

DAMLA NUR ŞAKAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNİN UBİKİTİN LİGAZ
GENLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DAMLA NUR ŞAKAR

**DANIŞMAN
PROF. DR. NESLİHAN ABACI**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2023

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce yüksek lisans eğitimim boyunca araştırma yapmamı her koşulda destekleyen, fikirlerimi somut hale işlememde yardımcı olan, kendisinin rehberliğinde çalışmamı sağlayan, değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Neslihan Abacı ‘ya, bilgi birikiminden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci’ye çok teşekkür ederim.

Bu süreç içerisinde birlikte çalışma fırsatı bulduğum, fikirlerini her zaman önemsettiğim tez sürecimin tamamında yanımda olan, her anlamda desteğini içten hissettiğim Msc. Burcu Salman Yaylaz’a

Motivasyonundan, deneyiminden, bilgisinden, manevi desteğinden yararlandığım sevgili hocam Dr. Zeliha Emrence ve bu süreçte tez deneylerim boyunca yardımlarını eksik etmeyen, yüksek lisans sürecimin her anının bir o kadar keyifli geçmesini sağlayan, çok değer verdiğim MSc. Şeyma Punar ve Berk İleri başta olmak üzere tüm Genetik LAB2 ailesine; Doç Dr. Ferda Paçal, Dr. Aris Çakiris, MSc. Elif Nur Bozdağ, Büneyan Tüzün, Bahadır Kasap, MSc. Duygu Bağcıcek ve MSc. İrem Coşkun’a

Çok değerli arkadaşlarım; Hazal Gizem Bozbeyoğlu, Gülce Oğuz, Aleyna Tekeli, Vidit Goyal’e yardımları ve destekleri için, Ali Bozaba’ya ise bu süreçte ki sabrı ve desteği için çok teşekkür ediyorum.

Son olarak aldığım her kararda yanımda yer alan, yalnızca tez sürecinde değil hayatımın her alanında desteklerini sonsuz hissettiğim, haklarını asla ödeyemeceğim annem Selma Şakar’a ve babam Süleyman Şakar’a, bende ki emeği çok büyük olan sevgili ablam Buse Yağmur Şakar’a ve biricik kardeşim, en büyük destekçim Zeynep Şakar’a teşekkür ederim.

“Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı” çerçevesinde tarafıma karşılıksız burs sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38259

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Meme Kanserinin Tanımı	3
2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.1.3. Meme Kanseri Patofizyolojisi ve Prognozu.....	4
2.1.4. Meme Kanserinin Etiyolojisi	4
2.1.5. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri	5
2.2. SDR Ailesi ve DHRS2 Geni	7
2.2.1. SDR Ailesi	7
2.2.2. DHRS2 Geni	7
2.2.2.1. DHRS2'nin Yapısı ve Organel Lokalizasyonu.....	7
2.2.2.2. DHRS2'nin Fonksiyonu.....	8
2.2.3. MDM2 ve TP53 Genleri	10
2.2.3.1. TP53	10
2.2.3.2. MDM2.....	11
2.3. Post-Translasyonel Modifikasyonlar	12
2.3.1. Ubikitinasyon ve Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)	13
2.4. Ubikitin E3 Ligazlar ve Sınıflandırması	14
2.4.1. Ring Tipi E3 Ligazlar	14
2.4.2. HECT Tipi E3 Ligazlar.....	15
2.4.3. U-box Tipi E3 Ligazlar	15

2.4.4. RBR Tipi E2 Ligazlar	15
2.5. Ubikitin E3 Ligazların Aktivasyonu	16
2.6. FBXW7, CCNE1, MYC, TRIM6, STUB1, TRUSS, BRCA1, BRCA2, BARD1 Genleri.....	17
2.6.1. FBXW7	17
2.6.2. CCNE1	18
2.6.3. c-MYC	19
2.6.4. TRIM6.....	20
2.6.5. STUB1	21
2.6.6. TRUSS	21
2.6.7. BRCA1, BRCA2 ve BARD1	22
2.6.8. Aday Genlerin Pathway Üzerindeki Etkileşimi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Kullanılan Hücre Soyları	25
3.1.2. Cihazlar	26
3.1.3. Kitler	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Optimizasyon Deneyleri	28
3.2.1.1. Uygulanacak Primer Miktarının ve Tm Derecelerinin Belirlenmesi	28
3.2.1.2. DHRS2 Gen Anlatımı Arttırılan ve Baskılanan Örneklerin Seçimi	28
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	29
3.2.3. RNA Miktarlarının ve Kalitelerinin Ölçümlenmesi.....	29
3.2.4. cDNA Sentezi	30
3.2.5. Primerlerin Tasarımı	31
3.2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR)	33
3.2.7. qRT-PCR yöntemi ile 10 Aday Genin İfadesinin Baskılanmasının ve Artışının Kantitatif Olarak Belirlenmesi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. DHRS2 Gen İfadesinin Arttırılması Sonucunda Aday Genlerdeki Değişim Sonuçları	37
4.1.1. Vektör Grubu	37
4.1.1.1. MCF-7 Hücre Hattı Vektör Grubu	38

