

HÜMEYRA KARACA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ İSTANBUL-2025

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MEME KANSERİNDE *DHRS2* GENİNDE MEYDANA
GELEN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN EPİTELYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

HÜMEYRA KARACA

DANIŞMAN
PROF. DR. NESLİHAN ABACI

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2025

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Hümeysra KARACA tarafından Prof. Dr. Neslihan ABACI'nın danışmanlığında hazırlanan “Meme Kanserinde DHRS2 Geninde Meydana Gelen Ekspresyon Değişimlerinin Epitelyal Mezenkimal Geçiş İle İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/08/2025 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Pr. Dr. Sema SİRMA EKMEKCI
İÜ, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Genetik AD

Jüri-Danışman

Prof. Dr. Neslihan ABACI
İÜ, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Genetik AD

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Melda SARIMAN
İst. Galata Üni.
Dış Hek. Fak. Temel Bilimler AD

BEYAN

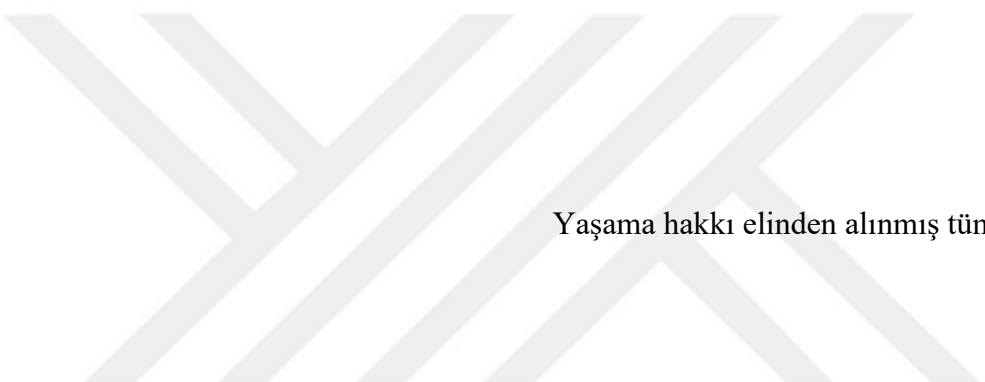
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hümevra KARACA

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında “Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi” Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF



Yaşama hakkı elinden alınmış tüm çocuklara
Gazze'ye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımı destekleyerek bu tezi hazırlama fırsatı sunan, engin bilgi ve deneyimiyle bana rehberlik eden, her aşamada desteğini hissettiren çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Neslihan Abacı'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına değer katan, yol göstericiliğiyle her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci'ye gönülden teşekkür ederim.

Çok kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan kıymetli, , yol göstericiliğiyle her zaman yanımda olan hocalarım Arş. Gör. Dr. Aris Çakiris ve Öğr. Gör. Dr. Zeliha Emrence'ye, laboratuvara geldiğim ilk günden beri bilgilerini, yardımlarını benden esirgemeyen bana her anlamda yol gösteren çok değerli arkadaşlarım Burcu Salman Yaylaz, Şeyma Punar ve Vahideh Zarerajabî'ye, kıymetli ekip arkadaşlarım Bahadır Kasap, Büneyan Tüzün ve Sümbül Gezer'e bana kattıkları her bilgi ve çalışma ortamımı benim için mutlu bir yer haline getirdikleri için çok teşekkür ederim.

Bu tez sürecinin cefasını çekerken benden maddi, manevi ve psikolojik desteğini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım Gülşah Tuna ve Sümeyye Kocağa'ya, yürüdüğüm bu süreçte en umutsuz olduğum anlarda bile bana destek olan, mutluluğumu hüznümü paylaştığım dostlarım Büşra Nur Şener, Hatice Sümeyya Sayar, İrem Naz Öz, Sare Parlak ve Sümeyye Özdemir'e çok teşekkür ederim.

Hayatımı her zaman kolaylaştırıp, güzelleştiren, bana verdikleri destekle bu hayatı yürümemi sağlayan, varlıkları ile bana güç veren canım annem ve babama, bana her zaman yol gösteren kıymetli ablam Rumeysa'ya ve neşe kaynağım kardeşlerim Hayrunnisa ve Kemal'e çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB), 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladıkları desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41090

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MEME KANSERİ	3
2.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	3
2.1.2. Meme Kanseri Sınıflandırılması	5
2.1.2.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	5
2.2. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	6
2.3. EMT İle İlişkili Genler.....	7
2.3.1. SDR Gen Ailesi.....	7
2.3.1.1. <i>DHRS2</i> Geni.....	7
2.3.1.2. <i>DHRS2</i> 'nin Fonksiyonları	8
2.3.2. <i>CDH1</i>	10
2.3.3. <i>TWIST1</i>	12
2.3.4. <i>SDC1</i>	12
2.3.5. <i>GMEB1</i>	13
2.3.6. <i>SNAIL</i>	14
2.3.7. <i>WNT</i> Gen Ailesi	15
2.3.7.1. <i>WNT3A</i>	16
2.3.7.2. <i>WNT4</i>	17
2.3.8. <i>TMED</i> Gen Ailesi.....	17
2.3.8.1. <i>TMED9</i>	18

2.3.8.2. <i>TMED5</i>	19
2.4. CRISPR.....	19
2.4.1. CRISPR/Cas9 Hücreye Taşınması.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. GEREÇ	26
3.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	27
3.2.2. Besiyeri ve Hücre Soyları	28
3.3. YÖNTEM	28
3.3.1. Hücre Soylarının Kültür Ortamında Çoğaltılması	28
3.3.2. gRNA Vektörlerinin Sulandırılması	29
3.3.3. gRNA Vektörlerinin Çoğaltılması	29
3.3.4. Paketleme Vektörlerinin Çoğaltılması	30
3.3.5. MidiPrep Yöntemi İle Plazmit İzolasyonu.....	30
3.3.6. Transfeksiyon İşlemi.....	31
3.3.7. Virüs Titrasyonu	33
3.3.7.1. Titrasyonu PCR Bileşenleri.....	33
3.3.7.2. RT PCR Dereceleri	34
3.3.8. Uygun Polybren Dozunun Ayarlanması	34
3.3.9. Uygun Puromisin Dozunun Ayarlanması	34
3.3.10. MCF7 Hücrelerinin Virüsle Enfeksiyonu ve Antibiyotik seçilimi	34
3.3.11. Primer Tasarımı.....	35
3.3.12. DHRS2 Vektörünün MCF7 Hücrelerine Transfeksiyonu.....	36
3.3.13. RNA İzolasyonu.....	37
3.3.14. cDNA Sentezi	38
3.3.15. Gen Ekspresyon Analizi.....	39
3.3.16. DNA İzolasyonu	40
Saflaştırılma Aşaması	41
3.3.17. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	41
3.3.18. Agaroz Jel Elektrophorezi	42
3.3.19. Sanger Dizileme	42
3.3.20. Veri İncelemesi	43
4. BULGULAR.....	44

4.1. Plazmit İzolasyonu.....	44
4.2. Virüs Titrasyon Sonuçları	45
4.3. Optimizasyon Çalışmaları Sonuçları	46
4.3.1. Puromisin Seçilimi İçin Doz Belirlenmesi.....	46
4.3.2. Polybren için Uygun Dozun Belirlenmesi	47
4.4. MCF7 Hücrelerinin Virüsle Enfeksiyonu ve Antibiyotik seçilimi	49
4.5. Sanger Dizilime Sonucu ve Oluşacak Protein Tahmini.....	51
4.6. <i>DHRS2</i> Gen Artışı Sonucunda İlişkili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler ...	52
4.7. <i>DHRS2</i> Gen <i>Knockout</i> 'u Sonucunda İlişkili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler.....	54
5. TARTIŞMA	56
6. KAYNAKLAR	63
HAM VERİLER	75
FORMLAR	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Meme kanseri risk faktörleri	4
Tablo 2: Kullanılan Cihazlar.....	26
Tablo 3: Kullanılan kimyasallar ve kitler	27
Tablo 4: Tez sürecinde kullanılan hücre soyları	28
Tablo 5 :Transfeksiyon için kullanılacak vektör miktarları.....	32
Tablo 6: Virüs titrasyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve hacimleri.....	33
Tablo 7: Virüs titrasyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve hacimleri.....	34
Tablo 8: Primer dizileri.....	35
Tablo 10: cDNA sentezi için kullanılan maddeler ve cDNA koşulları	38
Tablo 11: RT-PCR için kullanılan maddeler	39
Tablo 14: PCR için kullanılan malzemeler	41
Tablo 15: PCR koşulları	42
Tablo 16: Plazmit izolasyon sonuçları	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması.....	6
Şekil 2: Genomik konumdaki <i>DHRS2</i> geni	8
Şekil 3: <i>DHRS2</i> proteininin tahmin edilen protein-protein etkileşim ağı..	10
Şekil 4: Kaderinin moleküler organizasyonu.....	11
Şekil 5: <i>TMED9</i> 'un domain organizasyonu.....	19
Şekil 6: CRISPR-Cas9 ile Genom Düzenleme ve DNA Tamir Mekanizmaları (NHEJ ve HDR) Şeması	21
Şekil 7: CRISPR sistemlerinin hücreye taşınma yöntemleri	22
Şekil 8: İş akış şeması.....	25
Şekil 9: <i>DHRS2</i> ekspresyon vektörü.....	37
Şekil 10: Midiprep izolasyonu.....	45
Şekil 11: Virüs dilüsyon hesaplama formu.....	46
Şekil 12: Antibiyotik doz seçimi görüntüleri.....	47
Şekil 13: Polybren doz seçimi görüntüleri (10 µg/ml, 8 µg/ml, 6 µg/ml).....	48
Şekil 14: Polybren doz seçimi görüntüleri (4 µg/ml, 2 µg/ml, Kontrol)	49
Şekil 15: Antibiyotik seçilimi sonrası besiyeri renk değişimi	50
Şekil 16: Antibiyotik seçilimi sonrası hücre morfolojileri	50
Şekil 17: Sanger dizi sonuçlarının <i>DHRS2</i> geninin dizisi ile karşılaştırılması.....	51
Şekil 18: 77. Pozisyondaki delesyon sonucunda oluşacak aminoasit dizisi değişimi	52
Şekil 19: 91. Pozisyondaki delesyon sonucunda oluşacak aminoasit dizisi değişimi	52
Şekil 20: Vektör verilen MCF7 hücrelerinde <i>DHRS2</i> ekspresyonu	53
Şekil 21: <i>DHRS2 overekspresyonu</i> sonucu değişen genlerin ekspresyonları	54
Şekil 22: <i>DHRS2</i> gen <i>knockout</i> 'u sonucu değişen genlerin ekspresyonları	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAV:	Adeno-ilışkili virüsler
B-ALL:	B hücresi kaynaklı akut lenfoblastik lösemi
BLBC:	Bazal benzeri meme kanseri
cDNA:	Komplementer DNA
CDH1:	Kaderin-1
CrRNA:	CRISPR RNA
CRISPR:	Düzenli aralıklarla kümelenmiş palindromik tekrar kümeleri
DHRS2:	Dehidrogenaz/ Redüktaz üyesi 2
DSB:	Çift iplikli kırılma
E. Coli:	Escherichia coli
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT:	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER:	Östrojen reseptörü
FAK:	Fokal adezyon kinaz
FBS:	Fetal bovine serum
GAG:	Glikozaminoglikan
GMEB1:	Glukokortikoid modülatör element bağlayıcı protein 1
GME:	Glukokortikoid düzenleyici eleman
gRNA:	Rehber RNA
HDR:	Homoloji yönlendirmeli onarım
HCC:	Hepatosellüler karsinom
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
HGF	Heposit büyüme faktörü
HLH:	Heliks-döngü-heliks
kDA:	Kilodalton
LB:	Luria-Bertani
LV:	Lentivirüs
MDM2:	Murin çift dakika 2
MMP2:	Matris metalloproteinaz-2

MRP1:	Çoklu ilaç direnci proteini 1
NHEJ:	Homolog olmayan uç birleşmesi
OE:	Overekspresyon
PAM:	Protospacer bitişik motif
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PR:	Progesteron reseptörü
PTEN:	Fosfotaz ve tensin homologu
RLT:	RNA lizis tamponu
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR:	Gerçek zamanlı PCR
SDR:	Kısa zincirli dehidrogenaz/ redüktaz
sgRNA:	Tek Kılavuz RNA
SDC1:	Syndecan-1
SNAI1:	Snail ailesi transkripsiyon baskılayıcı 1
TMED:	Transmembran Emp24 Domain İçeren
TMED 5	Transmembran Emp24 domain içeren protein 5
TMED9:	Transmembran Emp24 domain içeren protein 9
TNBC:	Üçlü negatif meme kanseri
TWIST1:	Twist ailesi temel heliks-döngü-heliks transkripsiyon faktörü 1
VEGF:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
WHO:	Dünya sağlık örgütü
WNT:	Wingless/Integrated (Kanatsız/Entegre)
WNT3A:	WNT Gen aile üyesi 3A
WNT4:	WNT Gen aile üyesi 4
β :	Beta
γ :	Gamma
δ :	Delta

ÖZET

Karaca, H. (2025). Meme kanserinde *DHRS2* geninde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin Epitelyal Mezenkimal Geçiş ile İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla oluşan, kadınlarda en sık görülen malign tümörlerden biridir. Dünya genelinde kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sırada yer alır. Meme kanserine bağlı ölümlerin önemli bir kısmı, hastalığın uzak organlara metastaz yapması sonucunda gerçekleşmektedir. Bu çalışmada, meme kanserinde önemli rol oynayabileceği düşünülen *DHRS2* geninin epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreci üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. İlk aşamada, veri tabanları ve laboratuvarımızda gerçekleştirilen transkriptom analizleri üzerinden hem *DHRS2* hem de EMT sürecinde rol oynayabileceği öngörülen on hedef gen (*WNT3A*, *WNT4*, *TMED5*, *TMED9*, *GMEB1*, *SDC1*, *CDH1*, *VIM*, *TWIST1* ve *SNAIL*) belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar kapsamında, MCF7 hücre hattında genetik manipülasyonlar gerçekleştirilerek, *DHRS2* geninin *overekspresyonu* gen vektörü aracılığıyla sağlanmış, ayrıca CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak *DHRS2* gen *knockout* (KO) modelleri oluşturulmuştur. Bu hücrelerden elde edilen RNA, cDNA'ya çevrilmiş ve ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, *DHRS2* gen ekspresyonundaki değişikliklerin, özellikle *WNT3A*, *WNT4*, *TMED9* ve *SDC1* genlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon değişikliklerine yol açtığını göstermiştir. Bu sonuçlar, *DHRS2*'nin Wnt/ β -katenin başta olmak üzere çeşitli sinyal yollarını aktive ederek EMT sürecine etki ettiğini düşündürmektedir. *DHRS2* ekspresyonundaki değişiklikler, *VIM*, *CDH1*, *SNAIL*, *TWIST1* gibi EMT belirteç genlerinde sadece kısmi ve sınırlı değişikliklere yol açmıştır. Bu durum, klasik EMT programının tam olarak başlamadığını, ancak hücrelerde hem epitelyal hem de mezenkimal özelliklerin birlikte görüldüğü ara bir fenotip olan "parsiyel EMT" oluşumuna neden olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, *DHRS2*'nin MCF7 hücre hattında EMT süreci üzerindeki rolünü ve Wnt/ β -katenin sinyal yoluyla olan olası ilişkisini ortaya koyarak, meme kanserinin progresyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *DHRS2*, Epitelyal Mezenkimal Geçiş, Meme kanseri, Metastaz, CRISPR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TYL 2024-41090) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Karaca, H. (2025). Investigation of the Relationship Between *DHRS2* Gene Expression Changes and Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Genetics. Master's Thesis. Istanbul.

Breast cancer is one of the most common malignant tumors in women and ranks second in cancer-related deaths worldwide. A major cause of mortality is metastasis to distant organs. This study investigated the potential role of the *DHRS2* gene in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, which is critical for cancer progression and metastasis. Using publicly available databases and transcriptomic data from our laboratory, ten target genes (*WNT3A*, *WNT4*, *TMED5*, *TMED9*, *GMEB1*, *SDC1*, *CDH1*, *VIM*, *TWIST1*, and *SNAIL*) were identified as candidates involved in both *DHRS2* regulation and EMT. In MCF7 breast cancer cells, *DHRS2* overexpression was induced using a gene vector, while CRISPR-Cas9 technology generated *DHRS2* knockout models. Total RNA was isolated from these cells, converted into cDNA, and target gene expression was measured by RT-qPCR. *DHRS2* expression changes led to significant alterations in several EMT-related genes, especially *WNT3A*, *WNT4*, *TMED9* and *SDC1*. However, classical EMT markers (*VIM*, *CDH1*, *SNAIL*, *TWIST1*) showed only modest changes, suggesting that *DHRS2* does not fully trigger a classical EMT program. Instead, the findings point towards a "partial EMT" state, where cells exhibit both epithelial and mesenchymal characteristics. *DHRS2* appears to influence EMT mainly through the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathways. This study provides new insights into the regulatory role of *DHRS2* in EMT and its possible contribution to breast cancer progression through partial EMT and Wnt/ β -catenin pathway activation.

Keywords: *DHRS2*, Epithelial-Mesenchymal Transition, Breast Cancer, Metastasis, CRISPR

This study was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No: TYL 2024-41090).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, genlerde meydana gelen değişimlerle birlikte anormal hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır. Sağlıklı fizyolojik şartlar altında anormal hücreler ölür ya da çoğalamazlar. Ancak anormal hücreler büyümeye ve bölünmeye devam ettiğinde kanserleşme süreci başlar. Meme kanseri ise meme dokularında anormal çoğalma ile meydana gelmektedir. Duktal ve lobüler karsinom olmak üzere iki çeşittir. Duktal karsinom, süt kanallarında duktüslerde başlayan ve meme kanserinin yaygın olarak görülen çeşididir. Lobüler karsinom ise süt üreten lobüllerde meydana gelir. Meme kanseri hücreleri primer tümörden ayrılıp, uzak ya da yakın dokulara da sızarak metastaz olarak adlandırdığımız vücudun farklı dokularına yayılım gösterebilirler (Pius & Nkem, 2025). Meme kanserinde sağ kalım oranları diğer kanserlere oranla yüksek olsa da metastaz geliştiğinde 5 yıllık sağ kalım oranları %20'lere kadar düşmektedir (Jones, 2008). Bu nedenle metastazın biyolojik mekanizmalarının anlaşılması, erken teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ve daha etkili hedefe yönelik tedavi stratejilerinin oluşturulması açısından büyük klinik önem taşımaktadır.

Kısa zincirli alkol dehidrojenaz/redüktaz (*SDR*) gen ailesinin bir üyesi olan *DHRS2* geni, hücre içinde çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir (Z. Li vd., 2022). Yapılan çalışmalar, *DHRS2*'nin MDM2 aracılığıyla p53 proteininin stabilizasyonunu desteklediğini ve MDM2-TP53 stres yanıt yolunu düzenleyerek hücresel homeostazın korunmasına katkı sağladığını göstermektedir. Ayrıca *DHRS2*'nin hücrelerde reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltarak oksidatif stresin baskılanmasında yardımcı olduğu ve lipid metabolizmasında aktif rol oynadığı bilinmektedir. (Z. Li vd., 2022; Şakar, 2023; Zhou vd., 2018) . *DHRS2* ekspresyonundaki değişimlerin farklı kanser türlerinde hücresel proliferasyon, invazyon ve tümör progresyonu gibi süreçleri etkileyebileceği bildirilmekte olup *DHRS2*'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili yolları yukarı düzenleyerek hücre göçünü teşvik edebileceğini öne sürülmektedir (Liu vd., 2023).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *DHRS2* geninin meme kanserinde EMT sürecine olan potansiyel etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, MCF7 meme kanseri hücre hattında iki farklı model oluşturulmuştur: Bir grupta CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak *DHRS2* geni *knockout* edilirken, diğer grupta ise gen vektörü

aracılığıyla *DHRS2* ekspresyonu artırılmıştır. Elde edilen bu hücresel modellerde, EMT süreciyle ilişkili olduğu bilinen aday genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler analiz edilmiştir. Böylece, *DHRS2*'nin başta Wnt/ β -katenin sinyal yolu olmak üzere EMT ile ilişkili temel hücresel sinyal yolları üzerindeki olası düzenleyici etkilerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, memedeki anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelen ve kadın nüfusu arasında en sık karşılaşılan kanser çeşididir (Thwin vd., 2024; Xu vd., 2024). Bu hastalık, kanserle ilgili ölümlerin ise ikinci önde gelen sebebidir (Xu vd., 2024). 2022 yılı itibarıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, dünya genelinde 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve 670.000 kadın meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Çeşitli tedavi yöntemlerinin gelişmesine rağmen, hastaların %35'inde metastaz, nüks ve ilaç direnci gibi komplikasyonlar görülmektedir (Zhao vd., 2020). Metastatik meme kanserleri metastatik olmayan meme kanserlerine kıyasla çok daha kötü prognoz göstermektedir. Lokalize meme kanserlerinin %50'sinin metastaz yaptığı tespit edilmiştir. Meme kanserli hastaların ortalama sağ kalım süresi 2-3 yıl olarak belirlenmiştir (Xu vd., 2024).

2.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar meme kanseri riskini ve ilerlemesini etkileyen kalıtsal ve çevresel birçok farklı faktörlerle ilişkilendirmiştir. Gecikmiş evlilik yaşı, geç doğum yaşı, gecikmiş ergenlik, erken adet görme, geç menopoz yaşı, emzirme süresinin kısalığı, yüksek yağlı diyet, sigara-alkol kullanımı, fiziksel aktivite azlığı, obezite, vücut kitle indeksinin yüksek olması ($\geq 5,0$), doğum kontrol hapı kullanımı gibi birçok çevresel faktör meme kanseri riskini arttırmaktadır (Tablo 1) (Kashyap vd., 2022).

Meme kanseri hastalarının yaklaşık olarak %10'unda kalıtsal meme kanseri gözükmemektedir (Shiovitz & Korde, 2015). Meme kanseri olan birinci derece akraba olması, erken başlangıçlı (<35) meme kanseri için yüksek risk oluşturmaktadır (Beral vd., 2001). Tümör baskılayıcı gen olan *BRCA1* ve *BRCA2* genleri homolog onarım yoluyla DNA onarımına katkı sağlar. Bu genlerdeki mutasyonların kalıtsal meme kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bailey vd., 2013). *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının yaygınlığı etnik gruplar arasında değişmektedir; Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, Asyalı grupta bu mutasyonlar daha düşükken (%0,5) ve Aşkenazi grubunda daha yüksek (%10,2) olduğu bulunmuştur. Ayrıca ırklara göre farklı mutasyon çeşitleri tespit

edilmiştir. Örneğin Aşkenazi Yahudilerinde *BRCA1 185delAG* veya *BRCA2 6174delT* mutasyonları sıklıkla karşılaşılan mutasyonlardanken, İzlandalı ailelerde *BRCA2 999del5* mutasyonu daha çok görülmektedir (Daly vd., 2016).

