevler görür. Kanseri hücreleri ise EMT dönüşümünü hücre-hücre bağlantılarını koparmak ve bazal laminadan sızmak için kullanırlar. Hücre yüzey bileşenleri dışında hücre dışındaki matriks yapısını bozarak EMT'ye katkı sağlayan bir diğer önemli protein grubu ise MMP enzim ailesidir. Intravazasyon ve ekstrasvazasyon (damar yapısından geçme) basamakları benzerdir ve integrinler aracılığı ile gerçekleşir.



Şekil 6: Epitelyal mezenkimal geçişin evreleri (EMT)

Metastatik kolonizasyonda tohum-toprak hipotezi kabul görmektedir. İnvaziv hale gelen ve yeni dokuya uyum sağlama yeteneği olan hücreler “tohum”, dolaşımda bulunan kanser hücrelerinin yerleşeceği ve kendisine uyumlu olan doku ise “toprak” olarak tanımlanmaktadır. Metastatik kolonizasyonda mikrometastazlar gerçekleşebilir ve yıllarca uykuda kalabilirler. Primer tümörler metastatik niş olarak adlandırılan metastazın yapılacağı dokunun hazır olmasını sağlayan sinyaller gönderebilirler. Tüm bunlara ek olarak kanser hücrelerindeki metastazı engelleyici genlerin baskılanması da hücrelerin metastaz yeteneğini artırıcı etkiye neden olmaktadır (2).

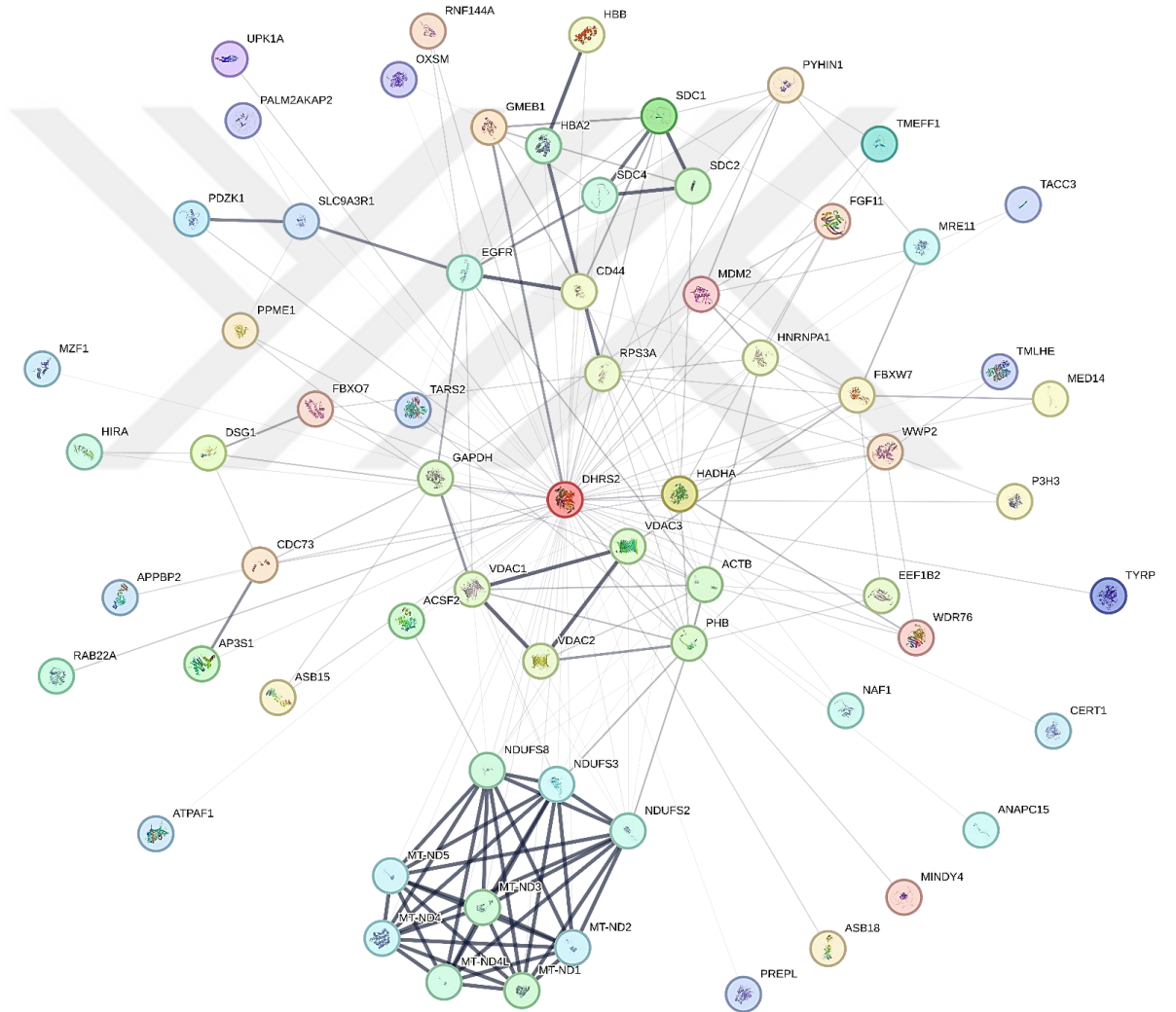
2.6. SDR Ailesi ve Dehidrogenaz Redüktaz 2 (DHRS2) Geni

Kısa zincirli dehidrogenaz redüktaz (*Short-chain Dhydrogenase/Reductase*, SDR) ailesi, *NADPH* bağımlı, hücre içerisindeki birçok metabolik sürece dahil olan ve yaşayan tüm canlılarda bulunan bir enzim ailesidir. SDR tanımı 1991 yılında yapılmıştır ve bu enzim

ailesinin toplamda 46 binden fazla üyesi vardır, oldukça heterojen bir gruptur. Evrimsel süreçte yüksek korunmuşluğa sahiptirler, türler arasında protein dizilerinin arasındaki benzerlik gelişmişlik düzeyine göre değişse bile peptit omurgası ve katlanma sonrasındaki üç boyutlu yapılarının benzerlik oranları yüksektir. Bakteri ve mayalarda SDR proteinlerinin belirlenmesinin ardından insan genomundaki SDR üyelerinin kümelenip sınıflandırılması kolaylaşmıştır. Temelde klasik ve genişletilmiş olarak iki ana gruba ayrılırlar. Bu sınıflandırma N-terminal ucundaki aktif bölge ile kofaktör bağlanma bölgesine göre yapılır. SDR ailesinin enzim substratları geniş bir spektrum oluştururlar. Aromatik bileşikler, alkoller, şekerler, steroidlerden ksenobiyotiklere kadar farklı substratları işleyebilirler. SDR genlerindeki SNP varyantları kanser ve metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (33–35).

Dehidrogenaz/Redüktaz 2 geni, *DHRS2*, SDR ailesinin mitokondride aktivite gösteren enzimlerinden sadece biridir. *DHRS2* geni 14. Kromozomun uzun kolunun 11.2 bölgesinde yer almaktadır. (14q11.2) Birden fazla transkripti bulunmaktadır ve hangi transkriptin proteine dönüşeceği dokuya özeldir. 1991 yılında sodyum bütirat uygulanarak hücre döngüsü bloklanmış HepG2 hücre hattında çekirdekte biriken tanımsız bir protein olarak fark edilmiştir ve protein D olarak adlandırılmıştır (36,37). Sonraki yıllarda aminoasit dizisinin belirlenmesinin ardından ontoloji analizleri ile SDR gen ailesine ait olduğu saptanmıştır. Hücre nükleusunda proteine dönüştükten sonra yapısında taşıdığı sinyal peptiti aracılığı ile mitokondriye taşınır ve orada oksidoredüktaz aktivitesini gösterir. *Hep27* ve *SDR25C1* olarak da literatürde yer alan *DHRS2* protein kodlayan transkriptine bağlı olmak üzere 280 ila 300 aminoasit uzunluğundadır ve protein büyüklüğü 25-30 kDa arasında değişmektedir. İlk tanımlanan 9 ekzon daha sonraki çalışmalarda Heinz ve arkadaşları tarafından 5' ucunda kodlamayan bir ekzon daha olduğu bulunmuştur (38,39). Yapısal ilginçlikleri bulunan bu genin ikinci ekzonunda retroviral kökenli olduğu düşünülen proksimal bir promotör bölgenin bulunduğu ve 3., 4. ve 6. ekzonlarda başlangıç kodonu olarak tanımlanabilecek bölgelerin bulunduğu saptanmıştır. Bu nedenle alternatif kırılma ve bu promotör bölge nedenli sentezlenen farklı transkriptlerin hücreler içerisinde farklı işlevler gösterebildiği düşünülmektedir. Bir başka yaklaşımda ise *DHRS4* genine olan genomik dizi benzerliğinden ve lokasyon yakınlığından yola çıkan araştırmacılar, memeli sınıfının ortaya çıkması sırasında *DHRS2* geninin *DHRS4*'ün kopyası olarak genoma girmesi ile oluştuğunu dile getirmektedirler (40).

Enzimatik aktivitesinin dışında hücre içi yollarda düzenleyici görevleri olduğu bilinmektedir. *MDM2* üzerinden *p53* ve *p21* düzenlenmesine yardımcı olmasının yanısıra, *MYB* ve *LEF1* transkripsiyon faktörleri ile de etkileşim halindedir. Proliferasyon, migrasyon ve invazyon, reaktif oksijen stres cevabı, hücre döngüsü gibi bir Meme, cilt, mesane, karaciğer kanserleri gibi birçok kanserde ekspresyon seviyelerinde değişim gözlemlenmiştir ve günümüzde de *DHRS2* hakkındaki çalışmalar önem kazanmaktadır (41–43).



Şekil 7: *DHRS2* proteini ve etkileşimde olduğu diğer proteinler (StringDB verisi)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücrelerin Seçimi ve Transfeksiyon İşlemleri

Gen ifade profillerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve karşılaştırmaların yapılabilmesi amacıyla, çalışmamızda dört farklı insan meme hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hatlarından ikisi luminal A alt tipli epitel ve duktal kökenli adenokarsinomlar olan MCF7 ve T47D hücreleridir. Diğer bir hücre hattı ise üçlü negatif olarak sınıflandırılan epitel kökenli MDA-MB-231 hücreleridir. Tüm bu adenokarsinomlar ile sağlıklı doku karşılaştırması yaptığımız fibrokistik epitel hücrelerimiz ise MCF10A'dır. Hücrelere özgü besiyerleri ve dondurma koşulları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Kültür koşulları

Hücre	Büyüme medyumı	Dondurma koşulları
MCF7	%10 FBS	%5 DMSO
	%1 Penisilin/streptomisin	Büyüme medyumı
	DMEM	
T47D	%10 FBS	%5 DMSO
	%1 Penisilin/streptomisin	Büyüme medyumı
	RPMI1640	
MDA-MB-231	%10 FBS	%5 DMSO
	%1 Penisilin/streptomisin	Büyüme medyumı
	DMEM-F12	
MCF10A	%10 FBS	%7,5 DMSO
	%1 Penisilin/streptomisin	Büyüme medyumı
	%0,02 EGF	
	(100 µg/ml stok)	
	%0,1 Hidroksikortizon	
	(0,5 mg/ml stok)	
	%0,1 İnsülin	
	(10 mg/ml stok)	
	%1 MEM aminoasit	
	(100X (10mM) stok)	

Hücreler uygun koşullarda çoğaltılıp deney için uygun bir sayıya getirildikten sonra transfeksiyonu işlemlerine başlandı (44).

3.1.1. *DHRS2* Ekspresyon vektörü transfeksiyonu

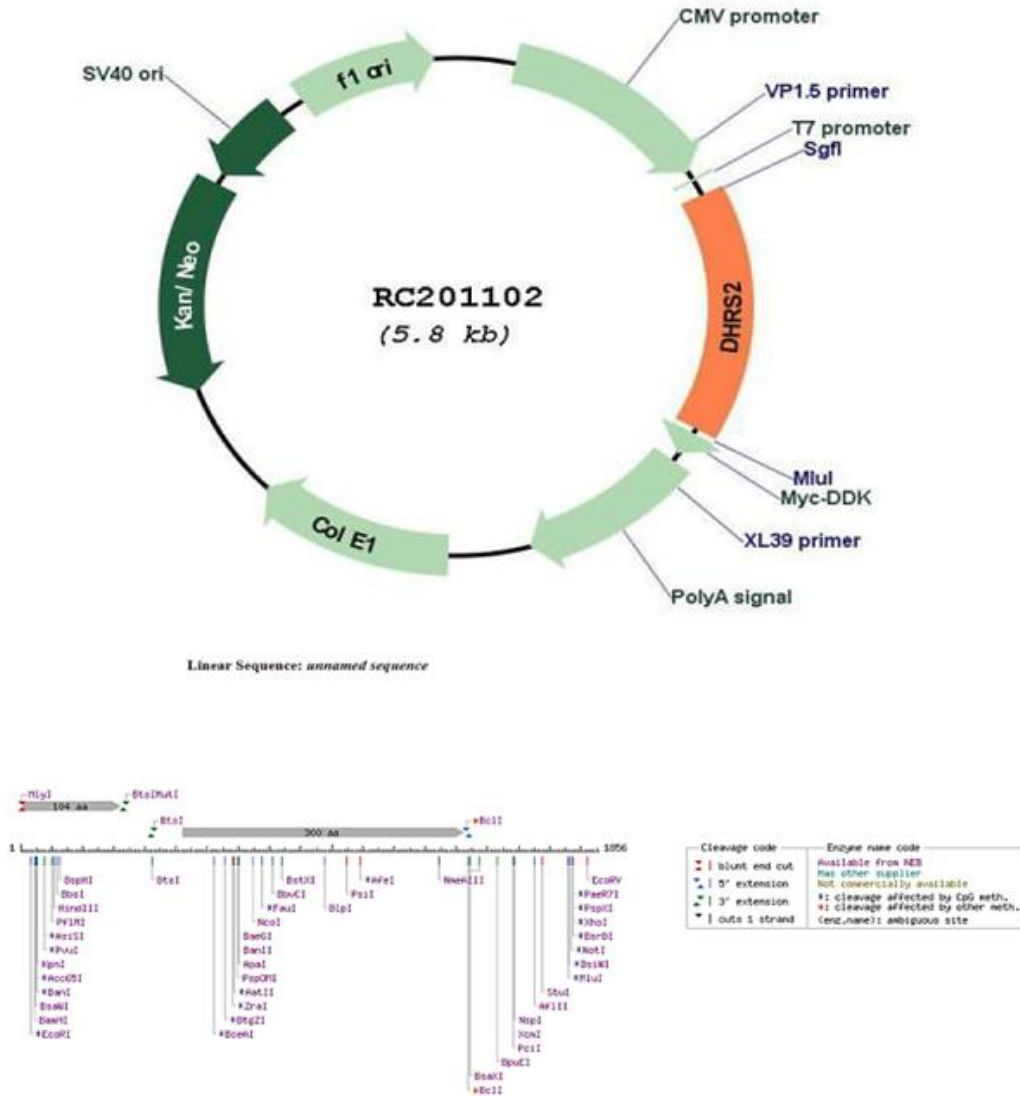
DHRS2 geninin ifadesinin arttırılacağı grup olan ekspresyon vektörü grubu (*DHRS2* OE-vektör) ve aynı vektörün promotör bölgesinin (*CMV promoter*) kesilip çıkartılarak kontrol grubu (*DHRS2*-vektör kontrol) olarak belirlenmiştir. Bu vektörlerin çoğaltılmasında ticari olarak alınan kompetan *DH5α* ve *ccdB E.coli* suşları kullanılmıştır. Vektör haritası ve kesim için kullanılan enzimler aşağıda verilmiştir.

Vektörler bakterilere aşağıdaki aşamalar ile aktarılmıştır.

- -80 °C’de saklanan kompetan hücreler buz üzerinde eritildikten sonra üzerine 1 mg plasmid eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi.
- Sonrasında bakterilerin olduğu deney tüpü 42 °C’de 90 saniye ısı bloğu veya termal döngü cihazında inkübe edildi.
- 42 °C’den alınan örnekler tekrar buza alındı ve 5 dakika bırakıldı.
- Üzerine 900-500 µl SOC medyum eklenerek 37 °C’de 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyonu tamamlanan örnekler santrifüj edildikten sonra pellet plasmidin direnç genine uygun antibiyotik ile hazırlanmış agar plaklara ekilip 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün koloni oluşumu kontrol edildi ve her bir sıvı besiyerine (LB) tek bir koloni gelecek şekilde sıvı besiyerinde çoğaltma gerçekleştirildi.
- Bakteriler yeterli yoğunluğa geldikten sonra Qiagen QIAprep® Miniprep kiti aracılığı ile plasmid izolasyonları gerçekleştirildi.

Transfeksiyonlar için Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 kullanıldı. Her hücre grubu için önerilen sayılar değişmekle beraber transfeksiyon protokolü her hücre için aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- siRNA transfeksiyonundan farklı olarak Opti-MEM™ ile seyreltilen plasmid DNA’sına uygun miktarda P3000 eklenir ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Arkasından Opti-MEM™ ile seyreltilen Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 ile plasmid içeren tüp birleştirilir ve aynı koşullarda hücrelere aktarılır.



Şekil 8: *DHRS2* ekspresyon vektörü ve enzim kesim bölgeleri

3.1.2. *DHRS2* siRNA transfeksiyonu;

- Hücreler deneyden bir gün önce belirlenen sayılarda ve kendi medyumlarında hücre kültür kaplarına ekilir.
- %80 yüzey kaplamasına ulaştıklarında hangi kuyulu kültür kabına ekildiğine göre verilecek siRNA (Dharmacon™ SMARTpool ON-TARGETplus) miktarı hesaplanır. Yüzey alanı ve hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri bu hesaplama için kritiktir.

- Daha sonra yine siRNA için yapılan pmol hesabı gibi hücrelerin transfeksiyonunda kullanılacak lipozomal ajan miktarı hesaplanır.
- Gerekli miktarda Opti-MEM™ ile RNaz/DNaz içermeyen tüplerde Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 ve siRNA seyreltilir.
- Daha sonra her iki tüp bir araya getirilir ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Hücre medyuma homojen bir şekilde dağıtılır, dikey ve yatay hareketlerle kuyunun tüm bölgelerine eşit bir şekilde yayılması sağlanır.

3.2. Gen İfadelerindeki Değişimlerin Kantitatif Olarak Ölçülmesi

3.2.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonları Monarch ® Total RNA Miniprep Kit, Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit ve Trizol yöntemleri ile yapıldı.

Monarch ® Total RNA Miniprep Kit, Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

- Hücreler kuyulu kültür kaplarından tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılır ve eppendorf tüplerine toplanır.
- Üzerinden besiyeri uzaklaştırılmış hücre pelleti lizis tampon çözeltisi ile çözülür ve hücrelerin parçalanması sağlanır.
- Daha sonra üzerine kitin önerdiği oranda etanol eklenir.
- Bu karışım RNA kolonlarına aktarılır ve protokole uygun bir şekilde santrifüj edilerek (12000-16000xg) RNA'nın kolonlara tutunması sağlanır.
- Ardından yıkama solüsyonları ile işlem tekrarlanır.
- Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra RNA'nın kolonlardan koparılması için RNaz içermeyen özel bir su kolonu tamamen ıslatacak şekilde kolona eklenip, kolonlar toplama tüplerine aktarılır.
- Yine aynı hızda santrifüj edilir ve toplama tüplerindeki RNA'lar hızlıca buza alınır ve ölçümü gerçekleştirilir.

Trizol ile manuel RNA izolasyonu yöntemi hücre sayısının çok olduğu veya RNA'ların kırılmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajı aynı süreç içerisinde hücrenin DNA ve proteinlerinin de toplanabilmesidir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- Toplanan hücre pelleti 1 ml trizol solüsyonunda çözülür ve üzerine 1:5 oranında kloroform eklenir. Tüpteki sıvı alt-üst edilerek karıştırılır.
- +4 °C'de ~12000xg'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Tüpteki sıvı santrifüj sonrasında 3 faz olarak görünmelidir. En üstteki şeffaf faz yeni bir tüpe aktarılır.
- Daha sonra üzerine izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve 10 dakika santrifüj edilir.
- Dipteki pellete zarar vermeyecek şekilde üst sıvı çekilir ve %75'lik etanol eklenir.
- Santrifüj sonrası süpernatant iyice çekilir ve steril bir ortamda tüpün ağzı açık bırakılarak oda sıcaklığında kalan alkolün uçması beklenir.
- Son olarak alkolün uzaklaştırılmasının ardından pellet RNaz içermeyen su ile çözülür (20-40 µl) ve soğuğa alınır.

3.2.2. cDNA sentezi

İzole edilen RNA'ları gen ifade analizlerinde kullanabilmek için bu RNA'ların komplementer DNA'ya dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu sayede deney sırasında RNA'lar kolayca parçalanmaz ve uzun ömürlü olur. Komplementer DNA'ya dönüşüm için ProtoScript® First Strand cDNA sentez kiti kullanılmıştır. İşlem basamakları ve miktarları Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3: cDNA sentezi basamakları

Total RNA	1-6 µl	Toplam hacim 8 µl
Random Primer	2 µl	
dH2O	RNA hacmine göre belirlenir.	
70 °C'de 5 dakika		
Termal ısı bloğunda inkübe edilir.		
Buza alınır.		
M-MultiV reaksiyon karışımı	10 µl	Toplam hacim 20 µl (8+12 µl)
M-MultiV enzim karışımı	2 µl	
25 °C'de 5 dakika		
42 °C'de 1 saat		

80 °C’de 5 dakika

Termal ısı bloğunda inkübasyon edilir.

Örnekler -20 °C’de saklanır.

3.2.3. Eş zamanlı Kantitatif PZR (*Real-Time PCR*)

cDNA sentezinin ardından gen ifadelerinin sayısal olarak ölçümlerinin yapılabilmesi için gen amplifikasyonlarında ışıma vererek kantitatif bir değer eldesi sağlayan *SYBR-green* metodu kullanılmıştır. Tüm okumalar, genlere özgü tasarlanmış olan primerlerin uygun çalışma sıcaklıkları belirlendikten sonra gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte kullandığımız solüsyonların içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4: Kantitatif PZR karışımı için gerekli miktarlar

Luna Universal qPCR Master Mix	5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA	2 µl
Nuclease-free su	1 µl
Toplam hacim 10 µl	

Gerekli tüm malzemeler oda sıcaklığına getirilir, daha sonra buza alınır. Karışımlar hazırlanırken solüsyonların tamamen erimesi beklenir, pipetleme ve küçük vorteksler ile tamamen homojen bir karışım elde edilmesine dikkat edilir. Daha sonra karışım Roche LC480 cihazına uyumlu beyaz qPZR plate'lerine dağıtılır ve üzerine deney gruplarına göre belirlenmiş cDNA'lar eklenir ve plate'in üzeri kapatılır. (*sealing film*) Cihaza koymadan önce plate 1 dakika 2500-3000 rpm'de santrifüj edilir ve cihaza koyulur. Chaz koşulları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Kantitatif PZR koşulları

	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dakika	1

	95	10 sn	
Çoğaltma	64	20 sn	45
	72	10 sn	
	95	5 sn	
Erime Eğrisi	65	1 dakika	1
	97		
Soğutma	40	30 sn	1

Tüm polimeraz zincir reaksiyonu deneyleri boyunca kullanılan ve cDNA'ya özgü sentezlenmiş primer dizileri aşağıda verilmiştir.