4.1.1.2. T47D Hücre Hattı Vektör Grubu	39
4.1.1.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı Vektör Grubu	40
4.1.1.4. MCF-10A Hücre Hattı Vektör Grubu	41
4.2. DHRS2 Gen İfadesinin Baskılanma Sonuçları	42
4.2.1. siRNA Grubu	42
4.2.1.1. MCF-7 Hücre Hattı siRNA Grubu	43
4.2.1.2. T47D Hücre Hattı siRNA Grubu	44
4.2.1.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı siRNA Grubu	45
4.2.1.4. MCF-10A Hücre Hattı siRNA Grubu	46
4.3. siRNA ve Vektör Grubu Network Analizi.....	47
4.3.1. MCF-10A Hücre Hattı Network Analizi	48
4.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattı Network Analizi	49
4.3.3. T47D Hücre Hattı Network Analizi.....	50
4.3.4. MCF-7 Hücre Hattı Network Analizi	51
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	57
HAM VERİLER	68
FORMLAR	69
PATENT HAKKI İZNİ	70
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1:Meme kanseri oluşumundaki risk faktörleri (11).....	4
Tablo 2-2: Kanser tiplerinde DHRS2'nin rolü (20).....	9
Tablo 3-1:Meme kanseri reseptör durumları ve moleküler alt tipleri.....	25
Tablo 3-2:Aday genlerin normalizasyon sıcaklıkları.....	28
Tablo 3-3:cDNA reaksiyon karışımı.....	30
Tablo 3-4: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	31
Tablo 3-5:STUB1, BRCA1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, TRUSS, BARD1, MYC, MDM2, DHRS2,CCNE1 genlerine özgü tasarlanan primer dizileri	32
Tablo 3-6:Kuyu başı qRT-PCR reaksiyon karışımı.....	34
Tablo 3-7: Real Time PCR koşulları	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme tümörü moleküler alt tiplerinin özeti (18).....	6
Şekil 2-2:Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki mevcut alt tiplere şemalarının karşılaştırılması (MBC:metaplastik meme kanseri) (15)	7
Şekil 2-3: DHRS2 geninin genomdaki lokasyonu , ekzonları ve protein yapısı (23–25)	8
Şekil 2-4: TP53 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (34,35)	10
Şekil 2-5: TP53 Network (37)	11
Şekil 2-6: MDM2 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (40,41)	11
Şekil 2-7: TP53'ün MDM2 tarafından düzenlenmesi (42)	12
Şekil 2-8: Ubikitinin yapısı (48)	13
Şekil 2-9: Ubikitin-proteazom sisteminin (UPS) üç aşaması (52).....	14
Şekil 2-10:Ubikitin Ligaz Tipleri (59).....	16
Şekil 2-11: <i>HECT</i> ve <i>RING</i> ligazlarının mekanizmaları (65).....	16
Şekil 2-12: FBXW7 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (68,69)	17
Şekil 2-13: CCNE1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (78,79)	18
Şekil 2-14: c-MYC geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (90,91).....	19
Şekil 2-15: MYC Yapısı (93).....	20
Şekil 2-16: TRIM6 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (96,97)	20
Şekil 2-17: STUB1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (98,99).....	21
Şekil 2-18:TRUSS geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (101,102).....	22
Şekil 2-19:BRCA1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (104,105)	22
Şekil 2-20: BRCA2 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (106,107)	22
Şekil 2-21: String veri tabanında MYC-MDM2-TP53 yolağı üzerinden DHRS2 geninin aday genler ile etkileşimi	24
Şekil 3-1: Örneklere ait amplifikasyon eğrileri ve standart eğri.....	36
Şekil 4-1: Vektör grubu qRT-PCR ekspresyon sonuçları.....	37
Şekil 4-2:MCF-7 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları	38
Şekil 4-3:T47D hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları	39

Şekil 4-4:MDA-MB-231 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları.....	40
Şekil 4-5: MCF-10A hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları	41
Şekil 4-6: siRNA grubu qRT-PCR ekspresyon sonuçları.....	42
Şekil 4-7: MCF-7 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday..	43
Şekil 4-8:T47D hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları	44
Şekil 4-9: MDA-MB-231 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları.....	45
Şekil 4-10: MCF10-A hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları	46
Şekil 4-11: MCF10A grubuna ait network analizi.....	48
Şekil 4-12: MDA-MB-231 grubuna ait network analizi.....	49
Şekil 4-13: T47D grubuna ait network analizi.....	50
Şekil 4-14: MCF7 grubuna ait network analizi	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BARD1	BRCA1 ile ilişkili RING domain proteini
BRCA1	Meme Kanseri 1
BRCA2	Meme Kanseri 2
CCNE1	Siklin E
c-MYC	MYC-protoonkogen
Cullins	hidrofobik protein grubu
DHRS2	Dehidrogenaz/Redüktaz 2
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Çift Zincirli Ribonükleik Asit
E3	Ubikitin Ligaz
ER	Östrojen Reseptörü
ETV5	Ets-varyant gen5
FBXW7	F-box/WD repeat domain protein 7
HECT	E6-AP Karboksil Terminaline Homolog
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
MBC	Metaplastik meme kanseri
MCF-10A	İnsan meme hücre hattı
MCF-7	İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
MDA-MB-231	Metastatik meme kanseri hücre hattı

MDM2	E3 ubiquitin protein ligaz
T47D	İnsan meme kanseri hücre hattı
TBP	Tata Bağlama Proteinini
TRIM6	Üçlü motif içeren protein 6
TRUSS	Trpc4 ile ilişkili protein
TP53	Protein 53
RING finger	RING finger domain
RNA	Ribonükleik asit
SDR	Kısa zincirli dehidrogenaz redüktaz
siRNA	Small interfering RNA
STUB1	STIP homology and U box containing protein 1
PTM	Post translasyonel modifikasyon
qRT-PCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir
ROS	Reaktif oksijen türleri
PR	Progesteron Reseptörü
NTC	Transfekte olmayan hücre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
UPS	Ubikitin-Proteozom sistemi
TSG	Tümör baskılayıcı gen
ul	Mikrolitre
MEC	Meme epitel hücreler
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transfer

ÖZET

Şakar, D.N Meme Kanseriinde DHRS2 Geninin Ubikitin Ligaz Genleri ile İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2023

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. TP53 kanser araştırmalarında sıklıkla çalışılan tümör baskılayıcı gendir. MDM2, TP53'ün bir E3 ubikitin ligazı olarak görev yapar ve poliubikitinleşmeyi katalize eder. DHRS2, Mdm2'yi baskılayarak TP53'ü düzenler. Ubikitinasyon, protein degradasyonunda rol alır ve E1-E2-E3 enzim kaskadı tarafından gerçekleştirilir: Çalışmamızda MCF7, T47D, MCF10A ve MDA-MB-231 olmak üzere dört farklı insan meme hücre hattı kullanıldı. Önceki çalışmamızda hücre hatlarındaki DHRS2 geninin ekspresyonu gen spesifik siRNA ile susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overeksprese edilmiştir. Bu örneklerden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. qRT-PCR kullanılarak $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile ekspresyon değerleri belirlendi. DHRS2 mRNA seviyesindeki değişim diğer ubikitin genleri üzerinde araştırıldı. MDA-MB-231 vektör grubunda STUB1 kontrol grubuna kıyasla yüksek ekspresyon gösterirken BRCA2'nin ifadesi ciddi oranda azaldı. MCF7 hücre hattı vektör grubunda BRCA1 ve MYC genlerinin ifadesi kayda değer ekspresyon artışı gösterirken buna kıyasla STUB1 ve BARD1'in ifadesi kontrol grubuna göre ciddi oranda azaldı. T47D vektör grubunda MYC ifadesi en yüksek seviyede artarken STUB1'in ifadesi önemli ölçüde azaldı. DHRS2 ifadesi MCF7 siRNA grubunda baskılandığında MYC ifadesi yüksek oranda ekspresyon gösterdi. MDA-MB-231 siRNA grubunda TRIM6 dışında ifadesi azalan gen tespit edilmedi. Hücre hatlarının RNAi/vektör uygulaması etkisiyle birçok spesifik genomik değişiklik oluşturduğu düşünülerek hedef genlerimizin farklı davrandığı belirlendi. Bu tez çalışması, DHRS2 ile çoklu hücre içi ubikitin genlerinin ilişkisini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Hücre Hatları, DHRS2, Ubikitin Ligaz Genleri, Ubikitinasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38259