Tablo 1: Meme kanseri risk faktörleri (Kashyap vd., 2022)

Risk Faktörü	Sonuçlar
Erken Ergenlik	Ergenlikte hızla çoğalan farklılaşmamış meme hücreleri, artan hormonal değişim maruziyeti nedeniyle mutajenlere karşı daha yüksek bir duyarlılık gösterir
Erken adet görme	Adet döneminde meme hücreleri büyüme ve bölünme eğilimindedir ve bu durum meme kanseri riskini artırır
Geç evlilik yaşı	Östrojen hormonuna uzun süre maruz kalmak
Geç doğum yaşı	Meme dokusunun farklılaşmaması ve östrojen hormonuna uzun süre maruz kalma
Emzirme başarısızlığı	Meme dokusu farklılaşmaması, östrojenik olmayan mutajenlere ve östrojene karşı daha duyarlı olması
Geç menopoz yaşı	Meme involüsyonunun geç başlaması ve östrojen ve progesterona uzun süre maruz kalması
Fiziksel aktivite eksikliği	Anovulatuvar döngü sayısının artması nedeniyle seks hormonlarına maruz kalmanın azalması
Yüksek yağlı diyet	Kolesterol östrojen sinyallemesini ve hücre çoğalmasını aktive eder
Obezite	İnflamatuvar sitokin ve kemokin düzeylerinde artış
Alkol tüketimi	Östrojen hormonunu artırır

Sigara içmek	p53 gen mutasyonu ve DNA nükleotidleri gibi gen mutasyonlarını indükler
Doğum kontrol hapı	Doğum kontrol hapları progesteron ve östrojen içerir
Aile Geçmişi	<i>BRCA1/BRCA2</i> gen mutasyonları

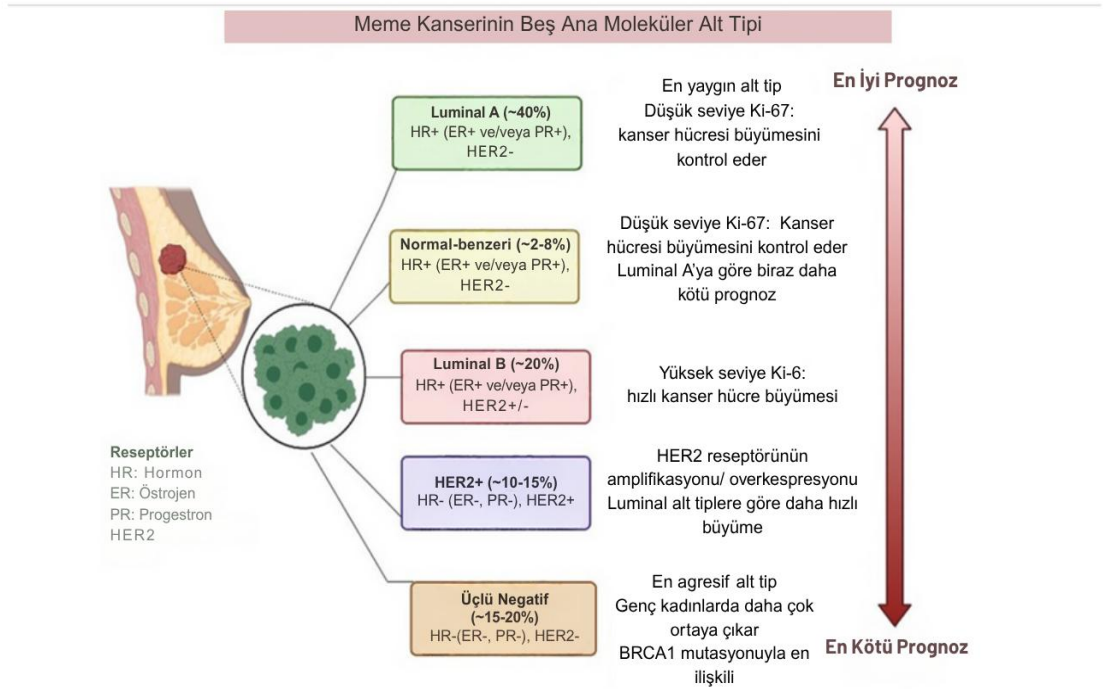
2.1.2. Meme Kanseri Sınıflandırılması

Meme kanseri kendi içerisinde heterojenite gösteren bir kanser türüdür. Bu sebeple kendi içerisinde farklı sınıflandırmalara ayrılmıştır. Bu sınıflandırmalar arasında en yaygın kullanılan iki sınıflandırma vardır. Bunlar; histopatolojik sınıflandırma ve moleküler sınıflandırmadır.

2.1.2.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

Meme kanseri farklı alt tiplere sahip heterojen bir kanser çeşididir. Bu alt tipler hormon reseptörlerinin immünohistokimyasal ekspresyonuna göre östrojen reseptörü pozitif (ER+), progesteron reseptörü pozitif (PR+), insan epidermal büyüme faktörü pozitif (HER2+) ve bu reseptörlerden hiçbirinin ifade edilmedi üçlü negatif meme kanseri olmak üzere dört kategoriye ayrılır (Perou vd., 2000). Günümüzde yapılan küresel gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarıyla meme kanseri; ER, PR ve HER2+ immünohistokimya belirteçleri ve moleküler özelliklerine göre alt tiplere ayrılmış durumdadır. Bu alt tipler Luminal A, Luminal B, HER2+, normal benzeri ve üçlü negatif/bazal benzeri meme kanseri (BLBC) olmak üzere beş tanedir (Şekil 1) (Orrantia-Borunda vd., 2022). Luminal A tipi hormon reseptörleri pozitif olan yani hem ER hem de PR içeren kanser tipleri iken HER2+, BLBC ve normal benzeri kanserler ER- kanser çeşididirler. Luminal A, invazif meme kanserlerinin yaklaşık %50'sini oluşturan en yaygın gözükten moleküler alt tipidir. Bununla birlikte tüm içsel alt tipler arasında en iyi prognoza sahip olan tiptir. Luminal B kanserleri, Luminal A kanser çeşidine göre daha yüksek dereceli ve daha kötü prognoza sahiptir. ER pozitiflerdir fakat PR negatif olabilirler ve yüksek Ki67 ekspresyonunsa sahiptirler. HER2+ grup meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. ER ve PR yokluğu ve HER2+ varlığı ile

karakterizedirler. Luminal meme kanserlerine göre çok daha hızlı büyürler ve daha kötü prognoza sahiptirler. Üçlü negatif meme kanserleri ER, PR ve HER2 negatif meme kanserleridir ve tüm meme kanserlerinin %20'sini oluştururlar. Yüksek çoğalma hızı, DNA onarım genlerinde değişiklik ve artmış genomik instabilite gösterir. İmmünohistokimyasal olarak bazal ve bazal olmayan TNBC olarak ikiye ayrılırlar. Bazal TNBC'ler CK5/6 ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü tip 1 (EGFR1) ekspresyonu karakterize iken bazal olmayanlar CK5/6 sitokeratinlerinin ekspresyonu yoktur (Orrantia-Borunda vd., 2022) .



Şekil 1: Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması (Singh & Yadav, 2021)

2.2. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

Epitel-mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerinin kutupsallıklarını ve hücre-hücre bağlantılarını kaybederek, mezenkimal hücrelere özgü hareketlilik ve invazyon özellikleri kazandıkları dinamik bir biyolojik süreçtir (Maier vd., 2010). Normal koşullarda embriyogenez, organ gelişimi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olaylarda kritik rol oynar. Ancak patolojik durumlarda, özellikle kanser progresyonu sırasında EMT'nin yeniden aktive olması, tümör hücrelerinin bağ dokusuna göç etmesini, dolaşım sistemine girmesini ve uzak organlara metastaz yapmasını kolaylaştırır

(Marconi vd., 2021). Bu süreçte E-kaderin gibi epitel belirteçlerinin baskılanması, buna karşılık vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal belirteçlerin artışı karakteristik değişikliklerdir. EMT aynı zamanda transkripsiyon faktörleri (SNAIL, TWIST, ZEB) ve sinyal yolları (Wnt/ β -katenin, TGF- β , Notch) aracılığıyla düzenlenir (Sarrand & Soyfoo, 2023). Bu sayede epitel hücrelere mezenkimal bir hal alır ve bir dokudan başka bir dokuya göç eder.

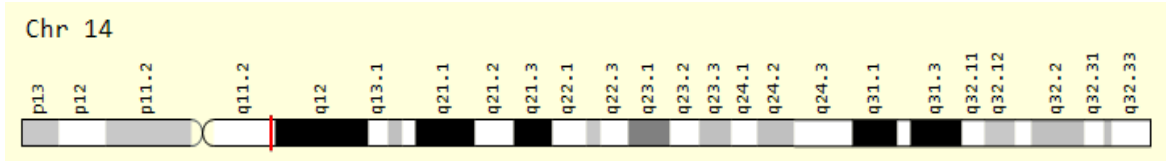
2.3. EMT İle İlişkili Genler

2.3.1. SDR Gen Ailesi

Kısa zincirli dehidrogenazlar/redüktazlar (SDR'ler), NAD(P)(H)-bağımlı oksidoredüktazlar süper ailesine ait enzimlerdir (Kallberg vd., 2010). SDR gen ailesi, tüm organizmalarda bulunmakta olup, 46.000'den fazla üyesi ile geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Bu enzimler, lipid, amino asit, karbonhidrat, kofaktör, hormon ve ksenobiyotik metabolizmasında önemli roller üstlenir. Ayrıca, redoks sensör mekanizmalarında da kritik işlevler görür (Kavanagh vd., 2008). SDR proteinleri, yapı ve işlev açısından büyük çeşitlilik gösterir. Hepsi de bağlanma bölgesi, katalitik kalıntı motifi ve her iki tarafında α -heliks bulunan "Rossmann kıvrımı" olarak bilinen a-tabakasından oluşan korunmuş üç boyutlu yapı vardır (Yu vd., 2021).

2.3.1.1. *DHRS2* Geni

Hep27 olarak da bilinen Dehidrojenaz/Redüktaz Üyesi 2 (*DHRS2*), NADH/NADPH'ye bağımlı kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz (SDR) ailesine ait bir enzim olup kromozom 14q11.2'de lokalizedir (Şekil 2). *DHRS2* geninin 300 ve 280 aminoasit uzunluğunda iki farklı formu bulunmaktadır (Zhou vd., 2018). Bu proteinin hücre içindeki lokalizasyonu ağırlıklı olarak sitoplazma, çekirdek ve mitokondride gözlenmektedir (Gabrielli & Tofanelli, 2012). İlk olarak karaciğer hücrelerinde ekspresyonu tanımlanan *DHRS2* geni, yumurtalık ve parotis bezinde yüksek seviyede, karaciğer, meme bezleri, plasenta ve testiste ise daha düşük düzeylerde ifade edilmektedir (Gabrielli & Tofanelli, 2012).



Şekil 2: Genomik konumdaki *DHRS2* geni (GeneCards®'tan uyarlanmıştır (<https://www.genecards.org>)).

2.3.1.2. *DHRS2*'nin Fonksiyonları

Birçok kanser türünde *DHRS2*'nin yer aldığı kromozom bölgesinde delesyonların meydana geldiği saptanmıştır. Ancak bu genin tümör biyolojisindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde yer alan çalışmalar, *DHRS2*'nin kanser tipine bağlı olarak hem tümör baskılayıcı gen hem de onkogen benzeri davranışlar sergileyebildiğini ve farklı biyolojik fonksiyonlar üstlenebildiğini ortaya koymaktadır (Z. Li vd., 2021).

NADPH bağımlı bir karbonil redüktaz olan *DHRS2*, 1-fenil-1,2-propandion, 2,3-heptandion, 3,4-heksandion gibi zararlı dikarbonil bileşiklerin indirgenmesine aracılık ederek bu bileşikleri daha az toksik hâle getirmektedir. Bu özelliği sayesinde *DHRS2*, hücreleri karbonil kaynaklı sitotoksik hasardan koruyarak antioksidatif savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır (Shafqat vd., 2006).

DHRS2'nin lipid metabolizmasında da işlevsel olarak aktif olduğu ve östrojen ile steroid hormonların metabolizmasında yer aldığı bilinmektedir. *DHRS2* östrojen ile steroidler gibi hormonların metabolizmasında rol alan bir enzim olarak iş görür. Bu durum *DHRS2*'nin kanser progresyonunda özellikle meme kanseri gibi hormon reseptörlerinin aktif olduğu kanserlerde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalar meme kanserinde, özellikle östrojen reseptörü pozitif olan alt tiplerde *DHRS2* ekspresyonunun yükseldiğini göstermiştir (J. Wang vd., 2013).

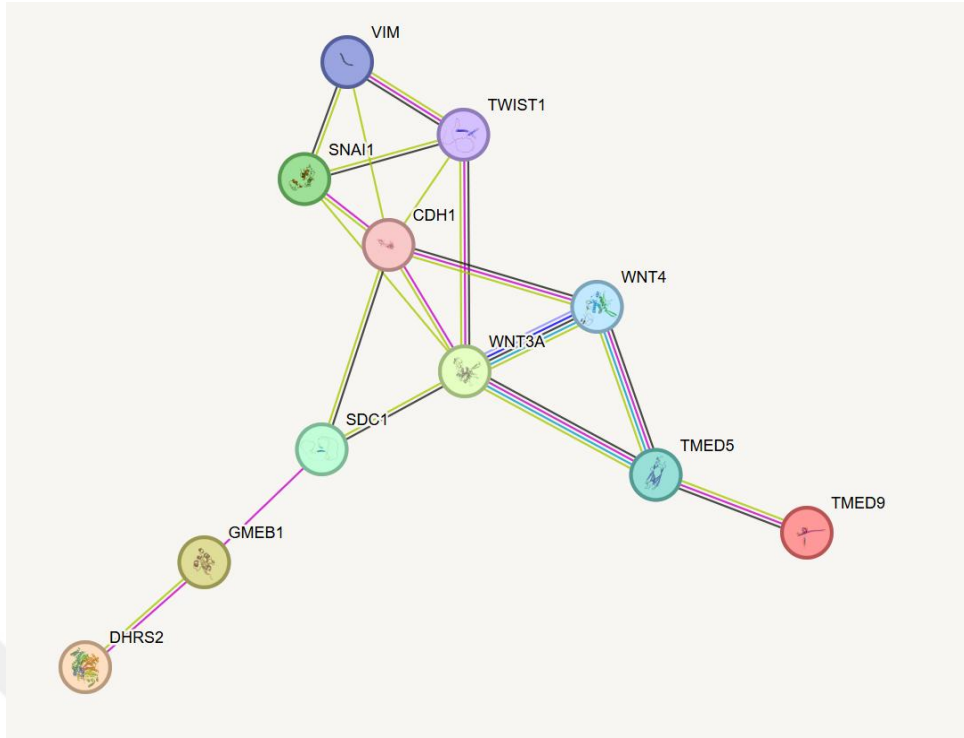
DHRS2 proteini, N-terminalinde bulunan mitokondriyal hedefleme sinyali aracılığıyla mitokondriyal matrikse taşınan bir proteindir. Mitokondriler, hücredeki metabolik ve redoks süreçlerin düzenleyici merkezleri olup, oksidatif stres koşullarında artan reaktif oksijen türleri (ROS) hücresel hasara yol açabilmektedir. Bu noktada, *DHRS2*'nin mitokondriye lokalize olması, özellikle oksidatif stresle ilişkili hücresel savunma mekanizmalarında görev üstlendiğini düşündürmektedir. *DHRS2* artışı, bu

stres koşullarında süperoksit radikallerini ortadan kaldırarak hücreyi oksidatif hasardan koruyabilir (Zhou vd., 2018).

Bazı tümör modellerinde, *DHRS2* ekspresyonunun azalmasının hücresel davranışlar üzerindeki etkileri de gösterilmiştir. Örneğin, özofageal skuamöz hücreli karsinom modelinde *DHRS2* düzeylerinin azalması, ROS seviyesinin düşmesine, MAPK sinyal yolunun ve matris metalloproteinaz-2 (*MMP2*) ekspresyonunun baskılanmasına ve sonuç olarak hücre göçünün engellenmesine yol açmıştır (Zhou vd., 2018).

Bunlara ek olarak, *DHRS2*'nin katalitik olmayan fonksiyonları da oldukça dikkat çekicidir. *DHRS2* proteini, E3 ubiquitin ligaz enzimi olan MDM2'nin potansiyel bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Hücre içinde nükleusa taşınabilen *DHRS2* proteini p53'ün inhibitörü olan MDM2'nin merkez domainine bağlanarak, MDM2 aracılığıyla gerçekleştirilen p53 yıkımını baskılamakta ve böylece p53 proteininin stabilizasyonuna katkı sağlamaktadır (Oda vd., 2018). Bu durum, *DHRS2*'nin hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz gibi p53 aracılı hücresel süreçlerde dolaylı olarak etkili olabileceğini göstermektedir.

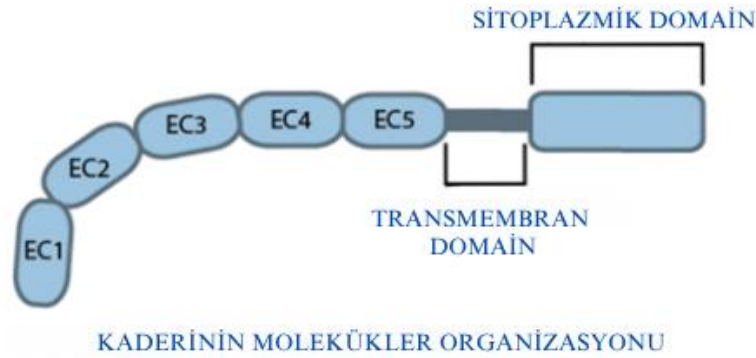
Ayrıca, Jurkat insan T hücreli lösemi hücre hattında yapılan çalışmada, *DHRS2*'nin *LEF1* transkripsiyon faktörünün doğrudan hedeflerinden biri olduğu gösterilmiş; bu da *DHRS2*'nin bağışıklık hücrelerinde de fonksiyonel önem taşıyabileceğine işaret etmiştir (Ekmekci vd., 2020). Genel olarak bakıldığında, *DHRS2* gen ekspresyonundaki değişimlerin farklı genlerle etkileşime girerek proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi çok sayıda kanserle ilişkili biyolojik süreci etkileyebileceği bildirilmektedir (Şekil 3) (Salman Yaylaz, 2024).



Şekil 3: DHRS2 proteininin tahmin edilen protein-protein etkileşim ağı. (STRING veritabanından alınmıştır (<https://string-db.org>)).

2.3.2. *CDH1*

CDH1 (kaderin-1) geni, insan genomunda 16. kromozomun uzun kolu üzerinde, 16q22.1 bölgesinde yer almakta olup yaklaşık 100 kb uzunluğundadır. Gen, 16 ekzon ve 15 introndan oluşmakta ve türler arasında oldukça korunmuş bir yapıya sahiptir (Shenoy, 2019). Kalsiyum (Ca^{2+}) bağımlı hücre-hücre adezyonunu düzenleyen, 120 kDa ağırlığında bir glikoprotein olan E-kaderin proteinini kodlamaktadır (Van Roy & Berx, 2008). E-kaderin proteini, üç bölgeye sahiptir: sitoplazmik alan, transmembran alan ve beş tandem tekrardan oluşan ekstraselüler alan (Şekil 4). Bu yapı, E-kaderinin hücreler arası bağlantılarının oluşumunda ve hücre adezyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Bücker & Lehmann, 2022) .



Şekil 4: Kaderinin moleküler organizasyonu

CDH1 geninde meydana gelen mutasyonlar, E-kaderin proteininin fonksiyon kaybına yol açabilir. E-kaderinde meydana gelen fonksiyon kaybı, çeşitli hücresel mekanizmaları ve sinyal yollarını etkileyerek kanser progresyonunda kritik bir rol oynar. Özellikle, E-kaderin kaybı epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ve Notch yollarının aktivasyonuna neden olarak hücrelerin hareketliliğinin, invazyon yeteneklerinin artmasına ve apoptotik uyarılara karşı direnç geliştirmelerine zemin hazırlar. E-kaderin yokluğu hücre içerisinde β -katenin miktarının artmasına sebep olur. β -katenindeki bu artış Wnt sinyal yolunun aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen olan *PTEN* (Fosfataz ve tensin homoloğu)'nin inaktivasyonuna sebep olarak hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasında sebep olur. Bunun dışında E-kaderin inaktivasyonunun metastaz süreciyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bilinmektedir. E-kaderin kaybı, hücre-hücre yapışmasını düzenleyen *SNAI1*, *SLUG*, *TWIST* ve *ZEB1* gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda artışa neden olur. Bu artış, hücrelerin yapısal bütünlüğünü bozarak apikal-bazal polaritesini kaybetmesine ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecini başlatmasına yol açar. Bu sürecin başlaması ise, hücrelerin metastatik özellikler kazanmasını sağlayarak farklı dokulara göç etmesine sebep olur (Shenoy, 2019).

2.3.3. *TWIST1*

TWIST1 (Twist Ailesi Temel Heliks-Döngü-Heliks Transkripsiyon Faktörü 1) geni, 7. kromozomun kısa kolunda 7p21.2 bölgesine lokalize olmuştur (Bourgeois vd., 1996). Bu gen, gastrulasyon ve mezodermal gelişimin temel düzenleyicisi olarak görev yapan, heliks-döngü-heliks (HLH) yapısına sahip bir transkripsiyon faktörünü kodlar. HLH protein süper ailesine ait olan *TWIST1*, ailenin diğer üyeleriyle dimerleşerek promotör bölgelerdeki E-kutuları olarak adlandırılan korunmuş dizilere bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. *TWIST1* ilk olarak *Drosophila*'da mezoderm spesifikasyonu ve farklı doku tiplerine bölünmesi ve erken embriyo gelişimi sırasında dorsal-ventral düzenlenme için gerekli olan zigotik genlerden biri olarak tanımlanmıştır. "Twist" adı, *TWIST1* geninin bulunmadığı *Drosophila* (meyve sineği) embriyolarının normal gelişim sürecini tamamlayamayıp mezoderm tabakasını oluşturamaması ve embriyonun sonunda bükülmüş bir şekil alarak ölmesi nedeniyle verilmiştir. İnsanlarda *TWIST 1*, normal omurgalı gelişimi için kritik öneme sahiptir. Bu gendeki mutasyonlar, küçük kafatası ve uzuv anomalileriyle karakterize otozomal dominant bir hastalık olan Saethre-Chotzen sendromuna yol açar (Qin vd., 2012). Ayrıca *TWIST1*, hücrel belirlenme süreçlerinde ve miyogenez, osteogenez ve nörogenez gibi çeşitli soyların farklılaşmasında rol oynamaktadır (Vesuna vd., 2009).

TWIST1 geninin ekspresyonunun, glioma, sarkom, melanom, meme kanseri ve skuamöz hücreli karsinom gibi birçok kanser türünde arttığı tespit edilmiştir. Bu artış, EMT ve kanser kök hücre özelliklerini tetikleyerek kanserin progresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. *TWIST1*'in ekspresyonunun baskılanması, özellikle meme kanseri hücre hatlarında metastatik özelliklerin azalmasına neden olurken, ekspresyonunun artması ise E-kadherin seviyelerini düşürerek EMT'yi teşvik etmektedir. Bununla birlikte, *TWIST1* proteinin aşırı ekspresyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu artırarak in vivo anjiyogenezi indüklemekte ve MYC kaynaklı apoptozun ana düzenleyicilerinden biri olan p53 yolunu inhibe etmektedir. Bu özellikleriyle *TWIST1*, hem kanser gelişimi hem de metastaz süreçlerinde kritik bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır (Khales vd., 2022).