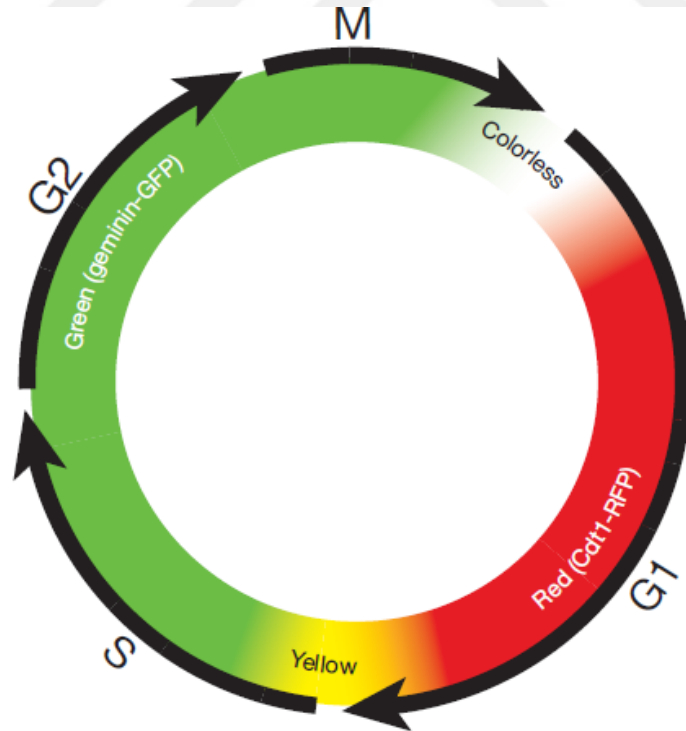
Tablo 6: Kullanılan primerlerin listesi

Gen	Forward dizi	Reverse dizi
<i>DHRS2</i>	GCTGTCATCCTGGTCTCTTCC	CTGGAACCACGCAGTTTACC
<i>TP53</i>	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	GGTACAGTCAGAGCCAACCT
<i>MDM2</i>	CTACAGGGACGCCATCGAAT	ACTCTCCCCTGCCTGATACA
<i>JMY</i>	GACCGAGCAGGAAATCGACA	TTCTTCGTAGCCCTTCTGCC
<i>CDKN1A</i>	CACTTTGATTAGCAGCGGA	AGCCGAGAGAAAACAGTCCA
<i>CCND1</i>	AGCTGTGCATCTACACCGAC	TCTGTTTGTTCTCCTCCGCC
<i>CCNE1</i>	CCCAAACCTCAACGTGCAAGC	TTGCTCGCATTTTTGGCTGC
<i>CDK4</i>	GCCAGCCGAAACGATCAAG	CAGCTTGACTGTTCCACCAC
<i>CDK6</i>	CGAAGTCTTGCTCCAGTCCA	CTCCTGGGAGTCCAATCACG
<i>CDK2</i>	ACTGGCATTCCTCTTCCCCT	GCGAGTCACCATCTCAGCAA
<i>RB1</i>	GACCGAGAAGGACCAACTGA	CTGGAAGGCTGAGGTTGCTT
<i>IL1A</i>	GGTAGTAGCAACCAACGGGAA	CAGCAGCCGTGAGGTACTGAT
<i>IL1B</i>	TCGACACATGGGATAACGAGG	CAACACGCAGGACAGGTACA
<i>CASP1</i>	ACAAGACCTCTGACAGCACG	TAAACCACACCACACCAGGG
<i>PYHIN1</i>	CCAGCACAACCCTACCTGAA	GATGACTGTGCTCCTGGGTG
<i>MEFV</i>	TGCCTGTCCCTGAAAAGTGG	TCAGCTCCGGAACATTGAAC
<i>IL18</i>	GCTGAAGATGATGAAAACCTGGA	GAGGCCGATTTCCTTGGTCA
<i>EpCAM</i>	GTGAAAACCTACAAGCTGGCCG	GCCAGCTTTGAGCAAATGACA

<i>ACTB</i>	ACAGAGCCTCGTCGCCTTTGCC	TGGGGTACTTCAGGGTGAGG
<i>TBP</i>	ACTGACCTAAGACCATTGCAC	CTTGAAGTCCAAGAACTAGCTGG

3.3. Hücre Döngüsü Analizleri

Floresan ubikitinasyon hücre döngüsü indikatörü (Flourescent Ubiquitination Cell Cycle Indicator, FUCCI) hücre döngüsünün evrelerinde farklı renkler veren floresan özellikli bir proteindir. Cdt1 ve geminin proteininin füzyonundan oluşur. G1 fazında geminin proteini ubikitin işaretlenip yıkıma uğradığı için ortamda sadece kırmızı işaretli protein (RFP, ex/em; 555/584 nm) olan Cdt1 kalır ve G1 fazındaki hücreler kırmızı renkli olarak görülür. Eğer hücre döngüsü S, G2 veya M fazında ise Cdt1 yıkılır ve ortamda GFP (ex/em; 485/520 nm) işaretli geminin proteini kalır ve hücreler yeşil renkte görünür. Hücreler G'den S fazına geçiş aşamasında ise ortamda her iki protein de bulunacağından hem kırmızı hem de yeşil ışımaya verirler. Bu iki renk birbirinin üzerine geldiği için sarı renkli görünürler. Bu dinamik kırmızı- sarı- yeşil renk değişimi hücre döngüsünün ilerleyişini göstermektedir.



Şekil 9: Floresan işaretli ubikinleyici hücre döngüsü indikatörü (FUCCI)

Bu çalışmada hücre döngüsünün takibi için hücreler önce Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor BacMam 2.0 sistemi ile muamele edildi. BacMam 2.0 sistemi bir viral partikül sistemidir ve hücrelere bu sensörün kolayca girebilmesini sağlamaktadır. Hücre başına 20 PPC (*particle per cell*) olacak şekilde altı kuyulu hücre kaplarında, iki adet yuvarlak cam lamel üzerine ekilmiş 200.000 hücreye uygulama yapıldı. Hücrelere sensör transfeksiyonundan sonra *DHRS2* OE-vektör, *DHRS2* siRNA verildi ve deney grupları oluşturuldu. Daha önceden belirlediğimiz inkübasyon süreleri sonrasında yuvarlak lameller temiz lam üzerine alınarak 40X mercek kullanılarak, belirtilen emisyon/eksitasyon dalga boyları sisteme girilerek konfokal mikroskopta incelendi.

3.4. Hücre Ölümünün İncelenmesi (Apoptoz Deneyleri)

Hücre ölümünün belirlenebilmesi için hücresel apoptoz yollarından biri olan Kaspaz3/7 aktivitesi baz alınarak veriler elde edildi. Kullanmış olduğumuz Invitrogen™ CellEvent™ Caspase-3/7 Red Detection Reagent kiti nükleik asit bağlayıcı floresan boya konjuge halde bulunan DEVD olarak kısaltılan dört aminoasitten oluşan peptidin kesilmesi ile işlev görmektedir. Apoptoz sırasında aktif halde bulunan *Kaspaz 3* ve *Kaspaz 7* DEVD peptidini keserek nükleik asite bağlanma afinitesi olan boyayı serbest bırakır ve bu boya DNA'ya bağlanarak floresan bir ışımaya verir. Bu yöntem Kaspaz aktivitesinin yanı sıra hücrelerin çekirdeklerinin durumu hakkında da bilgi vermektedir. Her bir hücre hattından 50.000 hücre/ kuyu olacak şekilde 24 kuyulu kültür kaplarına ekildi ve transfeksiyon uygulamaları yapıldı. Deney grupları için daha önce belirlenen inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra Invitrogen™ CellEvent™ Caspase-3/7 Red Detection Reagent toplam hacimde 1X olacak şekilde kit protokolünün önerdiği yöntem ile eklendi ve bir saat 37 derecede inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkanarak konfokal mikroskopta görüntülenmesi yapıldı.

3.5. İleri Glikasyon Son Ürün Seviyelerinin Tespiti

Hücrelerde metabolik indirgenmeler sonucunda oluşan ve diğer bileşenlere bağlanarak hücre içi stres yollarını aktifleştiren ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) hücrelerdeki miktarları OxiSelect™ AGE Competitive ELISA kiti ile ölçülmüştür. Bu kit birden fazla tipteki AGE'leri tanıyarak kolorimetrik ölçüm imkânı sağlamaktadır. İlk olarak plaka AGE konjugatı ile kaplanır. Bu kaplama işlemi aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

- 100X konjugat seyreltici solüsyonu PBS içerisinde seyreltilir ve 1X solüsyon elde edilir.
- AGE konjugatının derişimi 10 µg/ml olacak şekilde hazırlanır.
- Bu iki bileşen 1:1 oranında karıştırılır ve 96 kuyulu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklenir ve gece boyunca +4°C’de bırakılır.
- Ertesi gün kuyulardaki sıvı çekilir ve PBS ile yıkanır, üzerine 200 µl seyreltici solüsyon eklenir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Kullanım öncesine kadar içerisindeki sıvı uzaklaştırılmaz ve +4 °C’de saklanır.

Kaplama işleminden sonra kullanılacak örnekler, tampon çözeltiler ve AGE-BSA standartları hazırlanır.

- Yıkama solüsyonu deiyonize su ile 100X’ten 1X’e seyreltilir.
- Anti-AGE ve sekonder antikor 1:1000 oranında örnek seyreltici ile seyreltilir.
- 50 µl örnek ve standart, önceden belirlenen plaka tasarımına uygun olarak AGE konjugat kaplı kuyulara eklenir ve 10 dakika, oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılır.
- Sonrasında örneklerin üzerine 50 µl seyreltilmiş anti-AGE antikor eklenir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 1 saatin sonunda 3 yıkama yapılır. 250 µl 1X yıkama tamponu kuyulara eklenir ve iyice çekilir. Daha sonra kurutma kağıdına vurularak tüm sıvı uzaklaştırılır.
- Yıkamadan sonra 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor-HRP konjugatı eklenir ve oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından bir önceki yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlanır.
- Oda sıcaklığına getirilmiş substrat solüsyonundan her bir kuyuya 100 µl eklenir. Oda sıcaklığında 2 ila 30 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılır. Bu aşamada renk değişimi beklenmektedir.
- Sürenin tamamlanmasının ardından her bir kuyuya 100 µl durdurma solüsyonu eklenir ve hemen plaka okuyucuda 450 nm’de ölçümü yapılır.

3.6. Migrasyon (Yara İyileşme) Testleri

8 kuyulu cam *chamber slide* kültür kaplarına 5×10^5 hücre ekildi. Hücreleri yüzeye %90 oranında yayılma gösterdiğinde 200 µl’lik pipet ucuyla baştan sonra lineer

bir çizgi çizildi. Kuyular yapışan hücrelere zarar vermeden PBS ile 2 kez yıkandı. Kuyuların üzerine *DHRS2* siRNA, hedefsiz (NT) siRNA, *DHRS2* OE-vektör ve boş vektör olarak adlandırılan vektör kontrol grubu için oluşturulan *DHRS2* dizisi kesilmiş olan vektör lipozomal ajan aracılığı ile verildi ve birer kuyu transfekte edilmemiş kontrol grubu olarak bırakıldı. Yara öncesi, 0 olmak üzere her 24 saat sonunda grupların görüntüleri kamera bağlantılı ışık mikroskopunda 4X büyütme objektif ile alındı. Image J programı ile yara açıklıklarındaki değişimler analiz edildi.

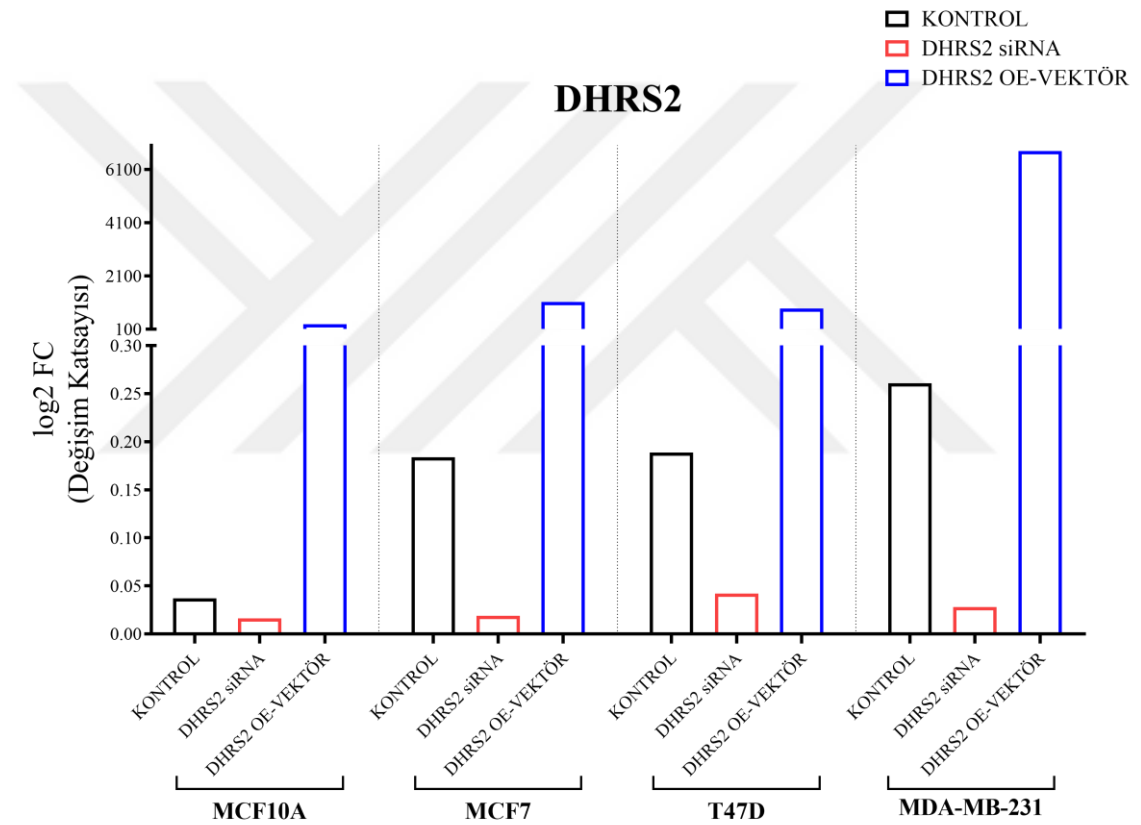
3.7. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki gen ifadelerinin karşılaştırılması GraphPad Prism versiyon 8 ile yapıldı. Tüm grafikler ve istatistiksel testlerde yine aynı program kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda Holm-Sidak, tek yönlü ANOVA ve t-test yaklaşımları kullanıldı. Floresan işaretli proteinlerin görüntü ve yoğunluk miktarları ImageJ/FIJI arayüzü kullanılarak sayısal değerlere dönüştürüldü. Buna ek olarak migrasyon analizleri *wound healing size tool* eklentisi ile yapıldı ve alan ölçümleri tamamlandı. Ölçümlerin standart sapmaları ve ortalamaları Microsoft Excel ile hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık tüm karşılaştırmalarda 0,05'den küçük olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Optimizasyon Sonuçları

Fonksiyonel çalışmalara başlamadan önce *DHRS2* geninin optimal baskılanma ve artma süreleri farklı saat dilimlerinde denenmiştir. Baskılanma oranı için belirlenen eşik %85, artma eşiği ise 100 katın üzerinde olarak belirlenmiştir. Tüm hücrelerde transfeksiyonlar eş zamanlı gerçekleştirilmiş olup herhangi bir dış etkiye maruz kalması engellenmiştir.



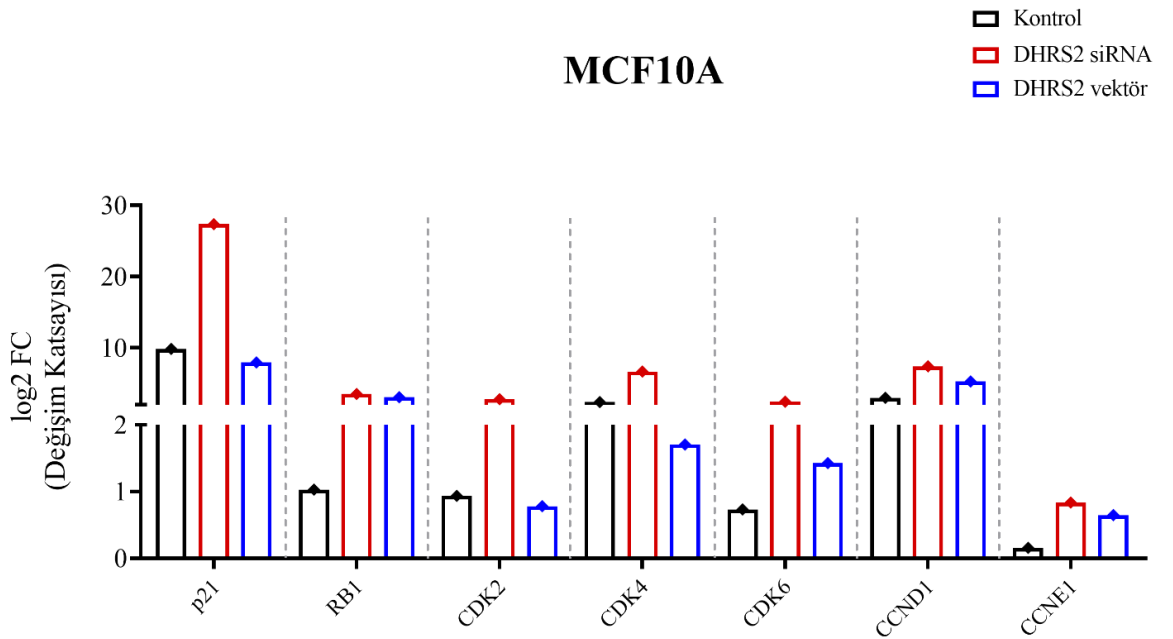
Şekil 10: Optimizasyon sonrasında deney gruplarındaki *DHRS2* gen ifade seviyeleri

4.2. Hücre döngüsü bileşenlerinin gen ifadeleri ve FUCCI analiz sonuçları

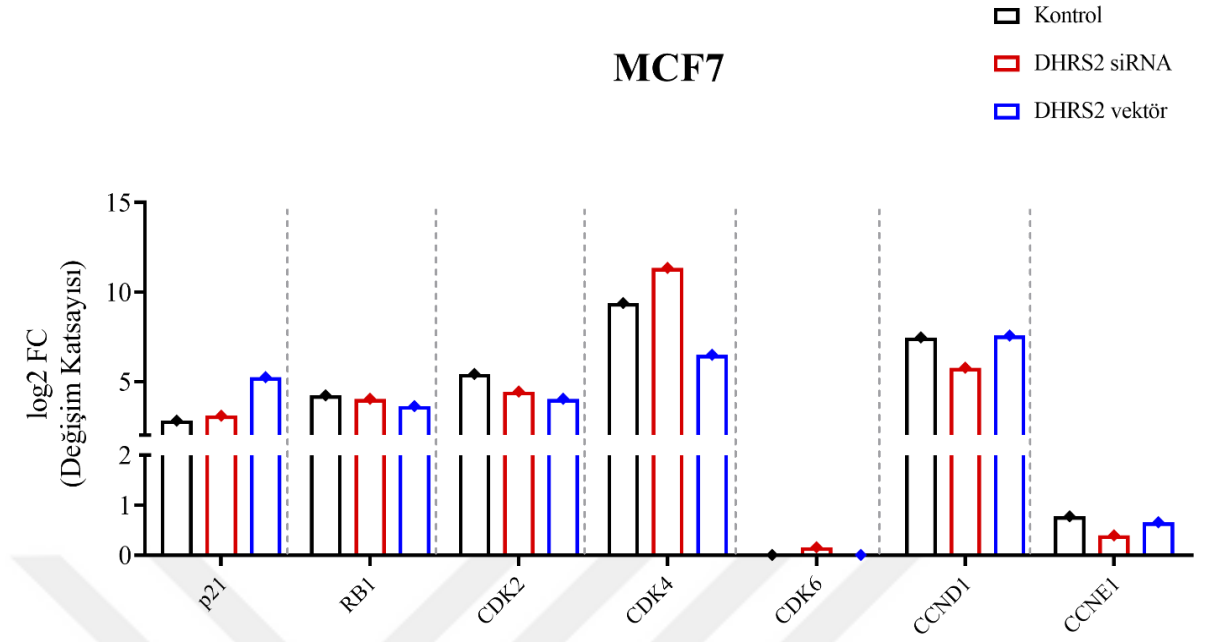
DHRS2 hücre döngüsü durdurulmuş hepatoselüler karsinom hücrelerinde keşfedilmesine rağmen hücre döngüsünün hangi aşamasında görev yaptığı hala bilinmemektedir. Bu nedenle hücre döngüsünün başlatıcı (G1) ve sentez (S) evrelerine geçişi sağlayan ve bu geçişi düzenleyen genlerden bazıları incelenmiştir. Hücre döngüsünün kanser hücrelerinde oldukça aktif olduğu bilinmektedir. Bu döngünün

başlaması için gerekli sinyali veren genlerden biri olan *RB1* her üç kanser hücresinde kontrol olarak kullandığımız MCF10A ile kıyaslandığında ortalama 4 kat daha fazla eksprese olmaktadır. Benzer şekilde *CCNE1* (*Siklin E*) ve *CCND1* (*Siklin D*) genleri ise MCF7, T47D ve MDA-MB-231 hücrelerinde sırasıyla 5 kat ve 2 kat artmış ifadeye sahiptir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi için gerekli olan inhibitörlerden biri olarak görev yapan *CDKN1A*, diğer adıyla *p21*, adenokarsinom hücrelerinde %70 oranında baskılanmıştır.