ABSTRACT

Şakar, D.N Investigation of the Association of DHRS2 Gene with Ubiquitin Ligases Genes in Breast Cancer. .İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis. İstanbul. 2023

Breast cancer is the most abundant cancer type within the women worldwide. TP53 is the widely-studied tumor suppressor gene. The E3 ubiquitin ligase of TP53, known as MDM2, catalyzes the polyubiquitination. DHRS2 regulates TP53 via suppressing Mdm2. Ubiquitination has a role in protein degradation and the capability of E1-E2-E3 enzyme cascade. MCF7, MCF10A, T47D, and MDA-MB-231 are human breast cell lines used in this thesis. The expression of the DHRS2 gene in cell lines was silenced beforehand by gene-specific siRNA and overexpression with the DHRS2 expression vector. Followingly, total RNA isolation, cDNA synthesis were performed. Expression values were determined by the $\Delta\Delta CT$ equation using qRT-PCR. Alterations in DHRS2 mRNA level were investigated on other ubiquitin genes. In the MDA-MB-231 vector group, STUB1 showed high expression in contrast with the control group, while the expression of BRCA2 was noteworthy declined. The expression of the BRCA1 and MYC genes in the MCF7 cell line vector group indicated a remarkable increase whereas the STUB1 and BARD1 expressions were significantly diminished. MYC expression was highest in the T47D vector group, while the expression of STUB1 was considerably reduced. When DHRS2 expression was repressed in the MCF7 siRNA group, MYC expression was highly expressed. No diminished gene was detected in the MDA-MB-231 siRNA group, except for TRIM6. It has been determined that our target genes behave differently, considering that cell lines produce many specific genomic changes due to the effect of RNAi/vector application. This thesis demonstrates the correlation between DHRS2 and multiple intracellular ubiquitin genes.

Key words: Breast Cancer, Cell Lines, DHRS2, Ubiquitin Ligases Genes, Ubiquitination

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 38259

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık karşılaşılan kanserlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada bulunmaktadır. 2050 yılına kadar dünya genelinde kadınlarda meme kanseri insidansının yılda neredeyse 3,2 milyon yeni vakaya yaklaşacağı tahmin edilmektedir. Meme kanseri günümüzde, farklı biyolojik alt tiplerden oluşan ve farklı belirtileri olan bir hastalıktır. Çeşitli klinik, patolojik ve moleküler özellikler çerçevesinde değerlendirilen birden fazla faktörün sebebiyet verdiği bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte bazı vakalar iyi prognozla yavaş ilerleme gösterirken, bazı vakalar agresif bir klinik izlemektedir.

Ubikitin ligazlar ubikitin aktive edici bir enzim (E1), ubikitin-konjugasyon enzimi (E2) ve ubikitin ligaz (E3) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. E3 grubunun çoğu, E6 ile ilişkili protein (E6-AP), COOH terminus (HECT) bölge homolog veya RING finger bölge içerir. Tüm HECT bölgesi ve bazı RING finger E3'leri bağımsız olarak işlev görebilmesine rağmen, bazı RING finger proteinleri Cullins ve F-Box gibi bir kaç başka protein ile E3 kompleksleri oluşturur. HECT bölgesi içeren proteinler, ubikitin ile tiyol ara ürünleri oluşturabilir ve bağımsız E3'ler olarak işlev görebilir. Ubikitin ligazların en büyük alt ailesini RING finger E3'ler oluşturur. MDM2, BRCA1, BARD1 gibi birçok RING finger E3'ünün meme karsinogenezinde önemli roller oynadığı öne sürülmüştür. F-Box Proteinleri ise protein-protein etkileşim bölgesi içerir. SCF kompleksleri için substrat tanımayla aracılık eder.

DHRS2 (Hep27) önemli bir protein olarak bilinen, kısa zincirli alkol dehidrojenaz/redüktaz (SDR) enzim ailesinin bir üyesidir. DHRS2 geni, E3 ubikitin ligazlardan biri olan MDM2 homologunun bir inhibitörü olarak görev yapar. Çekirdekteki MDM2'nin merkezi alanına bağlanır ve MDM2'nin E3 ubikitin ligaz aktivitesini inhibe eder, böylece hücrede TP53'ün işlevinin stabilize edilmesini sağlar. Mdm2-TP53 stres cevap yolu, hücrel homeostazın önemli bir düzenleyicisi olarak rol alır.

Çeşitli mitojenik ve genotoksik stres faktörleri, hücre döngüsü durması, apoptoz, DNA onarımı veya replikatif yaşlanma birlikte TP53'e etki eder, TP53 koruyucu görev görerek bu faktörlerin etkisini hücrede önlemede rol alır.

Bununla birlikte onkojenik aktivitenin izlenmesinde TP53'ün belirgin işlevi göz önüne alındığında, aşırı eksprese edilen Myb'inde DHRS2'ye bağlı bir şekilde TP53'ü stabilize ettiği ortaya çıkmıştır. DHRS2, proto-onkogen c-Myb tarafından transkripsiyon seviyesinde düzenlenir ve c-Myb kaynaklı TP53 stabilizasyonu için gereklidir. Sürekli onkojenik aktivitenin izlenmesinde TP53'ün rolüyle uyumlu olarak, yüksek c-Myb aktivitesi, DHRS2 ekspresyon seviyelerini artırabilir, bu da DHRS2'nin daha fazla nükleer birikimine ve dolayısıyla TP53 stabilizasyonunun artmasına neden olur. Bir çok kanser tipinde c-Myb'nin düzenlenmesinde ubiquitin-proteazom sisteminin önemli bir rol üstlendiği ortaya konmuştur. c-Myc dahil olmak üzere bir dizi insan geninin promotör bölgelerinde c-Myb bölgeleri içerdiği bildirilmiştir. Ubikitin-proteazom sistemi yoluyla c-Myc protein stabilitesinin düzenlenmesinde birden fazla E3 ligaz yer alır. c-Myc protein stabilitesinin düzenlenmesinde görevli E3 ligazlara örnek olarak; BRCA1, STUB1, FBXW7, BARD1, MDM2 verilebilir.