2.3.4. *SDC1*

Syndecan-1 (*SDC1*), adını Yunanca "bir arada tutmak" anlamına gelen *syndein* kelimesinden alır ve memelilerde dört üyeden oluşan (*SDC1*, *SDC2*, *SDC3*, *SDC4*)

sindekan ailesinin en çok çalışılan ve en iyi bilinen üyesidir. İnsan genomunda 2p24.1 kromozomal bölgesinde lokalize olan *SDC1* geni, 9 ekzondan oluşur ve epitel ile mezenkimal hücrelerde ifade edilir. Bu gen, sindekan, SDC1 ya da CD138 olarak da bilinen ve hücre dışı, transmembran ve sitoplazmik alanlardan oluşan bir proteini kodlar. SDC1'in büyük hücre dışı alanı (ektodomain), glikozaminoglikan (GAG) zincirlerini (heparan sülfat ve kondroitin sülfat) içerir. SDC1 diğer sindekanlar arasında da oldukça korunan 24-25 amino asit uzunluğundaki hidrofobik transmembran alanı aracılığıyla plazma membranına bağlanır (Akl vd., 2015). Bu sayede SDC1 proteini integral bir membran proteini olarak işlev görür ve hücre çoğalmasına, hücre göçüne ve hücre-matris etkileşimleri gibi süreçlerde önemli rol oynar, enzimler ve enzim inhibitörleriyle etkileşim kurar (Liao vd., 2020).

SDC1 ekspresyonundaki bozukluklar, hücre proliferasyonu, metastaz, invazyon ve anjiyogenezi tetikleyerek kanser gelişimine sebep olabilirler. *SDC1* ekspresyon düzeyleri farklı tümör tiplerinde değişiklik göstermektedir. Örneğin baş ve boyun kanseri, hepatosellüler karsinom, akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerdeki *SDC1* ekspresyonları azalırken; endometrial kanser, over kanseri, meme kanseri ve pankreas kanseri gibi bazı kötü huylu tümörlerde *SDC1* ekspresyonu artığı gösterilmiştir (Kim vd., 2011).

SDC1 ekspresyonunun kaybı, hücre adezyonunu sağlayan e-kaderin ekspresyonunun azalmasına ve hücre dışı matrikse bağlanma yeteneğinin kaybına yol açarken, hücre hareketliliğini ve invazyonu artırır. Stromal *SDC1* ekspresyonunun artışı, fibronektin üretimini ve hücre dışı matris organizasyonunu değiştirerek anjiyogenezi destekler (Akl vd., 2015).

SDC1, ayrıca çeşitli hücre sel sinyal yollarını modüle etmektedir. Epidermal büyüme faktörü EGF9, EGF reseptör ailesi (ErbB11-4), hepatosit büyüme faktörü (HGF), HGF için reseptör tirozin kinaz (Met) ve Wnt ligandları gibi pek çok sinyal faktöründe rol oynamaktadır (Liao vd., 2020). *SDC1*'in, akciğer ve kolorektal kanserlerde fokal adezyon kinaz (FAK) sinyalleme sinin aktivasyonu yoluyla hücre adezyonunu arttırdığı bilinmektedir. (Akl vd., 2015).

2.3.5. *GMEB1*

GMEB1 (Glukokortikoid Modulator Element Bağlayıcı Protein 1) geni, insan kromozomunun kısa kolunda 1p35.3 lokasyonunda bulunur ve 13 eksondan oluşur

(NCBI). Bu gen, 88 kDa moleküler ağırlığında bir nükleoprotein olan GMEB1 proteinini kodlar. GMEB1, glukokortikoid reseptör (GR) sinyal yollarını düzenleyen transkripsiyonel faktör olarak ilk kez tanımlanmıştır. Protein, GMEB2 ile etkileşimde bulunarak tirozin aminotransferaz (TAT) gen promotör dizisinin glukokortikoid düzenleyici elementi (GME) ile bağlanmasını sağlar ve bu bağlanma, glukokortikoid reseptör transaktivasyonunu modüle eder (An vd., 2019).

GMEB1'in ekspresyonunun artmasının, insan nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Nakagawa vd., 2008). Aynı şekilde, IL-2'nin *GMEB1* ekspresyonunu artırarak PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ettiği ve bu mekanizma yoluyla glukokortikoid kaynaklı T hücresi apoptozunu engellediği gösterilmiştir (Kawabe vd., 2012). Bu bulgular, *GMEB1*'in anti-apoptotik özellikler sergilediğini göstermektedir.

Kanser biyolojisi bağlamında yapılan çalışmalarda, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde *GMEB1*'in aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu kolaylaştırdığı, buna karşılık hücre apoptozunu baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *GMEB1*'in baskılanmasının bu süreçleri tersine çevirdiği ve kanser hücrelerinin büyüme ve yayılmasını engellediği rapor edilmiştir (C. Chen vd., 2023). Bu veriler, *GMEB1*'in kanser gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir role sahip olabileceğini göstermektedir.

2.3.6. *SNAIL*

SNAIL (Snail Ailesi Transkripsiyon Baskılayıcısı 1) geni ilk olarak 1984 yılında yapılan bir araştırmada, *Drosophila melanogaster*'da tanımlanmış ve mezoderm oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Grau vd., 1984). Daha sonra, Snail homologları insanlar, diğer omurgalılar, omurgasız kordatlar (protokordatlar), böcekler, nematotlar, annedliler ve yumuşakçalar dahil olmak üzere birçok türde bulunmuştur. Omurgalılarda Snail ailesi Snail1, Snail2 ve Snail3 olmak üzere 3 üyeli bir ailedir (Nieto, 2002). Bu ailenin üyeleri birbiriyle yakın ilişkili transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapan proteinleri kodlar. Proteinler C-terminal bölgeleri, belirli DNA dizilerini tanıyan çinko parmak bölgeleri, N-terminal bölgesi ve baskılayıcı aktivite için gerekli olan SNAG bölgesini içermektedirler. Bu proteinlerin embriyonik gelişim, kanser metastazı ve EMT'de önemli roller oynadığı bilinmektedir (S. P. Han vd., 2011). *SNAIL*; *SNAIL* gen ailesi arasında en çok çalışılan gendir. Bu gen 20. kromozom

üzerinde, 3 ekzonu bulunan bir gendir. Mezoderm oluşumu, gastrulasyon ve nöral kret gelişimi sırasında ve EMT'nin gerekli olduğu çoğu gelişimsel süreçte ifade edilir (S. P. Han vd., 2011; Twigg & Wilkie, 1999). SNAI1, EMT süreci için çok önemli bir gen olan *CDH1*'in promotöründe bulunan E-kutularına bağlanarak *CDH1* geninin transkripsiyonunu baskılar ve E-kaderinin oluşmasını engeller. Öte yandan, SNAI1 bir transkripsiyonel aktivatör olarak da görev yapar. SNAI1, fibronektin, kolajenler ve matris bozunma enzimi matris metalloproteinaz 2 ve 9 (MMP2 ve MMP9) gibi mezenkimal belirteçleri ve TWIST ve ZEB1 gibi EMT transkripsiyon faktörlerini de artırır. Bu durum hücrelerin epitelden mezenkimal fenotipe geçmesini sağlayarak kanser invazifliğine sebep olur. Bunun dışında SNAI1 kanserle ilişkili fibroblastların aktivasyonuna sebep olur ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin invazyonu ve bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaşır. (Dong & Wu, 2021).

2.3.7. *WNT* Gen Ailesi

WNT (Wingless/Integrated (Kanatsız/Entegre) gen ailesi ilk kez 1982 yılında farelerde *Int* geni olarak tanımlanmıştır (Nusse & Varmus, y.y.). Sonraki çalışmalar, bu genin *Drosophila*'da tanımlanan *wingless* geni ile homolog olduğunu ortaya koymuş ve böylece bu gen ailesi *WNT* adı altında birleştirilmiştir (Nusse & Varmus, 2012). İnsan genomunda *WNT* gen ailesi, *WNT1*, *WNT2*, *WNT2B* (*WNT13*), *WNT3*, *WNT3A*, *WNT4*, *WNT5A*, *WNT5B*, *WNT6*, *WNT7A*, *WNT7B*, *WNT8A*, *WNT8B*, *WNT9A* (*WNT14*), *WNT9B* (*WNT14B*), *WNT10A*, *WNT10B*, *WNT11* ve *WNT16* olmak üzere toplam 19 üyeden oluşmaktadır (Bodine, 2008). Bu genlerin kodladığı proteinler sistein açısından zengin, salgılanan glikoproteinlerdir. Vücut büyümesi, gelişimi, kök hücre farklılaşması, embriyonik gelişim, kanser gelişimi polarite, göç ve apoptoz gibi birçok fizyolojik süreçte temel düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır (Pashirzad vd., 2019).

WNT genleri tarafından aracılık edilen sinyal iletim yoluna “Wnt sinyal yolu” adı verilir. Wnt sinyalleme kanonik (β -katenin-bağımlı) yol ve kanonik olmayan (β -katenin-bağımsız) yol olmak üzere iki ana yola ayrılır. Kanonik Wnt/ β -katenin yolu, WNT ligandlarının Frizzled (Fz) reseptörü ve LRP5/6 koreseptörü ile etkileşimi sonucu Disheveled (Dvl) proteininin aktivasyonunu ve β -katenin'in yıkımdan korunarak sitoplazmada birikmesini sağlar. Stabil β -katenin daha sonra nükleusa transloke olur ve TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu yol; embriyonik gelişim, hücre büyümesi, farklılaşma, polarite oluşumu,

sinir sistemi gelişimi ve kanser oluşumu gibi birçok önemli biyolojik süreçte kilit roller oynar. Organizma evriminde en çok korunmuş yollardan biridir (He vd., 2015). Kanonik olmayan yol ise β -katenin'den bağımsız olarak çalışır. Non-kanonik Wnt sinyal yolu, Wnt/kalsiyum (Wnt/ Ca^{2+}) ve Wnt/düzlemsel hücre polaritesi (Wnt/PCP) sinyal iletim yolları olarak iki alt yola ayrılır (He vd., 2015). Wnt/ Ca^{2+} sinyalinin, iskelet yapısının yeniden düzenlenmesi, hücre adezyonu, doku ayrılması ve göç gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlediği gösterilmiştir. Wnt/PCP yolunda ise Wnt ligandları miyozin aktivasyonu, aktin polimerizasyonu, hücre polarizasyonu ve hücre hareketliliği gibi süreçlere etki etmektedir. WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT7A, WNT8, WNT8B ve WNT10A kanonik yolda rol alırken, WNT4, WNT5a ve WNT11, Wnt5a ise kanonik olmayan sinyal yolunu aktive eder (Pashirzad vd., 2019).

2.3.7.1. *WNT3A*

WNT3A (Wingless Tipi MMTV Entegrasyon Bölgesi Ailesi Üyesi 3A), insan genomunda 1q42'de lokalizedir yer alır ve kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktif bir üyesidir. WNT3A, β -katenin birikimini indükleyerek bu yolu aktive eder. Bu aktivasyon, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar (KirikoshiH vd., y.y.). β -katenin birikimini indükler ve böylece kanonik Wnt sinyal yolunu aktive eder. Nöral kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler gibi çeşitli kök hücre tiplerinde hem çoğalma hem de farklılaşma süreçlerinde önemli roller oynar. Yapılan çalışmalar WNT3A'nın embriyonik kök hücre gelişimini, sağlıklı hücrelerin invazyon ve çoğalmasını desteklemesi, organ oluşumu gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır. Kanserde ise WNT3A varlığı kanser türüne bağlı olarak farklı sonuçlar doğurabilir. Örneğin WNT3A, B hücresi öncüsü akut lenfoblastik lösemi (B-ALL) hücre ölümünü indüklerken MCF7 (meme kanseri) hücrelerinin çoğalmasını desteklemektedir. Ayrıca WNT3A'nın hepatosellüler karsinomda (HCC) hipoksi kaynaklı epitel-mezenkimal geçişi (EMT) artırabileceği gözlemlenmiştir (He vd., 2015).

Özellikle nöral kök hücreler ve hematopoietik kök hücrelerde hem proliferasyonun hem de farklılaşmanın kontrolünde etkilidir. *WNT3A*'nın fizyolojik süreçlerdeki rollerine dair çalışmalar; ekstremité-kas-iskelet gelişimi, organogenez, sağlıklı hücre invazyonu ve proliferasyonu gibi olaylarda etkili olduğunu göstermektedir.

Patolojik süreçte *WNT3A*'nın etkileri, bulunduğu bağlama ve hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin, B hücresi kaynaklı akut lenfoblastik lösemi (B-ALL) hücrelerinde *WNT3A*, hücre ölümünü tetiklerken MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde ise proliferasyonu desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, hepatosellüler karsinom (HCC) modelinde yapılan çalışmalar, *WNT3A*'nın hipoksi kaynaklı EMT'yi artırabileceğini ortaya koymuştur (Thiago vd., 2010; S. H. Wang vd., 2014; Qi Zhang vd., 2013).

2.3.7.2. *WNT4*

WNT4 (WNT Gen Aile Üyesi 4) geni, insan genomunda 1p36.12 kromozomal lokasyonda yer almakta olup, yedi ekzondan oluşmaktadır. *WNT4*, WNT protein ailesinin en çok çalışılan üyelerinden biri olarak kabul edilir. Bu genin kodladığı glikoprotein, hem kanonik (β -katenin-bağımlı) hem de kanonik olmayan (β -katenin-bağımsız) Wnt sinyal yolları üzerinden etkili olmakta; başta organogenez ve hücre farklılaşması olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde kritik roller üstlenmektedir (Pitzer vd., y.y.; Sottnik vd., 2024).

Embriyonik dönemde *WNT4*'ün işlev kaybı, çoklu organ disgenezisi veya agenezisi ile sonuçlanmakta ve bu durum çoğu zaman fetal ölümle neticelenmektedir. Bu durum *WNT4*'ün gelişimsel süreçlerdeki önemli rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır (Sottnik vd., 2024).

Kanser biyolojisinde ise *WNT4*'ün artmış ekspresyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu destekleyerek kanser gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, *WNT4* işlev bozukluklarının; prekanseröz uterus lezyonları, over kanseri ve özellikle meme kanserini ile ilişkilendirilmiştir. *WNT4* varlığının meme kanseri kök hücrelerinin çoğalmasını destekleyebileceği bildirilmiştir. Öte yandan, kolorektal kanser üzerine yapılan araştırmalar, *WNT4*'ün Wnt4/ β -katenin yolu aracılığıyla EMT sürecini aktive edebildiğini ortaya koymuştur (Sottnik vd., 2024; D. Yang vd., 2020; Quanlong Zhang vd., 2021).

2.3.8. *TMED* Gen Ailesi

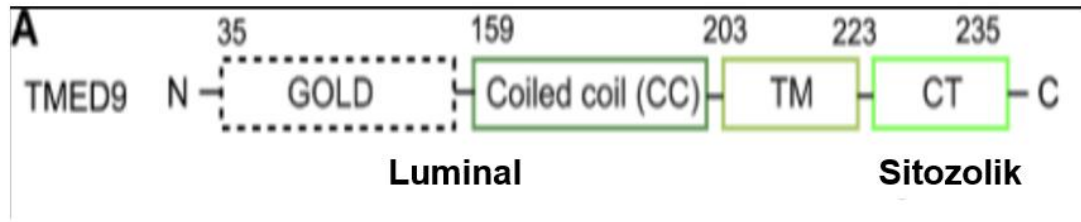
TMED (*Transmembran emp24 alanı içeren*) gen ailesi: α alt ailesi (*TMED4* ve *TMED9*), β alt ailesi (*TMED2*), γ alt ailesi (*TMED1*, *TMED3*, *TMED5*, *TMED6* ve

TMED7) ve δ alt ailesi (*TMED10*) olmak üzere dört alt aileden oluşur (Mi & Li, 2025). TMED ailesinin proteinleri lüminal golgi dinamikleri (GOLD) ve sarmal bobin (CC) alanları ve tek bir transmembran heliks (TM) alanı ile korunan bir alan mimarisini paylaşır (Şekil 5) (Xiao vd., 2024). Bu proteinler, insan vücudundaki protein taşınmasının temel düzenleyicileridir. Endoplazmik retikulum (ER)-Golgi kargo yoluyla proteinlerin hedeflenen yerlere iletilmesini sağlarlar (G. H. Han vd., 2022). Bu gen ailesinin üyeleri kötü huylu tümörler de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli roller oynamaktadırlar.

2.3.8.1. *TMED9*

TMED9 (Transmembrane emp24 domain içeren protein 9), insan genomunda 5. kromozomun uzun kolu (5q35.3) üzerinde yer alan ve 5 ekzon içeren bir gendir. TMED ailesinin bir üyesi olan *TMED9*, endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aygıtı arasındaki vezikül aracılı taşımada görev yaparak proteinlerin ve lipidlerin veziküllere taşınması, paketlenmesi ve belirli hücresel bölgelere iletilmesini düzenler (H. Wang vd., 2024).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *TMED9*'un çeşitli kanser türlerinin gelişiminde önemli işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Over kanseri ile ilişkili çalışmalarda, *TMED9*'un aşırı ekspresyonunun kötü genel sağkalım oranlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda ise yüksek *TMED9* düzeylerinin, tümör hücrelerinin proliferasyon ve göç yeteneğini artırdığı gösterilmiştir (G. H. Han vd., 2022; Ju vd., 2021). Ayrıca, hepatoselüler karsinom dokularında *TMED9*'un yüksek ekspresyon düzeylerinin, tümöral damar invazyonu ve olumsuz prognoz ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır (Y. C. Yang vd., 2021). Bu durum, *TMED9*'un tümör ilerlemesi ve metastaz potansiyeli üzerindeki olası etkilerini desteklemektedir. Ek olarak, yapılan mekanistik çalışmalar, *TMED9*'un CNIH4/TGF α /GLI sinyal yolu üzerinden kolorektal kanser metastazını teşvik edebileceğini göstermiştir (Mishra vd., 2019).



Şekil 5: *TMED9*'un domain organizasyonu (Xiao vd., 2024)

2.3.8.2. *TMED5*

TMED5 (Transmembran Emp24 Domain İçeren Protein 5) insan genomunda 1. Kromozomun kısa kolunda (1p22.1) yer alan ve 6 ekzondan oluşan bir gendir. Bu gen p24 protein ailesinin bir üyesi olan 229 aminoasitten oluşan *TMED5* proteinini kodlar. *TMED5*, p24 ailesinin diğer üyeleri gibi vezikül formasyonu ve yük seçimi gibi süreçlere destek sağlar (Pastor-Cantizano vd., 2016). p24 ailesinin diğer üyeleri gibi ER'den golgiye protein taşıyan veziküllerin oluşumuna ve hedeflerine ulaşmasına yardımcı olur.

TMED5 kanser biyolojisinde önemli bir düzenleyicidir. HEK293T hücrelerinde yapılan çalışmada *TMED5* geninin Wnt sinyal yolunu düzenlediğini göstermiştir (1). Hepatoselüler karsinomada *TMED5*'in ekspresyonun düşüşü hücre çoğalması göçü ve invazyonunu baskıladığı ve apoptozu artırdığı gözlemlenmiştir (X. Cheng vd., 2023).

2.4. CRISPR

CRISPR (Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Palindromik Tekrarlar), genetik hataları düzeltmeyi ve hücrelerdeki ya da organizmalardaki genleri hızlı, ucuz ve nispeten kolay bir şekilde açıp kapatmayı mümkün kılan bir gen düzenleme teknolojisidir (Redman vd., 2016). İlk olarak 1987 yılında Ishino ve arkadaşları tarafından *Escherichia coli* (*E. Coli*) bakterisinde keşfedilen bu dizilerin, daha sonra birçok bakteri türünde de bulunduğu ortaya konmuştur (Ishino vd., 1987). CRISPR, doğada bakterilerin ve arkelerin virüslere karşı geliştirdiği adaptif (kazanılmış) bir bağışıklık sistemi olarak görev yapar. Bu sistem sayesinde bakteriler, kendilerine daha

önce saldıran virüslerin DNA dizilerini tanıyarak bunları "ara parçalar" şeklinde hafızaya alır. Bu diziler, CRISPR DNA tekrarları olarak iç içe geçmiş biçimde genomda yer alır. CRISPR dizisinin hemen önünde ise PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) adı verilen bir lider dizi bulunur. Cas proteinleri ile birlikte bu CRISPR dizileri, CRISPR-Cas sistemini oluşturarak adaptif bağışıklığın işleyişinde rol oynar (Amitai & Sorek, 2016; F.A. vd., 2016).

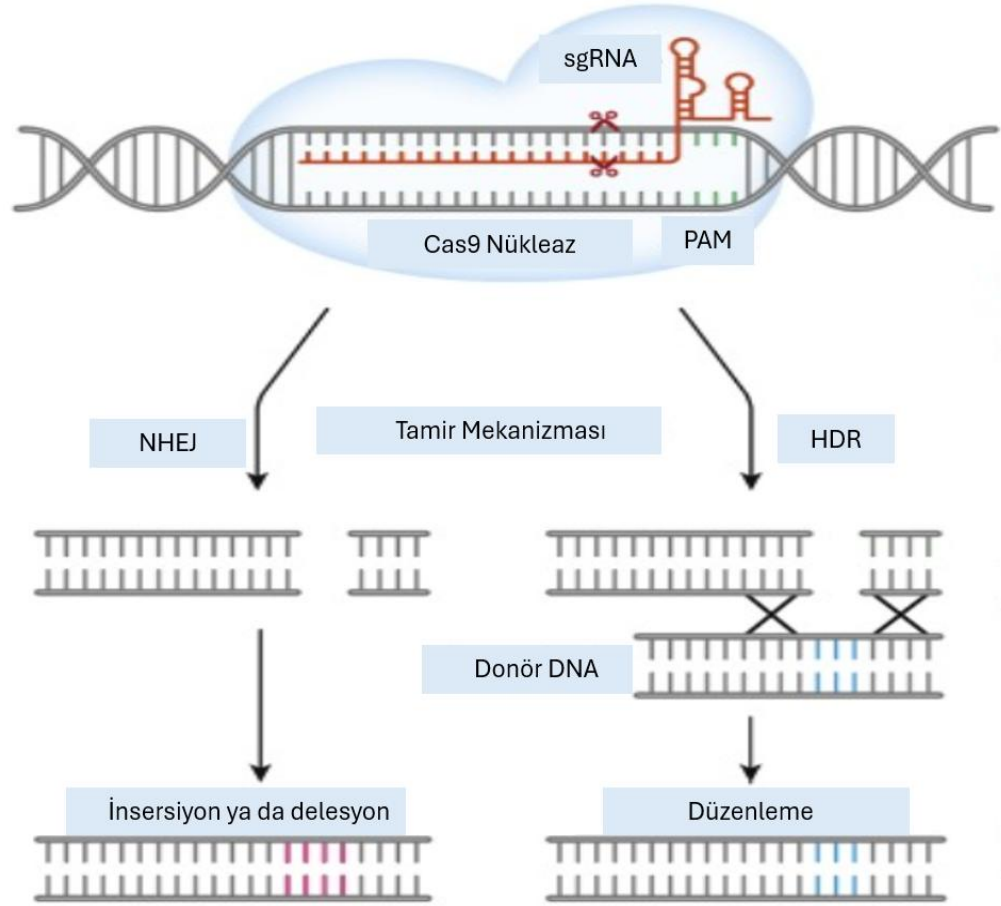
CRISPR-Cas sisteminin etki mekanizması; adaptasyon, ifade (ekspresyon) ve müdahale (interferans) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir:

- Adaptasyon aşamasında, Cas proteinleri hedef DNA'daki spesifik PAM dizilerini tanıyarak bu DNA'yı uygun uzunlukta ara parçalara ayırır ve bu parçaları CRISPR dizisine entegre ederek immünolojik hafıza oluşturur.
- İfade ve olgunlaşma aşamasında, CRISPR dizisi bir öncül RNA transkriptine dönüştürülür. Bu transkript daha sonra, her biri bir tekrar dizisi ile çevrelenmiş tek bir ara dizi içeren küçük RNA birimlerine, yani CRISPR RNA'larına (crRNA) işlenir. crRNA'lar, bir veya daha fazla Cas proteiniyle birleşerek aktif Cas-crRNA kompleksini oluşturur.
- Müdahale aşamasında, bu kompleks hücre içinde yabancı nükleik asitleri tarar. crRNA'nın yönlendirmesiyle PAM bölgesi tanınır ve hedef DNA parçaları (Amitai & Sorek, 2016; Zhu, 2022).

crRNA'nın özgül hedef dizileri tanıyabilme özelliği, Cas nükleazın DNA'yı kesme kapasitesi ve hücrenin DNA onarım mekanizmaları sayesinde CRISPR-Cas sistemi gen düzenleme için kullanılabilir hale gelmiştir. Çift sarmallı DNA kırıkları (DSB) oluştuğunda hücreler, bu hasarı onarmak için homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) ve homolog yönlendirmeli onarım (HDR) olmak üzere iki ana mekanizma kullanır. Eğer homolog bir DNA dizisi mevcutsa, hücre genellikle HDR yolunu seçer ve kırılan DNA'yı homolog rekombinasyonla onarır. Bu süreçte, homolog parçalar DNA'ya entegre edilir. Homolog dizinin bulunmadığı durumlarda ise hücre, genellikle NHEJ mekanizmasını devreye sokarak kırık uçları doğrudan birleştirir (Zhan vd., 2019a).