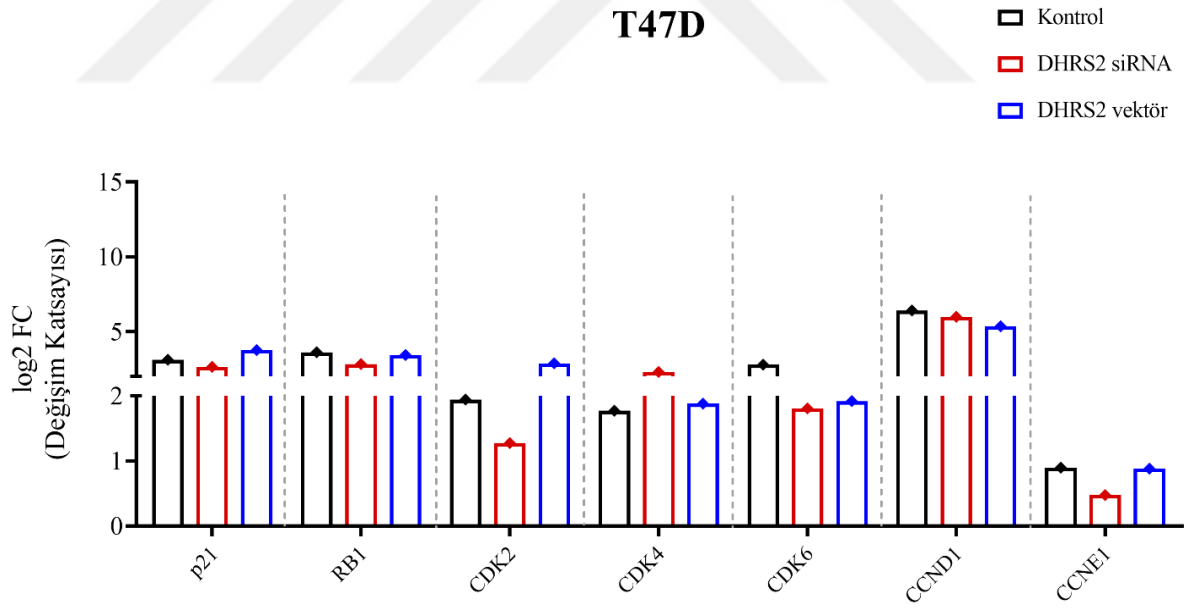
CDKN1A ifadesi kanser gruplarında *DHRS2*'nin artması ile paralellik gösterirken, MCF10A grubunda tam tersi *DHRS2*'nin baskılandığı grupta artmış ifadeye sahiptir. *CDK2*, T47D *DHRS2* OE-vektör ve MCF10A *DHRS2*-siRNA gruplarında artarken, diğer tüm gruplarda azalmıştır ve en düşük seviyesi MDA-MB-231 *DHRS2*-siRNA grubunda gözlemlenmiştir. *CDK4* MCF10A *DHRS2*-siRNA grubunda 2,7 kat artmıştır. *CDK4* ile kompleks olarak görev alan *CDK6* ise yine aynı grupta 3 katlık bir artış gösterirken, MCF7 *DHRS2*-si grubunda 22 katlık bir artış göstermiştir. *Siklin E* ve *Siklin D* ise karsinom grubunda *DHRS2*'nin baskılanması durumunda azalma gösterirken, fibrokistik MCF10A'da ise durum tam tersi olarak ölçülmüştür. Gen ekspresyonlarındaki tüm değişimler grafikler ile gösterilmiştir.



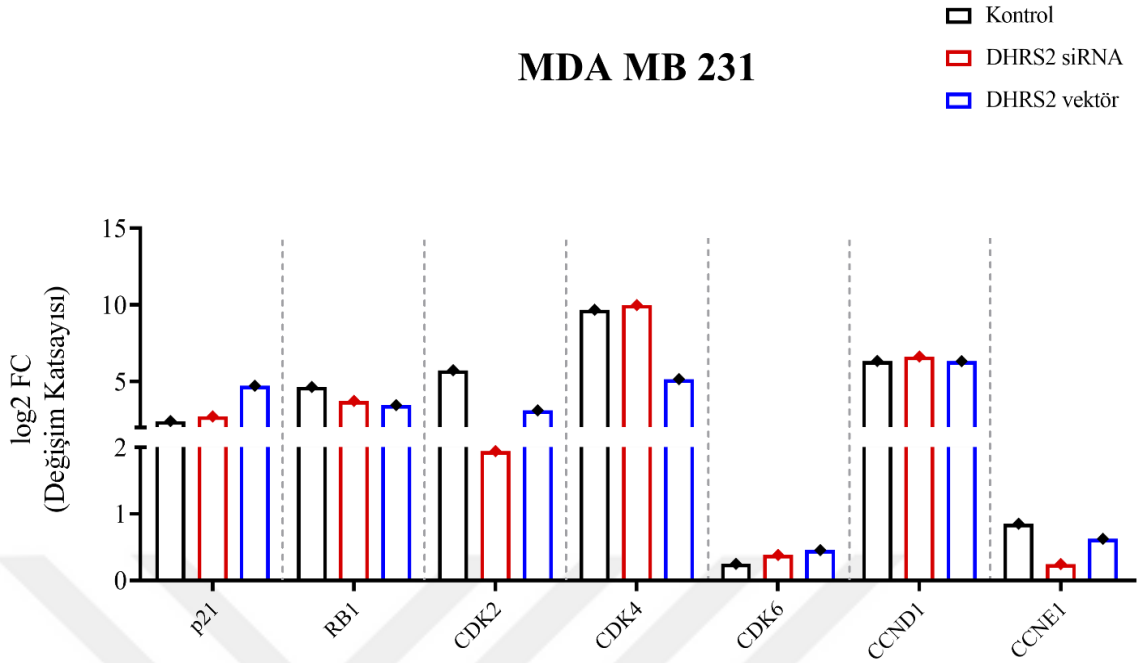
Şekil 11: MCF10A hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri



Şekil 12: MCF7 hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri



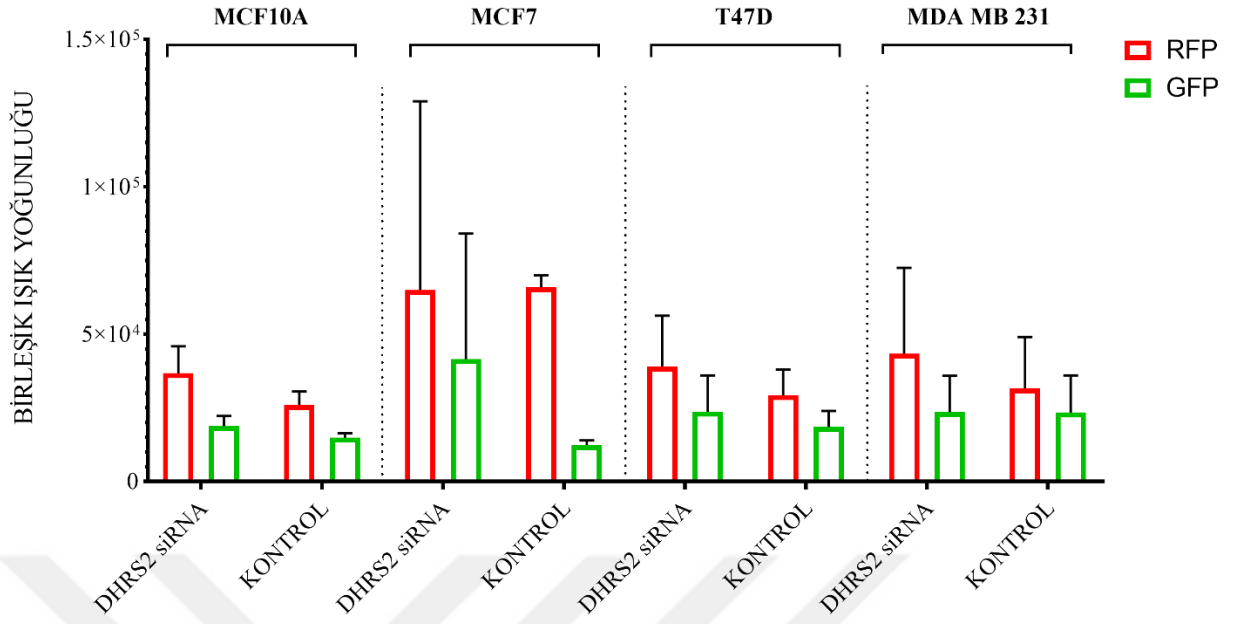
Şekil 13: T47D hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri



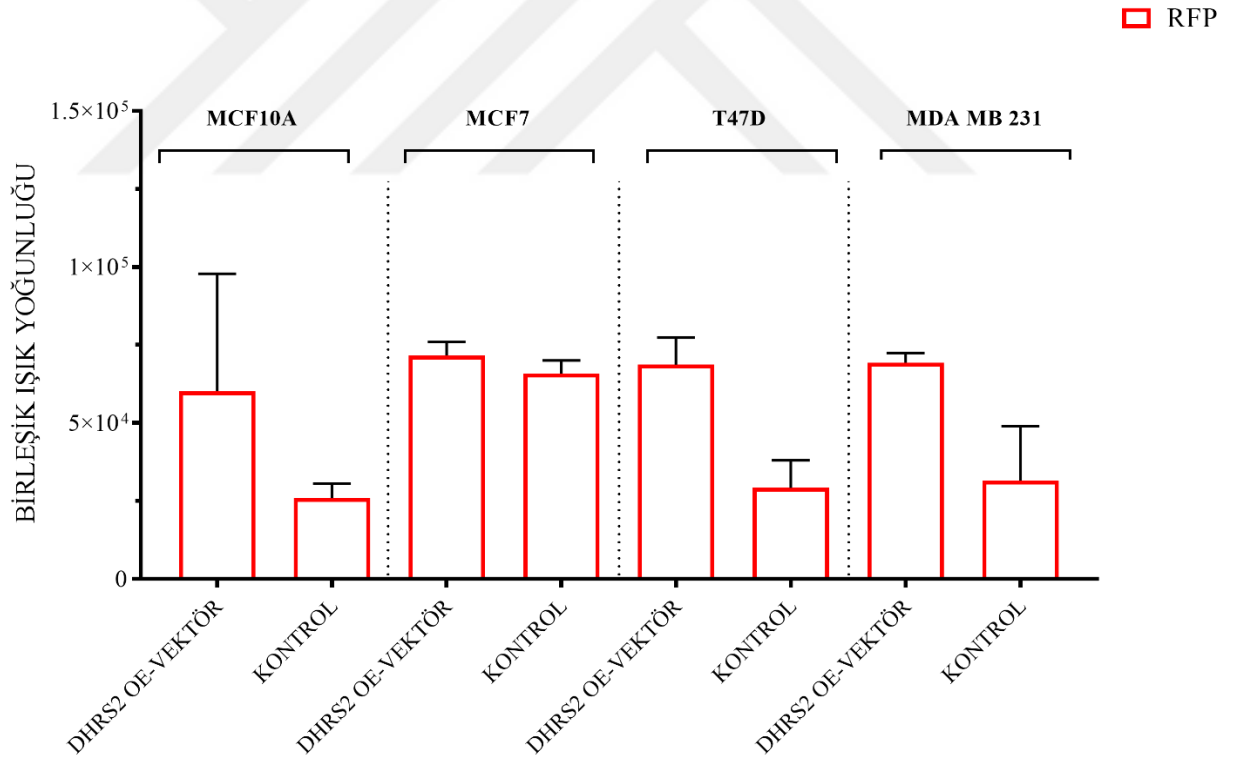
Şekil 14: MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü genlerinin ifade seviyeleri

Hücre döngüsü belirli genlerin ifadelerinin ölçülmesinin yanı sıra FUCCI (floresan ubikitinasyon hücre döngüsü indikatörü) ile de analiz edilmiştir. Bu analiz metot bölümünde detaylıca açıklanan hücrenin hangi fazda olduğuna bağlı olarak ubikitinlenip yıkılan proteinlerin verdiği floresan ışıma aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Konfokal mikroskop ile fotoğraflanan hücrelerin ışık yoğunluğu analizlerinin ardından gruplar arası karşılaştırmalar istatistiksel olarak yapılmıştır. Hücrelerdeki kırmızı yoğunluğunun yüksek olması G1, sarı olarak görülmesi S ve yeşil miktarının daha yüksek olması o hücrenin G2/ M fazında olduğu bilgisi ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücrelerde aynı anda her iki floresan proteinin bulunabileceği literatürde mevcuttur.

DHRS2 OE-vektör uygulanmış tüm hücre gruplarında, hücrenin döngüye giremediği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde *DHRS2*-siRNA uygulanmış hücrelerde ise hücrelerin G1'den normal bölünme sürelerinden daha erken çıktığı ve S fazına geçtiği gözlemlenmiştir. Bu hızlanmanın en net görüldüğü hücre MCF7 hücreleri olmuştur ($p=8,2E-10$). MDA-MB-231 ve T47D, MCF10A ile benzer bir patern göstermişlerdir.



Şekil 15: *DHR2* siRNA grupları için Fucci ışık yoğunluğu ölçümü



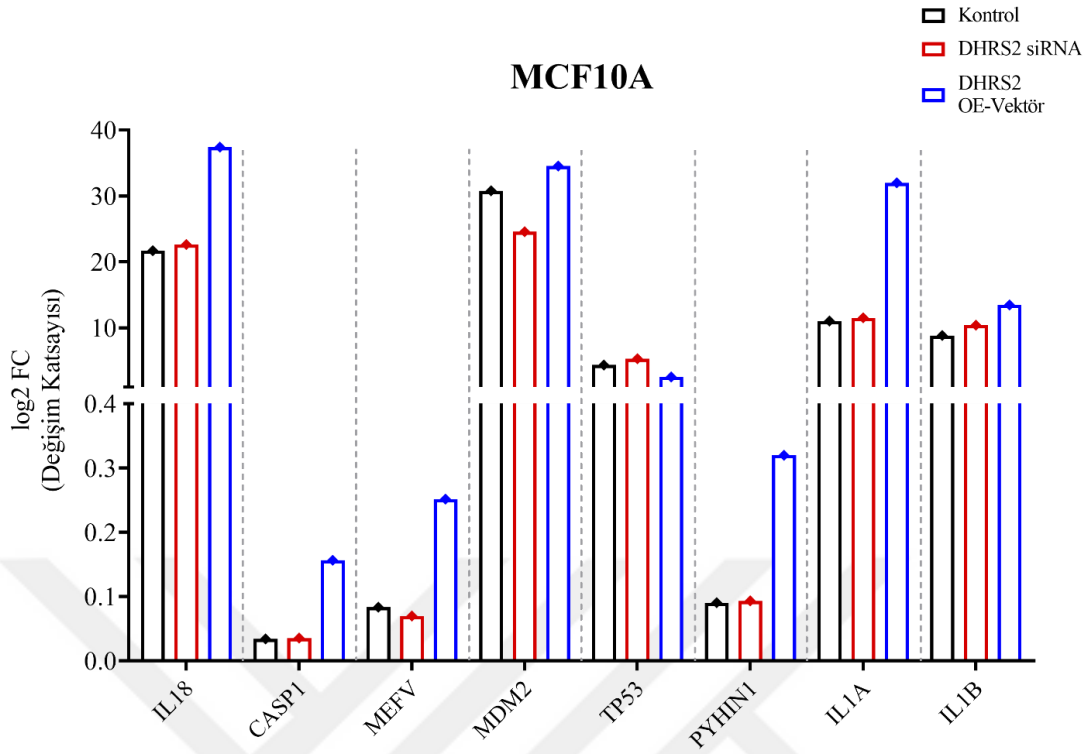
Şekil 16: *DHR2* OE-Vektör grupları için Fucci ışık yoğunluğu ölçümü

4.3. Hücrelerin inflamasyon ve Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz yanıtları

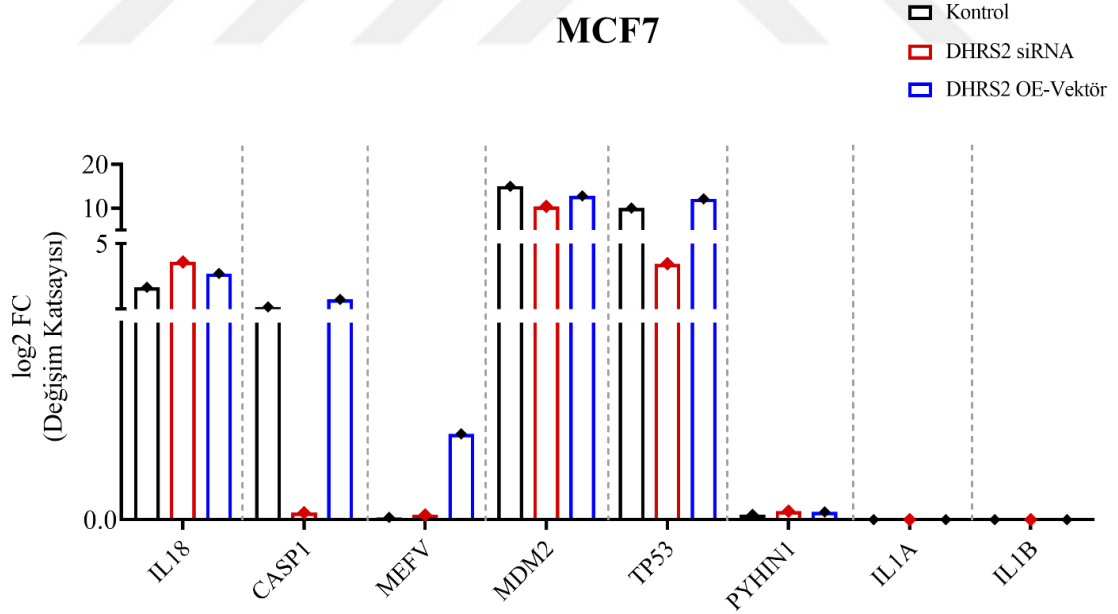
DHRS2 geninin hedef yollarından biri inflamasyon ve sitokin yanıtı olduğunu öngördüğümüz için *DHRS2* gen ifadesi hücre içinde değiştiğinde bu yollarda bulunan ilgili genlerdeki değişim kantitatif gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Epitelyal kökenli olduğunu bildiğimiz bu dört hücre grubunda kontroller arası karşılaştırma yapıldığında hedef genlerin birçoğunun ekspresyonlarının MCF10A hücrelerine göre azaldığı *CASP1* geninin MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ortalama 8 kat arttığı, *TP53* gen ifadesinin ise MCF7 hücrelerinde 2,3 kat arttığı ancak MDA-MB-231 hücrelerinde 2 kat azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bilgiye ek olarak, *IL1A* ve *IL1B* gen ifadelerinin MCF7 ve T47D hücrelerinde çok düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir.

IL18 piroptoz yolağı için önemli bir sitokindir ve MCF10A, MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde *DHRS2* gen ifadesi arttırıldığında kontrole göre 1,5 kat artma göstermiştir. T47D hücrelerinde aynı alt grupta grup içi kontrolüne göre %80 azalma gözlemlenmiştir. *DHRS2*'nin baskılandığı gruplarda ise *IL18* seviyesi MCF7 hariç tüm hücreler kontrol ile aynı seviyede kalmıştır. *IL18* ile doğrudan etkileşimde olan *CASP1* geni ise en yüksek değişimi T47D hücrelerinde göstermiştir. Bir diğer inflamatuvar gen olan *MEFV* geni ise sırasıyla T47D ve MCF7 hücrelerinin *DHRS2* OE-vektör gruplarında sırasıyla 58 ve 38 katlık değişimler göstermiştir. *PYHIN1* geni ise en yüksek gen ifade değişimini grup içi kontrol ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücre grubunda göstermiştir. Hücre içerisindeki *DHRS2* miktarı arttığında *PYHIN1* gen ifadesi 119 katlık bir artış göstermektedir. Bu oran MCF10A hücreleri için 3,5'tir. T47d ve MCF7 hücrelerinde ise *PYHIN1* artışı *DHRS2* ifadesinin baskılandığı hücrelerdedir.

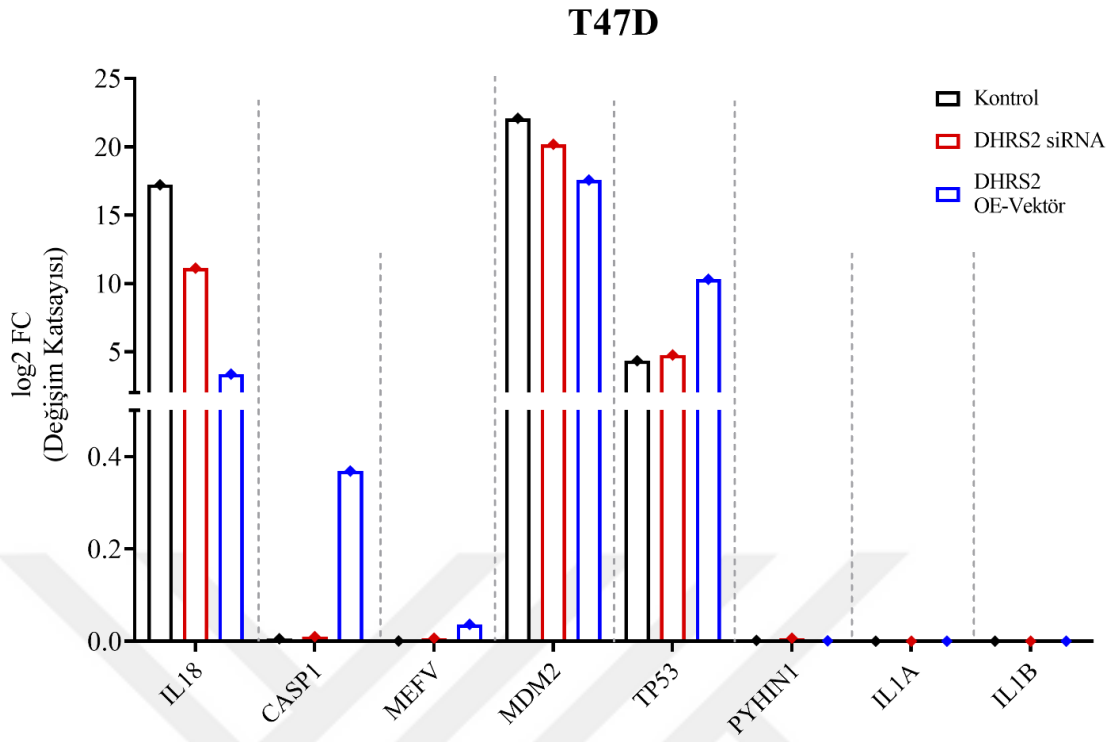
IL1A ve *IL1B* genleri MCF7 ve T47D hücrelerinde çok düşük seviyelerde olsa da MDA-MB-231 hücrelerinde *DHRS2* OE-vektör grubunda artmış, *DHRS2*-siRNA gruplarında ise %95 oranında azalmıştır. MCF10A grubunda ise *DHRS2* ifadesinin baskılanması hücre içerisindeki *IL1A* ve *IL1B* ifadesini değiştirmemiştir. Tüm değişim katsayıları Şekil 17'de verilmiştir.