Bu tez çalışmasında MCF-7, MDA-MB-231, T47D ve MCF-10A meme hücre hatları kullanıldı. Belirtilen hücre hatlarında laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada, DHRS2 geninin ekspresyonu gene özgü siRNA ile susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overekspre edilmiştir. Aday genlerin ekspresyon seviyeleri 3 farklı meme kanseri hücre hattında ve kontrol grubu olarak rol alan fibrokistik meme hücre hattında karşılaştırıldı. Bu çalışmada, DHRS2 ile birtakım onkogen ve tümör baskılayıcı genlere etki eden ubiquitin ligaz yolları üzerindeki genlerin etkileşiminin araştırılması amaçlandı. Aday genlerin meme kanseri üzerindeki etkileri araştırılarak tanı ve tedavide biyobelirteç olarak kullanılabilecek genler açığa çıkarılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Meme Kanserin Tanımı

Kanser, kontrolsüz büyüyen hücrelerin neden olduğu karmaşık bir hastalık olarak nitelendirilmektedir. Kontrolsüz hücre büyümesinin, çoklu hücresel düzenleyici görevi gören sistemlerde biriken mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Anormal hücrelerin birikmesi sonucunda, tümör adı verilen bir doku kütlesi oluşur. Tümör iyi huylu veya kötü huylu özelliklere sahip olabilir. İyi huylu tümörler vücuda yayılmaz. Kötü huylu tümörler, iyi huylu tümörlerin aksine, çevredeki sağlıklı dokuları istila etme (invazyon) ve lenfatik veya dolaşım sistemleri yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılma (metastaz) yeteneğine sahiptir (1).

Kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni haline gelen meme kanseri kadınlarda sıkça görülmektedir. Bir dizi morfolojik ve moleküler alt tipten oluşan heterojen bir hastalıktır (2). Tüm insan kanserlerinin %90'ı karsinomdur (1). Genelde memede bulunan tümörler, karsinom olarak nitelendirilen meme bezlerinin, epitel hücrelerinin malignitesidir. Meme kanserleri memede oluştukları yere göre iki grupta incelenir. Duktal karsinom duktal dokuda meydana gelir, lobüllerde meydana gelenler lobüler karsinomdur.

2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya çapında meme kanseri, kadın kanserlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır ve mortalite-insidans oranı %15'tir (3). Dünya çapında görülme sıklığı 27/100.000 (Afrika ve Doğu Asya) ile 97/100.000 (Kuzey Amerika) arasında değişmektedir. Meme kanseri insidansı ile ekonomik gelişmişlik derecesi bağlantılıdır, bu bağlamda sosyal yaşam ve yaşam tarzı faktörleri arasında ilişki bulunmaktadır (4). Dünya'da meme kanseri çok yaygın görülmekte olup ölüm oranları toplumlara göre farklılık göstermektedir. Ekonomik refahın yüksek olduğu toplumlarda erken tanı ve tedavi sayesinde meme kanserindeki mortalite düşmektedir (5,6).

2.1.3. Meme Kanseri Patofizyolojisi ve Prognozu

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'u, ülkeye ve etnik kökene göre farklılık göstermekle birlikte, genetik yatkınlık veya aile öyküsü önemlidir. Meme kanseri ile ilişkili en yaygın *germline* mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 genlerinde bulunmaktadır ve bu genlerde görülen mutasyonların kümülatif riski yaşam boyunca yaklaşık %70'tir (7,8).

“Erken meme kanserinin prognozuna bakıldığında; Evre 0 ve Evre I'in her ikisi de beş yıllık sağkalım %100'dür. Evre II ve evre III meme kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı sırasıyla yaklaşık %93 ve %72'dir. Hastalık sistemik olarak yayıldığında prognoz ciddi oranda kötüleşir. Evre IV meme kanseri hastalarının sadece %22'si tanıdan 5 yıl sonrasına kadar hayatta kalır” (9).

2.1.4. Meme Kanserinin Etiyolojisi

Meme kanseri vakalarının büyük bir kısmı hamilelikle ilişkili faktörlerle, hormonal tedaviyle, yaşam tarzı faktörleriyle (obezite, alkol alımı, düşük lifli diyet ve sigara içme) ve diğer risk faktörleriyle ilişkilendirilebilir (Tablo 2-1) (10).

Tablo 2-1:Meme kanseri oluşumundaki risk faktörleri (11)

Meme Kanseri Oluşumundaki Risk Faktörleri
Yaşlanma
Genetik mutasyonlar (örneğin, BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51, vb.)
Ailede kanser öyküsü, özellikle meme, yumurtalık, pankreas ve prostat
Meme lezyonlarının kişisel öyküsü - Proliferatif olmayan lezyonlar - Atipisiz proliferatif lezyonlar - Yüksek riskli lezyonlar (yani, atipik duktal hiperplazi ve lobüler intraepitelyal neoplazi) - Meme kanseri (duktal karsinom in situ, invaziv meme kanseri)
Tip II diyabet
Geç gebelik faktörleri
Düşük doğum sayısı veya gebelik olmaması
Obezite

Diyet içeriği (örneğin, yüksek yağ ve düşük lif)
Steroid hormonlara maruziyet - İklimsel semptomlar için hormonal tedavi - Oral hormonal kontraseptifler
Düşük fiziksel aktivite

Yüksek gelirli ülkelerde, meme kanseri vakalarının üçte birinden fazlasının yaşam tarzında değişikliğe gidilmesi durumunda, önlenabilir olduğu görülmektedir (10). Oral hormonal kontraseptif kullanımının meme kanseri riskini artırıp artırmadığı tartışma konusudur ancak risk küçüktür ve artmış ölüm riski ile ilişkili olmadığı öngörülmektedir (12). Ancak menopozal hormon tedavisinin, kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı daha açık bir şekilde gösterilmiştir (13).