Bu iki onarım mekanizması, DNA dizileri üzerinde değişiklik yapılmasını mümkün kılar. Hücreye, homolog kollar içeren yapay bir onarım şablonu (donör DNA)

ve gen düzenleme vektörleri verildiğinde, HDR mekanizması kullanılarak hedef gen bölgesine yeni bir genetik bilgi entegre edilebilir (*knock-in*). Alternatif olarak, homolog dizinin yokluğu durumunda NHEJ yoluyla baz çifti ekleme veya silme gibi hatalar oluşturularak genin işlevi devre dışı bırakılabilir (*knock-out*) (Şekil 6) (Zhu, 2022).

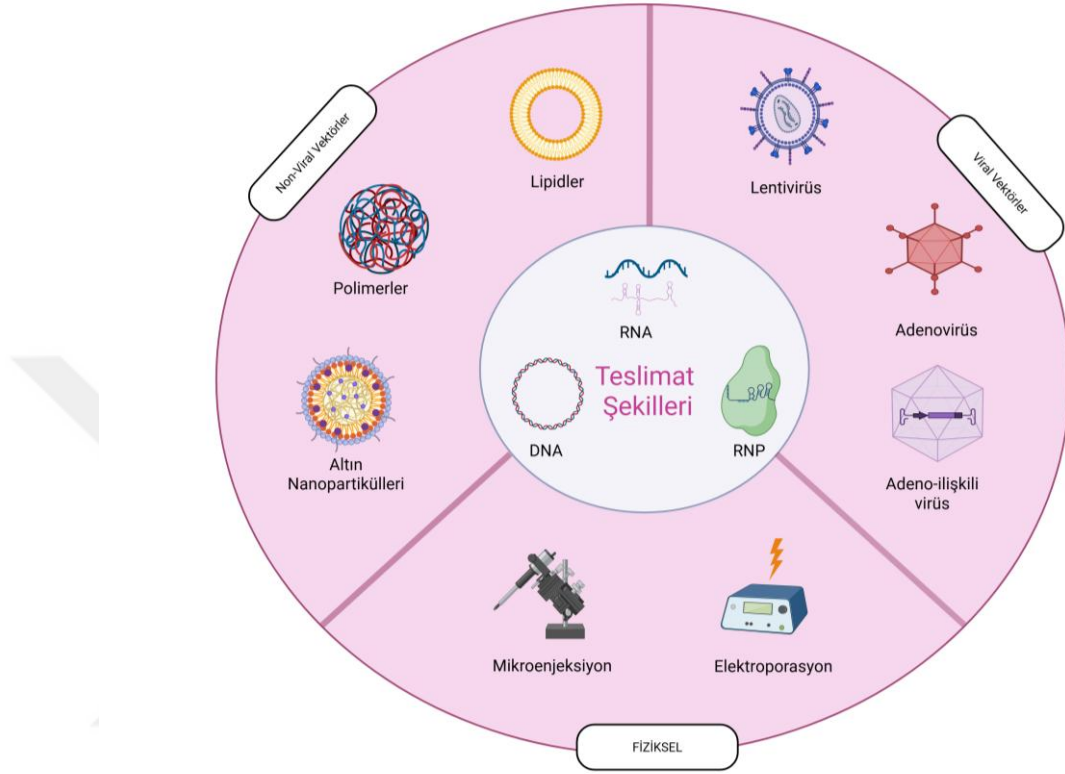


Şekil 6: CRISPR-Cas9 ile Genom Düzenleme ve DNA Tamir Mekanizmaları (NHEJ ve HDR) Şeması (Zhan vd., 2019b)

2.4.1. CRISPR/Cas9 Hücreye Taşınması

CRISPR genetik düzenlemeler için önem taşıyan bir sistemdir. Hücre içerisinde planlanan genetik değişikliklerin başarıyla gerçekleştirilebilmesi ve istenmeyen genetik modifikasyonlardan kaçınabilmesi için CRISPR sistemlerinin hücre içerisine doğru, etkili ve stabil bir şekilde taşınması gerekmektedir. Cas enzimi ve rehber RNA'lar (gRNA) hücre içerisine DNA, RNA/mRNA veya ribonükleoprotein (RNP) formunda

gönderilebilmektedir. Hücre içerisine taşıma yöntemleri fiziksel, viral ve viral olmayan olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 7) (Horodecka & Düchler, 2021).



Şekil 7: CRISPR sistemlerinin hücreye taşıma yöntemleri

A) Fiziksel yöntemler:

CRISPR/Cas sisteminin hücre içerisine taşınmasında kullanılan fiziksel yöntemler mikroenjeksiyon ve elektroporasyon yöntemleridir. Mikroenjeksiyon, Cas9 proteini ve gRNA'ların doğrudan hücre içerisine, mikroskop altında mikroığnelerle enjekte edilmesini içeren bir yöntemdir. Bu teknik, yüksek verimlilik, hassas dozaj kontrolü ve hedef bölgeye spesifik taşıma gibi avantajlara sahiptir. Ancak, her bir hücrenin manuel olarak enjekte edilmesi gerektiğinden, ölçeklenebilirliği sınırlıdır ve uygulama açısından zaman alıcıdır. Elektroporasyon ise çok kullanılan fiziksel dağıtım yöntemidir. Elektrik akım darbeleri ile hücre zarlarındaki gözeneklerin geçici olarak açılması sağlanarak kargoların hücrelere taşınmasına olanak verir. Elektroporasyon, kargoları çok çeşitli hücre tiplerine etkili bir şekilde taşıdığı için in vitro ve ex vivo gen

düzenlemede yaygın olarak kullanılır. Fakat her hücre tipi için spesifik optimizasyonların gerekmesi ve güçlü elektrik akımının yüksek oranda hücre ölümüne sebebiyet vermesi bu yöntemin dezavantajlarıdır (H. Cheng vd., 2021).

B) Viral yöntemler

Laboratuvar ortamında, hücre kültüründe Cas9 ekspresyonunu elde etmek için virüsler yaygın olarak kullanılmaktadır. Virüsler, istila ettikleri hücrelerde üretilmeyen proteinlerin ekspresyonunu başlatabilme yeteneklerine sahiptirler. Viral parçacıklar, replikasyondan sorumlu *rep* genlerini çıkarılarak ve bu bölgelere terapötik transgenle değiştirilerek gen düzenleme çalışmalarında kullanıma uygun hale getirilmiştir. Bu sayede, virüs konakçı hücreye girerek transgenin ekspresyonunu başlatabilmektedir ancak kendini çoğaltması veya yeni hücrelere yayılması engellenmiş olmaktadır.

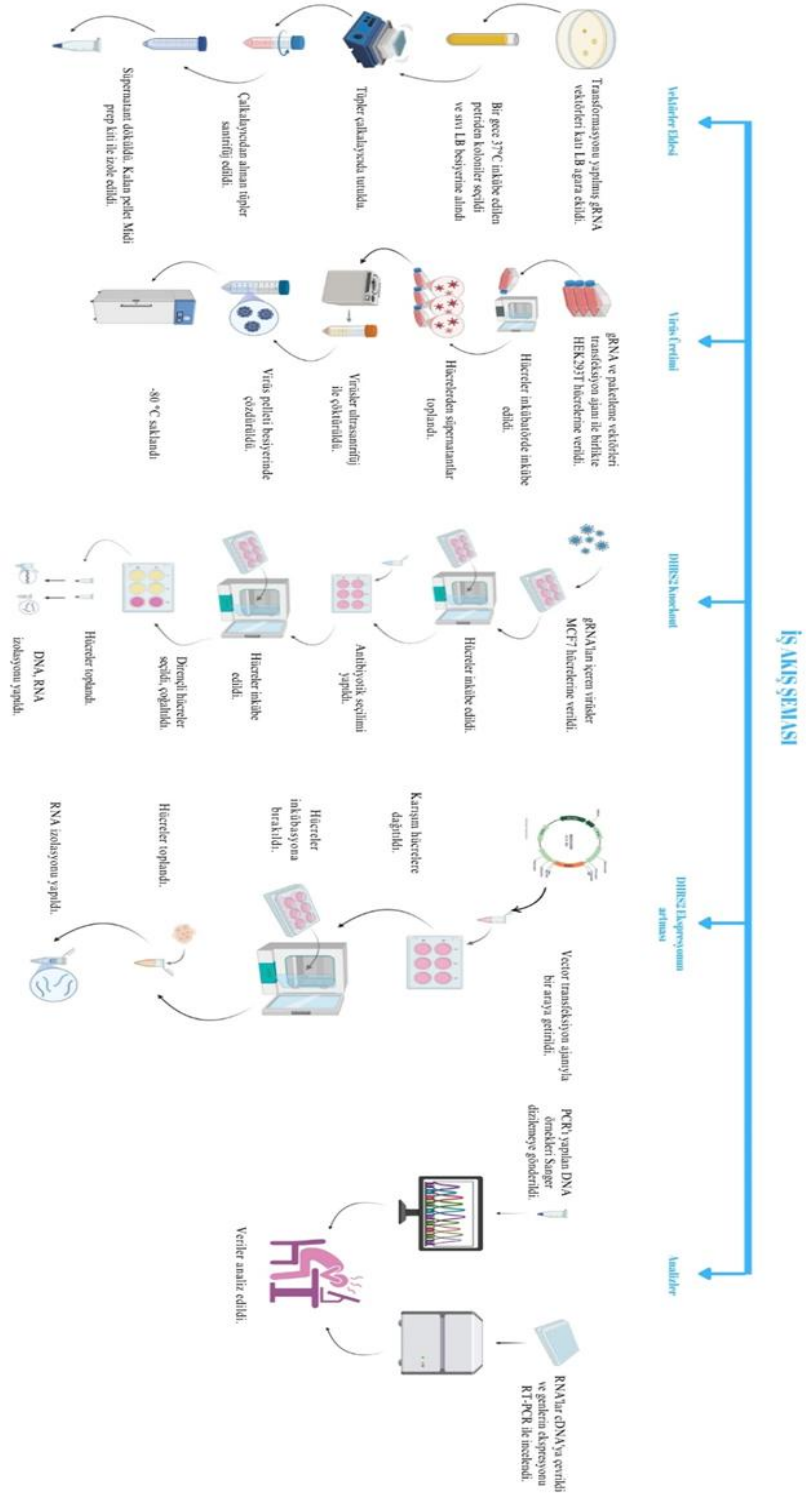
Adenovirüsler, Lentivirüsler ve Adeno-ilişkili virüsler (AAV) CRISPR çalışmaları için kullanılmaktadır. Her virüs tipinin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Cas9 iletimi için kullanılan en yaygın viral vektör, AAV vektörüdür. AAV'ler, adenovirüsler ve lentivirüslere kıyasla daha düşük bağışıklık tepkileri oluşturmaktadır. Ancak AAV'nin maksimum yük taşıma kapasitesi yaklaşık 4,7 kb'dir. Bu sebeple hem *Cas9* (4.3 kb) gibi büyük bir geni hem de gRNA'nın aynı vektörde taşınmasını zorlaştırmaktadır. Buna karşın, lentivirüsler ve adenovirüsler, daha yüksek taşıma kapasitelerine sahip olup her iki bileşenin aynı anda iletimine olanak tanır. Lentivirüs (LV), tek zincirli RNA küresel bir virüstür ve LV vektörleri, nispeten hafif immünogenite, kararlı ifade, yüksek paket kapasitesi (8 kb) ve bölünmeyen hücrelerde bile mükemmel enfeksiyon verimliliği dahil olmak üzere birçok belirgin özelliğe sahiptir. Lentiviral vektörler, özellikle bölünmeyen hücrelerde yüksek enfektivite göstermeleri, kararlı gen ekspresyonu sağlamaları ve 8 kb'ye kadar genetik yük taşıyabilmeleri gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, genoma entegre olma eğilimleri ve bu nedenle potansiyel mutagenез riski taşımaları önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca, CRISPR bileşenlerinin uzun süreli ekspresyonu hedef dışı etkilerin artmasına neden olabilmektedir. Adenovirüsler ise genoma entegre olmadan geçici ekspresyon sağlar ve hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilirler. Yüksek taşıma kapasiteleri sayesinde birden fazla sgRNA ile birlikte

Cas9'un eş zamanlı iletimine olanak tanır, bu da çoklu hedeflere yönelik gen düzenleme çalışmalarında avantaj sağlar (H. Cheng vd., 2021).

C) Viral Olmayan Yöntemler

CRISPR/Cas sistemini hücreye taşınması sağlarken virüslerin toksik özelliklerinden kaçınmak için hücreye kargolanması için lipid bazlı nanopartiküller, polimerik vektörler ve altın nanopartiküller gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Lipozomlar, sulu çözelti ortamında oluşan lipid çift katmanlarından oluşan küresel yapılardır. Hem nükleik asitler hem de hücre zarları negatif yüklü olduğundan, aralarındaki itme nükleik asitlerin hücrelere girmesini engeller. Negatif yüklü nükleik asitlerin pozitif yüklü lipozomlara kapsüllenmesi, komplekslerin hücre zarlarından hücrelere füzyonunu kolaylaştırır. Bu sayede CRISPR/Cas9 sisteminin hedeflenen hücreye, DNA (plazmid), mRNA (Cas9 ve sgRNA) veya protein (RNP) formatında iletebilmesine olanak verir. Polietilenimin ve poli-L-lizin gibi lipid olmayan polimerik reaktifler de CRISPR/Cas9 kargolarının taşınması için nanopartiküller üretmek amacıyla yaygın olarak kullanılır. Polimerik reaktifler CRISPR/Cas9 kargolarının hücrelere endositozu sağlamak için pozitif yüklü komplekslere kapsüllenmesini sağlar. Bu yöntemlerde virüsler gibi toksik etkiye sahip olmazken, elektroporasyon kadar stres oluşturmaz. Fakat endosomal yola dayanan bu stratejinin verimliliği, viral transdüksiyon ve elektroporasyonla karşılaştırıldığında daha düşüktür. Altın nanopartiküller ise özellikle CRISPR RNP kompleksi iletimi için kullanılır. Bu yöntemin virüsler, lipidler veya polimerik vektörlerin aksine, altın nanopartiküller boyut ve dağılım açısından kontrol edilmesi daha kolaydır. İstenilen bölgeye yüksek verimlilikte ulaştığı ve hedef dışı etkilerinin minimum düzeyde olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (F. Chen vd., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil 8: İş akış şeması

3.1. GEREÇ

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 2: Kullanılan Cihazlar

-
- -80°C Buzdolabı (Thermo Scientific)
 - -20°C Buzdolabı (Beko)
 - + 4°C Buzdolabı (Beko)
 - Su Banyosu
 - Laminar Kabin (Nuanre)
 - RT-PZR cihazı (Roche/ Light Cycler 480)
 - Vorteks (Stuart)
 - Pipet seti (Gilson)
 - CO2 Inkübatör-Nüve (Thermo Electron Corporation)”
 - PCR Cihazı (Thermo Fisher/SimpliAmp)
 - Etüv
 - Santrifüj Cihazı (Beckhman)
 - Ultra santrifüj cihazı
 - Hücre Sayma Cihazı
 - Sprektrofotometre (Nanodrop 2000/ Thermo Scientific)
 - Sıvı Azot Tankı (StateBourne)
 - Mikroskop (Olympus)
 - İnkübatör (Thermo Electron Corporaiton)
 - Hücre sayma cihazı
 - Otoklav (ALP CL-40M)
-

3.2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 3: Kullanılan kimyasallar ve kitler

-
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, 4368814)
 - PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher, 12183020)
 - Sensifast™ sybr® No-rox kit (Meridian Bioscience, BIO-98050)
 - Takara X fect Reaksiyon Kiti
 - ABM Lentivirüs Titrasyon Kiti
 - PureLink Genomic DNA mini Kit
 - HiPure Plasmid Midiprep Kit
 - Qiagen QIAprep® Miniprep kiti
 - Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent
 - DMEM
 - FBS (Fetal sığır serumu)
 - Penisilin/Streptomisin
 - Tripsin
 - PBS
 - LB Agar
 - LB Broth
 - Amfisilin
 - Kloramfenikol
 - S.O.C Medyum
 - Puromisin
-

-
- Polybren
 - Dimetil Sülfoksit (DMSO)(Cryo-Sure) cell culture grade (BIOMATİK)
-

3.2.2. Besiyeri ve Hücre Soyları

Tez sürecinde, laboratuvarımızın azot tankında bulunan MCF7 ve HEK293T hücre hatları kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: Tez sürecinde kullanılan hücre soyları

KULLANILAN HÜCRE SOYLARI	
MCF7	MCF7 hücreleri meme bezlerinden elde edilen, östrojen reseptörü pozitif, adelant bir hücre soyudur (Ram vd., 1998).
HEK293	HEK 293 (Human Embriyonik Kidney) hücre hattı insan embriyosunun böbreğinden elde edilen epitelyal hücre hattıdır.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. Hücre Soylarının Kültür Ortamında Çoğaltılması

Tez çalışmasında deneyler sırasında kullanılacak olan HEK 293, MCF7 hücre hattı laboratuvarımızda bulunan azot tankından çıkarılarak kullanılmıştır. HEK 293 ve MCF7 hücre soyları %10 FBS, %1 Penisilin Streptomisin içeren DMEM besiyeri içerisinde büyütüldü.

Azot tankından alınan hücreler 37°C'lik su banyosunda tutularak hızlıca eritildi. Ardından üzerlerine 5 ml besiyeri eklenerek 1500 rpm'da 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 6 ml besiyeri içerisinde 3×10^6 hücre olacak şekilde T25 hücre kültür kaplarına ekilerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörlerde inkübe edildi. Hücreler 2-3 günde bir pasajlandı.

Pasajlama işlemi gerçekleştirilirken öncelikle besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından flask yüzeyi PBS ile yıkandı ve tripsinle muamele edilerek hücreler kaldırıldı. FBS'li

besiyeri kullanılarak tripsin inaktive edildi. Hücre süspansiyonu falkon tüplere aktararak 5 dakika (dk) 1500 rpm'da santrifüj edildi. Hücre pelletinden uygun miktarda hücre alınarak yeni hücre kaplarına ekildi. Her üç hücre hattı da adalant hücre olduğu için tüm hücreler için aynı pasajlama işlemi uygulandı.

3.3.2. gRNA Vektörlerinin Sulandırılması

CRISPR işlemleri için kullanılacak olan *DHRS2* gRNA'ları *SYNBIO Technologies* firmasından ticari olarak satın alındı. *DHRS2* geni için 3 farklı gRNA (*DHRS2* gRNA1, *DHRS2* gRNA2, *DHRS2* gRNA3) satın alındı. Liyofilize haldeki gRNA'lar 13000 rpm'da 30 saniye (sn) boyunca santrifüj edildi. Bu gRNA'lar 100 ul ampul su içerisinde çözündürüldü. Vorteksleme işlemi yapılarak homojen hale getirildi. Süspanse hale gelen gRNA'lar -20 °C' de saklandı.

3.3.3. gRNA Vektörlerinin Çoğaltılması

Vektörler, ısı-şoku yöntemi kullanılarak DH5α kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.

- -80°C'den alınan DH5α kompetan hücreleri ve -20 °C'den alınan gRNA'lar buz üzerinde çözündürüldü.
- 2 ul vektör ve 100 ul kompetan hücre 0,2'lik ependorf tüplerde karıştırıldı ve 30 dk buzda bekletildi.
- 42°C'de 50 sn tutuldu ve 2 dk buzda bekletildi.
- Bu karışım 900 µl S.O.C medyum içerisine alındı ve 1 saat boyunca 37°C, 220 rpm'lık çalkalayıcıda tutuldu.
- %0,1'lik amfisilin içeren LB agar platlerine ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'da inkübe edildi.
- Ertesi gün koloni seçimleri yapıldı.
- Seçilen koloniler % 0,1 amfisilin içeren LB Broth besiyerine alındı ve 8 saat boyunca 37°C, 220 rpm'lık çalkalayıcıda tutuldu.
- 8 saatin sonunda bakteri kolonileri 100 ml'lik LB Broth besiyerine alındı ve gece boyunca 37°C, 220 rpm'lık çalkalayıcıda tutuldu.
- Ertesi gün 4500 rpm'da 15 dakika santrifüj edilerek hücre pelleti elde edildi.

3.3.4. Paketleme Vektörlerinin Çoğaltılması

-80'de gliserol stok halinde bulunan paketleme vektörü olan psPAX2 ve zarf protein vektörü olan PMD2.G çözdürüldü ve %0,01 amfisilin içeren 6 ml LB Broth içerisine eklendi ve 220 rpm 37°C'da 8 saat inkübe edildi. 8 saatin ardından bakteri kolonileri 100 ml'lik LB Broth besiyerine alındı ve gece boyunca 37°C, 220 rpm'lık çalkalayıcıda tutuldu. Ertesi gün 4500 rpm'da 15 dakika santrifüj edilerek hücre pelleti elde edildi.

3.3.5. MidiPrep Yöntemi İle Plazmit İzolasyonu

- *DHRS2* gRNA1, gRNA2, gRNA3, PMD2.G ve psPAX2 vektörlerinin izolasyonu *Invitrogen Purelink HiPure Plasmid Midiprep Kit*'i kullanılarak yapıldı.
- Santrifüj işlemlerine başlanmadan önce kit içerisinden 5 kolon çıkartıldı ve kolanların her birine 10 ml EQ1 solüsyonu eklenerek solüsyonun yer çekimi ile akması beklendi.
- LB Broth besiyerinde çoğaltılan bakteriler 4500 rpm'da 15'er dk'lık art arda santrifüjler yapılarak 50 ml falkon tüp içerisinde çöktürüldü.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelletine 4ml RNaz içeren R3 solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.
- Falkona 4 ml L7 solüsyonu eklendi.
- 5 defa falkon alt üst edildi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Falkona 4 ml N3 solüsyonu eklendi. Falkon alt üst edilerek karışımın homojen hale gelmesi sağlandı ve ardından 12000 G'de 10 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant EQ1 solüsyonundan geçirilmiş kolonlara yüklendi ve sıvının yerçekimi ile akması beklendi.
- Kolonlar 2 kez 10 ml'lik W8 yıkama tamponu ile yıkandı ve sıvının akmasına izin verildi.
- Yıkama işleminden sonra kolonların altına 15 ml'lik falkon tüpleri yerleştirildi.
- Kolona 5 ml E4 solüsyonu eklendi ve solüsyonun akması beklendi.
- Falkon tüpün üzerine 3,5 ml izopropanol eklenip pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Tüp 4°C'da, 30 dk, 12000 G'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- Pelletlerin üzerine %70 etanol eklendi ve tüp 12000 G, 4°C'da 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.