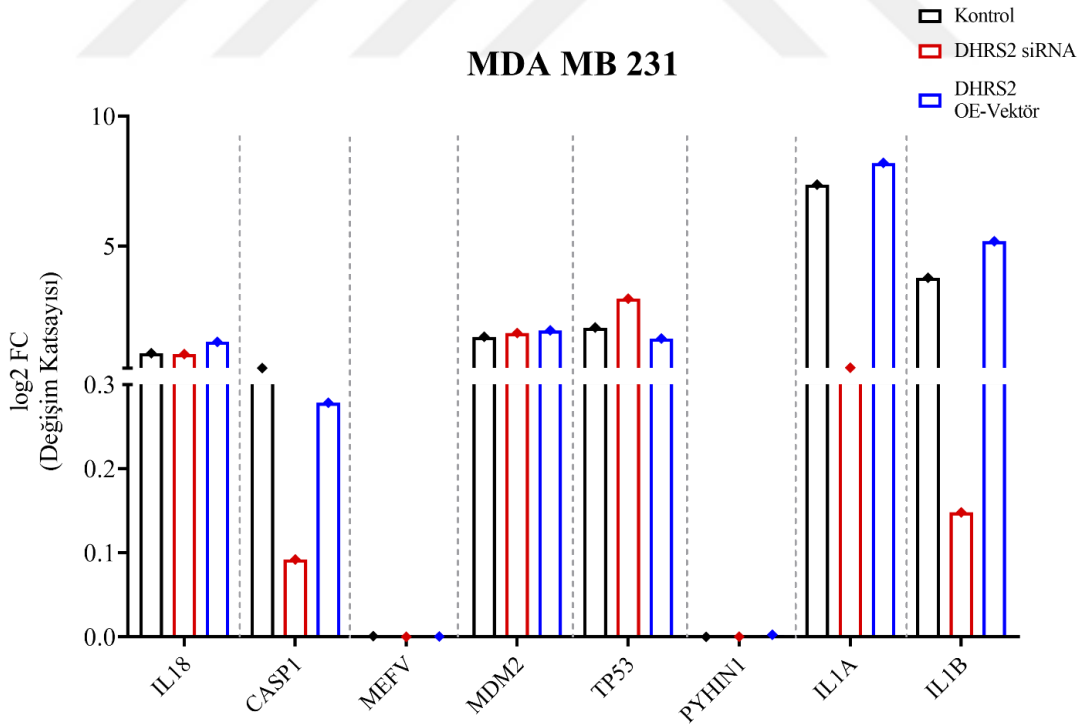
Şekil 17: MCF10A hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri



Şekil 18: MCF7 hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri

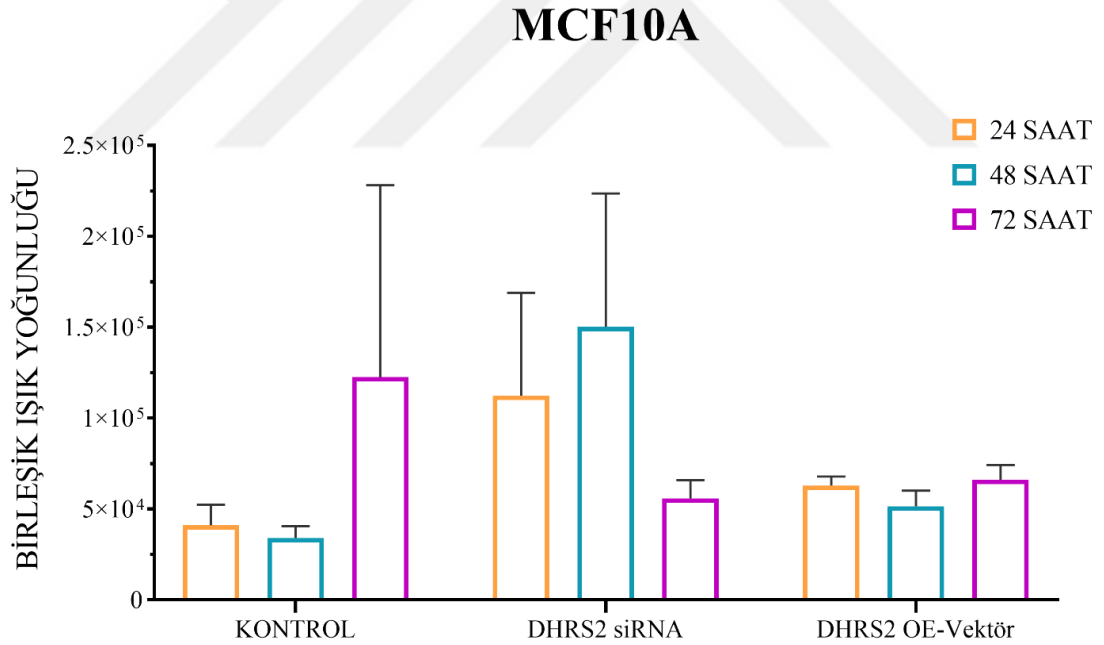


Şekil 19: T47D hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri

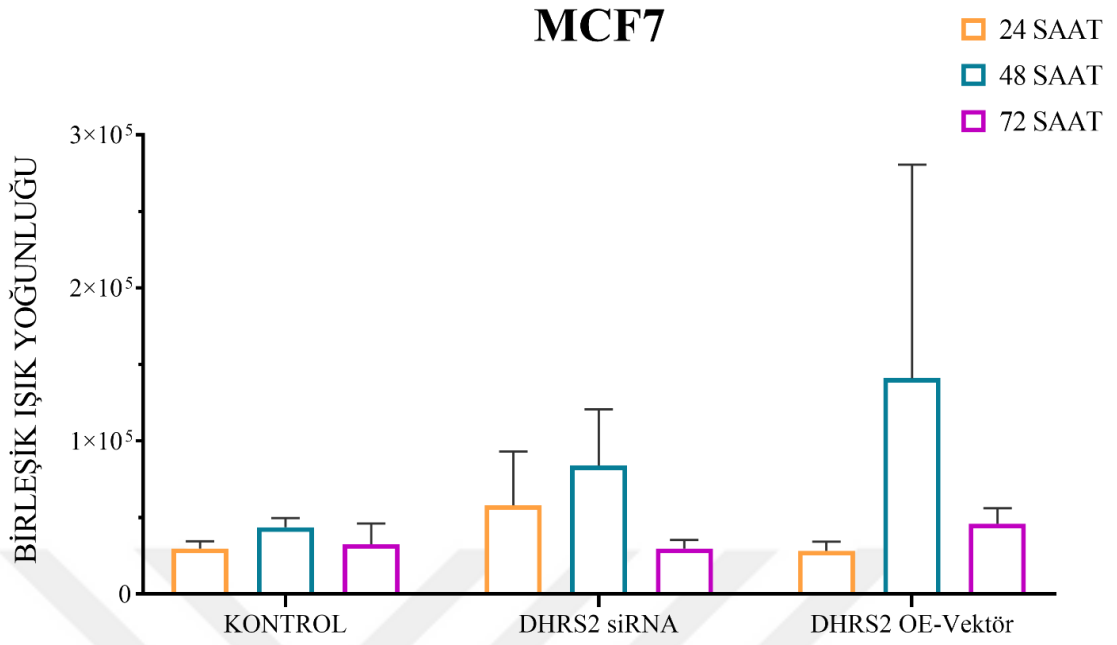


Şekil 20: MDA-MB-231 hücrelerindeki seçili inflamasyon ilişkili genlerin ifade seviyeleri

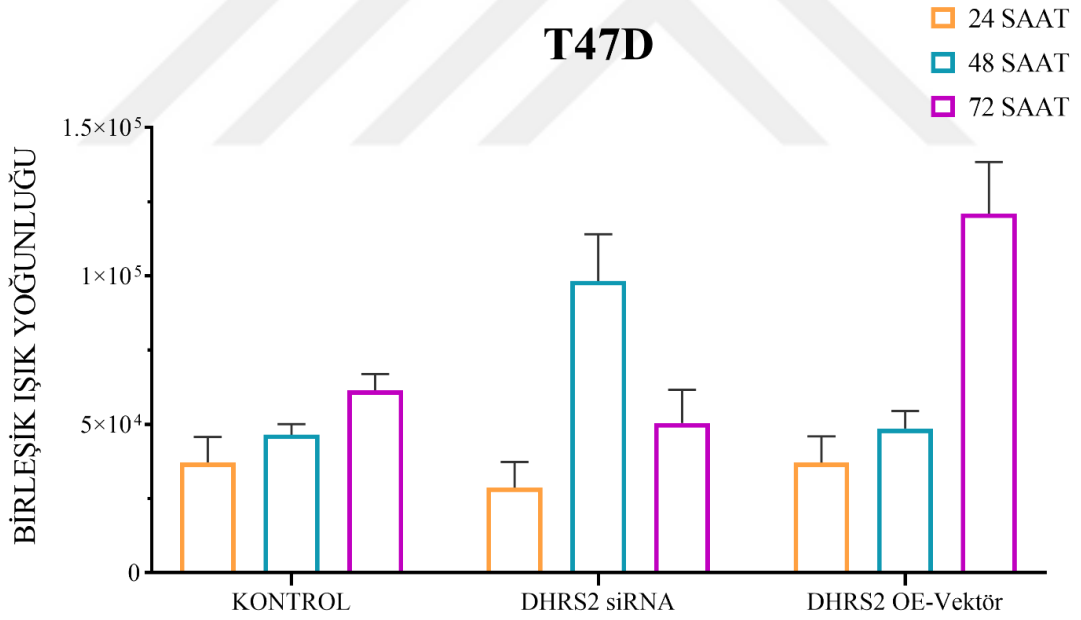
DHRS2 gen ifadesindeki değişimlerin hücre içi Kaspaz aracılı apoptoz mekanizmalarını nasıl etkilediği immünfloresan yöntemler aracılığı ile belirli saat gruplarında ölçölmüştür. Karşılaştırmalar hücrelerdeki en yüksek *DHRS2* baskılanması ve artılmasının saptandığı saatler de dikkate alınarak yapılmıştır. Görüntöleme sonucu elde edilen fotoğraflardan elde edilen yoğunluk ölçömleri sonucunda istatistiksel testler yapılmıştır. Bu testlere göre MCF7 hücrelerinde *DHRS2*-siRNA grubunda en yüksek apoptoz oranı saptanmıştır ($p=0,003$). *DHRS2* ifadesi baskılandığında hücreler *CASP3/7* aracılı apoptoz yolaklarını aktifleştirmektedir. Aynı şekilde T47D ve MDA-MB-231 hücrelerinde de *DHRS2* ifadesinin baskılanması sonucunda apoptotik hücrelerin miktarı artmıştır (sırasıyla $p=4,8E-06$, $p=1,76E-06$). MCF10A grubunda ise *DHRS2*-siRNA grubunda değil *DHRS2* OE-vektör grubunda en yüksek apoptotik hücre verisine ulaşılmıştır ($p=4,29E-05$). Bu sonuç *DHRS2* gen amplifikasyonunun kanser hücreleri için apoptozdan kaçış mekanizmalarından biri olabileceğini düşöndürmektedir. Hücrelerdeki *CASP3/7* aracılı apoptoz ölçömleri aşığıda verilmiştir.



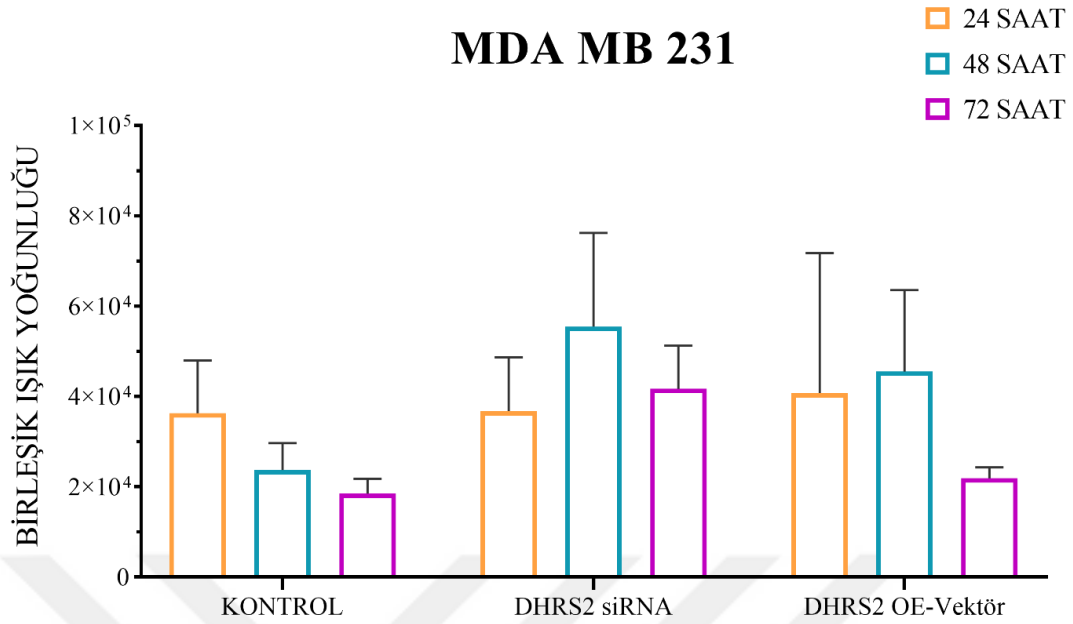
Şekil 21: MCF10A hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçömleri



Şekil 22: MCF7 hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri



Şekil 23: T47D hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri



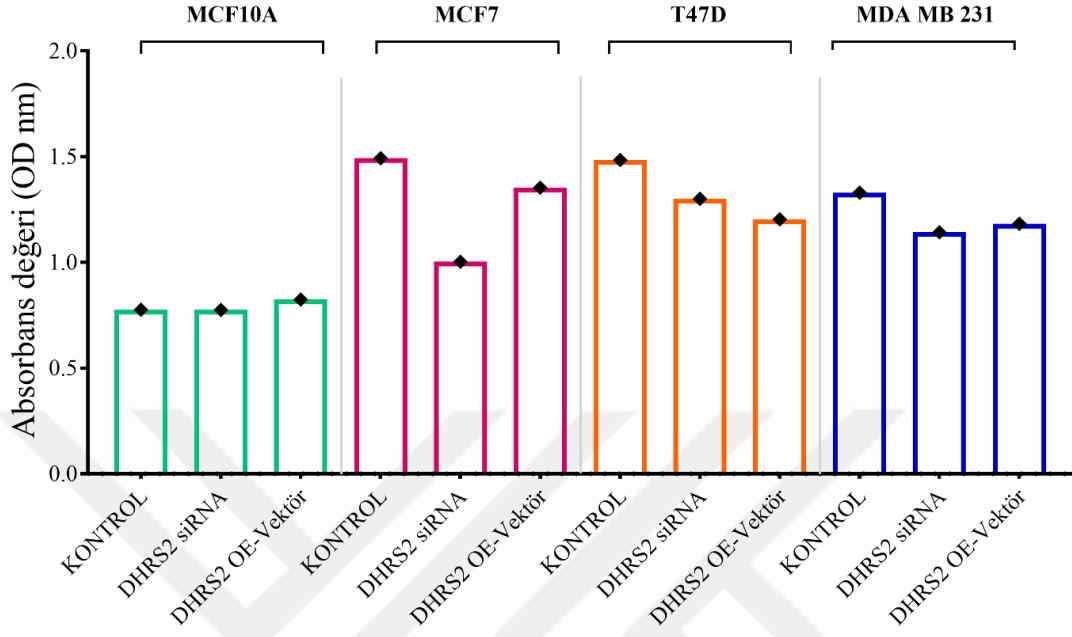
Şekil 24: MDA-MB-231 hücreleri için Kaspaz 3/7 aracılı apoptoz ölçümleri

4.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri

İleri glikasyon son ürünleri (AGE) hücrelerdeki şeker metabolizması sonucunda açığa çıkan ikincil metabolitler ile hücre içerisindeki nükleik asitler veya proteinlerin çapraz bağlar yaparak yeni bir bileşik oluşturması durumunda oluşan metabolitlerdir.

Yapılan AGE *ELISA* deneyleri sonucunda, adenokarsinom hücrelerde kontrol grubumuz olan MCF10A hücrelerine nazaran 1,8 kat daha fazla AGE üretimi gözlemlenmiştir. Her üç hücrenin grup içi kontrollerinde benzer miktarlarda AGE salınımı mevcuttur. Tüm çalışma gruplarındaki AGE miktarı Şekil 25'te optik yoğunluk ölçümü olarak verilmiştir.

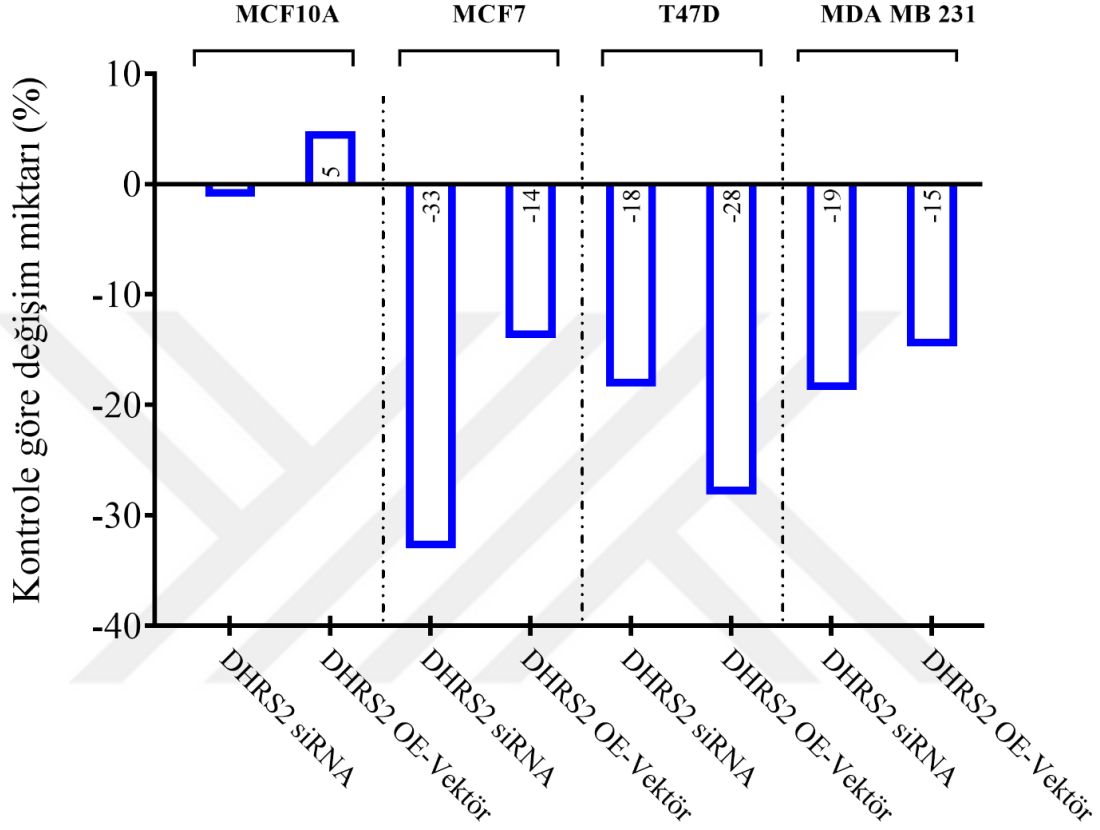
İleri Glikasyon Son Ürünleri



Şekil 25: AGE ELISA sonuçlarının gruplardaki dağılımı

Kontrol hücrelerde *DHRS2* ekspresyonu AGE miktarını zıt yönlü olarak değiştirmiştir ancak karsinom grupları ile kıyaslandığında bu değişim oranı çok küçüktür. *DHRS2*'nin baskılanması sonucunda MCF7 en yüksek yanıtı vermiştir ve %33 oranında AGE miktarında azalma gözlemlenmiştir. Yine aynı Luminal alt tipine ait olan bir başka hücre olan T47D hücrelerindeki AGE miktarı ise *DHRS2* miktarının artması sonucunda %28 oranında azalma göstermiştir. Hücre gruplarında *DHRS2* gen ifadesi değiştirildiğinde hücre dışına salınan AGE miktarları da değişim göstermektedir. Bu değişimler Şekil 26'da yüzde oran olarak bildirilmiştir.