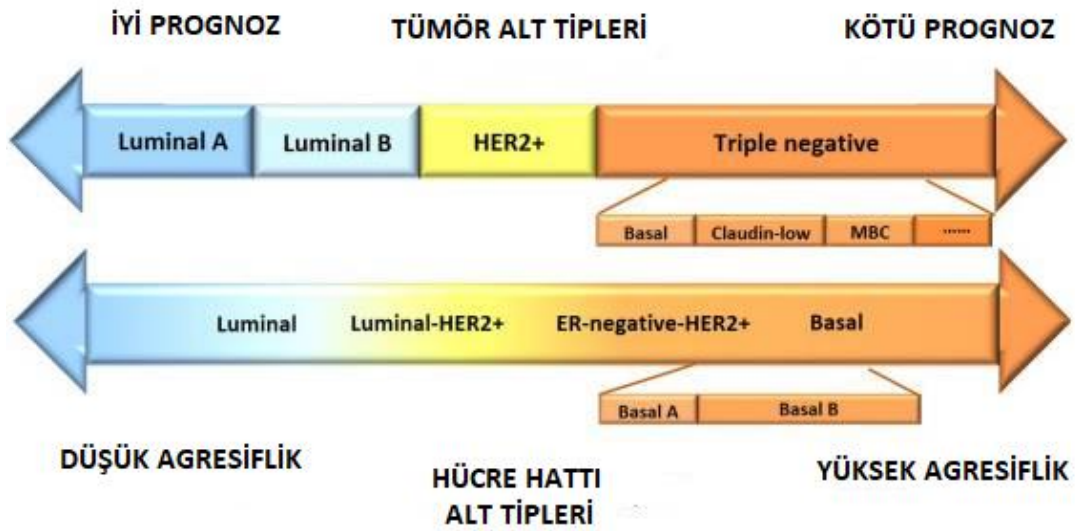
2.1.5. Meme Kanserin Moleküler Alt Tipleri

Meme kanseri çok heterojendir ve klinik olarak hormon reseptörü (ER ve PR) ve HER2 (ERBB2) durumuna göre üç ana alt tipe ayrılır: İlk luminal ER-pozitif ve PR-pozitif belirteçleridir ki bunlar luminal A ve B'ye olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Bu iki grupta birbirinden HER2 ve KI67 faktörleri ile ayrılır. HER2'nin overekspres olduğu; ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) diğer alt gruplardır (Şekil 2-1) (14). ER, PR ve HER2'nin üçlü negatif statüsüne sahip hücre hatları, çoğu literatürde bazal A ve bazal B hücre hatları olarak ayrılır. Bazal A daha lüminal benzeridir (15). Hormon reseptörlerinin (ER ve PR) ve HER2'nin uluslararası kılavuzlara dayalı standartlaştırılmış tanısal değerlendirilmesi, bu alt tiplerin belirlenmesi için gereklidir (16,17). Luminal A benzeri ve B benzeri meme kanserlerini ayırt etmek için proliferasyon belirteci protein Ki-67 (MKI67) kullanılır (Şekil 2-1) (18).

Alt Grup		Biyobelirteç	Görülme Sıklığı
Luminal	Luminal A	[ER+[PR+] HER2- KI67-	% 23.7
	Luminal B	[ER+[PR+] HER2- KI67+	% 38.8
		[ER+[PR+] HER2+ KI67+	% 14
HER2+	HER2 overexpression	ER-PR-HER2+	% 11.2
Üçlü Negatif	Basal	[ER-PR-] HER2-, basal marker+	% 12.3
	Normal-Like	[ER+[PR+] HER2-KI67-	% 7.8

Şekil 2-1: Meme tümörü moleküler alt tiplerinin özeti (18)

Özetle; ER, PR, HER2 durumuna göre meme kanseri lüminal A, lüminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif olarak sınıflandırılır. Üçlü negatif tümörler ; Bazal alt tip olarak adlandırılır; bazal A ve bazal B, sırasıyla bazal tümörleri ve *claudin-low* ve MBC tümörlerini temsil edecek şekilde daha da farklılaştırılır. Lüminal hücre hatları A ve B olarak ikiye ayrılır. Lüminal A’da HER2 ve KI67 biyobelirteci yoktur. Lüminal B ise HER2’nin varlığına göre ikiye ayrılır. Lüminal tipteki tümörler daha iyi prognoza sahiptir. Bunun aksine üçlü negatif hücrelerde kötü prognoz ve daha agresif bir durum söz konusudur. (Şekil 2-2) (15).



Şekil 2-2: Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki mevcut alt tiplere şemalarının karşılaştırılması (MBC:metaplastik meme kanseri) (15)