- Hücre pelleti yaklaşık 10 d boyunca oda sıcaklığında kurutuldu. Safılaştırılmış DNA 200ul TE ile çözdürüldü.
- Plazmid süspansiyonu -20'de saklandı.

3.3.6. Transfeksiyon İşlemi

Takara X Fect Reaksiyon Kit'i kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

Transfeksiyon işlemi için:

- 3 adet T25 hücre kültür kabına her birinde 1.000.000 hücre olacak şekilde 5 ml besiyeri içerisine HEK 293 hücreleri ekildi.
- Bir gece hücrelerin hücre kültür kabına yapışması beklendi.
- Ertesi gün besiyeri değiştirildi.
- GRNA1, GRNA2 ve GRNA3 vektörleri tablo 5'de gösterilen miktarlarda 0,5 ul'lik ependorf tüpe aktarıldı üzerleri transfeksiyon bufferi ile 300 ul'ye tamamlandı.
- Ardından ependorfa 6 ul transfeksiyon ajanı eklendi.
- Karışım 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Karışım hücrelere verilerek 4 saat beklendi.
- 4 saatin sonunda transfeksiyon ajanı içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyuların üzerine taze besiyeri eklendi.
- 40. Saatte besiyerleri toplandı.
- Toplanan besiyerleri öncelikle 500g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant 0,45 um'lik filtreden geçirildi.
- Filtreden geçirilen sıvının üzeri 35 ml'e ye kadar soğuk PBS ile tamamlanarak 27000g'de 1 saat 45 dk, 4°C'da santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant döküldü ve pellet 500 ul serumsuz DMEM besiyeri ile süspanse hale getirilerek -80'de saklandı.

Tablo 5 :Transfeksiyon için kullanılacak vektör miktarları**GRNA 1**

GRNA1	8,5 ug	8500 ng	951 ng/ml	8.9 ul
psPAX2	7,2 ug	7200 ng	666 ng/ ml	10,8 ul
PMD2.G	4,3 ug	4300 ng	671 ng/ ml	6,4 ul
	20 UG			26,1

GRNA 2

GRNA2	8,5 ug	8500 ng	1673 ng/ml	5.1 ul
psPAX2	7,2 ug	7200ng	666 ng/ ml	10,8 ul
PMD2.G	4,3 ug	4300 ng	671 ng/ ml	6,4 ul
	20 UG			22,3

GRNA3

GRNA3	8,5 ug	8500 ng	1198 ng/ ml	7,1
psPAX2	7,2 ug	7200 ng	666 ng/ ml	10,8
PMD2.G	4,3 ug	4300 ng	671 ng/ ml	6,4
	20 UG			24,3

3.3.7. Virüs Titrasyonu

Virüs titrasyonu için *ABM Lentivirüs Titrasyon Kiti* (Cat. No. LV900) kullanıldı. Kitin protokolü takip edilerek titrasyon gerçekleştirildi. 2 ul virüs süspansiyonu üzerine 18 ul virüs lizis bufferı eklendi ve spin atıldı. Ardından virüslerin parçalanması için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Kit içerisinde bulunan Standart DNA kullanılarak 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranında DNA dilüsyonları hazırlandı. Tablo 6'ya göre karışım hazırlandı. Karışımlar beyaz PCR platelerine dağıtıldıktan sonra örnekler 2'şer kopya halinde eklendi. Plate santrifüj cihazında 30 sn'ye santrifüj edildikten sonra qPCR cihazına konuldu ve Tablo 7'da verilen değerlere göre PCR işlemi başlatıldı.

3.3.7.1. Titrasyonu PCR Bileşenleri

Tablo 6: Virüs titrasyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve hacimleri

Bileşen	Hacim
2X qPCR Master Mix	10 µl
Primer Mix	2 µL
DNA	2 µL
Nükleaz free H2O	6µL

3.3.7.2. RT PCR Dereceleri

Tablo 7: Virüs titrasyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve hacimleri

	Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>Reverse transkripsiyon</i>	42°C	20 dk	1
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denetürasyon	95°C	15 sn	34
<i>Annealing/ Uzama</i>	62°C	1 dk	

Virüs miktarı, RT-PCR sonuçlarından elde edilen verilerin kitte belirtilen formülasyona uygulanmasıyla hesaplandı.

3.3.8. Uygun Polybren Dozunun Ayarlanması

Kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde MCF7 hücreleri 48 kuyulu hücre kaplarına ekildi. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyulara 1,5 ug/ml, 1 ug/ml, 0,75 ug/ml ve 0,5 ug/ml Puromisin içeren besiyeri verildi. 3 gün boyunca hücreler takip edildi ve 0,5 ug/ml Puromisin Dozunun toksik olmadığı belirlendi. Bu doz ile deneylere devam edildi.

3.3.9. Uygun Puromisin Dozunun Ayarlanması

Kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde MCF7 hücreleri 48 kuyulu hücre kaplarına ekildi. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyulara 10 ug/ml, 8 ug/ml, 6 ug/ml, 4 ug/ml ve 2 ug/ml Puromisin içeren besiyeri verildi. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 gün boyunca hücrelerin canlılığı izlendi 8 ug/ml dozunun toksik olmadığı belirlendi. Bu doz ile deneylere devam edildi.

3.3.10. MCF7 Hücrelerinin Virüsle Enfeksiyonu ve Antibiyotik seçilimi

MCF7 hücreleri kuyu başına 300.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kaplarına ekildi. Ertesi gün MOI'si 5 olacak şekilde virüsler 8ug/ml polybren ile birlikte verildi. Ardından oda ısısında 1500 rpm'da 45 dk santrifüj edildi. Virüs verildikten 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Virüslü besiyeri uzaklaştırıldıktan 72 saat sonra

antibiyotik seçilimine başlandı. 0,5 ug/ml puromisin hücrelere 1 hafta süresince uygulanarak seçim yapıldı.

3.3.11. Primer Tasarımı

Kullanılan genlerine dizisine özgü primerler (Tablo 8), NCBI Primer-BLAST ve UCSC In-Silico PCR veritabanları kullanılarak tasarlandı. Sentezleyen firma tarafından liyofilize olarak gönderilen primerler, 100 pmol/μl konsantrasyonunda çözülerek ana stok çözeltileri hazırlandı. PCR ve qRT-PCR analizlerinde kullanılmak üzere, bu ana stoklardan 1:10 oranında seyreltme yapılarak kullanıldı.

Tablo 8: Primer dizileri

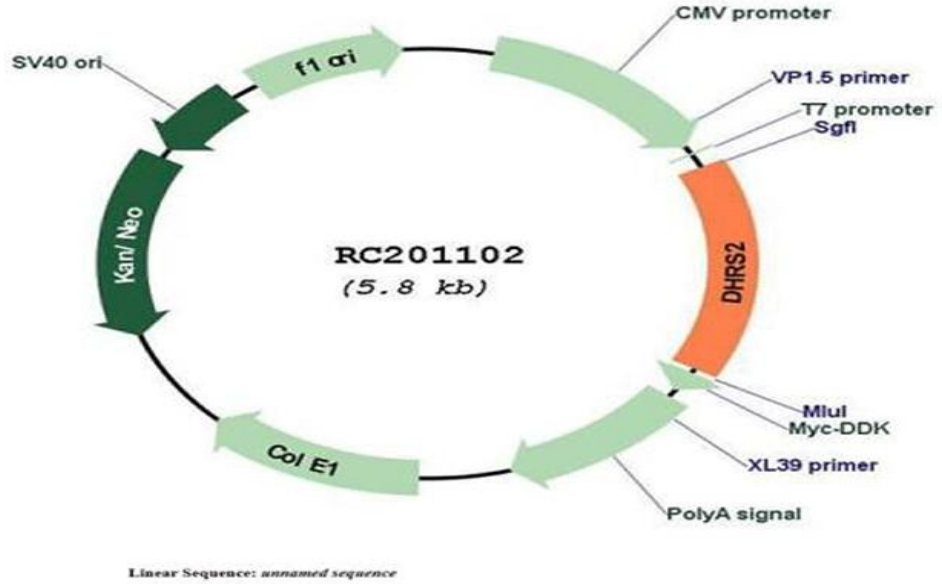
GEN	İleri Dizi	Geri Dizi
<i>DHRS2</i>	GCTGTCATCCTGGTCTCTTCC	TGGAACCACGCAGTTTACC
<i>DHRS2</i>	CATCCCTGTGCTAGGCTTTCT	GTTCTGCATGTTCCCCTCTCT
<i>WNT4</i>	GGAGACGTGCGAAACTCA	CATGACTTCCAGGTTCCGCT
<i>WNT3A</i>	TTGGGCCACAGTATTCCTCC	CTGGGCATGATCTCCACGTA
<i>SDC1</i>	TCACCTTGTCACAGCAGACC	CTGGAGACGTGGGAATAGCC
<i>SNAI1</i>	TTTACCTTCCAGCAGCCCTAC	GAGGAGAAGGACGAAGGAGC
<i>GMEB1</i>	GGGCTGATGGAAGAGGTTGT	CTTGGAAGGGAGCCTGGATG
<i>TWIST1</i>	TGAGCAAGATTCAGACCCTCA	CAGCTTGCCATCTTGGAGTC
<i>CDH1</i>	AATGACAACGCCCCCATAACC	TGGGAGGAAGGTCTGCATCA
<i>VIM</i>	AACGCCAGATGCGTGAAATG	ATTCACGAAGGTGACGAGCC
<i>TMED5</i>	AAACTGGAAGACATCCTGGAATC	CTTGAATGGCTGACACCACC
<i>TMED9</i>	CACATCGGAGAGACGGAGAA	CCAGGGGTATGGGAAGTGAA

3.3.12. DHRS2 Vektörünün MCF7 Hücrelerine Transfeksiyonu

DHRS2 geninin ifadesini artırmayı hedefleyen çalışma kapsamında, ekspresyon vektörü grubu (*DHRS2* OE-vektör) tasarlanmıştır (Şekil 9). Vektörün çoğaltılması için ticari olarak temin edilen kompetan *E. coli* DH5α ve ccdB suşları kullanılmıştır.

Vektörlerin bakterilere aktarımı için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir:

- -80 °C’de saklanan kompetan hücreler buz üzerinde çözündürülmüş ve üzerine 1 µg plasmid eklenmiştir. Karışım buzda 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücre-plasmid karışımı, 42 °C’de ısı bloğu veya termal döngü cihazında 90 saniye inkübe edilmiştir.
- Ardından, örnekler tekrar buza alınarak 5 dakika bekletilmiştir.
- Üzerine 500-900 µl SOC besiyeri eklenmiş ve 37 °C’de 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyon yapılmıştır.
- Inkübasyonun ardından örnekler santrifüj edilerek pellet elde edilmiş, 1µg/ml kloramfenikol içeren agar plaklarına yayılarak 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün koloniler kontrol edilip, her biri tek koloni olacak şekilde 1µg/ml kloramfenikol sıvı LB besiyerine aktarılmıştır.
- Bakteri kültürleri yeterli yoğunluğa ulaştığında Qiagen QIAprep® Miniprep kiti ile plasmid izolasyonları gerçekleştirilmiştir.
- Hücrelere transfeksiyon için Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000 kiti kullanılmıştır. Her hücre grubu için önerilen hücre sayısı değişmekle birlikte transfeksiyon protokolü genel olarak şu şekilde uygulanmıştır:
- 200.000 MCF7 hücresi 24 well hücre kaplarına ekilmiş ve bir gece inkübe edilmiştir.
- Plasmid DNA Opti-MEM™ ile seyreltilip uygun miktarda P3000 reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- Daha sonra Lipofectamine™ 3000 reaktifi de Opti-MEM™ içinde seyreltilerek plasmid karışımı ile birleştirilmiş ve aynı koşullarda hücrelere uygulanmıştır



Şekil 9: *DHRS2* ekspresyon vektörü

3.3.13. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için “*Thermo PureLink RNA Mini Kit*” kullanıldı.

- Lysis bufferın içerisine %0,1 oranında betamercaptoetanol eklenerek RLT (RNA Lizis Tamponu) hazırlandı.
- Hücre pelleti 500 ul soğuk RLT ile çözdürüldü.
- 500 ul %70 ethanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Hücre süspansiyonu filtrelili kolona aktarıldı.
- 12.000g’de 45 sn santriüj edildi.
- Kolonun alt kısmı uzaklaştırıldı.
- Kolona 700 ul yıkama bufferı eklendi.
- 12.000g’de 45 sn santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı.
- 500 ul yıkama bufferı II eklenerek tekrardan 12000g’de 45 sn santrifüj edildi. Bu aşama tekrar edildi.
- Filtrelili kolon 2 dk 12000g’de santrifüj edilerek kurutuldu. Çökelti uzaklaştırıldı.
- Kolona 30-100 ul RNase free su eklendi.

- Oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
- 12.000g'de 2 dk santrifüj edildi.
- RNA'lar 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra ölçümleri gerçekleştirildi ve -80°C'da saklandı.

3.3.14. cDNA Sentezi

Gen ekspresyon analizlerinde, RNA'ya kıyasla daha dayanıklı ve kararlı bir yapı olan komplementer DNA (cDNA) tercih edilmektedir. Bu nedenle, elde edilen RNA örnekleri öncelikle cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezi için *Thermo Fisher* tarafından üretilen "*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" kullanılmıştır. Sentez işlemine ilişkin olarak, cDNA sentez karışımı tablo 10'a göre hazırlanmış ve bu karışım sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 2 saat ve 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA, daha ileri analizler için -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 9: cDNA sentezi için kullanılan maddeler ve cDNA koşulları

Madde	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	1 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptas (50 U/µL)	1 µl
RNaz İnhibitör	1 µl
RNA	1-5 µl
dH2O	8-12 µl (koyulan RNA miktarına göre mix dH2O ile 20 µl'ye tamamlanır.
cDNA	
25°C'da 10 dk	

37°C’da 2 saat

85°C’da 5 dk

3.3.15. Gen Ekspresyon Analizi

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR), gen ekspresyonunun eş zamanlı olarak izlenmesini sağlar. qRT-PCR sırasında kullanılan SYBR Green boyası, çift sarmallı DNA'nın oluklarına bağlanarak floresans yayar. PCR amplifikasyonu sırasında, hedef genin kopya sayısı arttıkça, SYBR Green'in floresans sinyali de artar. Floresans sinyali, belirli bir eşik değerini aştığında (Ct: threshold cycle), hedef genin varlığı ilk kez tespit edilir. Ct değeri, hedef genin başlangıçtaki miktarı hakkında bilgi verir; düşük Ct değeri yüksek gen ekspresyonunu, yüksek Ct değeri ise düşük gen ekspresyonunu gösterir.

Gen ekspresyon analizi için “*SYBR™ Green Universal Master Mix*” kullanılmıştır. Tablo 11’de kullanılan malzemeler, tablo 12’de ise gerekli sıcaklıklar gösterilmiştir.

Tablo 10: RT-PCR için kullanılan maddeler

Madde	Miktar
2X SYBR® Green PCR Master Mix	5 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
cDNA	2 µl
dH2O	1 µl

Tablo 12: RT-PCR koşulları

Program Adı	Süre	Derece	Döngü Sayısı
Pre-inkübasyon	5 dk	95°C	1
Çoğaltma	10 sn	95 °C	45
	20 sn	61-64 °C (primer için uygun sıcaklık)	
	10 sn	72°C	
Erime Eğrisi	5 sn	95°C	1
	1 dk	65°C	
Soğutma	30 sn	40°C	1

3.3.16. DNA İzolasyonu

“*Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit*” kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon için kitin protokolü kullanıldı.

Hücrelerin parçalanma aşaması

- Hücre pelleri 200 ul PBS içerisinde çözdürülerek süspanse hale getirildi.
- Üzerine 20 ul Proteinaz K eklendi.
- 20 ul RNase A eklenilerek vorteks ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
- 200 ul PureLink Genomik Lizis/ Bağlama Bufferı eklendi. Karışımın homojen hale gelmesi için vortekslendi.
- 55°C’da 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından karışıma 200 ul %100 etanol eklendi ve vortekslendi.

Saflaştırılma Aşaması

- Karışım spin kolonuna eklendi ve 10.000xg'de 1 dk boyunca oda ısısında santrifüjlendi.
- Kolonun alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Kolonun üzerine 500 ul yıkama bufferı 1 eklendi.
- 10.000xg'de 1 dk boyunca oda ısısında santrifüjlendi.
- Kolonun alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Kolonun üzerine 500 ul yıkama bufferı 2 eklendi.
- Kolon maksimum hızda 3 dk boyunca oda ısısında santrifüj edildi.
- Kolonun altındaki tüp uzaklaştırılarak temiz 1,5 ml'lik tüp yerleştirildi.
- 50 ul elüsyon bufferı kolona eklendi. 1 dk inkübe edildi.
- Kolon 1 dk maksimum hızda oda ısısında santrifüj edilerek DNA elde edildi.

DNA'nın konsantrasyonunu ölçmek için nanodropta ölçüm yapıldı ve DNA -20°C'da saklandı.

3.3.17. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) DNA'nın belirli bölgesinin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilk olarak denatürasyon aşamasıyla DNA'nın çift ipliği birbirinden ayrılır ardından DNA'nın belirli bölgesine özgü tasarlanmış primerler DNA'ya bağlanır ardından DNA polimeraz yardımıyla primerlerden başlanılarak DNA zinciri sentezlenir. PCR için gerekli malzemeler tablo 14'de, PCR sıcaklık koşulları ise tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 11: PCR için kullanılan malzemeler

Madde	Miktar
Buffer	2,5
MgCl ₂	2
2,5 mm Dntp	2

İleri Primer	1
Geri Primer	1
Taq Polimeraz	0,2
DNA	1
H2O	15,3

PCR KOŞULLARI

Tablo 12: PCR koşulları

	DERECE	SÜRE	DÖNGÜ
Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Anneling (Primer bağlanması)	95 °C	30 sn	35
	62 °C	30 sn	
	72 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	5 dk	1

3.3.18. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürününü istenilen boyutta olup olmadığını kontrol etmek için PCR ürünü %2 oranında agoroz içeren jelde 75V gerilim ile yürütüldü. “*GeneDireX 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Ready-to-use)*” markerı kullanıldı.

3.3.19. Sanger Dizileme

DNA’nın hedeflenen bölgesinin baz dizilimini belirlemek amacıyla Sanger dizileme yöntemi kullanılmıştır. Bu işlem için PCR sonucu elde edilen ürün dizileme için kullanılmış ve Sanger dizileme için hizmet alımı yapılmıştır.

3.3.20. Veri İncelemesi

Sanger dizileme sonrası elde edilen dizi Chromas, Ensembl, Mutalyzr veri tabanları kullanılarak incelendi.



4. BULGULAR

4.1. Plazmit İzolasyonu

Paketleme ve gRNA vektörleri çoğaltılıp izole edildikten sonra, elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları nanodrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür (Şekil 10). Ölçüm sonuçları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Saflık değerlendirmesinde kullanılan 260/280 oranı, DNA’nın protein kontaminasyonundan ne ölçüde arındığını göstermektedir. Bu oranın 1.80 değerine yakın olması, DNA’nın proteinlerden yeterli düzeyde arındırıldığını ve yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, 260/230 oranı ise DNA örneklerinin tuz, fenol, EDTA veya karbonhidrat gibi kimyasal kontaminantlardan arındırılma derecesini yansıtmaktadır. Bu oranın ideal olarak 2.0–2.2 aralığında olması, DNA’nın kimyasal saflığının yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 13: Plazmit izolasyon sonuçları

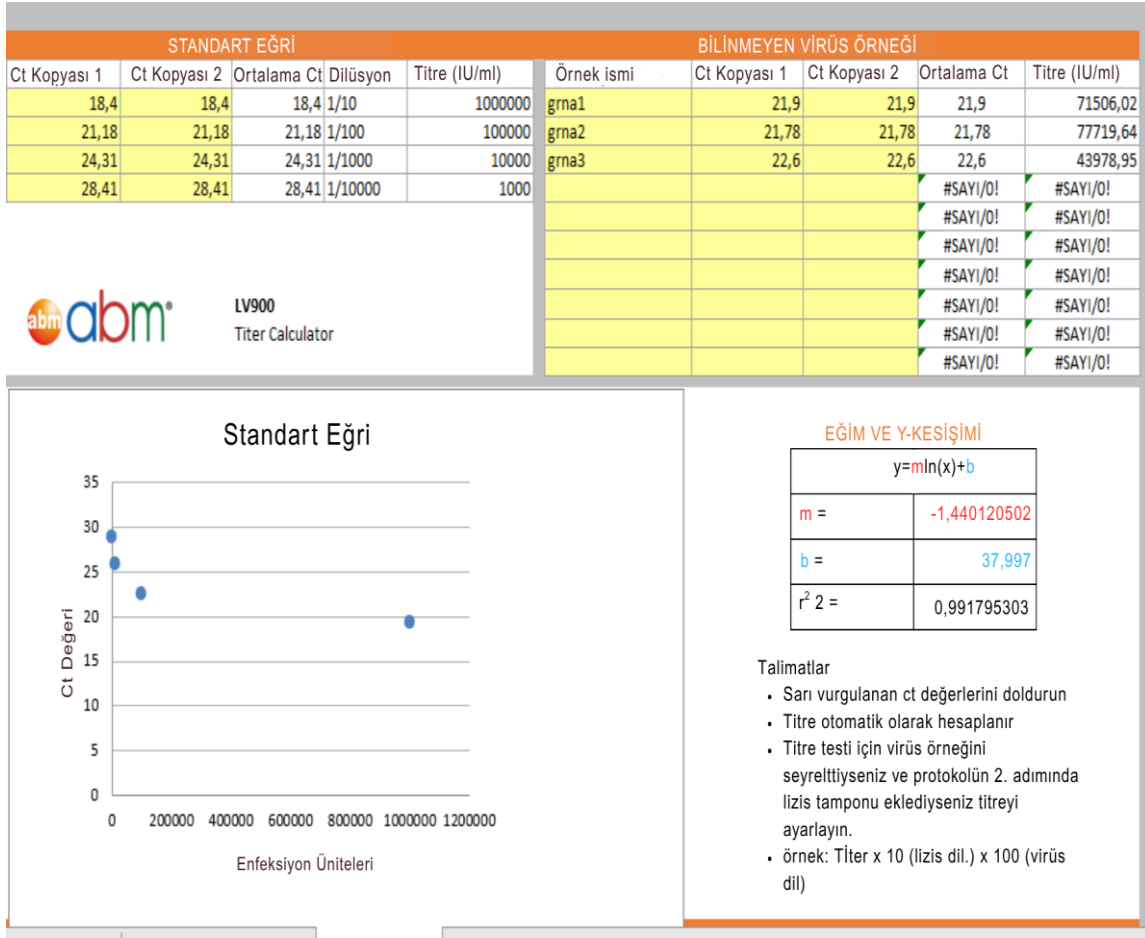
Vektör	Konsantrasyon	260/280	260/230
GRNA1	951 ng/μl	1,82	2,12
GRNA2	1673,3 ng/μl	1,88	2,25
GRNA2	1198,1 ng/μl	1,87	2,24
pMD.2G	671,5 ng/μl	1,88	2,20
psPAX2	666,5 ng/μl	1,90	2,17



Şekil 10: Midiprep izolasyonu

4.2. Virüs Titrasyon Sonuçları

Paketleme plazmitleri ve gRNA'ların HEK293T hücrelerine transfeksiyonu sonrasında elde edilen lentiviral partiküllerin konsantrasyonu, “*ABM Lentivirüs Titrasyon Kiti*”ne ait hesaplama formu kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 11). Bu işlemde, kit tarafından sağlanan standart viral DNA dilüsyonlarına karşılık, deneysel olarak elde edilen örneklerin Ct (eşik döngü) değerleri kıyaslanmış ve bu doğrultuda örneklerin viral konsantrasyonları hesaplanmıştır. Titrasyon PCR'ı sırasında uygulanan dilüsyon katsayısı ile birlikte, virüs çözündürme aşamasında gerçekleştirilen ek dilüsyonlar da dikkate alınarak toplam virüs partikül sayısı belirlenmiştir.