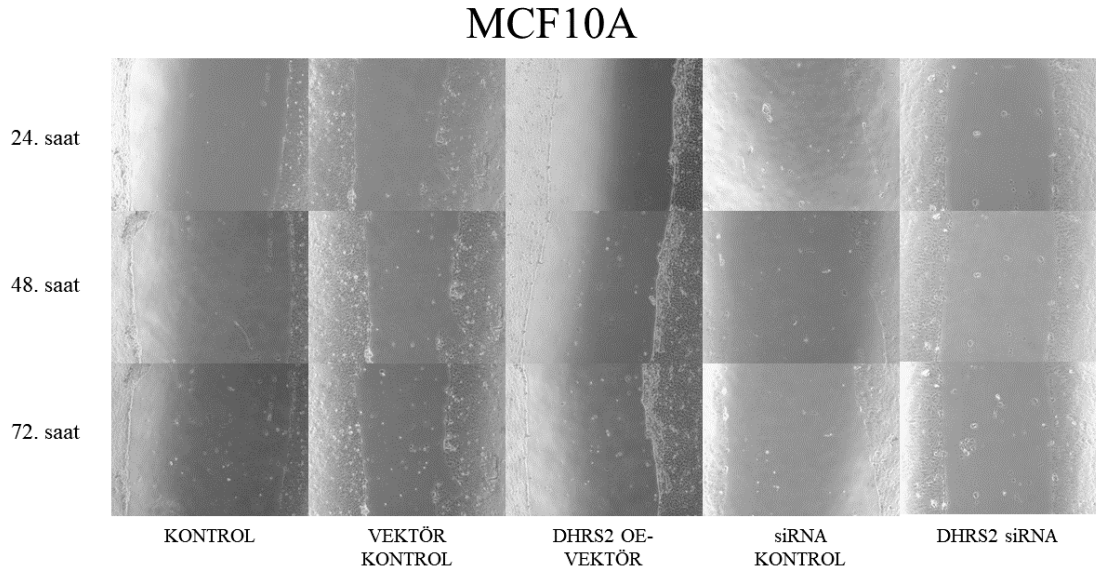
İleri Glikasyon Son Ürünleri



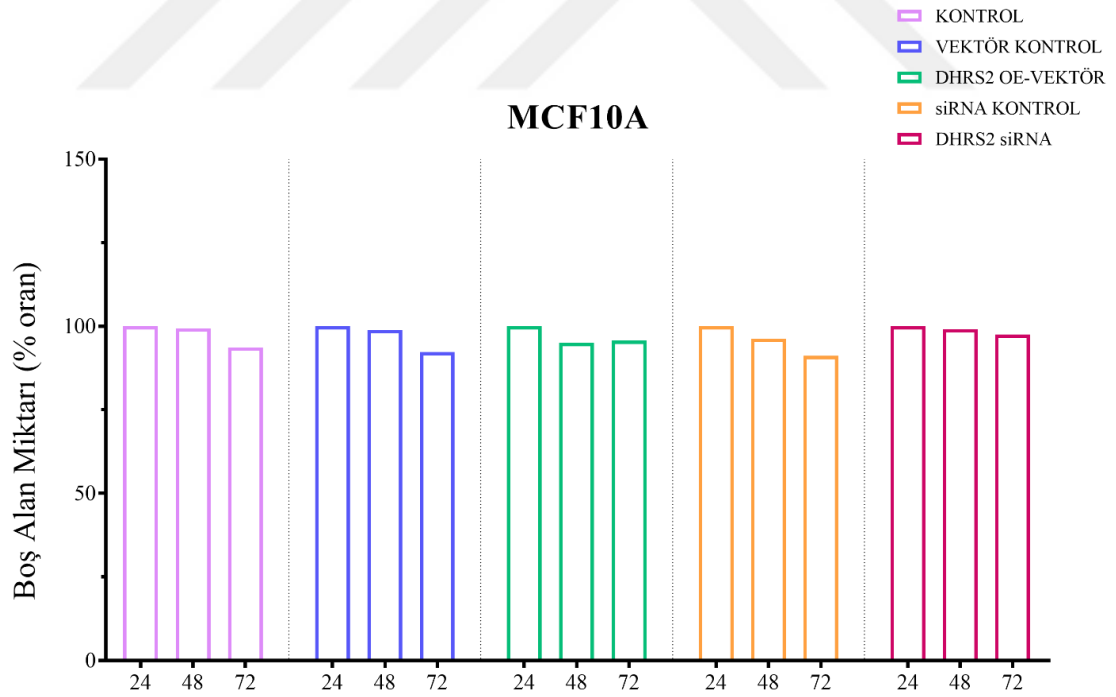
Şekil 26: *DHRS2* ifadesi değiştirilen gruplardaki AGE miktarının değişim oranları

4.5. Migrasyon Ölçümleri

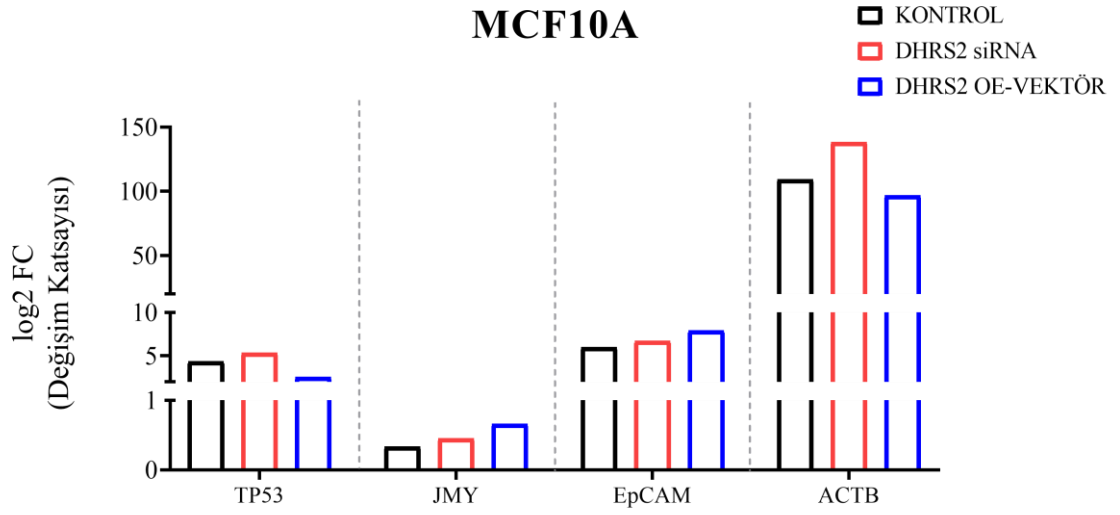
DHRS2 gen ifadesi azaldığında MCF7 hücrelerinde kontrollere göre yara kapanma hızının oldukça düşük olduğunu önceki çalışmalarımızdan da bilmekteyiz. Tüm çalışma gruplarında *DHRS2*-siRNA grupları %2,5 ila %14,8 arasında değişen oranlarda kapanma yüzdeleri göstermişlerdir. En düşük kapanma oranı ise hücre içi kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücrelerinde görülmüştür. *DHRS2* OE-vektör gruplarında ise yara kapanma oranları kontrol grupları ile benzer olmasına rağmen Şekil 36'da gösterildiği üzere yapıdan kopup hareketlenen çok fazla hücre gözlemlenmiştir. Bu da Hücrelerin invazyona daha açık hale geldiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.



Şekil 27: MCF10A deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri

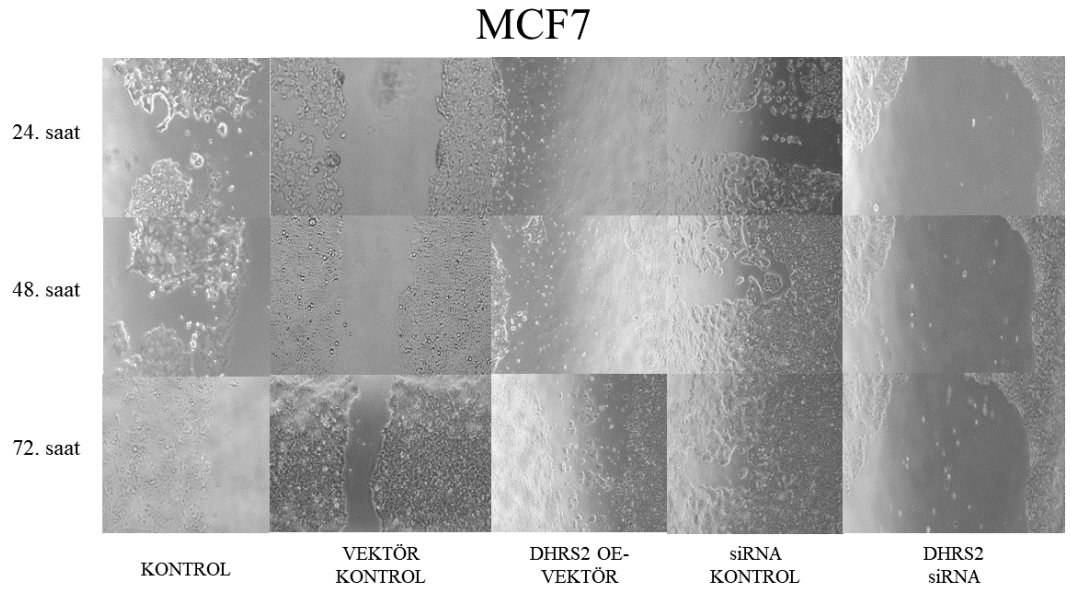


Şekil 28: MCF10A hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri

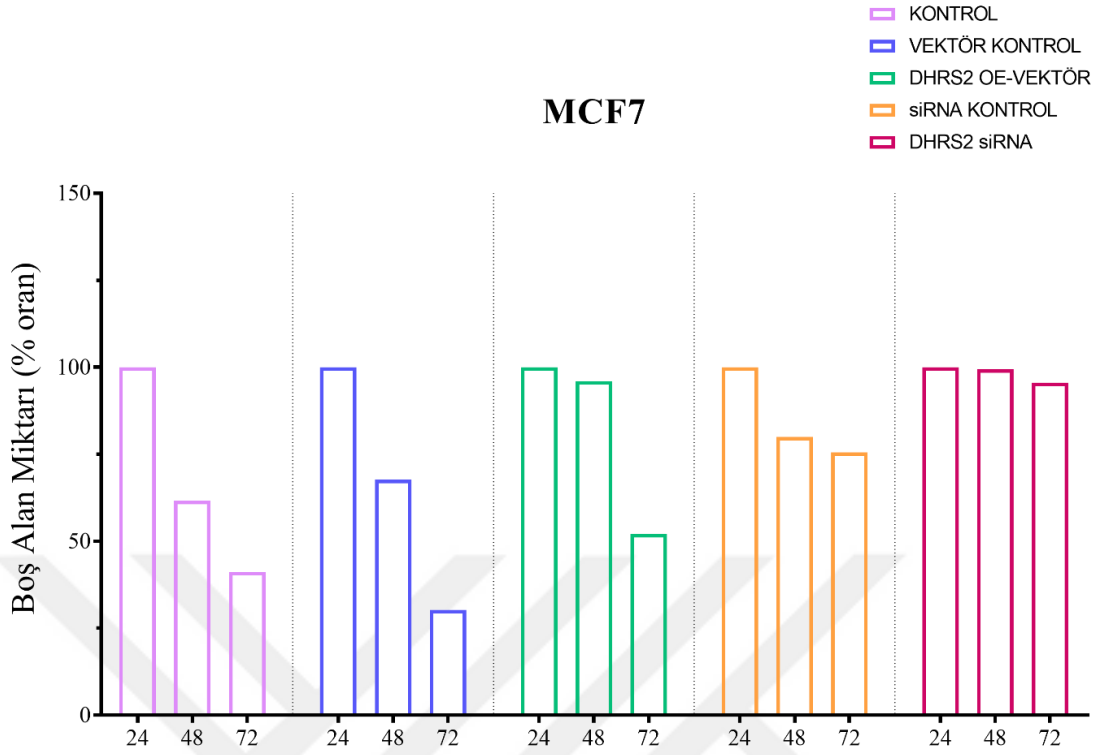


Şekil 29: MCF10A hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri

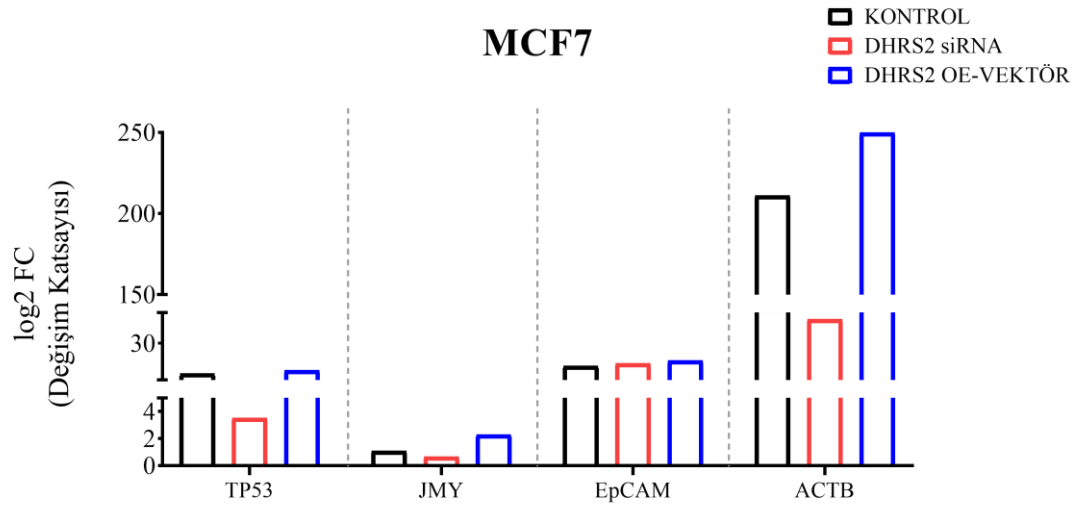
Kontrol hücre grubu olan MCF10A hücrelerinde meme kanseri için biyobelirteç olarak kullanılan genlerden EpCAM ifadesi luminal A grubu hücrelere nazaran daha azdır ve *DHRS2* gen ifadelerinden etkilenmemiştir.



Şekil 30: MCF7 deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri

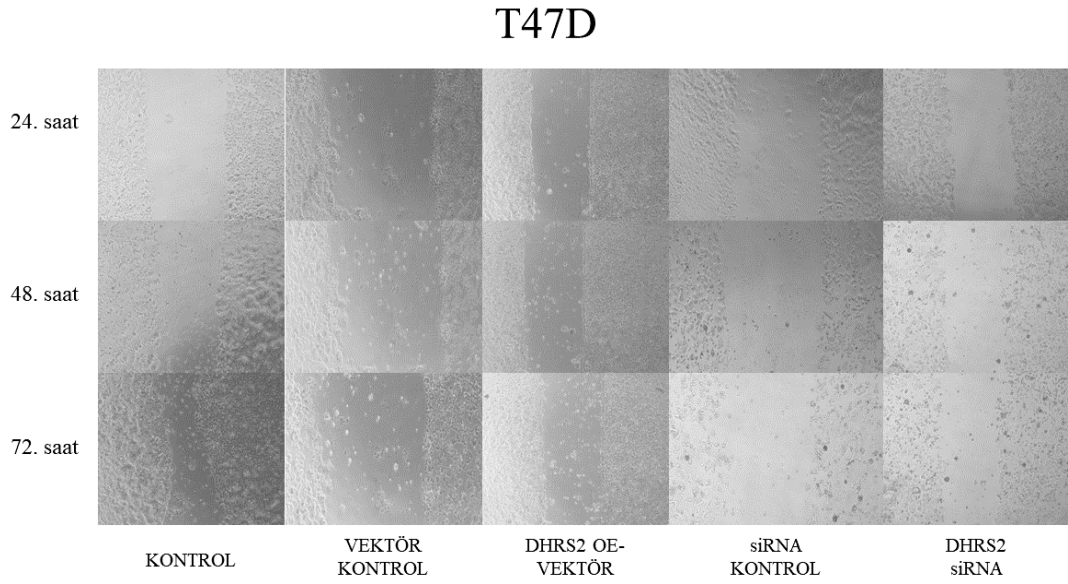


Şekil 31: MCF7 hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri

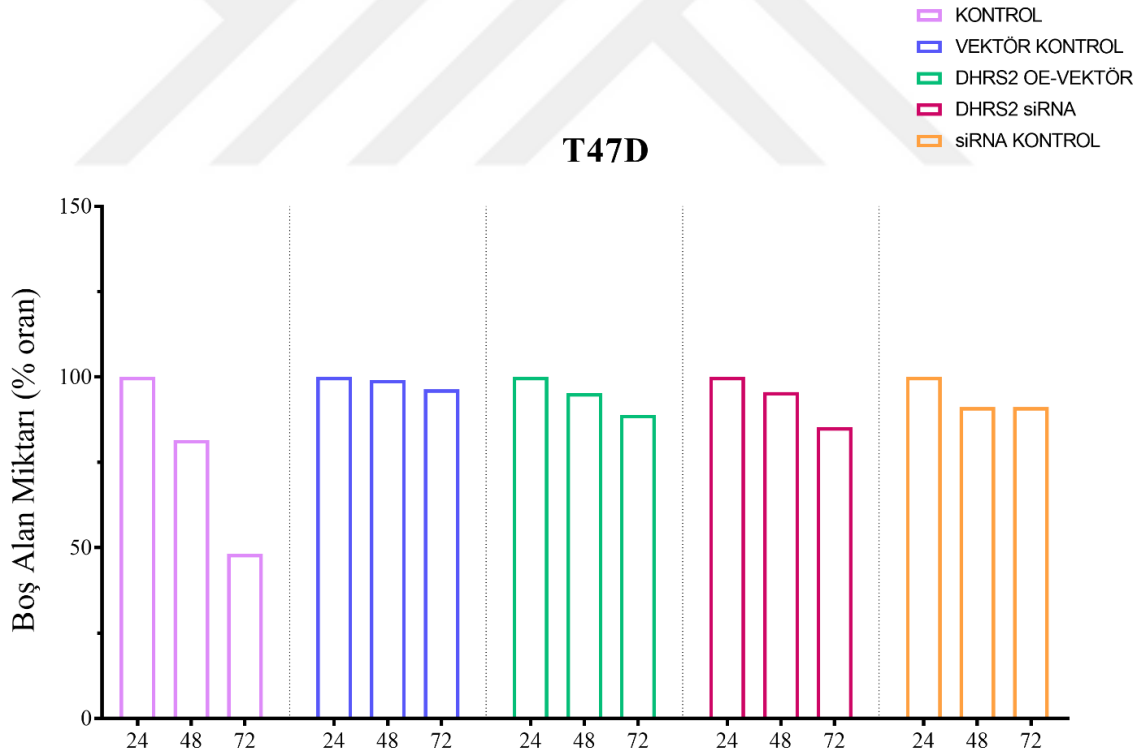


Şekil 32: MCF7 hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri

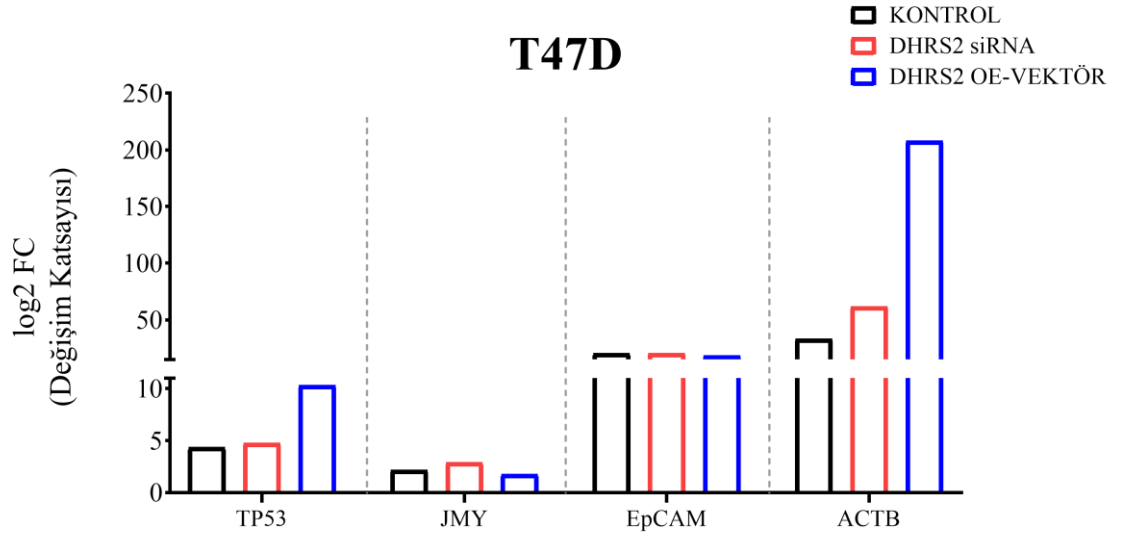
MCF7 hücrelerinde tüm genlerin ekspresyonları MCF10A hücrelerinden daha yüksek bulunmuştur. *DHRS2* siRNA uygulaması *TP53* ve ona bağımlı olarak görev yapan *JMY* geninin ekspresyonunu azaltmıştır. *ACTB* ise *DHRS2* baskılandığında %78 oranında azalma göstermiştir.



Şekil 33: T47D deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri



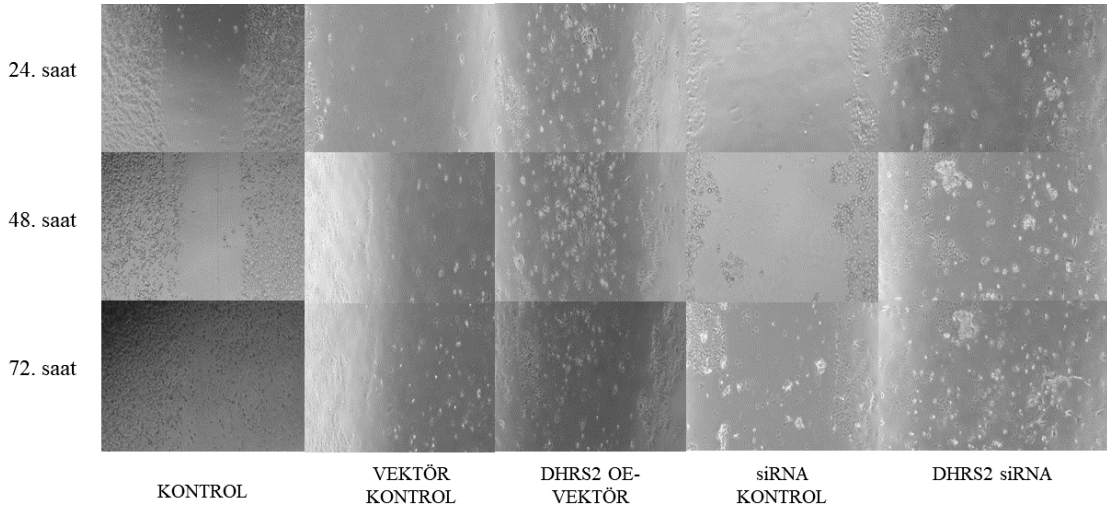
Şekil 34: T47D hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri



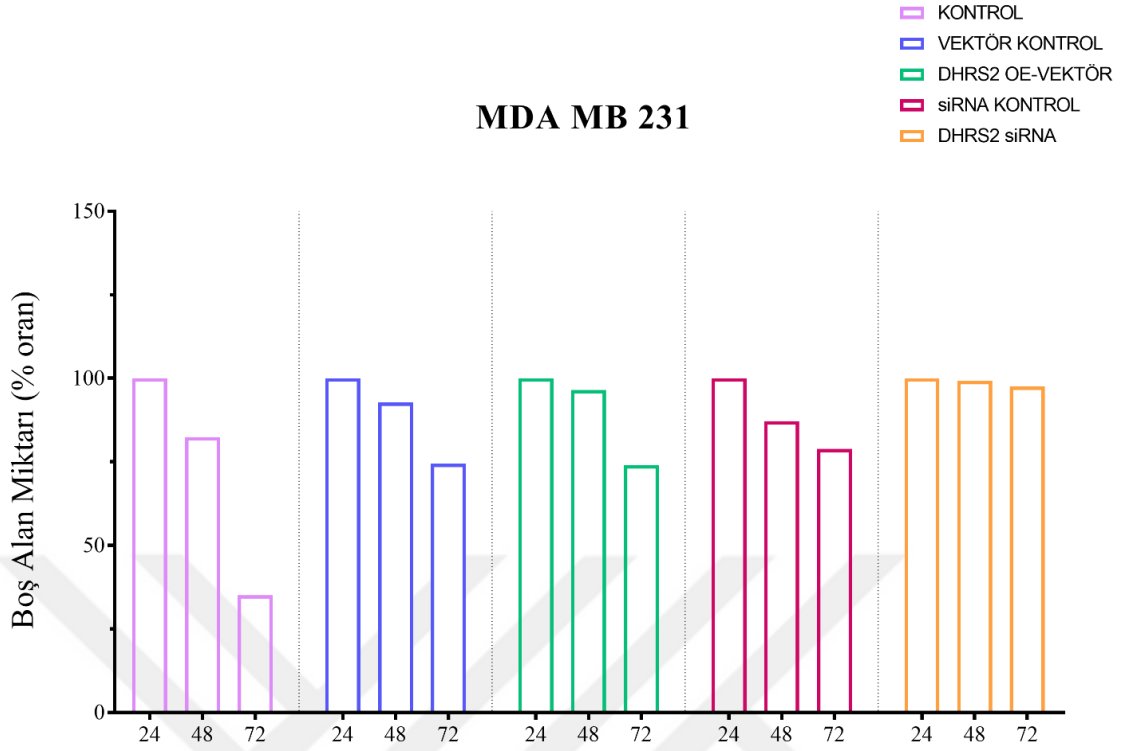
Şekil 35: T47D hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri

T47D hücrelerinde *JMY* ifadesi diğer tüm hücrelerden daha yüksek bulunmuştur. *EpCAM* ifadesi de MCF7 ile benzer oranda kontrol grubuna göre artmakla beraber deney grupları arasında önemli bir fark görülmemiştir. Ancak *ACTB* geninde *DHRS2* OE-Vektör grubunda yaklaşık 6 katlık bir artış görülmüştür.