2.2. SDR Ailesi ve DHRS2 Geni

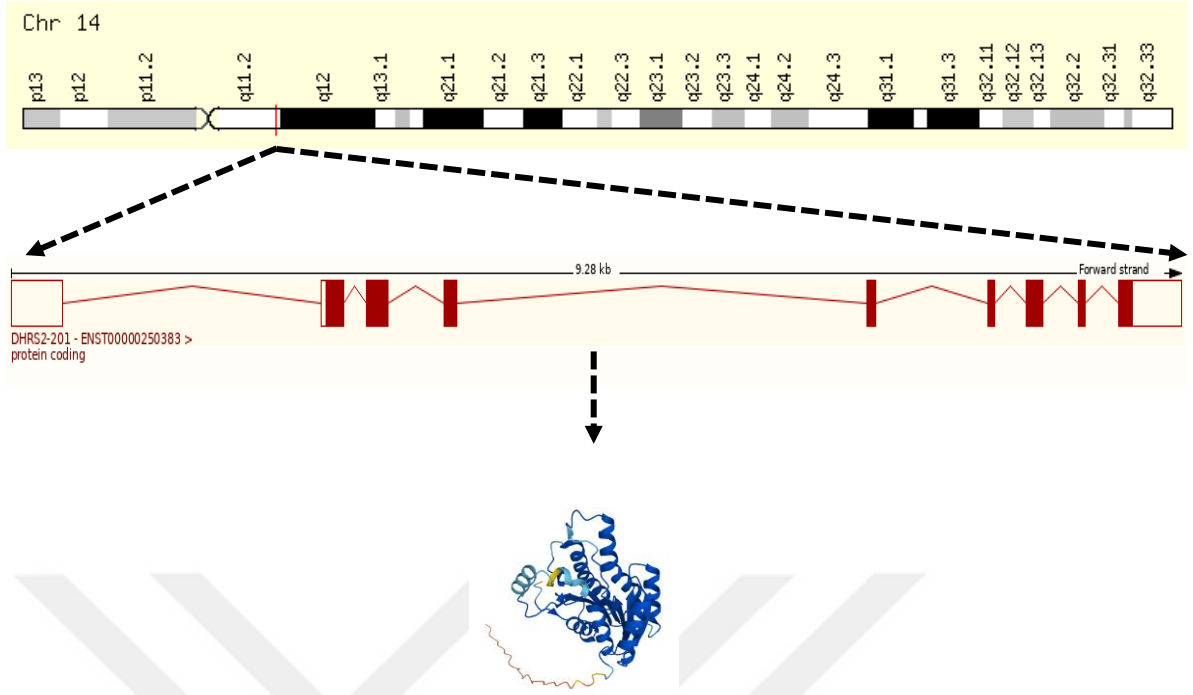
2.2.1. SDR Ailesi

SDR, geniş bir dehidrojenaz ve redüktaz ailesidir. SDR süper ailesi, lipidlerin, amino asitlerin, karbonhidratların, steroid hormonların ve daha bir çok bileşenin metabolizmasında önemli rol oynar. Bununla birlikte redoks mekanizmalarında yer alır (19). SDR'ler ara metabolitler ve sinyal molekülleri metabolizmasında; steroidler, retinoidler, lipidler, polihidrik alkoller, nükleotid molekülünün yapısındaki şeker ve eksojen bileşikler gibi substrat reaksiyonlarını katalize etmek için dehidrojenazlar, redüktazlar, izomerazlar veya liyazlar olarak görev yapan fonksiyonel aktiviteler gösterir (19).

2.2.2. DHRS2 Geni

2.2.2.1. DHRS2'nin Yapısı ve Organel Lokalizasyonu

DHRS2 geni Dehidrojenaz/Redüktaz SDR ailesi üye 2 olarak bilinmektedir. Aynı zamanda HEP27 olarak da bilinir. DHRS2 geni 14q11.2 bölgesinde lokalizedir. DHRS2 geni 9 ekzon içermektedir (20,21). DHRS2 ilk sodyum bütirat ile muamele edilmiş insan hepatoselüler karsinom hücre hattı HepG2'de nükleer protein olarak tanımlanmıştır (22).



Şekil 2-3: DHRS2 geninin genomdaki lokasyonu , ekzonları ve protein yapısı (23–25)

2.2.2.2. DHRS2'nin Fonksiyonu

DHRS2, peroksizom matriksinde retinoid dehidrojenaz redüktaza benzer üç peptit (tripeptid) Ser-Arg-Leu dizisini içermektedir (26). DHRS2 geninin iki farklı promotör bölgesi vardır: İlki, histon deasetilaz inhibitörü olan sodyum bütirat tarafından indüklenebilen hepatoselüler spesifik bir promotördür. Diğeri özellikle dendritik hücrelerde aktif olan upstream promotör'dür. (27). c-Myb ve Ets-varyant gen5 (ETV5) transkripsiyon faktörleri bu promotörlere bağlanmaktadır (26).

DHRS2 proteininin organel lokalizasyonu esas olarak sitoplazma, çekirdek ve mitokondridedir (19). En yüksek DHRS2'nin ekspresyonu parotis bezi ve yumurtalıkta bulunur; karaciğer, plasenta, meme bezleri ve testislerdeki ekspresyonu nispeten düşük seviyededir (28). DHRS2, indirgenmiş bir nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı karbonil redüktazdır. 1-fenil-1,2-propandion, 2,3-heptandion ve 3,4-heksandion gibi dikarbonil bileşiklerinin indirgenmesini katalize ederek hücreleri karbonil sitotoksik hasarından korur (19,29).

DHRS2 lipid metabolizmasında da önemli görev üstlenmekle birlikte lipid metabolizmasının deregülasyonu, kanser dahil olmak üzere çeşitli metabolik hastalıkların bir özelliğidir (20).

DHRS2 östrojen ve steroid hormonları için metabolik enzim görevi görür. Bu sayede kanserin progresyonunda önemli bir rol oynar. Enzimatik aktivitesine ek olarak, DHRS2'nin katalitik olmayan fonksiyonları da vardır. DHRS2 proteini mitokondriye N-terminal mitokondriyal hedef sinyal iletim yolu ile ulaşır. Bu sayede mitokondriyal matriks proteini olarak görev alarak oksidatif stres mekanizmasında rol oynar. Oksidatif stres koşulları altında, hücresel reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesi önemli ölçüde artar (26). DHRS2, hücrelerin oksidatif hasar görmesini süperoksitleri ortadan kaldırarak engeller (26). DHRS2 aynı zamanda “*E3 ubiquitin enzyme murine double minute 2 homolog*” (MDM2) geninin inhibitörü olarak görev yapar.

MDM2, TP53'e bağlanarak aktivitesini inhibe eder. DHRS2 ise çekirdeğe giderek MDM2'ye bağlanır bu sayede aktivitesi inhibe edilen TP53'ün fonksiyonunu geri kazandırır (27,30).

Son yıllarda, SDR enzim ailesinin tümörjenez ve ilerlemedeki rolü konusundaki araştırmalar artmıştır. Çeşitli kanserlerde 14q11.2 bölgesinin kaybı en yaygın kromozomal değişikliklerden biridir (26,31). DHRS2 geni, kromozom 14q11.2'de yer alır ve bu sebeple tümör baskılayıcı gen (TSG) olarak hareket edebileceğini düşündürür (29). Öte yandan, çelişkili çalışmalar da bildirilmiştir. Bu nedenle, DHRS2'nin bir onkogen olarak mı yoksa TSG olarak mı işlev gördüğü spesifik kanser tipine bağlıdır. Örneğin gastrik kanserde regülasyon seviyesi azalırken meme kanserinde artmaktadır Tablo (2-2) (20).