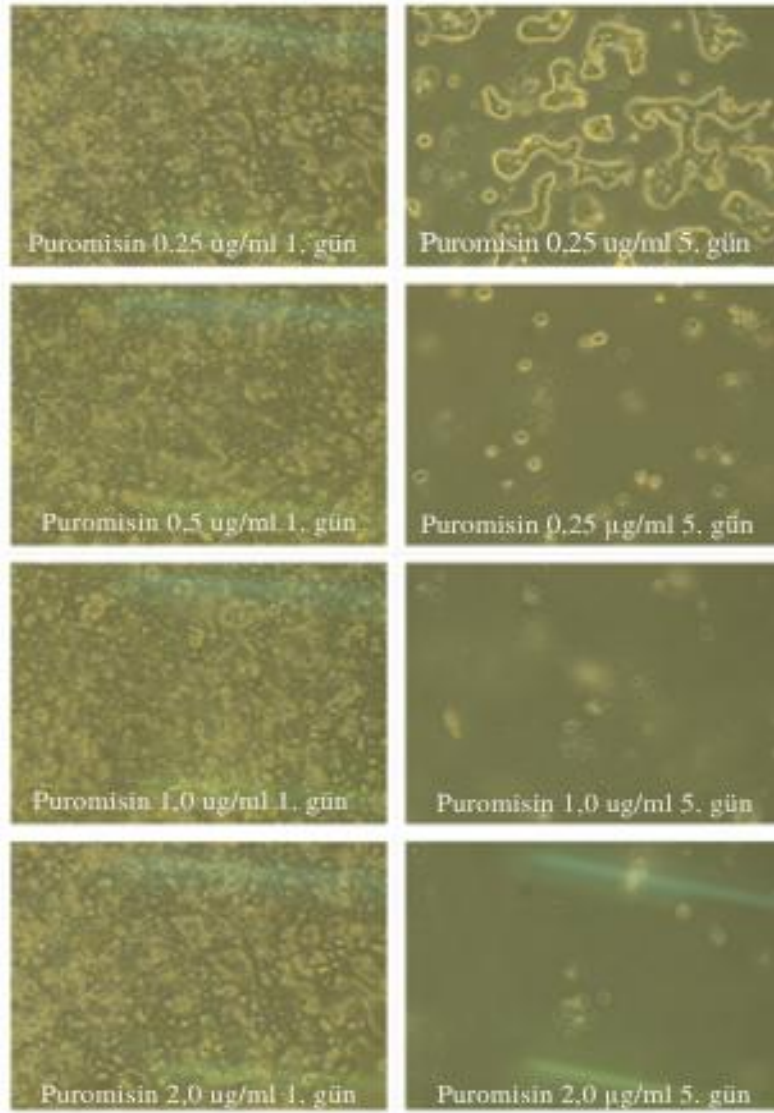
Şekil 11: Virüs dilüsyon hesaplama formu

4.3. Optimizasyon Çalışmaları Sonuçları

CRISPR çalışmalarına başlamadan önce bu çalışmalarda kullanılacak puromisin ve polybren için uygun dozlar belirlenmiştir.

4.3.1. Puromisin Seçilimi İçin Doz Belirlenmesi

MCF7 hücre hattında kullanılacak puromisin konsantrasyonu belirlemek için 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml ve 0,25 µg/ml konsantrasyonları denenmiş ve dirençsiz MCF7 hücrelerini öldürecek en düşük doz 0,5 µg/ml olarak belirlenmiştir (şekil 12).

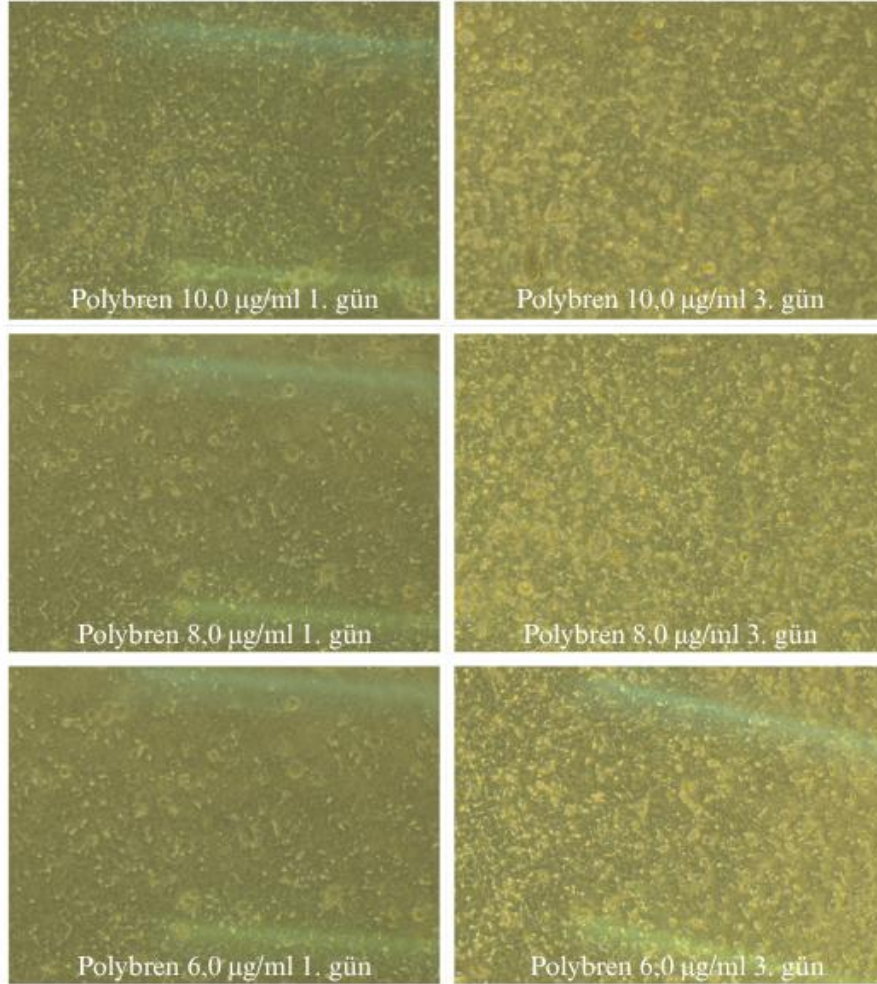


Şekil 12: Antibiyotik doz seçimi görüntüleri

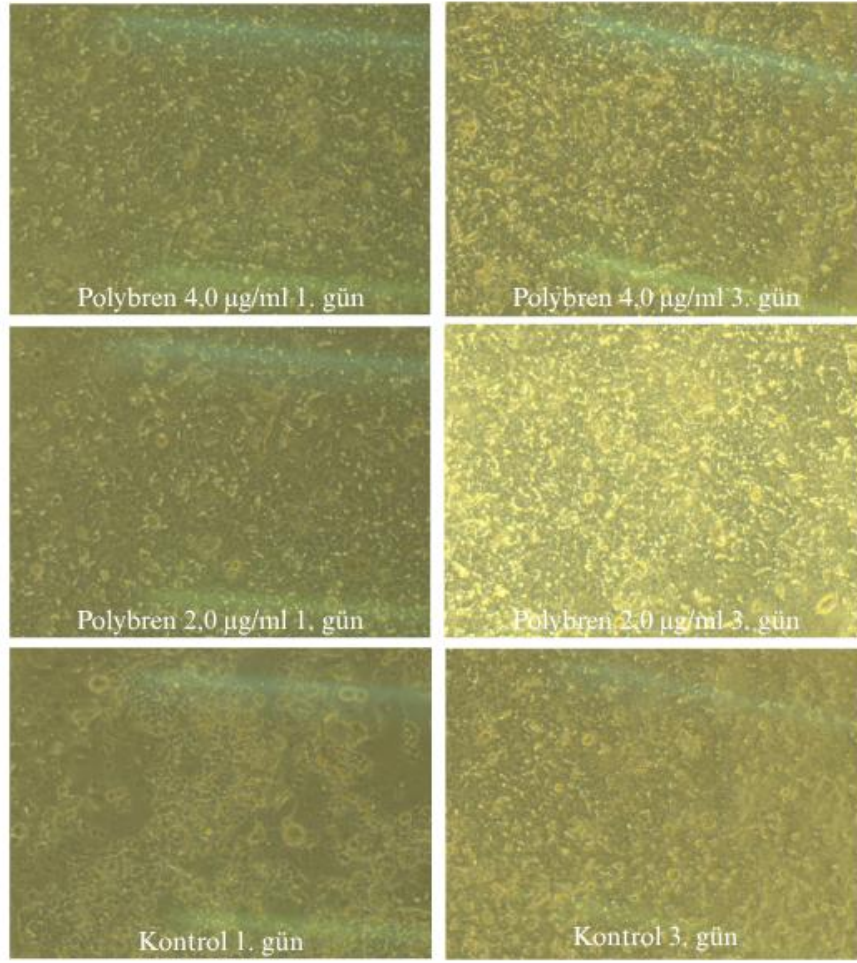
4.3.2. Polybren için Uygun Dozun Belirlenmesi

Polybren, viral partiküllerin hücre zarını geçerek hücre içerisine girmesini kolaylaştıran katyonik bir polimerdir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilere yol açabileceği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmada, MCF7 hücre hattı için toksik etki oluşturmeyen en yüksek polybren konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, hücrelere sırasıyla 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml ve 10 µg/ml polybren uygulanmış ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir (Şekil 13,14). Yapılan analizler sonucunda, 8 µg/ml konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde toksik

etki göstermediği belirlenmiş; bu doz, MCF7 hücreleri için toksik olmayan en yüksek polybren konsantrasyonu olarak seçilmiştir.



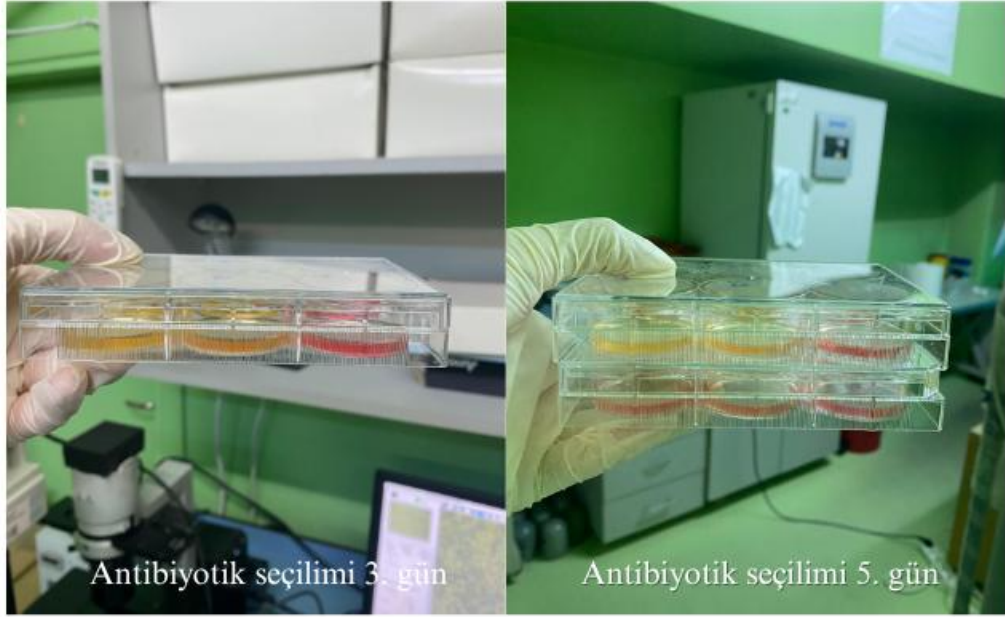
Şekil 13: Polybren doz seçimi görüntüleri (10 µg/ml, 8 µg/ml, 6 µg/ml)



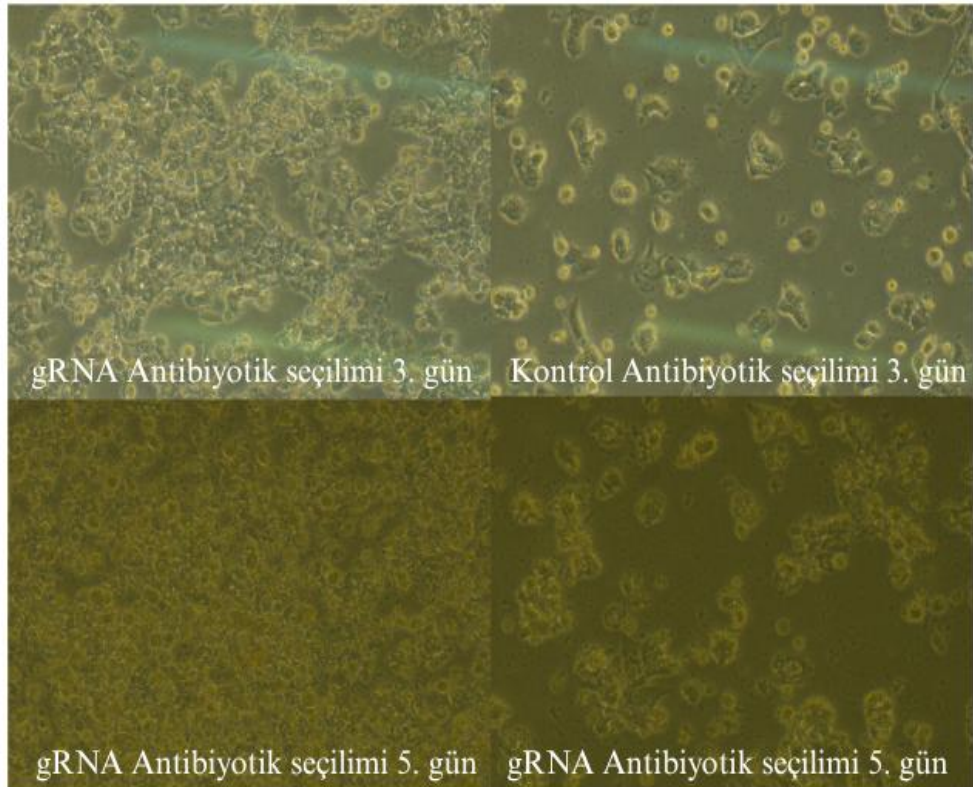
Şekil 14: Polybren doz seçimi görüntüleri (4 µg/ml, 2 µg/ml, Kontrol)

4.4. MCF7 Hücrelerinin Virüsle Enfeksiyonu ve Antibiyotik seçilimi

DHRS2 geninin *knockout*'u amacıyla, MCF7 hücreleri farklı enfeksiyon şiddetlerini karşılaştırmak üzere *multiplicity of infection* (MOI) değerleri 5 ve 10 olacak şekilde lentiviral partiküllerle enfekte edilmiştir. Kontrol grubu olarak yalnızca polybren eklenmiş, virüs uygulanmamış MCF7 hücreleri kullanılmıştır. Antibiyotik seçilimi sonrasında yapılan gözlemlerde, enfekte edilen hücrelerin canlılık düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, kontrol grubundaki hücrelerin ise seçim süreci sırasında öldüğü belirlenmiştir (Şekil 15,16). Bu doğrultuda antibiyotik seçilimi, enfekte olmayan hücrelerin tamamen elimine edildiği 5. günde sonlandırılmıştır.



Şekil 15: Antibiyotik seçilimi sonrası besiyeri renk değişimi



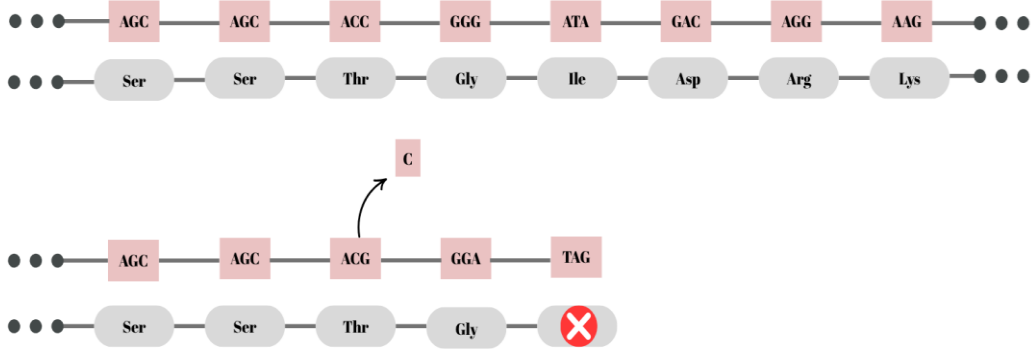
Şekil 16: Antibiyotik seçilimi sonrası hücre morfolojileri

4.5. Sanger Dizilime Sonucu ve Oluşacak Protein Tahmini

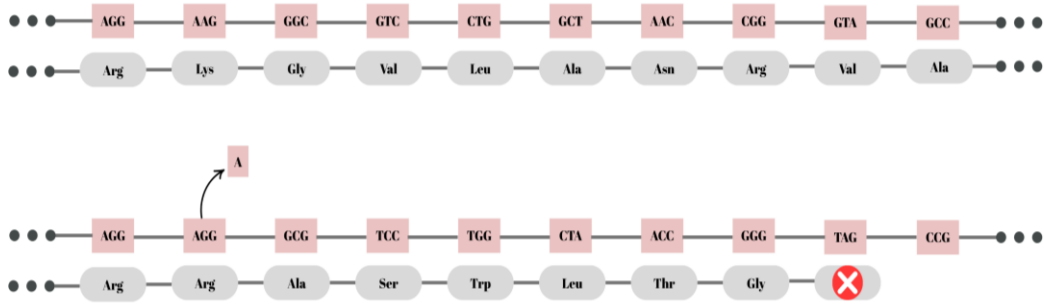
Sanger dizileme analizi sonucunda, *DHRS2* geninde gRNA3'ün hedeflediği bölgeye karşılık gelen lokasyonda iki bazlık bir delesyon tespit edilmiştir (Şekil 17) (NM_005794.4:c.77delC ve NM_005794.4:c.91delA). Bu mutasyonların protein düzeyindeki etkileri Mutalyzer veri tabanı kullanılarak değerlendirilmiştir. NM_005794.4:c.77delC delesyonunun, çerçeve kaymasına neden olarak 28. pozisyonundaki izolosin (Ile) amino asidine denk gelen kodun stop kodonuna dönüşmesine yol açtığı ve bunun sonucunda protein sentezinin erken durarak işlevsiz ve güdük (truncated) bir protein olduğu belirlenmiştir (Şekil 18). Diğer delesyon olan NM_005794.4:c.91delA ise mRNA'nın 91. pozisyonundaki bir nükleotidin silinmesine ve buna bağlı olarak çerçeve kaymasına neden olmuştur (Şekil 19). Bu kayma sonucunda, 31. pozisyonundaki lizin (Lys) amino asidinin arjinin (Arg) ile yer değiştirdiği, yedi amino asit sonrasında ise erken bir stop kodonunun oluşarak yine kısa ve işlevsiz bir protein meydana geldiği saptanmıştır. Her iki delesyonun da *DHRS2* proteininin yapısal ve/veya fonksiyonel bütünlüğünü bozarak kayba yol açtığı değerlendirilmiştir.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
832 bits(450)	0.0	455/457(99%)	2/457(0%)	Plus/Plus
Query 7	CAGCA-CGGGATAGACAGG-AGGGCGTCCTGGCTAACCGGGTAGCCGTGGTCACGGGGTC	64		
Sbjct 2734	CAGCACCAGGATAGACAGGAAGGGCGTCCTGGCTAACCGGGTAGCCGTGGTCACGGGGTC	2793		
Query 65	CACCACTGGGTGAGTGCTGGATTGCCCATGGGTCCTGGCCCTCACAGGGTCCTTGTGGC	124		
Sbjct 2794	CACCACTGGGTGAGTGCTGGATTGCCCATGGGTCCTGGCCCTCACAGGGTCCTTGTGGC	2853		
Query 125	TTCCACAAGGACTCAGGGTTTTAAAGCAAGACCCAGCCTTATTTGCTGATTTCCAGAGCT	184		
Sbjct 2854	TTCCACAAGGACTCAGGGTTTTAAAGCAAGACCCAGCCTTATTTGCTGATTTCCAGAGCT	2913		
Query 185	GGGTAGAGGAAGGACAGTGGAGAGAGGCTGAGGCTGACTTTTGCCCTCCATCTCTGCATT	244		
Sbjct 2914	GGGTAGAGGAAGGACAGTGGAGAGAGGCTGAGGCTGACTTTTGCCCTCCATCTCTGCATT	2973		
Query 245	CAGGATCGGCTTTGCCATCGCCCGACGTCTGGCCCGGGACGGGGCCACGTGGTCATCAG	304		
Sbjct 2974	CAGGATCGGCTTTGCCATCGCCCGACGTCTGGCCCGGGACGGGGCCACGTGGTCATCAG	3033		
Query 305	CAGCCGGAAGCAGCAGAACGTGGACCGGGCCATGGCCAAGCTGCAGGGGGAGGGGCTGAG	364		
Sbjct 3034	CAGCCGGAAGCAGCAGAACGTGGACCGGGCCATGGCCAAGCTGCAGGGGGAGGGGCTGAG	3093		
Query 365	TGTGGCGGGCATTGTGTGCCACGTGGGGAAGGCTGAGGACCGGGAGCAGCTGGTGGCCAA	424		
Sbjct 3094	TGTGGCGGGCATTGTGTGCCACGTGGGGAAGGCTGAGGACCGGGAGCAGCTGGTGGCCAA	3153		
Query 425	GGTGAGGGGGCAGGCGGTGGAAGGACACAGAGAGGGG	461		
Sbjct 3154	GGTGAGGGGGCAGGCGGTGGAAGGACACAGAGAGGGG	3190		

Şekil 17: Sanger dizi sonuçlarının *DHRS2* geninin dizisi ile karşılaştırılması



Şekil 18: 77. Pozisyondaki delesyon sonucunda oluşacak aminoasit dizisi değişimi



Şekil 19: 91. Pozisyondaki delesyon sonucunda oluşacak aminoasit dizisi değişimi

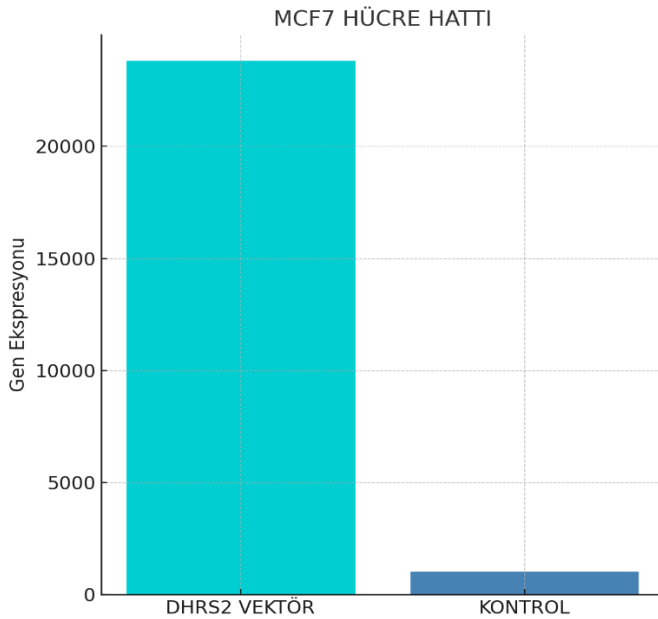
4.6. *DHRS2* Gen Artışı Sonucunda İlişkili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler

Vektör transfeksiyonu sonucunda 24, 48 ve 72. saatlerden elde edilen örneklerden RT-PCR ile *DHRS2* gen ekspresyonuna bakıldı. Örnekler arasında en yüksek gen ekspresyonun 24. Saatte olduğu gözlemlendiği için diğer genlerin 24. Saatteki değişimleri RT-PCR ile kontrol edildi. Örnekler çift kopyalar halinde çalışıldı. Analiz yapılırken vektör grubu, herhangi bir işleme tabi tutulmamış (NTC) negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İlgili genlerdeki değişimler referans gen olarak TBP ele alınarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ methodu ile hesaplandı.