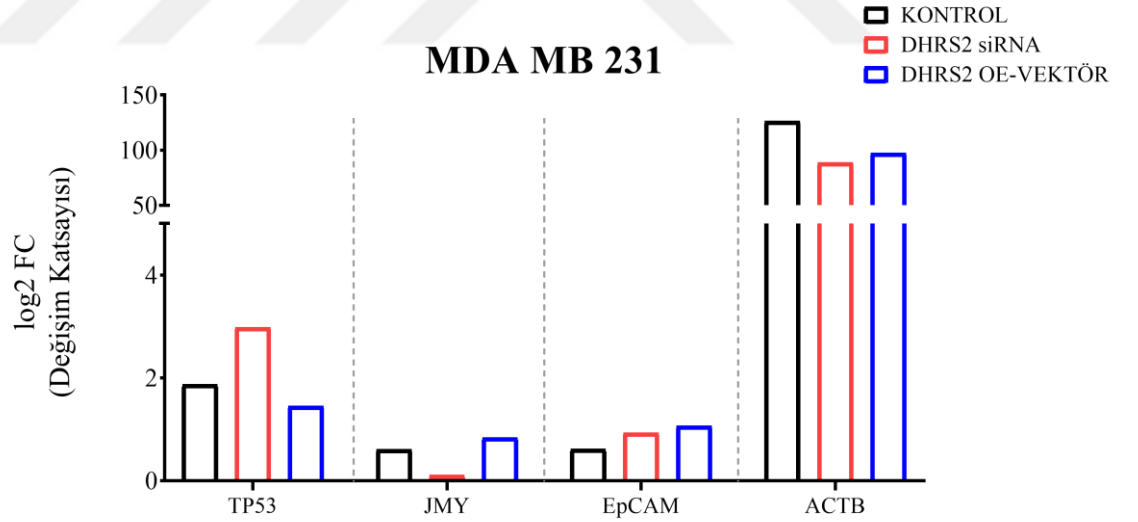
MDA MB 231



Şekil 36: MDA-MB-231 deney gruplarındaki saatlere bağlı yara iyileşme görüntüleri



Şekil 37: MDA-MB-231 hücreleri için FIJI programından alınan boş alan ölçümleri



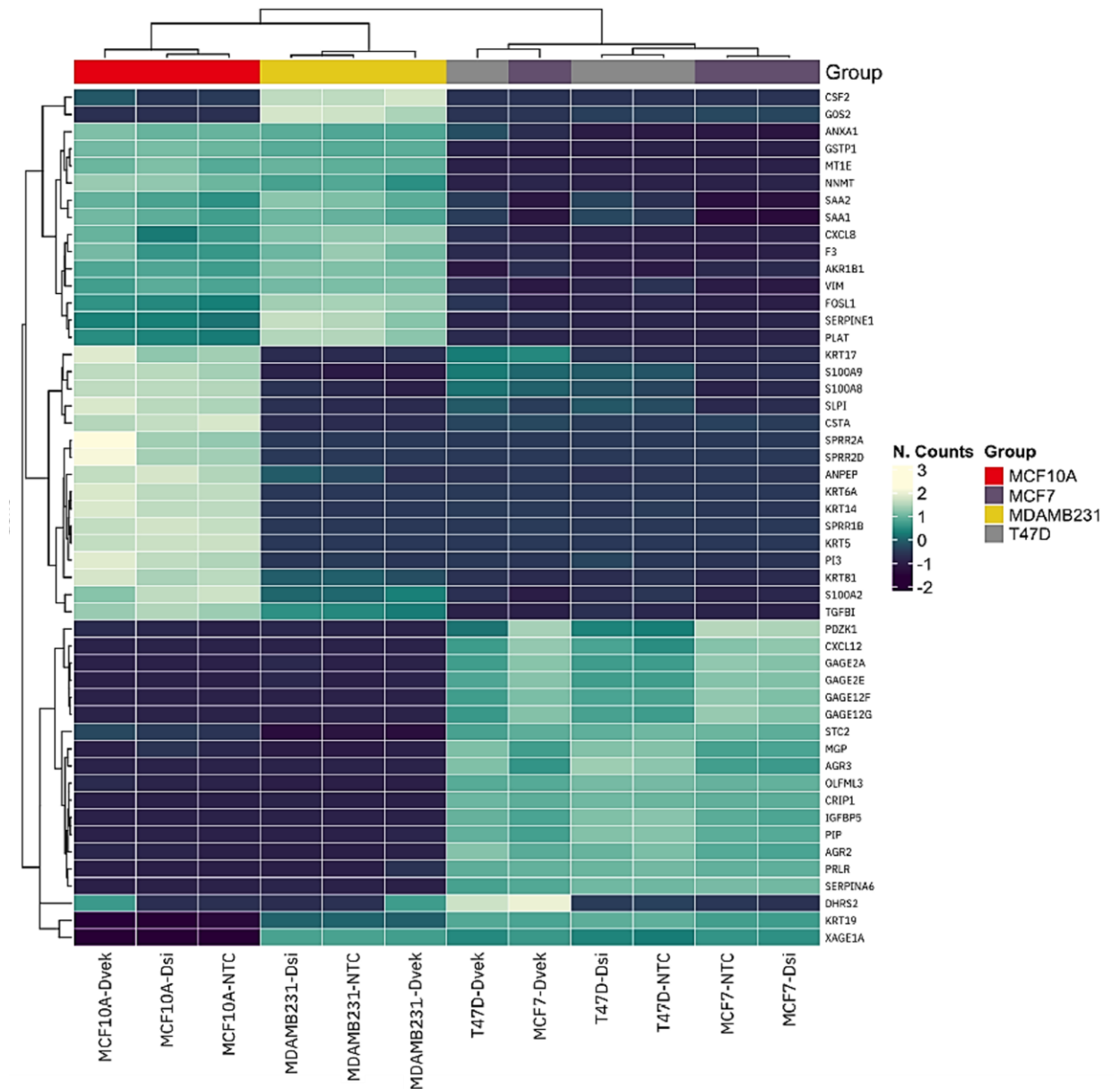
Şekil 38: MDA-MB-231 hücreleri için hücre iskeleti ile ilişkili seçili genlerin ifade değerleri

MDA-MB-231 hücre grubunda tüm kontrollere kıyaslandığında *ACTB* geni en yüksek ifadeye bu hücre grubunda sahiptir. Buna zıt olarak en düşük *EpCAM* seviyesi de yine bu hücrelerde görülmüştür. *JMY* geni ise *DHRS2* siRNA grubunda 6 kat azalmıştır.

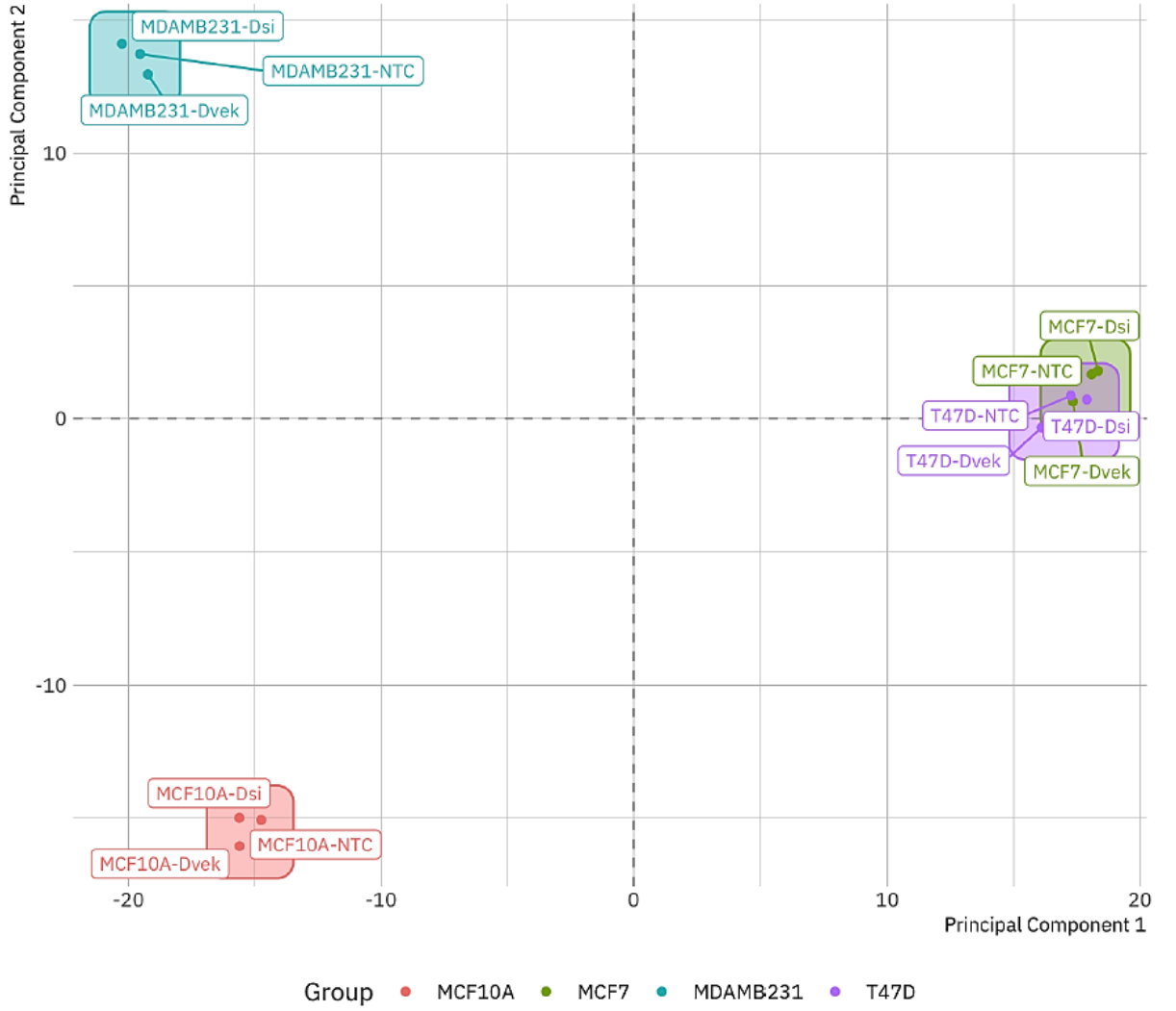
4.6. Transkriptom verisi sonuçları

Tüm fonksiyonel çalışmalara ek olarak *DHRS2*'nin hücre içindeki gen ifadelerine olan etkisi incelenmek amacıyla dört farklı hücre ve *DHRS2*-siRNA, *DHRS2* OE-vektör, kontrol olmak üzere üç gruptan toplam 12 adet hücrenin RNA dizilemesi gerçekleştirildi.

En yüksek değişimin görüldüğü ilk 50 gen ile yapılan dendrogram ve hücrelerin ortak eğilimlerinin şematize edildiği PCA analizleri Şekil 39 ve 40'da gösterilmiştir. Aynı meme kanseri alt tipine ait hücrelerin benzer eğilimlere sahip olduğu bu analizler ile gösterilmiştir.



Şekil 39: Transkriptom analizinde ifadesi en çok değişen 50 gen



Şekil 40: Temel bileşen analizi (PCA) görüntüsü

Ekspresyon değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmasından sonra gen ontoloji analizleri yapıldı. Bu analizler sırasında özellikle *DHRS2* OE-vektör gruplarında immün yanıt ve hücre sinyal iletim mekanizmaları daha çok etkilenirken, *DHRS2*-siRNA gruplarında ise metabolik yollar, hücre adezyon genlerinin ifadelerinde en yüksek değişimler gözlemlendi. *DHRS2* OE-vektör gruplarında yapısal, farklılaşmada rol oynayan ve gelişimsel genlerin ekspresyonlarında düşüş görüldü. Aynı grupta stres, sitokin gibi stimülantlara oluşturulan hücresel cevapta rol oynayan genlerin hücre içi ifadeleri artmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde diğerlerinden farklı olarak hücresel biyosentez ve bu sentez ürünlerinin düzenlenmesinde görevli genlerin ifadelerinde artış gözlemlenmiştir. *DHRS2* ifadesinin baskılanması her hücrede farklı

yanıtlar oluşturmuştur ancak gelişimsel prosesler ve hücre iskeletinin düzenlenmesi her hücrede ortak olarak bulunmuştur. Daha önceki çalışmamızda MCF7 hücrelerinde *DHRS2*-siRNA gruplarında migrasyon hızının azaldığı saptanmıştır. Bu bilgiye ek olarak mikrotübül ve hücre iskeleti bileşenlerinin gen ifadelerinin azaldığı yapılan transkriptom verisi ile desteklenmiştir. MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde *DHRS2* geni yokluğunda hücreler arası iletişim, adezyon ve biyolojik proseslerin regülasyon mekanizmaları benzer şekilde etkilenmektedir. T47D hücrelerinde yine *DHRS2* baskılandığında sitokin ve doğal immün sistem yanıtında rol oynayan genlerin ifadeleri değişmektedir. MCF10A hücrelerinde ise organel düzenlenmesi ve katabolik aktivite düzenlenmesi etkilenen prosesler arasındadır.

Tablo 7: MCF10A hücreleri *DHRS2* siRNA ve *DHRS2* OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler

MCF10A <i>DHRS2</i>-siRNA Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Nükleozom düzenlemesi	GO:0006334	Organonitrojen bileşiği metabolik süreci	GO:1901564
Hücre gelişimi	GO:0048468	Protein metabolik süreci	GO:0019538
Nükleozom organizasyonu	GO:0034728	Makromolekül modifikasyonu	GO:0043412
		Organel organizasyonu	GO:0006996
		Protein modifikasyon süreci	GO:0036211
		Birincil metabolik sürecin düzenlenmesi	GO:0080090
		Hücrel azot bileşiği biyosentetik süreci	GO:0044271
		Hücrel lokalizasyon	GO:0051641
		Azot bileşiği metabolik sürecinin düzenlenmesi	GO:0051171

		Katabolik süreç	GO:0009056
		Hücre içi taşıma	GO:0046907
		Strese karşı hücrel tepki	GO:0033554
		Lokalizasyon	GO:0051179
		Hücre içinde lokalizasyonun oluşturulması	GO:0051649
		Makromolekül lokalizasyonu	GO:0033036
		Post-translasyonel protein modifikasyonu	GO:0043687
		Biyolojik sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048518
		Hücrel sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048522
		Organik döngüsel bileşik biyosentetik süreci	GO:1901362
		Organonitrojen bileşik biyosentez süreci	GO:1901566
MCF10A DHRS2 OE-vektör Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Nükleozom düzenlemesi	GO:0006334	Biyolojik düzenleme	GO:0065007
Nükleozom organizasyonu	GO:0034728	Biyolojik sürecin düzenlenmesi	GO:0050789
Protein-dna kompleksi birleşimi	GO:0065004	Biyolojik sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048518
		Birincil metabolik sürecin düzenlenmesi	GO:0080090

		Azot bileşği metabolik sürecinin düzenlenmesi	GO:0051171
		Hücrel sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048522
		Hücrel süreçlerin düzenlenmesi	GO:0050794
		Uyarıcıya verilen yanıtın düzenlenmesi	GO:0048583
		Gelişimsel süreç	GO:0032502
		Strese karşı yanıt	GO:0006950
		Anatomik yapı gelişimi	GO:0048856
		Protein metabolik süreci	GO:0019538
		Organonitrojen bileşik metabolik süreci	GO:1901564
		Sinyal iletiminin düzenlenmesi	GO:0009966
		Protein modifikasyon süreci	GO:0036211
		Makromolekül modifikasyonu	GO:0043412
		Hücre iletişiminin düzenlenmesi	GO:0010646
		Metabolik sürecin düzenlenmesi	GO:0019222
		Sinyalizasyonun düzenlenmesi	GO:0023051
		Metabolik sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0009893

Tablo 8: MCF7 hücreleri *DHRS2* siRNA ve *DHRS2* OE*Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler

MCF7 <i>DHRS2</i>-siRNA Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Kimyasal sinaptik iletim	GO:0007268	Çok hücreli organizma süreci	GO:0032501
Anterograd trans-sinaptik sinyalizasyon	GO:0098916	Anatomik yapı gelişimi	GO:0048856
Trans-sinaptik sinyalizasyon	GO:0099537	Gelişimsel süreç	GO:0032502
Sinaptik sinyalizasyon	GO:0099536	Hücre farklılaşması	GO:0030154
Hücre-hücre sinyalizasyonu	GO:0007267	Hücrel gelişim süreci	GO:0048869
Çok hücreli organizma süreci	GO:0032501	Anatomik yapı morfogenezi	GO:0009653
Hücre yapışması	GO:0007155	Sistem gelişimi	GO:0048731
Sistem prosesi	GO:0003008	Hücre gelişimi	GO:0048468
Transmembran taşıma	GO:0055085	Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275
Heterotipik hücre-hücre yapışması	GO:0034113	Çok hücreli organizma sürecinin düzenlenmesi	GO:0051239
Kimyasal sinaptik iletimin modülasyonu	GO:0050804	Biyolojik düzenleme	GO:0065007
Trans-sinaptik sinyalizasyonun düzenlenmesi	GO:0099177	Hücre yapışması	GO:0007155
		Hücre popülasyonu çoğalması	GO:0008283
		Biyolojik sürecin düzenlenmesi	GO:0050789

		Hayvan organ gelişimi	GO:0048513
		Hücre iletişimi	GO:0007154
		Sinyalizasyon	GO:0023052
		Gelişimsel sürecin düzenlenmesi	GO:0050793
		Nörogenez	GO:0022008
		Biyolojik kalitenin düzenlenmesi	GO:0065008
MCF7 DHRS2 OE-vektör Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Gelişimsel süreç	GO:0032502	Biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0009607
Çok hücreli organizma süreci	GO:0032501	Savunma yanıtı	GO:0006952
Anatomik yapı gelişimi	GO:0048856	Diğer organizmalara cevap	GO:0051707
Sistem gelişimi	GO:0048731	Dış biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0043207
Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275	Dış uyaranlara yanıt	GO:0009605
Hücre farklılaşması	GO:0030154	Organizmalar arasındaki türler arası etkileşimde yer alan biyolojik süreç	GO:0044419
Hücrel gelişim süreci	GO:0048869	Diğer organizmalara karşı savunma tepkisi	GO:0098542
Anatomik yapı morfogenezi	GO:0009653	İmmün yanıt	GO:0006955
Sinir sistemi gelişimi	GO:0007399	Doğal bağışıklık yanıtı	GO:0045087

Hücre iletişimi	GO:0007154	İmmün sistem süreci	GO:0002376
Hayvan organ gelişimi	GO:0048513	Bağıışıklık sistemi sürecinin düzenlenmesi	GO:0002682
Çok hücreli organizma sürecinin düzenlenmesi	GO:0051239	Çok hücreli organizma sürecinin düzenlenmesi	GO:0051239
Sinyalizasyon	GO:0023052	Biyolojik sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048518
Taşımacılığın düzenlenmesi	GO:0051049	Sitokine yanıt	GO:0034097
Biyolojik kalitenin düzenlenmesi	GO:0065008	Uyarıcıya yanıt	GO:0050896
Hücre-hücre sinyali	GO:0007267	Hücrel sürecin pozitif düzenlenmesi	GO:0048522
Biyolojik düzenleme	GO:0065007	Çok hücreli organizma sürecinin pozitif düzenlenmesi	GO:0051240
Hücre gelişimi	GO:0048468	Biyolojik sürecin düzenlenmesi	GO:0050789
Hücre popülasyonu çoğalması	GO:0008283	Bağıışıklık sistemi sürecinin pozitif düzenlenmesi	GO:0002684
Nörogenez	GO:0022008	Biyolojik düzenleme	GO:0065007

Tablo 9: T47D hücreleri *DHRS2* siRNA ve *DHRS2* OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler

T47D <i>DHRS2</i>-siRNA Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Gelişimsel süreç	GO:0032502	Savunma yanıtı	GO:0006952
Küçük molekül metabolik süreci	GO:0044281	İmmün sistem prosesi	GO:0002376

Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856	Savunma yanıtı to other organism	GO:0098542
Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501	İnnate immune response	GO:0045087
Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275	Response to external stimulus	GO:0009605
Oksoasit metabolizması	GO:0043436	Biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0009607
Karboksilik asit metabolizması	GO:0019752	İmmün yanıt	GO:0006955
Organik asit metabolizması	GO:0006082	Diğer organizmalara yanıt	GO:0051707
Organonitrojen bileşik metabolik süreci	GO:1901564	Dış biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0043207
Sistem gelişimi	GO:0048731	Organizmalar arasındaki türler arası etkileşimde yer alan biyolojik süreç	GO:0044419
Hücre iskeleti organizasyonu	GO:0007010	Viral genom replikasyonunun negatif düzenlenmesi	GO:0045071
Fosfor metabolik süreci	GO:0006793	Virüse karşı savunma yanıtı	GO:0051607
Fosfat içeren bileşik metabolik süreci	GO:0006796	Simbiyont için savunma yanıtı	GO:0140546
Organel birleşmesi	GO:0070925	Virüse yanıt	GO:0009615
Küçük molekül biyosentetik süreci	GO:0044283	Viral sürecin negatif düzenlenmesi	GO:0048525
Biyolojik düzenleme	GO:0065007	Uyarıcıya yanıt	GO:0050896
Hücre bölünmesi	GO:0051301	Sitokine yanıt	GO:0034097
Organel organizasyonu	GO:0006996	Viral yaşam döngüsünün düzenlenmesi	GO:1903900
Hücre popülasyonu çoğalması	GO:0008283	Viral genom replikasyonunun düzenlenmesi	GO:0045069

Mikrotübül temelli süreç	GO:0007017	Strese verilen yanıt	GO:0006950
T47D DHRS2 OE-vektör Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Gelişimsel süreç	GO:0032502	Biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0009607
Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856	Dış biyotik uyarıcıya yanıt	GO:0043207
Sistem gelişimi	GO:0048731	Diğer organizmalara yanıt	GO:0051707
Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275	Diğer organizmalara savunma yanıtı	GO:0098542
Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501	Savunma yanıtı	GO:0006952
Hücre farklılaşması	GO:0030154	Dış uyaranlara yanıt	GO:0009605
Hücrel gelişimsel süreç	GO:0048869	Doğal bağışıklık yanıtı	GO:0045087
Anatomik yapı morfogenezi	GO:0009653	Organizmalar arasındaki türler arası etkileşimde yer alan biyolojik süreç	GO:0044419
Sinir Sistemi gelişimi	GO:0007399	Simbiyont için savunma yanıtı	GO:0140546
Hayvan organ gelişimi	GO:0048513	Virüse karşı savunma yanıtı	GO:0051607
Biyolojik düzenleme	GO:0065007	Virüse yanıt	GO:0009615
Hücre projeksiyon organizasyonu	GO:0030030	İmmün yanıt	GO:0006955
Gelişimsel süreç regülasyonu	GO:0050793	İmmün sistem prosesi	GO:0002376
Plazma membranına bağlı hücre projeksiyon	GO:0120036	Stres yanıtı	GO:0006950

organizasyonu			
Nörojeniz	GO:0022008	Dış uyaranlara verilen yanıtın düzenlenmesi	GO:0032101
Hücre popülasyonu çoğalması	GO:0008283	Viral sürecin negatif düzenlenmesi	GO:0048525
Biyolojik sürecin düzenlenmesi	GO:0050789	Sitokine yanıt	GO:0034097
Hücre gelişimi	GO:0048468	Biyotik uyarıcıya yanıtın düzenlenmesi	GO:0002831
Nöron üretimi	GO:0048699	Viral yaşam döngüsünün düzenlenmesi	GO:1903900
Doku gelişimi	GO:0009888	Uyarıcıya yanıt	GO:0050896