Tablo 2-2: Kanser tiplerinde DHRS2'nin rolü (20)

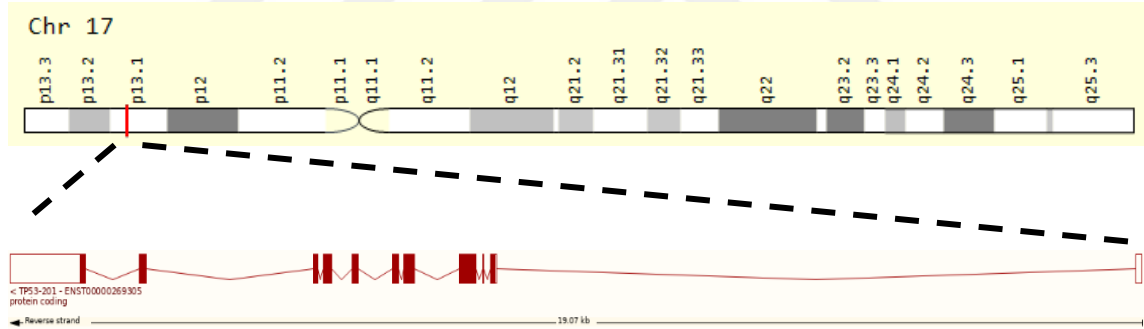
Hastalık Tipi	DHRS2 Ekspresyonu	Hastalığın prognozunda DHRS2'nin etkisi
Özofagus yassı hücre karsinomu	Düşük ekspresyon	Kanser hücrelerinin invazyonunu ve lenf düğümleri metastazını inhibe eder
Yumurtalık kanseri	Düşük ekspresyon	Kanser hücrelerinin HDAC'i tedavisine duyarlı hale getirilmesi
Gastrik kanseri	Düşük ekspresyon	Kanser hücrelerini 5-FU tedavisine duyarlı hale getirmek

Nazofarenks kanseri	Düşük ekspresyon	Kanser hücresi proliferasyonunu inhibe etmek
Meme kanseri	Yüksek Ekspresyon	ER-meme kanserine özel terapötik hedef
İskemi reperfüzyon hasarı	Yüksek Ekspresyon	Hücreleri oksidatif stresten korumak

2.2.3. MDM2 ve TP53 Genleri

2.2.3.1. TP53

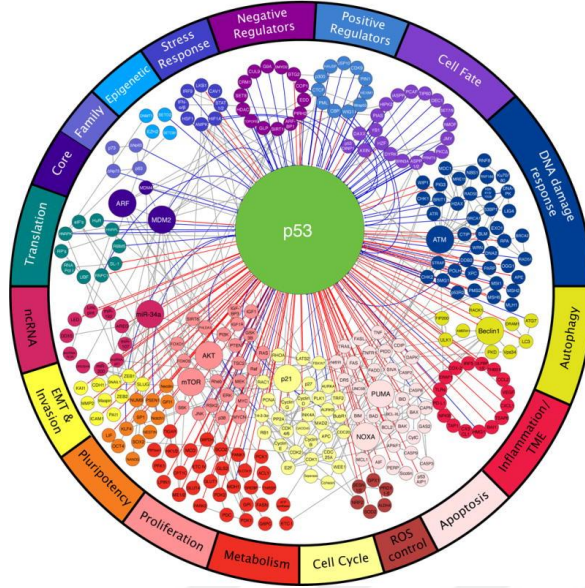
TP53 ilk olarak SV40 büyük T antijeni ile kompleks halinde keşfedilmiştir (32). 17p13.1 lokusunda bulunan insan tümör baskılayıcı gen olarak bilinen TP53, 393 amino asit uzunluğunda bir proteini kodlamaktadır (33).



Şekil 2-4: TP53 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (34,35)

TP53, geniş bir dizi hücrel hasara yanıt olarak apoptoz, büyümenin durması ve yaşlanmada temel faktördür (36). Genom bütünlüğünü düzenlemek, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz tek bir gen için büyük işlevler olsa da , sürekli genişleyen bir ağ ile, TP53'ün etkilerine katkıda bulunan ek yollarda bulunmaktadır.

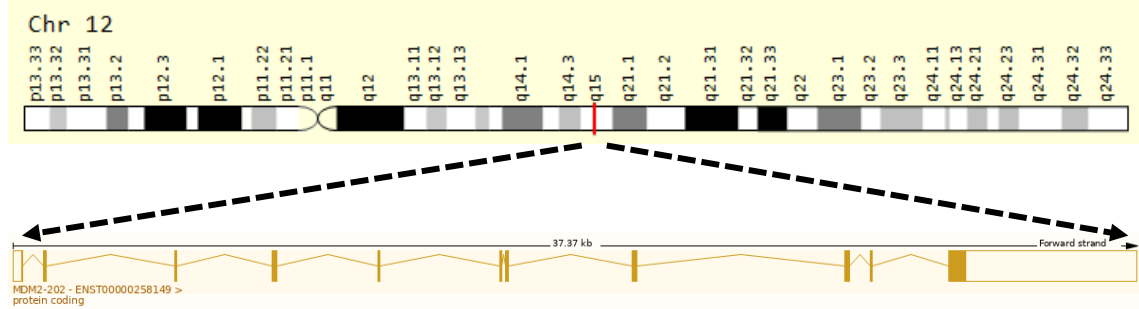
Örnek olarak, TP53 otofajiyi düzenleyebilir. Metabolizma faaliyetlerini değiştirebilir, pluripotensi ve hücrel plastisiteyi baskılayabilir ve ferroptoz olarak bilinen apoptotik olmayan demire bağımlı bir hücre ölümü biçimini kolaylaştırabilir. TP53'ün bazal seviyedeki fonksiyonu bile Şekil 2-5'te görüldüğü gibi diğer birçok tümör baskılayıcı ağın oluşumunu güçlendirebilir (37).



Şekil 2-5: TP53 Network (37)