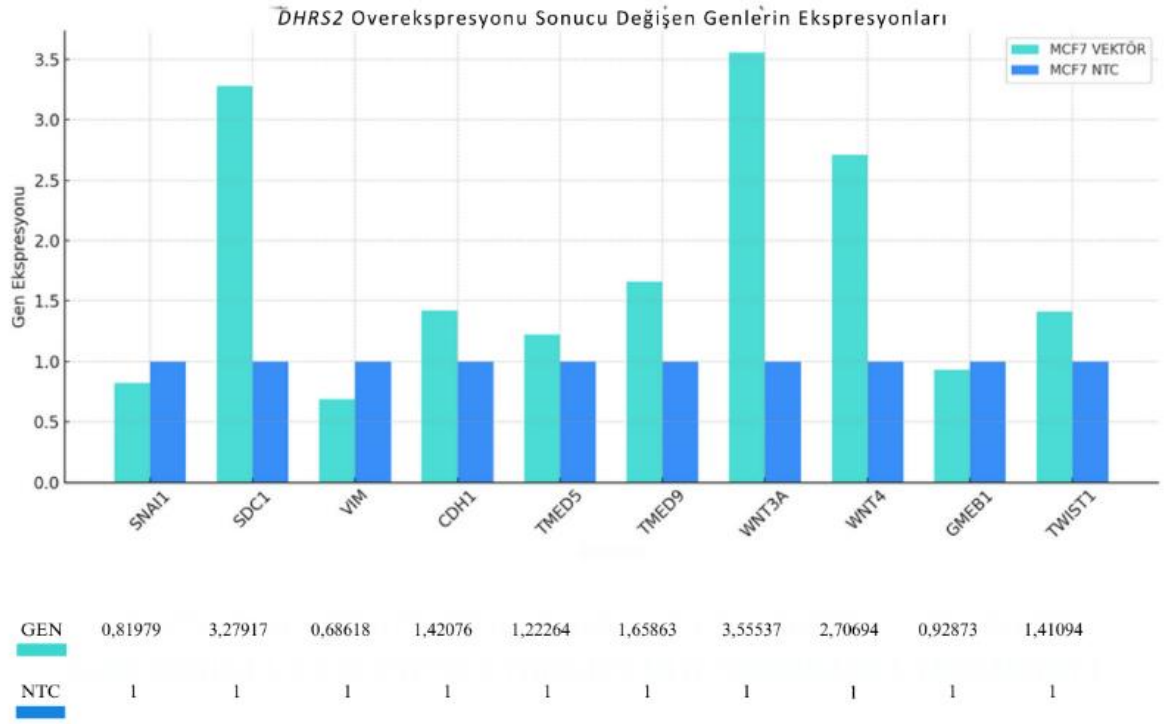
2^{-ΔΔCT} Methodu:

- Örneklerin RT-PCR sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması alındı.
- Genlerin ortalama CT değerleri Referans genleri ortalama ct değerlerinden çıkartılarak ΔCT değeri bulundu.
- Genlerin ΔCT sonucu referasn genleri ΔCT sonucundan çıkartılarak $\Delta\Delta CT$ değeri bulundu.
- Elde edilen $\Delta\Delta CT$ değerlerinin, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri heseplanarak genlerin kat değişimleri bulundu.

MCF7 hücrelerine *DHRS2* gen vektörünün verilmesinin ardından *DHRS2* gen ekspresyonunun 24000 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 20). *DHRS2* gen ekspresyonu arttığında, *SDC1* (3.27), *CDH1* (1.42), *TMED5* (1.22), *WNT3A* (3.55), *WNT4* (2.70), *TMED9* (1.65) ve *TWIST1* (1.41) genlerinde anlamlı düzeyde artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, *SNAIL* (0.81), *VIM* (0.68), ve *GMEB1* (0.92) genlerinde ise ekspresyon düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 21).



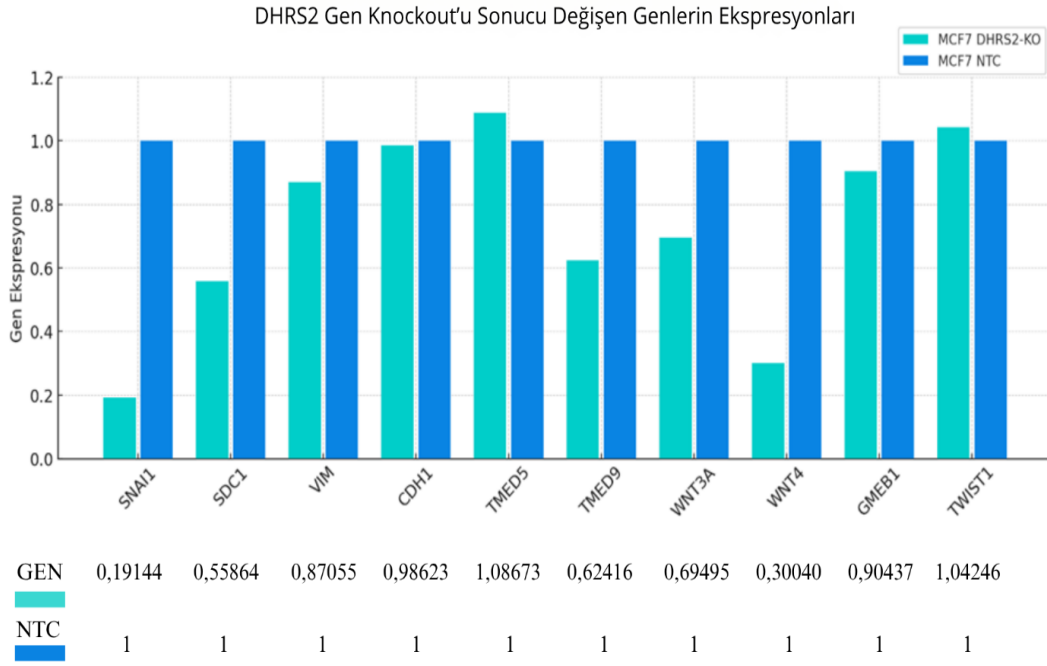
Şekil 20: Vektör verilen MCF7 hücrelerinde *DHRS2* ekspresyonu



Şekil 21: DHRS2 overekspresyonu sonucu değişen genlerin ekspresyonları

4.7. DHRS2 Gen Knockout'u Sonucunda İlişkili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler

DHRS2 gen *knockout*'u sonucunda EMT ile ilişkilendirilen genlerin ekspresyon seviyesine $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile bakıldı. RT-PCR sonucunda *TWIST1* (1.04), *TMED5* (1.08), *CDH1* (0.98) ve *GMEB1* (0.92) genlerin ekspresyonunda anlamlı bir değişim saptanmazken, *SDC1* (0.55), *WNT3A* (0.69), *WNT4* (0,30) *SNAIL* (0.19), *VIM* (0.87), *TMED9* (0.62) ve genlerinde ise ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22: *DHRS2* gen *knockout*'u sonucu değişen genlerin ekspresyonları

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık teşhis edilen malignite olup, dünya genelinde kanser ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021). Hastalığa bağlı mortalitenin temel nedeni, primer tümörün kendisinden ziyade, kanser hücrelerinin uzak organlara metastaz yapma yeteneğidir. Klinik olarak oldukça heterojen bir seyir izleyen meme kanserinde, hastaların yaklaşık %10–15’inde tanıdan sonraki üç yıl içinde agresif metastatik yayılım gözlenirken, bazı olgularda metastaz, başlangıç tanısından on yıl ya da daha uzun bir süre sonra ortaya çıkabilmektedir. Hem erken hem geç dönemde gelişen bu metastatik yayılım, sıklıkla beyin, akciğer, karaciğer ve kemik gibi organları hedef almakta olup, hastalığın prognozunu belirleyen en kritik faktörlerden biridir (Weigelt vd., 2005).

DHRS2 geni, insan tümörlerinde heterozigotluk kaybı ile karakterizedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *DHRS2*’nin hücre döngüsü, proliferasyon, migrasyon, invazyon, metastaz ve kemoterapiye direnç gibi temel tümör biyolojik süreçlerini etkileyerek çeşitli kanser türlerinin karsinogenezi ve ilerleyişinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (X. Luo vd., 2019). İlginç şekilde, *DHRS2*’nin kanser türlerine bağlı olarak farklı işlevler üstlendiği görülmektedir. Örneğin; akciğer ve over kanseri gibi bazı kanserlerde *DHRS2* ekspresyonunun artışı, hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterirken; meme kanseri özelinde bu durumun tersine işlediği, yani yüksek *DHRS2* ekspresyonunun hücre proliferasyonunu desteklediği bildirilmiştir (Z. Li vd., 2022; Salman Yaylaz vd., 2021). Nitekim MCF7 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda, *DHRS2* ekspresyonunun artmasının hücre çoğalmasını artırdığı, buna karşılık gen ekspresyonunun baskılanmasının ise hücrelerin göç ve invazyon yeteneklerini azalttığı gösterilmiştir (Salman Yaylaz vd., 2021). Bu bulgular, *DHRS2*’nin kanser türüne özgü farklı moleküler işlevlere sahip olabileceğini ve meme kanseri biyolojisinde pro-tümöral bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca laboratuvarımızda yapılan transkriptom çalışması sonucunda *DHRS2* gen ekspresyon değişiminin meme kanserinde proliferasyon, invazyon, migrasyon ve apoptoz süreçlerindeki farklı genleri etkilediği gösterilmiştir (Salman Yaylaz, 2024). Bu bilgilerden yola çıkılarak oluşturulan tez çalışmasında, *DHRS2*’nin meme kanserinde metastaz sürecine olan etkisinin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Özellikle, metastazın temel belirteçlerinden biri olarak kabul edilen epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreci ile *DHRS2* arasındaki ilişkinin ortaya konulması amaçlandı. Bu

doğrultuda, öncelikle veri tabanları yardımıyla hem *DHRS2* hem de EMT ile bağlantılı farklı biyolojik yollara ait genler seçildi ardından bu genlerin ekspresyon düzeyleri analiz edilerek, *DHRS2*'nin bu genler üzerindeki düzenleyici potansiyeli değerlendirildi.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler sonucunda, tümör progresyonunda önemli bir rol oynadığı bilinen Syndecan-1 (*SDC1*) in *DHRS2 overeskrepre* edildiği koşullarda 3,3 kat arttığı *DHRS2* geninin genetik olarak baskılandığı durumunda ise yarı yarıya azaldığı saptanmıştır. Bu bulgu, *DHRS2*'nin *SDC1* üzerinden tümör hücre davranışlarını yönlendirebileceğine işaret etmektedir.

SDC1, heparin sülfat proteoglikan ailesine ait hücre yüzey glikoproteinidir ve çeşitli malignitelerde anormal şekilde artmış ekspresyonu ile tanımlanmıştır. Literatürde, *SDC1*'in aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenez kapasitesini artırdığı, dolayısıyla kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mei vd., 2025). Bu bilgilerden yola çıkarak, *DHRS2*'nin *SDC1* ekspresyonunu yukarı yönde düzenlemesi, onun pro-tümöral etkilerinden biri olarak değerlendirilebilir.

Öte yandan, *DHRS2 knockout*'u hücrelerde *SDC1* ekspresyonunun azalması, bazı çalışmalarda gösterildiği gibi hücrede kaspaz bağımlı apoptozu indükleyen bir etki oluşturabilir. Özellikle, azalan *SDC1*'nin, transkripsiyon faktörleri olan *junB* ve *FLIP* (*FLICE* benzeri inhibitör protein)'in ekspresyonunu azalttığı ve bu azalma sayesinde kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesinde artışa yol açarak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Shimada vd., 2010). Bu durum, *DHRS2*'nin baskılandığı koşullarda gözlemlenen azalmış proliferasyon, invazyon ve artmış apoptoz süreci ile de uyumludur. Bu veriler ışığında, *DHRS2* ve *SDC1*'in birbirleri ile ilişki içinde oldukları, *DHRS2*'nin meme kanseri hücrelerinde *SDC1* aracılığıyla anti-apoptotik ve pro-tümöral bir etki oluşturabileceği düşündürmektedir. Dolayısıyla, *DHRS2*'nin bu regülatör/düzenleyici etkisi, sadece EMT ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda apoptoz kontrolü ve tümör progresyonu gibi geniş bir biyolojik yelpazede etkili olabilir.

Çalışmamızda incelediğimiz genlerden bir diğeri *GMEB1*'di. Veri tabanları üzerinden elde ettiğimiz bilgilere göre *GMEB1*, *DHRS2* ve *SDC1* ile ilişkili bir proteindir. Ayrıca literatürde *GMEB1*'in aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu kolaylaştırdığı buna karşılık hücre apoptozunu baskıladığı bildirilmiştir (C. Chen vd., 2023; Kotsaris vd., 2020). Ancak bulgularımıza baktığımızda ise *DHRS2 overeskrepreyon*'u ya da *knockout*'u sonrasında *GMEB1*

ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Herhangi bir değişikliğin olmaması *GMEB1*'in *DHRS2*, *SDC1* ile ilişkisinin doğrudan değil dolaylı şekilde olması, hücre bağlamına özgü sinyaller gerektirmesi, *GMEB1*'in hücre homeostazini düzenlemek için farklı sinyal yolları aracılığıyla da düzenlenmesi olasıdır.

Çalışmamızda, EMT sürecinde kritik rol oynayan kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolunun bir üyesi olan *WNT3A* geninin, *DHRS2*'nin *overeksprese* edildiği koşullarda yaklaşık 3,5 kat arttığı; hem kanonik hem de non-kanonik Wnt yolaklarında görev alan *WNT4* geninin ise 2,7 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, *DHRS2*'nin genetik olarak baskılandığı durumlarda *WNT3A* ekspresyonu yaklaşık %30, *WNT4* ekspresyonu ise %70 oranında azalmıştır. Bu sonuçlar, *DHRS2*'nin *WNT3A* ve *WNT4* genlerinin transkripsiyonel düzeyde pozitif regülasyonunda rol oynayabileceğini ve bu yolla EMT sürecine dolaylı katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

WNT3A sinyallemesi, esas olarak β -katenin'i merkezi bir sinyal molekülü olarak kullanan kanonik Wnt/ β -katenin yolunu aktive eder. Bu yolak, hücresel proliferasyon, farklılaşma, invazyon ve adezyon üzerinde önemli bir düzenleyici role sahiptir. Wnt/ β -katenin yolunun EMT'yi indükleme mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da β -katenin'in iki temel işlevi bu süreçte belirleyicidir: İlki, E-kaderin ile birlikte hücre adezyon bağlantılarında yapısal bir protein olarak görev alması; diğeri ise Wnt/ β -katenin sinyal yolunda ara sinyal taşıyıcısı olmasıdır. E-kaderin/ β -katenin kompleksinin kaybı, hücreler arası bağlantıların bozulmasına yol açarak hücre göçünü ve EMT'yi tetiklemektedir (Bao vd., 2012).

Literatürde, *WNT3A*'nın baskılandığı koşullarda E-kaderin (*CDH1*) düzeyinin arttığı, buna karşın mezenkimal belirteçlerden N-kaderin, TWIST ve Slug ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Wu et al., 2012). Bu durum, *WNT3A*'nın EMT'yi doğrudan indükleyici bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir. Benzer şekilde, *WNT4*'ün yüksek ekspresyonu, tümör hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyon kapasitelerini artırmakta ve böylece kanser gelişiminde önemli bir rol üstlenmektedir. Nitekim, kolorektal kanser hücrelerinde *WNT4*'ün β -katenin yolunu aktive ederek EMT'yi desteklediği ve *WNT4* yıkımının hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir (Zhang et al., 2021; Yang et al., 2020).

Çalışmamızda gözlemlenen *DHRS2* ekspresyon artışına paralel olarak *WNT3A* ve *WNT4* düzeylerindeki yükselme, *DHRS2*'nin EMT sürecine olan katkısının yalnızca klasik EMT belirteçleri üzerinden değil, aynı zamanda Wnt aracılı sinyal ağları

üzerinden de şekillenebileceğini göstermektedir. *DHRS2*'nin kanonik (Wnt/ β -katenin) ya da non-kanonik Wnt yolları üzerinden EMT'yi destekleyerek tümör progresyonuna katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Tersine olarak, *DHRS2*'nin baskılandığı koşullarda bu iki genin ekspresyonunun azalması ve apoptozla ilişkilendirilmesi, *DHRS2*'nin *WNT3A* ve *WNT4* ile güçlü bir moleküler etkileşim içinde olduğunu ve bu etkileşimin tümör hücre kaderini doğrudan etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamız sonucunda *DHRS2* geninin ekspresyonunun arttırılması sonrasında *TMED9* geninin ekspresyon düzeyinde yaklaşık 1,65 katlık bir artış gözlemlenirken, *DHRS2*'nin *knockout* edildiği koşullarda *TMED9* ekspresyonunun yaklaşık %40 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Literatürde, *TMED9*'un yüksek düzeydeki ekspresyonunun meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde hücresel proliferasyonu ve göçü desteklediği; hepatosellüler karsinom modellerinde *TMED9* proteinin aşırı ekspresyonunun β -katenin ve GLI ailesinden GLI1'in ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonuna katkı sağladığı bildirilmektedir (Mishra vd., 2019). Bu bulgular, *TMED9*'un tümör progresyonunda önemli bir rol üstlendiğini ve Wnt/ β -katenin yolları üzerinden etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda *DHRS2* ile *TMED9* arasında pozitif yönlü bir ilişki saptanması, bu iki genin aynı sinyal yolağı üzerinden birbirleriyle ilişkili şekilde işlev görebileceğini düşündürmektedir. *TMED9*'un β -katenin ekspresyonunu artırıcı etkisi göz önüne alındığında, *DHRS2* ve *TMED9*'un Wnt/ β -katenin sinyal yolları üzerinden karşılıklı etkileşim içerisinde bulunarak tümöral ilerleme ve EMT süreçlerine katkıda bulunabileceği öne sürülebilir.

TMED gen ailesine ait bir diğer gen olan *TMED5*'e ilişkin olarak, literatürde bu genin aşağı regülasyonunun hücre proliferasyonu, göç ve invazyonu baskıladığı, aynı zamanda apoptozu artırabileceği rapor edilmiştir (S. Luo vd., 2022). Ancak çalışmamızda *DHRS2* ekspresyonundaki değişimlerin *TMED5* gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkiye yol açmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, *TMED5*'in *DHRS2* aracılığıyla düzenlenmediğini ya da *DHRS2*'nin etkilerinin *TMED5* üzerinden dolaylı ve sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda *DHRS2* ile ilişkilendirdiğimiz diğer genler *VIM*, *SNAI1*, *CDH1* ve *TWIST1* genleriydi. *DHRS2* geninin *overekspresyon* 'u sonrasında mezenkimal geçişin önemli belirteçlerinden olan *VIM* (0,68) ve *SNAI1* (0,81) gen ekspresyonlarında azalma gözlemlenirken, epitel hücre belirteci *CDH1* (1,42) ve EMT düzenleyicisi *TWIST1*

(1,41) genlerinde artış saptanmıştır. Öte yandan, *DHRS2* geninin *knockout* edilmesi durumunda *VIM* (0,87), *CDH1* (0,98) ve *Twist1* (1,04) genlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, *SNAIL* gen ekspresyonunda yaklaşık %80'lik belirgin bir azalma saptanmıştır.

Literatürde, *SNAIL* geninin onkojenik bir rol üstlendiği, ekspresyonunun artmasının tümör progresyonunu desteklediği; buna karşın, meme epitel dokusunda *SNAIL* ekspresyonunun azalmasının, tümör ilerlemesi ve akciğere metastazı anlamlı düzeyde engellediği bildirilmiştir (Brenot et al., 2018). Öte yandan, *DHRS2* ekspresyonundaki azalma da meme kanserinde tümöral gelişimi baskılayarak kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmektedir. Ayrıca literatürde, p53 aktivasyonunun miR-34a/b/c ekspresyonunu artırarak EMT'yi indükleyen *SNAIL* transkripsiyon faktörünü aşağı düzenlediği gösterilmiştir (Siemens vd., 2011).

DHRS2'nin meme kanserinde *MDM2* ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir. Ancak östrojen pozitif ve *wild-type* p53 taşıyan MCF7 meme kanseri hücrelerinde, *MDM2 overekspresyonu* bulunsada dahi estradiol varlığında p53 protein düzeyleri yükselmeye devam etmektedir (Deisenroth vd., 2010). Bu durum, *DHRS2* ekspresyon artışının dolaylı yoldan p53 protein seviyesini artırabileceğini düşündürmektedir. Artan p53 seviyeleri ise miR-34 ailesi aracılığıyla *SNAIL* baskılanmasına yol açabilir. Bu bağlamda, elde ettiğimiz bulgular *DHRS2* ile *SNAIL* arasındaki ilişki yalnızca EMT ile ilişkili sinyal yolları üzerinden değil, aynı zamanda *MDM2*-p53-miR-34 eksenini üzerinden de düzenlenebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, *DHRS2* geninin *overekspresyonu* ile birlikte *Twist1* ekspresyonunda artış gözlemlenmiş, ancak *DHRS2*'nin *knockoutu* durumunda *Twist1* düzeyinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. *Twist1*, EMT sürecinin temel düzenleyicilerinden biri olup, hücrelerel farklılaşma, proliferasyon ve hareketliliğin artışında rol oynamakta; aynı zamanda kanser kök hücre fenotipi ile ilişkilendirilmektedir. Literatürde *Twist1*'in anti-apoptotik etkiler gösterdiği ve p53 sinyal yolunu inhibe edebildiği bildirilmektedir (Grzegorzolka et al., 2015). Ayrıca *Twist1* ekspresyonunun, özellikle primer ve metastatik tümörlerde arttığı ve β -katenin sinyal yoluyla aktive edildiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra *Twist1*'in AKT yolunu aktive ederek hücre invazyonu ve göçünü desteklediği ve böylece EMT sürecine katkı sağladığı da gösterilmiştir (J. Li & Zhou, 2011).