Tablo 10: MDA-MB-231 hücreleri *DHRS2* siRNA ve *DHRS2* OE-Vektör uygulaması sonucu ifadesi artan ve azalan genler için gen ontoloji analizlerinde bulunan biyolojik prosesler

MDA-MB-231 <i>DHRS2</i>-siRNA Grubu			
Biyolojik Prosesler			
İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501	Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501
Sistem gelişimi	GO:0048731	Çok hücreli organizasyon süreçlerinin düzenlenmesi	GO:0051239
Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856	Kimyasal maddelere yanıt	GO:0042221
Gelişimsel süreç	GO:0032502	Anatomik yapı homeostazı	GO:0060249
Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275	Doku homeostazı	GO:0001894
Monoatomik iyon taşınımı	GO:0006811	Gelişimsel süreç	GO:0032502

Monoatomik iyon transmembran taşınımı	GO:0034220	Hayvan organ gelişimi	GO:0048513
Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501	Hücre iletişimi	GO:0007154
Sistem gelişimi	GO:0048731	Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856
Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856	Doku yeniden şekillenmesi	GO:0048771
		Kemik erimesi	GO:0045453
		Hücre farklılaşması	GO:0030154
		Sistem gelişimi	GO:0048731
		Hücrel gelişimsel süreç	GO:0048869
		Biyolojik düzenleme	GO:0065007
		Biyolojik sürecin düzenlenmesi	GO:0050789
		Sinyalizasyon	GO:0023052
		Endojen uyarana hücrel yanıt	GO:0071495
		Anatomik yapı morfogenez	GO:0009653
		Hücre yapışması	GO:0007155

MDA-MB-231 DHRS2 OE-vektör Grubu

Biyolojik Prosesler

İfadesi azalan genler		İfadesi artan genler	
Çok hücreli organizma süreçleri	GO:0032501	Organonitrojen bileşik metabolik süreci	GO:1901564
Gelişimsel süreç	GO:0032502	Protein metabolik süreci	GO:0019538
Anatomik yapıların gelişimi	GO:0048856	Organel organizasyonu	GO:0006996

Hücre farklılaşması	GO:0030154	Birincil metabolik sürecin düzenlenmesi	GO:0080090
Gelişimsel süreç	GO:0048869	Azot bileşiği metabolik sürecinin düzenlenmesi	GO:0051171
Çok hücreli organizma gelişimi	GO:0007275	Makromolekül modifikasyonu	GO:0043412
Gelişimsel sürecin düzenlenmesi	GO:0050793	Hücrel azot bileşiği biyosentetik süreci	GO:0044271
Hücre gelişimi	GO:0048468	Protein modifikasyon süreci	GO:0036211
Sistem gelişimi	GO:0048731	Nükleobaz içeren bileşiklerin metabolik süreçlerinin düzenlenmesi	GO:0019219
Uyarıcıya yanıt	GO:0050896	Nükleobaz içeren bileşik biyosentetik süreci	GO:0034654
Çok hücreli organizasyon süreçlerinin düzenlenmesi	GO:0051239	Heterosiklik biyosentetik süreç	GO:0018130
Üreme	GO:0000003	Aromatik bileşik biyosentetik süreci	GO:0019438
Anatomik yapı morfogenez	GO:0009653	Metabolik sürecin düzenlenmesi	GO:0019222
Hücre popülasyonu çoğalması	GO:0008283	Katabolik süreç	GO:0009056
Hücre popülasyonu proliferasyonunun düzenlenmesi	GO:0042127	Fosfor metabolizması	GO:0006793
Biyolojik düzenleme	GO:0065007	Organonitrojen bileşik biyosentez süreci	GO:1901566
Hayvan organ gelişimi	GO:0048513	Organik döngüsel bileşik biyosentetik süreci	GO:1901362
Üreme prosesi	GO:0022414	Azot bileşiği metabolik sürecinin pozitif düzenlenmesi	GO:0051173
Hücre iletişimi	GO:0007154	RNA metabolik sürecinin düzenlenmesi	GO:0051252
Sinyalizasyon	GO:0023052	Fosfat içeren bileşik metabolik süreci	GO:0006796

5. TARTIŞMA

Kanser, teknolojinin ve bilimsel tekniklerin de ilerlemesiyle tedavisi mümkün hastalık grubu haline gelmiştir. Ancak bu ilerlemeye rağmen, insan genomunun her bir birey için özgü olması nedeniyle kanserin günümüzde kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Kanser kalıtsal olabileceği gibi yıllar içerisinde biriken mutasyon yükünün etkisiyle sporadik de olabilir. Günümüz yaşam koşulları birçok çevresel etmene maruz kalmamıza neden olmaktadır. Bu dış etmenler ve alışkanlıklar kanser vakalarının her geçen gün artmasına neden olmaktadır. Kanser bir hastalık tipi olmakla beraber köken aldığı doku veya organa göre isimlendirilmektedir. Kanseri cinsiyete bağlı olarak sınıflandırmak mümkündür. Erkeklerde akciğer kanseri en sık görülen kanserlerden biriyken kadınlarda meme kanseri öne çıkmaktadır. Meme kanseri, alt tipine bağlı olarak tedavi oranı en yüksek kanserlerden biridir. Buna rağmen üçlü negatif veya inflamatuvar meme kanseri tipleri gibi metastaz oranı yüksek gruplarda oldukça kötü bir seyir izlemektedir. Bu heterojenite nedeniyle meme kanseriyle olan bu mücadelede moleküler mekanizmaların ve ilaç hedefi olabilecek yeni hedef genlerin tespitine ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız bu tez çalışmasında hücre içi fonksiyonu tam anlamıyla tanımlanmamış olan, hücre homeostazında oldukça önemli bir yeri olduğunu düşündüğümüz kısa zincir dehidrogenaz redüktaz ailesi üyesi 2 (*DHRS2*) geninin meme kanseri hücrelerindeki olası etkilerini inceledik.

Hücreler gelişimsel süreçte veya strese maruz kaldıklarında senesens, uyku hali (*quiescence*) veya farklılaşma yolunu seçebilirler (18). Hücre senesensinde hücre bölünmesi geri dönüşümsüz olarak durdurulurken kanser kök hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biri hücre bölünmesinin devamlılığıdır. Bu hücreler hücre döngüsündeki düzenleyici mekanizmaları baskılayabilir veya bölünme sinyalinin sürekli aktif durumda kalmasını sağlayabilir. Büyüme sinyalinin devamlılığı hücre yüzey reseptörleri ile başlar. Meme kanserinde ise büyüme faktör reseptörlerinin etkisinin yanısıra hormon reseptörleri de aktif olarak hücre içi sinyal mekanizmalarını uyarmaktadır. Luminal A alt tipinde ER ve PR reseptörleri pozitif, HER2 reseptörü ise negatiftir ve her bir reseptör hücre döngüsünü farklı şekillerde uyarmaktadır (44). Normal meme dokusunda bu reseptörler östrojen, progesteron gibi üreme hormonları aracılığıyla uyarılırlar. Meme dokusunun gelişimi ve süt bezlerinin oluşumu için oldukça önemlidir (45).

Kanser hücrelerinde ise östrojen ve progesteron, *Siklin D (CCND1)* ve/veya *CDK2* gibi hücre döngüsü bileşenlerini fosforilleyebilirler (6). *DHRS2* proteini sodyum bütirat uygulaması sonucu hücre döngüsü durdurulmuş hepatoselüler karsinom hücrelerinde çekirdekte biriken bir protein olarak keşfedilmiştir (36,40). Bu keşif bizlere bu genin hücre döngüsü elemanları ile bir etkileşimde olabileceğini düşündürdüğünden, insan meme kanseri hücre hatlarında yaptığımız çalışmamızda *DHRS2* gen ifadesindeki değişimlerle hücre döngüsü bileşenleri arasındaki etkileşim incelenmiştir. İncelenen hücre döngüsü genleri, *DHRS2* gen ifadesi OE-vektör aracılığı ile arttırıldığında hücrelerin döngüye girememesi üzerine G0/G1 fazına göre seçilmiştir. Prostat kanserinde insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerden elde edilen ekzozomlar kullanılarak *DHRS2* ekspresyonu kanser hücrelerinde arttırılmıştır. Bu hücrelerde *Siklin D* ve *Siklin E* miktarlarında artış saptanmıştır. Buna ek olarak hücrelerin sonuçlarımıza benzer şekilde G0/G1 fazında tutulduğu, *DHRS2* siRNA verilen grupta ise S fazına geçiş yaptığı bulunmuştur (46). Benzer çalışmalarda ise *DHRS2* ekspresyonunun uyku halindeki (quiescence) hücrelerde arttığı ve hücre senesens için önemli bir aracı olabileceği görülmüştür. *DHRS2*'nin Hücre evrelerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (41,47). Yapılan floresan işaretli ubikitin hücre döngüsü indikatörü analizlerinden sonra hücrelerde *DHRS2* gen ekspresyonu baskılandığında hücrelerin kendi kontrol gruplarına göre döngüde daha ileride olduğu gözlemlenmiştir (kontrol-G1, *DHRS2* siRNA- S fazlarında görülmüştür.). Bu çalışmaya ek olarak, yapılan kantitatif gen ekspresyon analizlerinde hücreler arasında fark bulunmuştur. Kontrol grubu olarak kullandığımız fibrokistik meme epitel hücresi olan MCF10A östrojen ve progesteron reseptörü bulunmayan bir hücre hattıdır (48). MCF10A grubunda diğer tüm kanser grubu hücrelere oranla hücre döngüsü için önemli bir düzenleyici olan *p21* ifadesi daha yüksektir ve *DHRS2* yokluğunda *p21* ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Benzer bir ifade artışı hücre senesensini indüklemek üzere doksisiklin uygulanmış insan diploid fibroblast hücrelerinde görülmüştür. *DHRS2*'nin *p53* ve *p21* aktivasyonunda rolü olabileceği düşünülmektedir (41). *DHRS2*'nin siklinler ve siklin bağımlı kinazlar dışında hücre döngüsünü düzenleyici bazı transkripsiyon faktörleri ile ilişkisi bilinmemektedir. *MYB* transkripsiyon faktörü bunlardan biridir, c-*MYB* ve b-*MYB* formları S fazı düzenleyicilerindendir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (49). ER'nin c-*MYB* ekspresyonunu modifiye ederek *DHRS2* ifadesini değiştirdiği ve böylece *MDM2* ve *p53* üzerinden *p21* ifadesini düzenlediği bilinmektedir (50). Bulgularımızın ışığında

DHRS2'nin tümör hücrelerindeki artışı hücrelerdeki *p21* seviyesini arttırmakta ve hücrelerin G1 fazında tutulmasına neden olmaktadır (51). Bulgularımızı destekler bir çalışma da patojenlerden horizontal gen aktarımının incelenmesi amacıyla HEK293T ve NIH3T3 hücrelerinde yapılmıştır. Bu çalışmada G0/G1 fazında tutulan hücrelerde *DHRS2* ifadesinin arttığı bulunmuştur (52). *DHRS2* transkript miktarı artışının siklin bağımlı kinaz seviyelerinin en dramatik bir şekilde değiştiği grup bazal benzeri meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleridir. Tedavide kullanımda olan Palbiciclib, Abemaciclib ve Ribociclib gibi *CDK4/6* inhibitörlerinin seçiminde *DHRS2* seviyesinin bir kriter olabileceğini düşünmekteyiz (53).

Kanser hücrelerinin enerji metabolizmaları en hızlı şekilde enerjiden en yüksek verim alabileceği şekilde modifiye olmaktadır. Normal koşullarda hücreler glikoliz sonrasında hücre için gerekli diğer metabolitlerin üretimine devam ederken, tümör hücreleri gen ifadelerini değiştirerek besin kıtlığında bile ATP sentezleyebilecek biçimde TCA döngülerini modifiye ederler (21). *DHRS2* çekirdekte sentezlendikten sonra sahip olduğu mitokondriyal sinyal peptidi sayesinde mitokondriye taşınır ve bu sinyal dizisi kesildikten sonra olgun halde enzimatik işlev gösterir. NADPH bağımlı bir enzimdir ve hücre içerisinde NADPH dengesinin korunmasında da rol oynar (38). NADPH hücrede önemli bir elektron donörüdür, redoks ve anabolik reaksiyonların oluşturduğu stresin giderilmesinde kritik rollere sahiptir. NADPH homeostazı hücre içerisinde çeşitli yollar üzerinden desteklense de indirgenen antioksidan seviyesi kanserlerde oksidatif stresin de artması nedeniyle bozulmuştur (54). *DHRS2*, NADPH ile olan bağının yanı sıra mitokondride düzenleyici birçok aktiviteye sahiptir. Yapmış olduğumuz transkriptom sonuçlarına göre katyonik veya anyonik iyon bağlanması ve transportu (Ca^{+2} , çeşitli tuzlar), voltaj kanallarının düzenlenmesi ve oksidoredüktaz aktivitesini düzenleyici *NOTCH3*, *S100A14*, *NECAB2*, *ALOX15B* gibi birçok gen hücre içerisinde *DHRS2* miktarının değişiminden en çok etkilenen genler olmuşlardır.

Kanser hücrelerinin glikoz ile ilişkisi görüldüğünden daha karmaşıktır. Bu nedenledir ki diyabet ve obezite kanser için risk oluşturmaktadır. Meme kanserinde postmenopozal vakalarda tip 2 diyabet artmış risk ile ilişkilendirilmiştir. Adipoz dokunun artması ile östrojen üretiminin indüklenmesi arasında ilişki bulunmuştur. Lipid metabolizmasındaki genlerin transkripsiyon faktörü olan *PBX1* geni ile ER durumunun meme kanseri hücre

hatları ve hastalarında incelendiği bir başka çalışmada reseptör negatif hücre hattı olan MCF10A hücrelerinde *PBX1* transfeksiyonu sonrasında, ER arttığında *DHRS2* seviyesinin yukarı yönlü bir eğilime sahip olduğu gösterilmiştir (55). Buna ek olarak obeziteyle artan insülin direnci hiperglisemiye neden olmaktadır ve bu tümör büyümesi için yarar sağlamaktadır (56,57). Bir başka yaklaşım da östrojen reseptörünün insülin büyüme faktörü (IGF-1) ile çift yönlü çalıştığı ve bu mekanizmanın meme kanserinde bozulduğu yönündedir. ER hedefi olan progesteron reseptörünün indüklenmesi normal şartlarda serum konsantrasyonunun %1'in altına düşmesiyle gerçekleşirken, IGF artışı PR aktivasyonunu sağlamaktadır (58). Şeker metabolizmasındaki değişimler meme kanseri progresyonunu çeşitli açılardan desteklemektedir. Glikoliz sonrasında açığa çıkan ikincil metabolitler de hücre içerisindeki ROS stresini arttırabilmektedir. Glikoz ve fruktozun TCA döngüsüne katılmasından sonra ortaya çıkan ve ikincil metabolit olarak adlandırılan ara ürünlerin hücre içerisinde serbest bulunan protein, nükleik asit veya lipidler ile bağ kurması sonucu ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşmaktadır. Bu ürünler hücre içerisinde oluşabileceği gibi besinler yolu ile alınabilir. Günümüzde AGE ürünleri daha çok diyabet, obezite ve yaşlanma ile ilişkilendirilse de hücre yüzeyinde bulunan *RAGE* reseptörlerine bağlanmasıyla ROS stresini arttırabileceği veya doğrudan DNA'ya bağlanarak DNA hasarına neden olabileceği gösterilmiştir. DNA kırıkları veya hücredeki ROS stresini kanserlerin en önemli başlatıcılarından. *DHRS2* kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz ailesi enzimlerinden biri olup, polyol, steroid, yağ asidi türevleri ve ksenobiyotikleri NADPH bağımlı bir şekilde indirgediği düşünülmektedir. AGE üretiminde Maillard ve Polyol yolları aktiftir ve hücre içi AGE üretiminde açığa çıkan ürünler *DHRS2* substratı olabilirler (59). Aynı zamanda mitokondriyal ROS seviyesinin *DHRS2* miktarının artmasıyla zıt yönlü korelasyon gösterdiği bilinmektedir (60). Hücre içerisindeki ROS kaynaklarından biri olan AGE ürünlerinin *DHRS2* gen ifadesindeki değişimlerden etkilenip etkilenmediği bu tez kapsamında araştırılmıştır. Hücrelerdeki AGE seviyeleri kolorimetrik olarak Eliza testi ile ölçülmüştür. MCF10A hücrelerinde AGE ürünlerinin miktarındaki değişim diğer gruplara nazaran daha düşüktür. Ayrıca MCF10A hücrelerinde *DHRS2* ifadesi arttırıldığında AGE miktarı da artarken diğer gruplarda azalma görülmektedir. Yabani tip *p53* taşıyan MCF7 hücreleri en büyük düşüş yüzdesini gösterirken *p53* mutasyonu taşıyan T47D ve MDA-MB-231 hücreleri birbirlerine benzer oranlarda yanıt vermişlerdir. Luminal A grubu ER(+) MCF7, ER(-) MDA-MB-231 hücrelerine oranla

daha düşük *RAGE* ifadesine sahiptir (61). Bu yanıt farklılığı MCF7 hücrelerinde *DHRS2*'nin *RAGE* ifadesinde bir artışa neden olduğunu düşündürmektedir. *RAGE* ekspresyonuna ek olarak AGE ürünlerinin *MAPK* yolağını aktifleştirdiği ve bazı transkripsiyon faktörlerini fosforillediği bilinmektedir. Aktivasyon kanser hücrelerinde sinyal iletiminin sürekli açık kalması ve tümör gelişimine katkı sağlaması anlamına gelmektedir. ER ifadesinin meme kanserinde AGE ürünleri ile olan etkileşiminin ortaya çıkarılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

AGE-*RAGE* etkileşimi sadece ROS üretimine sebep olmaz, aynı zamanda inflamasyon yollarının aktifleşmesine de neden olur. Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada AGE ürünlerinin NF- κ B yolağını aktifleştirdiği gösterilmiştir (62). NF- κ B'nin hedef genlerinin işlevleri arasında inflamasyon dışında farklılaşma, apoptoz, proliferasyon düzenlemeleri bulunur (63). İnflamasyon tümörlerde proliferasyonun, anjiyogenezin ve invazyonun arttırılmasını sağlar. İnflamazomlar ise inflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasını ve salınımını sağlamak için gerekli kaspazların aktivasyonundan sorumlu oligomerik protein kompleksleridir. Transkriptom bulgularımızda *DHRS2* miktarı hücre içerisinde arttığında hormon reseptör pozitif hücrelerde, T47D ve MCF7, immün reseptör, sitokin ve kemokin aktivasyonu ve interferon yanıtlarını düzenleyen genlerin ekspresyon seviyelerinde artma görülmüştür. Bu bulgular *DHRS2*'nin luminal A grubunda inflamatuvar yanıtı düzenleyen bir gen olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle tez çalışmamızda *CASP1*, *IL18*, *IL1B*, *IL1A*, *PYHIN1* gibi inflamasyon ve buna bağlı olarak piroptoz yolağında rol oynayabileceğini düşündüğümüz genleri özel olarak inceledik. *PYHIN1*, HIN domaini içeren interferonlar tarafından uyarılabilen ve *Gasdermin B*, *MEFV*, *CARD* ve *MDM2* ile etkileşimli bir gendir. Meme kanserinde ekspresyon seviyesi oldukça düşüktür. Kanser grubu hücrelerde *DHRS2* ifadesinin baskılanmasının ardından ekspresyonu artarken MCF10A hücrelerinde vektör verilen grupta *PYHIN1* artışı görülmüştür. *PYHIN1* hücre içerisinde koruyucu etkiye sahiptir. Hücre içerisinde *p53* ve *RB*'dan bağımsız bir şekilde *p21*'i arttırarak *CDK2*'nin kinaz aktivitesini azalttığı, bu sayede proliferasyonu düzenlediği gösterilmiştir (64). Kaspaz 1 (*CASP1*) hücre ölüm mekanizmalarından biri olan piroptoz yolağı için önemli bir üyedir. *IL1B* ve *IL18*'i keser ve bu sitokinlerin salınımı gerçekleşir. *IL18*, STRINGdb protein-protein etkileşimi veritabanında *DHRS2* ile etkileşimde olarak gösterilmiştir. Bu nedenle *IL18* seviyesindeki değişimi daha net

anlayabilmek için *CASP1* ifadesi de bu çalışmada incelenmiştir. MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde *DHRS2* gen ifadesi baskılandığında *CASP1* ifadesinde dramatik bir düşüş görülmüştür. Buna zıt olarak T47D hücrelerinde vektör uygulaması sonrasında *CASP1* ifadesi artmıştır. Hücrelerin tümünde *CASP1* ve *IL18* ifadeleri birbirine zıt yönlü olarak değişmiştir. Kontrol grubumuzda *IL18* ifadesindeki değişim diğer hücrelerden daha belirgindir. Bunun nedeni olarak bazı kanserlerde *IL18*'in koruyucu bir etkiye sahip olmasıdır. Anti-tümör immün sistemi harekete geçirerek bu koyucu etkiyi sağladığı düşünülmektedir (65). Buna ek olarak üçlü negatif meme kanseri hastalarında serumda *IL18* miktarının arttığı saptanmıştır. MCF7 hücrelerinde doksorubisin uygulaması sonrasında yine hücrelerde *IL18* artışı görülmüştür (66).

IL18 sadece doğal bağışıklık düzenleyicisi, *NF-kB*, *MAPK* ve *PI3K* sinyal yollarını aktive eden bir sitokin değildir. *IL18* tümör gelişiminde etkileri olan bir sitokindir. Yapılan çalışmalarda *IL18*'in epitel yeniden düzenlenmelerine katıldığı, ekspresyonu artması durumunda tümör progresyonunu önlediği gösterilmiştir. *IL18*'in yanı sıra *DHRS2*'nin vimentin, kadherin gibi hücre adezyon molekülleriyle ilişkisi olduğu veritabanlarında gösterilmiştir. Transkriptom çalışmamızda özellikle MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kalsiyum iyon metabolizmasında işlevi olan genlerin ve özellikle vimentinin *DHRS2* ekspresyonundan etkilendiği bulunmuştur. Fokal adezyon durumunda kadherin ve integrinlerin yapısal değişiklik ve bağ kurabilmesi için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç vardır (67,68). Açık erişimli veritabanlarında metastatik kanserlerde *DHRS2* amplifikasyonları bildirilmiştir. Daha önceki çalışmamızda MCF7 hücrelerinde *DHRS2* siRNA uygulamasından sonra hücre migrasyonunun azaldığını göstermiştik. (69). Gastrik kanserlerde *HOXA13*'ün artışı *DHRS2*'yi baskılayarak hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu önemli ölçüde arttırmıştır (43,70). Bu bulgu *DHRS2*'nin farklı hücre tiplerinde farklı rollerinin olabileceğini göstermektedir. Tez çalışmamızda ise MCF7 hücrelerindeki *DHRS2* gen ifadesi baskılandığında hücre membran ve adezyon molekülleri, hücre bağlantılarında rol oynayan proteinlerin ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Kontrol hücrelerinde bu etki daha az görülmektedir. *STAMBPL1* geni *NF-kB* sinyal yolağının indirekt aktivatörlerinden biridir ve EMT geçişinde rol oynamaktadır. Akciğer kanserinde *STAMBPL1* geni baskılandığında *DHRS2* ifadesi artmış ve hücrelerin invazyon yetenekleri azalmıştır. Bu nedenle akciğer kanserinde koruyucu özellik gösterdiği ve bir tümör baskılayıcı gen gibi

hareket ettiği düşünölmektedir (71). Kalsiyum düzenlenmesine ek olarak vimentin, kolajen, aktin gibi mezenkimal hücre belirteçleri de hücre içi *DHRS2* seviyesinden oldukça etkilenmiştir. Aktin filamentler hücre hareketini kolaylaştıran yapılardır ve mezenkimal hücrelerde farklı düzenlenmelere maruz kalırlar (72). MCF10A hücrelerinde *DHRS2* baskılanması mikrotüböl düzenlenmesinde rol alan genlerin ifadelerini düşürürken, T47D hücrelerinde *DHRS2* gen ifadesi arttığında benzer bir yanıt oluşmuştur. Bu bilgilerden yaptığımız çıkarım, *DHRS2*'nin kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı tetikleyecek molekülleri düzenlediği yönündedir.

Aktin filamentlerin düzenlenmesi mezenkimal geçiş için önemli olduğu kadar hücre ölüm mekanizmaları için de önemlidir. Aktin filamentlerin apoptotik hücrelerdeki veziköl oluşumu, diğer proteinlerle olan sinyal iletimi ve kaspazlarla olan ilişkileri bilinmektedir (73). Yaptığımız *Kaspaz 3/7* analizlerinden sonra *DHRS2* ifadesi arttırılmış MCF10A hücrelerinde apoptotik hücre miktarının arttığı saptanmıştır. Buna karşın T47D, MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulaması sonucu grup içi kontrollere de bakıldığında *Kaspaz 3/7* miktarı artmıştır. Bir başka apoptoz düzenleyicisi olan *p53*, aktin düzenlenmesine katkı sağlayan proteinlerden biridir (74). Hücre içerisinde normal şartlarda *MDM2* ubiquitin E3 ligaz aracılığı ile bazal seviyede tutulan *p53*, stres durumunda nükleusta çeşitli genlerin aktivasyonunu sağlar. Birçok protein ve protein kompleksleriyle ilişkide bulunan *p53*'ün mutasyonları hücre homeostazını olumsuz etkilemektedir. *DHRS2*, *MDM2* aracılı bir *p53* düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır ve bu tanımlamanın ardından kanserdeki sinyal yolakları ve ilaç direnci çalışmalarında öne çıkmaya başlamıştır (42). *DHRS2*'nin *MDM2*'nin merkez domainine bağlanarak *p53* ve kesilmiş *PARP* miktarını arttırarak renal karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir).75) Bir diğer çalışmada anti tümör özelliği olduğu düşünölen gentian viyole (GV) *DHRS2*'ye bağımlı bir şekilde *MDM2* ekspresyonunu ve aynı zamanda *p53* ekspresyonunu SK-HEP-1 ve SMMC-7721 hücrelerinde arttırmaktadır. *DHRS2*'nin *MDM2*'ye bağlanarak onu proteolitik yıkımdan koruduğu, *MDM2* seviyesinin azalmamasına rağmen işlev göremez halde olması nedeniyle *p53* seviyesinin arttığı öne sürölmüştür. GV hücrelerdeki Fas ligand üretimini arttırarak dışsal apoptoz mekanizmalarını aktiveleştirmektedir. Bu çalışma ile *DHRS2*'nin Fas ligand üzerinden de apoptoz mekanizmalarına dahil olduğu gösterilmiştir (76). *DHRS2*'nin mitokondriyal işlevinden ötürü içsel apoptoz yolağında sitokrom c

salınımında etkili olup olmadığı hala bir merak konusudur. Kanser hücre hatlarında *DHRS2* OE-vektör gruplarında *CYCS* geninde 3 katlık bir artış bulunmuştur. Ancak MCF10A hücrelerinde durum tam tersidir ve *DHRS2* ifadesi baskılandığında sitokrom c miktarı artmaktadır. *DHRS2*'nin yüksek ekspresyonu yumurtalık ve özafagus kanserlerinde yine apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (60,77). Beta hücrelerinde ise pro-apoptotik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (78). Meme ve prostat kanserinde *SUV420H2* geni EMT ile ilişkilidir ve metastaza katkı sağlamıştır. Renal karsinoma hücrelerinde yapılan bir CHIP-seq analizde histon metiltransferaz geni olan *SUV420H2*, apoptotik süreçlerde *DHRS2*'nin hedeflerinden biri olduğu bulunmuştur. *SUV420H2* geni kromatin bölgelerinin metillenmesi ile görevlidir ve hücre içerisindeki miktarı azaldığında *DHRS2* geninin promoter bölgesi metillenmez ve aşırı üretimi gerçekleşir. Hücrede artan *DHRS2* miktarı apoptoz mekanizmalarını aktifleştirir (79). Bir diğer apoptoz ilişkili over kanserindeki bir epigenetik çalışmada, histon deasetilaz inhibitörlerinin seçimlerinde *DHRS2*'nin potansiyel bir biyobelirteç olduğu söylenmiştir (80). Önceki çalışmamızda MCF7 hücrelerinde Annexin V/7AAD deneyleri sonucunda siRNA uygulamasının apoptoz sürecinde etkin olmadığını, nekrotik hücrelerin oranlarını arttırdığımızı gösterdik (69). *DHRS2*'nin hem aktin filamentlerin düzenlenmesi hem de hücre zarının yapısına katılan metabolitlerin sentezinde görev aldığı düşünüldüğünde hipotezimizi destekler nitelikte bir sonuçtur. *DHRS2*'nin hücre apoptozundaki rolünün daha net bir şekilde ortaya çıkarılması için ileri fonksiyonel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

DHRS2 kanser hücrelerinde birçok mekanizmaya dahil olmaktadır. Yapmış olduğumuz fonksiyonel ve transkriptom çalışmasının sonuçları birbiri ile uyum göstermektedir. *DHRS2*'nin yüksek ekspresyon gösterdiği hücrelerde hücre döngüsünün tutulduğu, sitokin salınımı ile beraber inflamasyonu tetiklediği ve ikincil yollardan hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Bulgularımızın sonucu olarak *DHRS2*'nin meme kanserinde hücre proliferasyonu, apoptozu, invazyon ve migrasyonunu etkilediğini bildirmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Pecorino, L. (Ed.). (2021). *Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics* (5th ed.). Oxford University Press.
2. Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular biology of the cell: Seventh Edition* W.W. Norton & Company.
3. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
5. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye Kanser İstatistikleri. 2018.
6. Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
7. Houghton, S. C., & Hankinson, S. E. (2021). Cancer progress and priorities: Breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 30(5), 822–844. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-20-1193>
8. Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2019). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/pap.0000000000000232>
9. Guido, L. P., & Gomez-Fernandez, C. (2020). Advances in the molecular taxonomy of breast cancer. *Archives of Medical Research*, 51(8), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.001>
10. Biancolella, M., Testa, B., Salehi, L., D’Apice, M. R., & Novelli, G. (2021). Genetics and Genomics of Breast Cancer: update and translational perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.03.013>
11. Orsini, A., Diquigiovanni, C., & Bonora, E. (2023). Omics Technologies improving breast cancer research and diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12690. <https://doi.org/10.3390/ijms241612690>

12. Hanusek, K., Karczmarski, J., Litwiniuk, A., Urbańska, K., Ambrożkiewicz, F., Kwiatkowski, A., Martyńska, L., Domańska, A., Bik, W., & Paziewska, A. (2022). Obesity as a Risk Factor for Breast Cancer—The role of MIRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15683. <https://doi.org/10.3390/ijms232415683>
13. Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Li, D., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J., . . . Lai, P. H. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
14. Moccia, C., & Haase, K. (2021). Engineering Breast Cancer On-chip—Moving toward subtype specific models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.694218>.
15. Alves, L. N. R., Meira, D. D., Meriguetti, L. P., Casotti, M. C., Ventorim, D. D. P., Almeida, J. F. F., De Sousa, V. P., Sant’Ana, M. C., Da Cruz, R. G. C., Louro, L. S., Santana, G. M., Louro, T. E. S., Salazar, R., Da Silva, D. R. C., Zetum, A. S. S., Trabach, R. S. D. R., Errera, F. I. V., De Paula, F. M., De Vargas Wolfgramm Dos Santos, E., . . . Louro, I. D. (2023). Biomarkers in Breast Cancer: An Old Story with a New End. *Genes*, 14(7), 1364. <https://doi.org/10.3390/genes14071364>.
16. Martínez-Alonso, D., & Malumbres, M. (2020). Mammalian cell cycle cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 107, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.009>
17. Pietenpol, J. A., & Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: *Toxicology*, 181–182, 475–481. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00460-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00460-2)
18. Gorgoulis, V. G., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C. L., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L. J., Passos, J. F., Robbins, P. D., . . . Demaria, M. (2019). Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.

19. Liu, J., Peng, Y., & Wei, W. (2022). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, 32(1), 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>
20. Pack, L. R., Daigh, L. H., & Meyer, T. (2019). Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Current Opinion in Cell Biology*, 60, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.05.005>
21. DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
22. Singh, R., Barden, A., Mori, T. A., & Beilin, L. J. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129–146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>.
23. Perrone, A., Giovino, A., Benny, J., & Martinelli, F. (2020). Advanced Glycation End Products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2020/3818196>.
24. Haque, E., Kamil, M., Hasan, A., Irfan, S., Sheikh, S., Khatoon, A., Nazir, A., & Mir, S. S. (2019). Advanced glycation end products (AGEs), protein aggregation and their cross talk: new insight in tumorigenesis. *Glycobiology*, 30(1), 2–18. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz073>.
25. Turner, D. P. (2017). The role of Advanced Glycation End-Products in cancer disparity. In *Advances in Cancer Research* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.08.001>.
26. Zhao, D., Lü, H., & Huang, Z. (2015). Association between the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PubMed*, 20(2), 614–624. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26011358>.
27. Palanissami, G., & Paul, S. F. (2018). RAGE and its ligands: Molecular interplay between glycation, inflammation, and hallmarks of cancer—A review. *Discover Oncology*, 9(5), 295–325. <https://doi.org/10.1007/s12672-018-0342-9>
28. Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yépez, S., & Livingston, E. H. (2007). Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 139(1), 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.034>.

29. Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 897–907. <https://doi.org/10.1038/nrm1496>.
30. Cao, X., & Xu, J. (2019). Insights into inflammasome and its research advances in cancer. *Tumori Journal*, 105(6), 456–464. <https://doi.org/10.1177/0300891619868007>.
31. Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., & Chen, X. (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>.
32. Weinberg, R. A. (2013). *The biology of Cancer*. In W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9780429258794>
33. Oppermann, U., Filling, C., & Jörnvall, H. (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 130–132, 699–705. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00301-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00301-x).
34. Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E. A., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jörnvall, H., Kavanagh, K., Kedishvili, N. Y., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T., Thornton, J. M., Adamski, J., & Oppermann, U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.040>.
35. Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., & Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(24), 3895–3906. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8588-y>
36. Donadel, G., Garzelli, C., Frank, R., & Gabrielli, F. (1991). Identification of a novel nuclear protein synthesized in growth-arrested human hepatoblastoma HepG2 cells. *European Journal of Biochemistry*, 195(3), 723–729. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15759.x>.
37. Gabrielli, F., Donadel, G., Bensi, G., Heguy, A., & Melli, M. (1995). A Nuclear Protein, Synthesized in Growth-Arrested Human Hepatoblastoma Cells, is a Novel Member of the Short-Chain Alcohol Dehydrogenase Family. *European*

- Journal of Biochemistry, 232(2), 473–477. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.473zz.x>.
38. Shafqat, N., Shafqat, J., Eissner, G., Marschall, H., Tryggvason, K., Eriksson, U., Gabrielli, F., Lardy, H. A., Jörnvall, H., & Oppermann, U. (2006). Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(10), 1205–1213. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6013-y>.
 39. Heinz, S., Krause, S. W., Gabrielli, F., Wagner, H., Andreesen, R., & Rehli, M. (2002). Genomic Organization of the Human Gene HEP27: alternative promoter usage in HEPG2 cells and Monocyte-Derived dendritic cells. *Genomics*, 79(4), 608–615. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6743>.
 40. Gabrielli, F., & Tofanelli, S. (2012). Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene*, 511(2), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.013>.
 41. Oda, T., Sekimoto, T., Kurashima, K., Fujimoto, M., Nakai, A., & Yamashita, T. (2018). Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.210724>
 42. Deisenroth, C., Thorner, A. R., Enomoto, T., Perou, C. M., & Zhang, Y. (2010). Mitochondrial HEP27 Is a c-Myb Target Gene That Inhibits Mdm2 and Stabilizes p53. *Molecular and Cellular Biology*, 30(16), 3981–3993. <https://doi.org/10.1128/mcb.01284-09>
 43. Han, Y., Song, C., Wang, J., Tang, H., Peng, Z., & Lu, S. (2018). HOXA13 contributes to gastric carcinogenesis through DHRS2 interacting with MDM2 and confers 5-FU resistance by a p53-dependent pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 57(6), 722–734. <https://doi.org/10.1002/mc.22793>.
 44. Santen, R. J., Stuenkel, C. A., & Yue, W. (2022). Mechanistic effects of estrogens on breast cancer. *The Cancer Journal*, 28(3), 224–240. <https://doi.org/10.1097/ppo.0000000000000596>
 45. Li, Z., Wei, H., Li, S., Wu, P., & Mao, X. (2022). The role of progesterone receptors in breast cancer. *Drug Design Development and Therapy*, Volume 16, 305–314. <https://doi.org/10.2147/dddt.s336643>.

46. Xiao, W., Zeng, Z., Peng, K., Ren, D., & Zhang, L. (2023). Regulatory mechanism of DHRS2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes in prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Tissue & Cell*, 82, 102078. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102078>
47. Petropavlovskaja, M., Bodnar, C. A., Behie, L. A., & Rosenberg, L. (2007). Pancreatic small cells: Analysis of quiescence, long-term maintenance and insulin expression in vitro. *Experimental Cell Research*, 313(5), 931–942. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.12.012>.
48. Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B. Y., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PloS one*, 10(7), e0131285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131285>
49. Lei, W., Rushton, J. J., Davis, L. M., Liu, F., & Ness, S. A. (2004). Positive and negative determinants of target gene specificity in MYB transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29519–29527. <https://doi.org/10.1074/jbc.m403133200>.
50. Thorner, A. R., Parker, J. S., Hoadley, K. A., & Perou, C. M. (2010). Potential tumor suppressor role for the C-MYB oncogene in luminal breast cancer. *PLoS One*, 5(10), e13073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013073>.
51. Majtnerová, P., & Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1469–1478. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>.
52. Larrea, E., Fernández-Rubio, C., Peña-Guerrero, J., Guruceaga, E., & Nguewa, P. A. (2022). The BRCT Domain from the Homologue of the Oncogene PES1 in *Leishmania major* (LmjPES) Promotes Malignancy and Drug Resistance in Mammalian Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13203. <https://doi.org/10.3390/ijms232113203>.
53. Ben-Dror, J., Shalamov, M., & Sonnenblick, A. (2022). The history of early breast cancer treatment. *Genes*, 13(6), 960. <https://doi.org/10.3390/genes13060960>.
54. Ju, H., Lin, J., Tian, T., Xie, D., & Xu, R. (2020). NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>

55. Wang, J., Shidfar, A., Ivancic, D., Ranjan, M., Liu, L., Choi, M. R., Parimi, V., Gursel, D., Sullivan, M., Najor, M. S., Abukhdeir, A. M., Scholtens, D. M., & Khan, S. A. (2017). Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer. *International Journal of Cancer*, 140(11), 2484–2497. <https://doi.org/10.1002/ijc.30680>.
56. Kang, C., & LeRoith, D. (2018). Diabetes, obesity, and breast cancer. *Endocrinology*, 159(11), 3801–3812. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00574>.
57. Wiley, C. D., & Campisi, J. (2021). The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nature Metabolism*, 3(10), 1290–1301. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00483-8>.
58. Casà, A., Potter, A. S., Malik, S., Lazard, Z. W., Kuitse, I., Kim, H. T., Tsimelzon, A., Creighton, C. J., Hilsenbeck, S. G., Brown, P. H., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2011). Estrogen and insulin-like growth factor-I (IGF-I) independently down-regulate critical repressors of breast cancer growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(1), 61–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1540-0>.
59. Chen, N., Liu, Y., Li, Y., & Wang, C. (2020). Chemical proteomic profiling of protein 4'-Phosphopantetheinylation in mammalian cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(37), 16069–16075. <https://doi.org/10.1002/anie.202004105>
60. Zhou, Y., Wang, L., Ban, X., Zeng, T., Zhu, Y., Li, M., Guan, X. Y., & Li, Y. (2017). DHRS2 inhibits cell growth and motility in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 37(8), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.383>
61. Matou-Nasri, S., Sharaf, H., Wang, Q., Almobadel, N., Rabhan, Z., Al-Eidi, H., Yahya, W. B., Trivilegio, T., Ali, R., Al-Shanti, N., & Ahmed, N. (2017). Biological impact of advanced glycation endproducts on estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(11), 2808–2820. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.011>.
62. Lee, K. J., Yoo, J. W., Kim, Y. K., Choi, J. H., Ha, T., & Gil, M. (2018). Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via

- ERK and NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(3), 2195–2201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.182>.
63. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
 64. Ding, Y., Lee, J. F., Lu, H., Lee, M. H., & Yan, D. H. (2006). Interferon-Inducible protein IFIXA1 functions as a negative regulator of HDM2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1979–1996. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.5.1979-1996.2006>.
 65. Du, T., Gao, J., Li, P., Wang, Y., Qi, Q., Liu, X., Li, J., Wang, C., & Li, D. (2021). Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment. *Clinical and Translational Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.1002/ctm2.492>
 66. Inoue, N., Li, W., Fujimoto, Y., Matsushita, Y., Katagiri, T., Okamura, H., & Miyoshi, Y. (2019). High serum levels of interleukin-18 are associated with worse outcomes in patients with breast cancer. *Anticancer Research*, 39(9), 5009–5018. <https://doi.org/10.21873/anticanres.13691>.
 67. Harjunpää, H., Asens, M. L., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01078>
 68. Janiszewska, M., Primi, M. C., & Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.007759>
 69. Salman Yaylaz, B., Sırma Ekmekçi, S., Çınar, S., Deniz, G., & Abacı, N. (2021). DHRS2 is a potential marker of breast cancer metastasis. *Gene Reports*, 25, 101302. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101302>.
 70. Luo, X., Li, N., Zhao, X., Liao, C., Ye, R., Cheng, C., Xu, Z., Quan, J., Liu, J., & Cao, Y. (2019). DHRS2 mediates cell growth inhibition induced by Trichothecin in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1301-1>.
 71. Xiang, Y., Ling, L., Li, C., Hang, C., Zhou, C., Chen, J., Wang, Y., & Hu, L. (2023). STAMBPL1 promotes the progression of lung adenocarcinoma by

- inhibiting DHRS2 expression. *Translational Oncology*, 35, 101728. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101728>.
72. Shankar, J., & Nabi, I. R. (2015). ACTIN cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *PLoS One*, 10(3), e0119954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119954>
 73. Ren, W., Zhao, W., Cao, L., & Huang, J. (2021). Involvement of the ActIn machinery in programmed cell death. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.634849>.
 74. Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2008). Cell stress gives a red light to the mitochondrial cell death pathway. *Science Signaling*, 1(7). <https://doi.org/10.1126/stke.17pe9>
 75. Fang, L., Qian, C., Liu, W., Zhang, J., Ge, Y., Zhang, Q., Li, L., Liu, J., & Zheng, J. (2016). Selective effects of a fiber chimeric conditionally replicative adenovirus armed with hep27 gene on renal cancer cell. *Cancer Biology & Therapy*, 17(6), 664–673. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1190485>
 76. Chen, J., Zhao, F., Yang, H., Wen, J., Tang, Y., Wan, F., Zhang, X., & Wu, J. (2022). Gentian violet induces apoptosis and ferroptosis via modulating p53 and MDM2 in hepatocellular carcinoma. *PubMed*, 12(7), 3357–3372. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35968343>.
 77. Li, Z., Tan, Y. C., Li, X., Quan, J., Bode, A. M., Cao, Y., & Luo, X. (2022). DHRS2 inhibits cell growth and metastasis in ovarian cancer by downregulation of CHK α to disrupt choline metabolism. *Cell Death and Disease*, 13(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05291-w>
 78. Xue, D., Narisu, N., Taylor, D. L., Zhang, M., Grenko, C., Taylor, H. J., Yan, T., Tang, X., Sinha, N., Zhu, J., Vandana, J. J., Chong, A. C. N., Lee, A., Mansell, E. J., Swift, A. J., Erdos, M. R., Zhong, A., Bonnycastle, L. L., Zhou, T., . . . Collins, F. S. (2023). Functional interrogation of twenty type 2 diabetes-associated genes using isogenic human embryonic stem cell-derived β -like cells. *Cell Metabolism*, 35(11), 1897-1914.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.09.013>
 79. Ryu, T. Y., Lee, J., Kang, Y., Son, M., Kim, D., Lee, Y. S., Kim, M., & Cho, H. S. (2023). Epigenetic regulation of DHRS2 by SUV420H2 inhibits cell apoptosis

- in renal cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 663, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.04.066>
80. Han, Y., Wang, Z., Sun, S., Zhang, Z., Liu, J., Jin, X., Wu, P., Ji, T., Ding, W., Wang, B., & Gao, Q. (2019). Decreased DHRS2 expression is associated with HDACi resistance and poor prognosis in ovarian cancer. *Epigenetics*, 15(1–2), 122–133. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1656155>



HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNİN ROL OYNADIĞI MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 12	% 10	% 8	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to Bryant College Öğrenci Ödevi	% 1
3	dfzljdn9uc3pi.cloudfront.net İnternet Kaynağı	% 1
4	zenodo.org İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Koc University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Papasaikas, Panagiotis. "Computational and functional analyses of splicing regulation", Proquest, 20111003 Yayın	<% 1
7	Submitted to University of Nottingham Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.biorxiv.org İnternet Kaynağı	<% 1