Elde ettiğimiz bulgular, *TWIST1* ve WNT genlerindeki paralel ekspresyon değişiklikleri dikkate alındığında, *DHRS2*'nin *TWIST1* üzerindeki etkisinin Wnt/ β -katenin sinyal yolu aracılığıyla gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ancak, *DHRS2*'nin susturulması sonrasında *TWIST1* ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğin gözlenmemesi, bu genler arasındaki etkileşimin yalnızca belirli koşullar altında aktif olduğunu göstermektedir. *DHRS2*'nin yokluğunda *TWIST1* düzeylerinin değişmemesi, *TWIST1* ekspresyonunu düzenleyen alternatif sinyal yollarının da devrede olduğunu ve bu yolların *TWIST1* düzeyini sabit tuttuğunu göstermektedir.

Son olarak, *TWIST1* ekspresyonundaki değişikliğin *DHRS2 knockout* koşulunda gözlenmemesi, MCF7 hücre hattına özgü bir durum da olabilir. Literatürde *DHRS2*'nin p53 sinyal yolunu etkileyebildiği belirtilmiştir. Ancak MCF7 hücreleri östrojen reseptörü pozitif ve p53 geni normal (*wild-type*) olan hücrelerdir. Bu tür hücrelerde hormon sinyalleri nedeniyle p53 düzeylerinin sabit kalabileceği bilinmektedir (Deisenroth vd., 2010). Bu durumda, p53 düzeylerinde değişiklik olmaması, *TWIST1* ekspresyonunun da sabit kalmasına neden olmuş olabilir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, *DHRS2* geninin MCF7 hücrelerinde *overeksprese* edilmesiyle birlikte EMT sürecine ilişkin gen ekspresyon profillerinde dikkat çekici değişiklikler gözlemlenmiştir. Ancak mezenkimal fenotipin önemli bir göstergesi olan vimentini kodlayan *VIM* geninin ekspresyonunda anlamlı düzeyde bir azalma (yaklaşık 0,6 kat) tespit edilirken, epitelyal hücre yapışmasının temel belirteci olan E-kadherin (*CDH1*) ekspresyonunda yalnızca sınırlı bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, klasik EMT programının bu hücrelerde tam anlamıyla aktive edilmediğini, hatta kısmen baskılandığını düşündürmektedir.

Ancak bu durum, hücrelerin tam bir EMT yerine, hem epitelyal hem mezenkimal özelliklerin bir arada görüldüğü “parsiyel EMT” (kısmi EMT) olarak adlandırılan bir ara fenotipe sahip olabileceğini göstermektedir (Verstappe & Berx, 2023). Parsiyel EMT'de, *CDH1* gibi epitel belirteçlerin ekspresyonu korunurken veya artarken, *VIM*, *SNAIL* gibi mezenkimal belirteçlerde azalma gözlenebilir. Bu moleküler özellikler, hücrelerin tam olarak mezenkimal hale geçmeden toplu (kolektif) göç kabiliyeti kazanmasına olanak tanır. Nitekim, parsiyel EMT geçiren hücrelerin tek hücreli göçten ziyade kümeler halinde hareket ederek metastatik yayılımı daha etkili biçimde gerçekleştirebildiği bildirilmektedir (Pastorino vd., 2024).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, *DHRS2* geninin meme kanseri hücrelerinde tümör progresyonuna çok yönlü etkilerde bulunan bir düzenleyici olduğunu ortaya koymaktadır. *DHRS2*'nin *overekspresyonu*, özellikle *WNT3A*, *WNT4*, *SDC1* ve *TMED9* gibi proliferasyon, invazyon ve EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak protümöral süreçleri destekleyebileceğini göstermektedir. Buna karşın, *DHRS2*'nin baskılandığı koşullarda bu genlerin ekspresyonunun azalması ve apoptozla ilişkili bazı mekanizmaların aktive olması, *DHRS2*'nin kanser hücre yaşamı üzerinde dengeleyici bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Ayrıca, *DHRS2*'nin EMT ile ilişkili genler (*VIM*, *SNAIL*, *CDH1*, *TWIST1*) üzerindeki etkisi incelendiğinde, tam bir EMT programının değil, parsiyel EMT'ye özgü bir ekspresyon profili ortaya çıkmıştır. Bu durum, hücrelerin epitel-mezenkimal özellikleri bir arada taşıdığı ve metastatik yayılımı kolektif migrasyon stratejisini kullanabileceği yönünde önemli ipuçları sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu veriler *DHRS2*'nin EMT süreçlerini Wnt/ β -katenin başta olmak üzere çeşitli sinyal yolları üzerinden modüle ederek metastatik yetenek ve hücresel kader üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, *DHRS2* hem potansiyel bir biyobelirteç hem de hedeflenebilir bir terapötik aday olarak değerlendirilebilir. Ancak bu sonuçların daha geniş hasta örneklemi, hayvan deneyleri ve farklı moleküler alt tiplerde doğrulanması, *DHRS2*'nin meme kanseri biyolojisindeki rolünü daha net şekilde ortaya koyacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Akl, M. R., Nagpal, P., Ayoub, N. M., Prabhu, S. A., Gliksman, M., Tai, B., Hatipoglu, A., Goy, A., & Suh, K. S. (2015). Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine. *Oncotarget*, 6(30), 28693–28715. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4981>
2. Amitai, G., & Sorek, R. (2016). CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 67–76. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.14>
3. An, W., Yao, S., Sun, X., Hou, Z., Lin, Y., Su, L., & Liu, X. (2019). Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 (GMEB1) interacts with the de-ubiquitinase USP40 to stabilize CFLAR L and inhibit apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1182-3>
4. Bailey, J., Oliveri, A., & Levin, E. (2013). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nrm2831.BRCA1>
5. Bao, X., Song, H., Chen, Z., & Tang, X. (2012). Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 18(March), 1983–1990.
6. Beral, V., Bull, D., Doll, R., Peto, R., Reeves, G., Skegg, D., Colditz, G., Hulka, B., La Vecchia, C., Magnusson, C., Miller, T., Peterson, B., Pike, M., Rookus, M., & Thomas, D. (2001). Familial breast cancer: Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet*, 358(9291), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06524-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06524-2)
7. Bodine, P. V. N. (2008). Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Research*, 18(2), 248–253. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.13>
8. Bourgeois, P., Stoetzel, C., Bolcato-Bellemin, A. L., Mattel, M. G., & Perrin-

- Schmitt, F. (1996). The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its marine M-twist counterpart. *Mammalian Genome*, 7(12), 915–917. <https://doi.org/10.1007/s003359900269>
9. Bücken, L., & Lehmann, U. (2022). CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a Long and Twisted Story. *Cancers*, 14(18), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers14184377>
 10. Chen, C., Lin, H. G., Yao, Z., Jiang, Y. L., Yu, H. J., Fang, J., & Li, W. N. (2023). Transcription factor glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 promotes hepatocellular carcinoma progression by activating Yes-associate protein 1. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 15(6), 988–1004. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v15.i6.988>
 11. Chen, F., Alphonse, M., & Liu, Q. (2020). Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), 1–14. <https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
 12. Cheng, H., Zhang, F., & Ding, Y. (2021). Crispr/cas9 delivery system engineering for genome editing in therapeutic applications. *Pharmaceutics*, 13(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101649>
 13. Cheng, X., Deng, X., Zeng, H., Zhou, T., Li, D., & Zheng, W. V. (2023). Silencing of TMED5 inhibits proliferation, migration and invasion, and enhances apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 32(6), 677–688. <https://doi.org/10.17219/acem/156673>
 14. Daly, M. B., Pilarski, R., Axilbund, J. E., Berry, M., Buys, S. S., Crawford, B., Farmer, M., Friedman, S., Garber, J. E., Khan, S., Klein, C., Kohlmann, W., Kurian, A., Litton, J. K., Madlensky, L., Kelly Marcom, P., Merajver, S. D., Offit, K., Pal, T., ... Darlow, S. (2016). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. *JNCCN-Journal of the National Comprehensive Cancer Network* |, 14(2), 153–162. <http://education.nccn.org/node/78021>;
 15. 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>
16. Dong, B., & Wu, Y. (2021). Epigenetic regulation and post-translational modifications of snail in cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms222011062>
 17. Ekmekci, S. S., Emrence, Z., Abacı, N., Sarıman, M., Salman, B., Ekmekci, C. G., & Güleç, Ç. (2020). Lef1 induces dhers2 gene expression in human acute leukemia jurkat t-cells. *Turkish Journal of Hematology*, 37(4), 226–233. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2020.2020.0144>
 18. F.A., K., N.S., P., H., C.-J., Z., A., M., J., A., Z., F.A., K., M.R., H., & Z., S. (2016). CRISPR/Cas9 therapeutics: A cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*, 7(32), 52541–52552.
 19. 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>
 20. Grau, Y., Carteret, C., & Simpson, P. A. T. (1984). *MUTATIONS AND CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS*. 347–360.
 21. Han, G. H., Yun, H., Chung, J. Y., Kim, J. H., & Cho, H. (2022). TMED9 Expression Level as a Biomarker of Epithelial Ovarian Cancer Progression and Prognosis. *Cancer Genomics and Proteomics*, 19(6), 692–702. <https://doi.org/10.21873/cgp.20352>
 22. Han, S. P., Kim, J. H., Han, M. E., Sim, H. E., Kim, K. S., Yoon, S., Baek, S. Y., Kim, B. S., & Oh, S. O. (2011). SNAIL is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(3), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9643-4>
 23. He, S., Lu, Y., Liu, X., Huang, X., Keller, E. T., Qian, C. N., & Zhang, J. (2015). Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chinese journal of cancer*, 34(12), 554–562. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0052-4>
 24. Horodecka, K., & Dühler, M. (2021). Crispr/cas9: Principle, applications, and delivery through extracellular vesicles. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22116072>
25. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
 26. Jones, S. E. (2008). Metastatic breast cancer: The treatment challenge. *Clinical Breast Cancer*, 8(3), 224–233. <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.025>
 27. Ju, G., Xu, C., Zeng, K., Zhou, T., & Zang, L. (2021). High expression of transmembrane P24 trafficking protein 9 predicts poor prognosis in breast carcinoma. *Bioengineered*, 12(1), 8965–8979. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1990673>
 28. Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>
 29. Kawabe, K., Lindsay, D., Braitch, M., Fahey, A. J., Showe, L., & Constantinescu, C. S. (2012). IL-12 inhibits glucocorticoid-induced T cell apoptosis by inducing GMEB1 and activating PI3K/Akt pathway. *Immunobiology*, 217, 118–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.018>
 30. Khales, S. A., Mozaffari-Jovin, S., Geerts, D., & Abbaszadegan, M. R. (2022). TWIST1 activates cancer stem cell marker genes to promote epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10252-9>
 31. Kim, Y. I., Lee, A., Lee, B. H., & Kim, S. Y. (2011). Prognostic significance of syndecan-1 expression in cervical cancers. *Journal of Gynecologic Oncology*, 22(3), 161–167. <https://doi.org/10.3802/jgo.2011.22.3.161>
 32. KirikoshiH, Sekihara, H., & Katoh, M. (y.y.). *Expression of WNT14 and WNT14B mRNAs in human cancer, up-regulation of WNT14 by IFNgamma and*

up-regulation of WNT14B by beta-estradiol.

33. Kotsaris, G., Kerselidou, D., Koutsoubaris, D., Constantinou, E., Malamas, G., Garyfallos, D. A., & Hatzivassiliou, E. G. (2020). TRAF3 can interact with GMEB1 and modulate its anti-apoptotic function. *Journal of Biological Research (Greece)*, 27(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40709-020-00117-2>
34. Li, J., & Zhou, B. P. (2011). Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-49>
35. Li, Z., Liu, H., Bode, A., & Luo, X. (2021). Emerging roles of dehydrogenase/reductase member 2 (DHRS2) in the pathology of disease. *European Journal of Pharmacology*, 898, 173972. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2021.173972>
36. Li, Z., Tan, Y., 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>
37. Liao, S., Liu, C., Zhu, G., Wang, K., Yang, Y., & Wang, C. (2020). Relationship between SDC1 and cadherin signalling activation in cancer. *Pathology Research and Practice*, 216(1), 152756. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152756>
38. Liu, Y. M., Ge, J. Y., Chen, Y. F., Liu, T., Chen, L., Liu, C. C., Ma, D., Chen, Y. Y., Cai, Y. W., Xu, Y. Y., Shao, Z. M., & Yu, K. Da. (2023). Combined Single-Cell and Spatial Transcriptomics Reveal the Metabolic Evolvment of Breast Cancer during Early Dissemination. *Advanced Science*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.1002/advs.202205395>
39. Luo, S., Su, T., Zhou, X., Hu, W.-X., & Hu, J. (2022). *Chromosome 1 instability in multiple myeloma: Aberrant gene expression, pathogenesis, and potential therapeutic target.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.202200354>
40. 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 and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-019->

1301-1

41. Mei, Y., Zhao, L., & Zhou, N. (2025). SDC1 is a critical transmembrane proteoglycan in breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology* , 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12957-025-03840-z>
42. Mi, B., & Li, C. (2025). TMED9: a potential therapeutic target and prognostic marker in glioma and its implications across pan-cancer contexts. *Frontiers in Immunology*, 16(March), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1558881>
43. Mishra, S., Bernal, C., Silvano, M., Anand, S., & Ruiz i Altaba, A. (2019). The protein secretion modulator TMED9 drives CNIH4/TGF α /GLI signaling opposing TMED3-WNT-TCF to promote colon cancer metastases. *Oncogene*, 38(29), 5817–5837. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0845-z>
44. Nakagawa, T., Tsuruma, K., Takashi, U., & Nomura, Y. (2008). *GMEB1, a novel endogenous caspase inhibitor, prevents hypoxia- and oxidative stress-induced neuronal apoptosis.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.023>
45. Nieto, M. A. (2002). *THE SNAIL SUPERFAMILY OF ZINC-*. 3(March). <https://doi.org/10.1038/nrm757>
46. Nusse, R., & Varmus, H. (2012). Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO Journal*, 31(12), 2670–2684. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.146>
47. Nusse, R., & Varmus, H. E. (y.y.). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*.
48. 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*, 131(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.210724>
49. Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. İçinde *Breast Cancer* (C. 5,

Sayı 10, ss. 31–42). Exon Publications.
<https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/breast-cancer-subtypes>

50. Pashirzad, M., Fiuji, H., Khazei, M., Moradi-Binabaj, M., Ryzhikov, M., Shabani, M., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2019). Role of Wnt3a in the pathogenesis of cancer, current status and prospective. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5609–5616. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04895-4>
51. Pastor-Cantizano, N., Montesinos, J. C., Bernat-Silvestre, C., Marcote, M. J., & Aniento, F. (2016). P24 Family Proteins: Key Players in the Regulation of Trafficking Along the Secretory Pathway. *Protoplasma*, 253(4), 967–985. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0858-6>
52. Pastorino, G. A., Sheraj, I., Huebner, K., Ferrero, G., Kunze, P., Hartmann, A., Hampel, C., Husnugil, H. H., Maiuthed, A., Gebhart, F., Schlattmann, F., Gulec Taskiran, A. E., Oral, G., Palmisano, R., Pardini, B., Naccarati, A., Erlenbach-Wuenssch, K., Banerjee, S., & Schneider-Stock, R. (2024). A partial epithelial-mesenchymal transition signature for highly aggressive colorectal cancer cells that survive under nutrient restriction. *Journal of Pathology*, 262(3), 347–361. <https://doi.org/10.1002/path.6240>
53. Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
54. Pitzer, L. M., Moroney, M. R., Nokoff, N. J., & Sikora, M. J. (y.y.). *WNT4 Balances Development vs Disease in Gynecologic Tissues and Women's Health*. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab093>
55. Pius, O., & Nkem, A. (2025). *Journal of Global Biosciences Review Paper BREAST CANCER – REVIEW. March 2022*.
56. Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C., & Xu, J. (2012). Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research*, 22(1), 90–106. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.144>

57. Ram, P. T., Kiefer, T., Silverman, M., Song, Y., Brown, G. M., & Hill, S. M. (1998). Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 141(1–2), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00095-1)
58. Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 101(4), 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>
59. Şakar, D. N. (2023). *MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNİN UBİKİTİN LİGAZ GENLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*.
60. Salman Yaylaz, B. (2024). *MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNİN ROL OYNADIĞI MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN İNCELENMESİ*.
61. Salman Yaylaz, B., Sırma Ekmekci, S., Çınar, S., Deniz, G., & Abacı, N. (2021). *DHRS2 is a potential marker of breast cancer metastasis*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101302>
62. Shafqat, N., Shafqat, J., Eissner, G., Marschall, H. U., Tryggvason, K., Eriksson, U., Gabrielli, F., Lardy, H., 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>
63. Shenoy, S. (2019). CDH1 (E-cadherin) mutation and gastric cancer: Genetics, molecular mechanisms and guidelines for management. *Cancer Management and Research*, 11, 10477–10486. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S208818>
64. Shimada, K., Nakamura, M., De Velasco, M. A., Tanaka, M., Oujii, Y., Miyake, M., Fujimoto, K., Hirao, K., & Konishi, N. (2010). Role of syndecan-1 (CD138) in cell survival of human urothelial carcinoma. *Cancer Science*, 101(1), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01379.x>
65. Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291–1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>

66. Siemens, H., Jackstadt, R., Hüntten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., & Hermeking, H. (2011). miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*, 10(24), 4256–4271. <https://doi.org/10.4161/cc.10.24.18552>
67. Singh, D. D., & Yadav, D. K. (2021). TNBC: Potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough, nanomedicine and immunotherapy. *Biomedicines*, 9(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080876>
68. Sottnik, J. L., Shackleford, M. T., Robinson, S. K., Villagomez, F. R., Bahnassy, S., Oesterreich, S., Hu, J., Madak-Erdogan, Z., Riggins, R. B., Corr, B. R., Cook, L. S., Treviño, L. S., Bitler, B. G., & Sikora, M. J. (2024). WNT4 Regulates Cellular Metabolism via Intracellular Activity at the Mitochondria in Breast and Gynecologic Cancers. *Cancer Research Communications*, 4(1), 134–151. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.crc-23-0275>
69. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
70. Thiago, L. S., Costa, E. S., Lopes, D. V., Otazu, I. B., Nowill, A. E., Mendes, F. A., Portilho, D. M., Abreu, J. G., Mermelstein, C. S., Orfao, A., Rossi, M. I. D., & Borojevic, R. (2010). The Wnt signaling pathway regulates Nalm-16 b-cell precursor acute lymphoblastic leukemic cell line survival and etoposide resistance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.09.005>
71. Thwin, S. M., Malebary, S. J., Abulfaraj, A. W., & Park, H. S. (2024). Attention-Based Ensemble Network for Effective Breast Cancer Classification over Benchmarks. *Technologies*, 12(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/technologies12020016>
72. Twigg, S. R. F., & Wilkie, A. O. M. (1999). Characterisation of the human snail (SNAIL) gene and exclusion as a major disease gene in craniosynostosis. *Human Genetics*, 105(4), 320–326. <https://doi.org/10.1007/s004390051108>

73. Verstaeppe, J., & Berx, G. (2023). *A role for partial epithelial-to-mesenchymal transition in enabling stemness in homeostasis and cancer.*
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.02.001>
74. Vesuna, F., Paul van Diest, Chen, J. H., & Raman, V. (2009). *Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer.* 367(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.151>. Twist
75. Wang, H., Wang, Y., Tan, P., Liu, Y., Zhou, S., & Ma, W. (2024). Prognostic value and anti-tumor immunity role of TMED9 in pan-cancer: a bioinformatics study. *Translational Cancer Research*, 13(10), 5429–5445. <https://doi.org/10.21037/tcr-24-258>
76. Wang, J., Scholtens, D., Holko, M., Ivancic, D., Lee, O., Hu, H., Chatterton, R. T., Sullivan, M. E., Hansen, N., Bethke, K., Zalles, C. M., & Khan, S. A. (2013). Lipid metabolism genes in contralateral unaffected breast and estrogen receptor status of breast cancer. *Cancer Prevention Research*, 6(4), 321–330. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0304>
77. Wang, S. H., Li, N., Wei, Y., Li, Q. R., & Yu, Z. P. (2014). β -catenin deacetylation is essential for WNT-induced proliferation of breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 973–978. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1889>
78. Weigelt, B., Peterse, J. L., & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591–602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>
79. Xiao, L., Pi, X., Goss, A. C., El-Baba, T., Bazua-Valenti, S., Grinkevich, E., Keller, K., Morici, E., Padovano, V., Alimova, M., Alper, S. L., Carey, D., Udeshi, N. D., Carr, S., Chamberlain, B., Kornfilt, D. J. P., Wagner, F., Kazmirski, S. L., Kurumbail, R., ... Wu, H. (2024). *Molecular basis of TMED9 oligomerization and entrapment of misfolded protein cargo in the early secretory pathway.* 2221(September), 1–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adp2221>
80. Xu, J., Gao, F., Liu, W., & Guan, X. (2024). Cell-cell communication characteristics in breast cancer metastasis. *Içinde Cell Communication and*

- Signaling* (C. 22, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01418-4>
81. Yang, D., Li, Q., Shang, R., Yao, L., Wu, L., Zhang, M., Zhang, L., Xu, M., Lu, Z., Zhou, J., Huang, L., Huang, X., Cheng, D., Yang, Y., & Yu, H. (2020). WNT4 secreted by tumor tissues promotes tumor progression in colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01774-w>
 82. Yang, Y. C., Chien, M. H., Lai, T. C., Tung, M. C., Jan, Y. H., Chang, W. M., Jung, S. M., Chen, M. H., Yeh, C. N., & Hsiao, M. (2021). Proteomics-based identification of TMED9 is linked to vascular invasion and poor prognoses in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00727-5>
 83. Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019a). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 55(April 2018), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
 84. Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019b). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 55(March 2018), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
 85. Zhang, Qi, Bai, X., Chen, W., Ma, T., Hu, Q., Liang, C., Xie, S., Chen, C., Hu, L., Xu, S., & Liang, T. (2013). Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling. *Carcinogenesis*, 34(5), 962–973. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt027>
 86. Zhang, Quanlong, Pan, Y., Ji, J., Xu, Y., Zhang, Q., & Qin, L. (2021). Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review. *Cell Death Discovery*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00668-w>
 87. Zhao, S., Ma, D., Xiao, Y., Li, X.-M., Ma, J.-L., Zhang, H., Xu, X.-L., Lv, H., Jiang, W.-H., Yang, W.-T., Jiang, Y.-Z., Zhang, Q.-Y., & Shao, Z.-M. (2020). Molecular Subtyping of Triple-Negative Breast Cancers by

- Immunohistochemistry: Molecular Basis and Clinical Relevance. *The Oncologist*, 25(10), e1481–e1491. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0982>
88. Zhou, Y., Wang, L., Ban, X., Zeng, T., Zhu, Y., Li, M., Guan, X. Y., & Li, Y. (2018). DHRS2 inhibits cell growth and motility in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 37(8), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.383>
89. Zhu, Y. (2022). Advances in CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>



HAM VERİLER

FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNDE MEYDANA GELEN
EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 7	% 6	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	% 1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
5	Polat, Büşra. "Meme Kanserinde Hippo Sinyal Yolağı Üzerinde Yer Alan nos1ap'ın Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) Süreci İle Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2023 Yayın	<% 1
6	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Kaban, Kübra. "BCL-2 Hedefli# Sirna Yüklü Nk-kaynakli Eksozomların Olusturulması ve Meme Kanseri#nde Etki#nlili#ğil#nili#n Arastirilmesi.", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2023 Yayın	<% 1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)	<% 1