2.2.3.2. MDM2

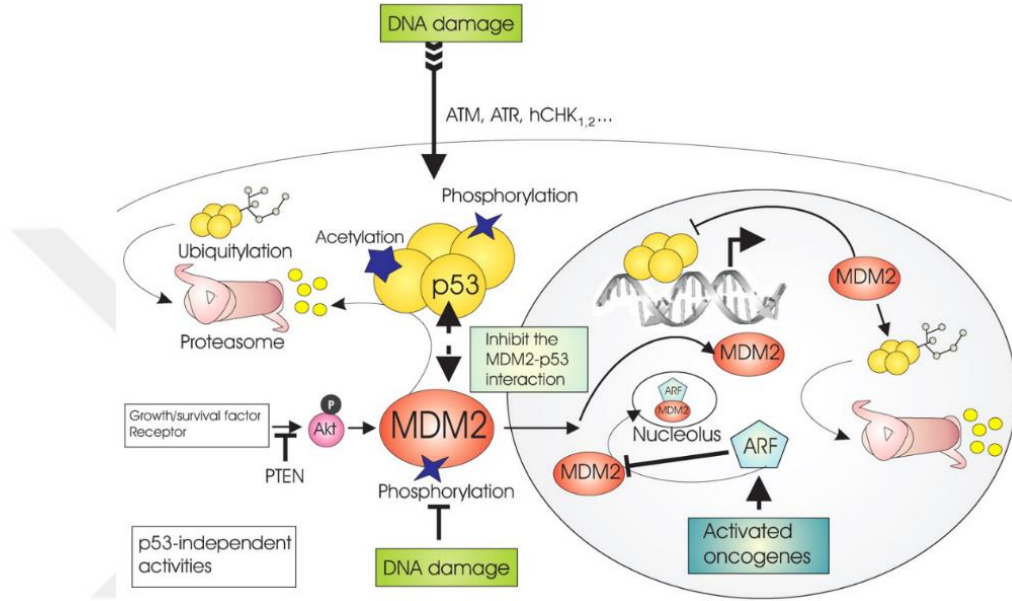
MDM2 geni, 498 aminoasit içeren bir proteini kodlar. 11 ekzon içeren 2372 kb MDM2, kromozom 12'nin uzun kolunda lokalizedir (Şekil 2-6) (38). MDM2 proteini, TP53 proteininin birincil negatif düzenleyici faktörüdür. Onkogenik E3 ubiquitin ligaz olan MDM2, TP53 proteinini sitoplazmaya aktarabilir. TP53 proteazomlar tarafından yıkılabilir (39).



Şekil 2-6: MDM2 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (40,41)

TP53 ve MDM2 Şekil 2-7'da gösterildiği üzere bir *feedback* mekanizması oluşturur. TP53, MDM2'nin ifadesini uyarır; MDM2 ise TP53 aktivitesini baskılar. MDM2 TP53'ün çekirdek ve sitoplazmadaki bozulmasını uyarır, transkripsiyonel aktivitesini engeller .

DNA'ya zarar veren çok çeşitli ajanlar veya düzensiz onkogenler, TP53 aktivasyonunu indükler. DNA hasarı, TP53 ve MDM2'nin fosforilasyonunu uyarır, böylece etkileşimlerini önler ve TP53'ü stabilize eder. Aktive edilmiş onkogenlerde MDM2'yi nükleolusa bağlayan ARF proteinini indükleyerek böylece TP53'ün yıkımını önler. *Survival signal* ise, Akt aktivasyonu yoluyla TP53'ün stabilizasyonunu engelleyerek MDM2'nin nükleer aktarımına katkıda bulunur.



Şekil 2-7: TP53'ün MDM2 tarafından düzenlenmesi (42)

2.3. Post-Translasyonel Modifikasyonlar

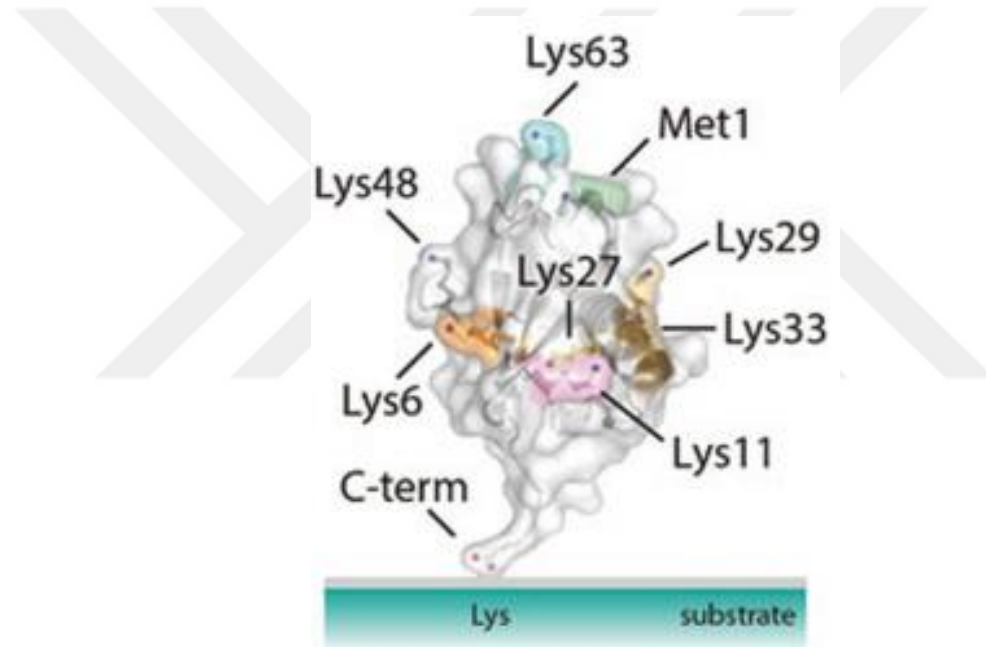
Translasyon sonrası protein modifikasyonu (PTM), bir dizi biyolojik fonksiyona sahip hücresel proteinlerin önemli düzenleyici mekanizmalarından biridir. Proteomdaki herhangi bir protein, translasyonu takiben veya translasyon esnasında modifiye edilebilir (43). PTM'ler, bir proteinin amino asit yan zincirlerinde veya C- veya N-terminalinde meydana gelebilir (44). Farklı modifikasyon türleri, proteinin hidrofobikliğini, yapısını ve stabilitesini değiştirir ve nihayetinde işlevini etkiler. Protein modifikasyonu geri dönüşümlüdür ve farklı organellerde farklı işlevlere sahiptir (43).

Bugün itibarıyla, translasyon sonrası modifikasyon yoluyla hedef proteinlerin aktivitesini, hücre içi dağılımı, protein etkileşimlerini ve protein ömrünü değiştirebilen fosforilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon ve sumoilasyon dahil olmak üzere 450'den fazla benzersiz protein modifikasyonu tanımlanmıştır (45). Ubikitinasyon, Ubikitin-Proteozom sistemi (UPS) tarafından gerçekleştirilir (46).

2.3.1. Ubikitinasyon ve Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)

Proteinler, hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde temel birimlerdir. Ubikitinasyon, proteinler için fosforilasyonun ardından ikinci en yaygın translasyon sonrası modifikasyondur. Bu nedenle, ubikitinasyonun anormal gerçekleşmesi, kanser başta olmak üzere hastalık gelişimine ve ilerlemesine yol açabilir (47).

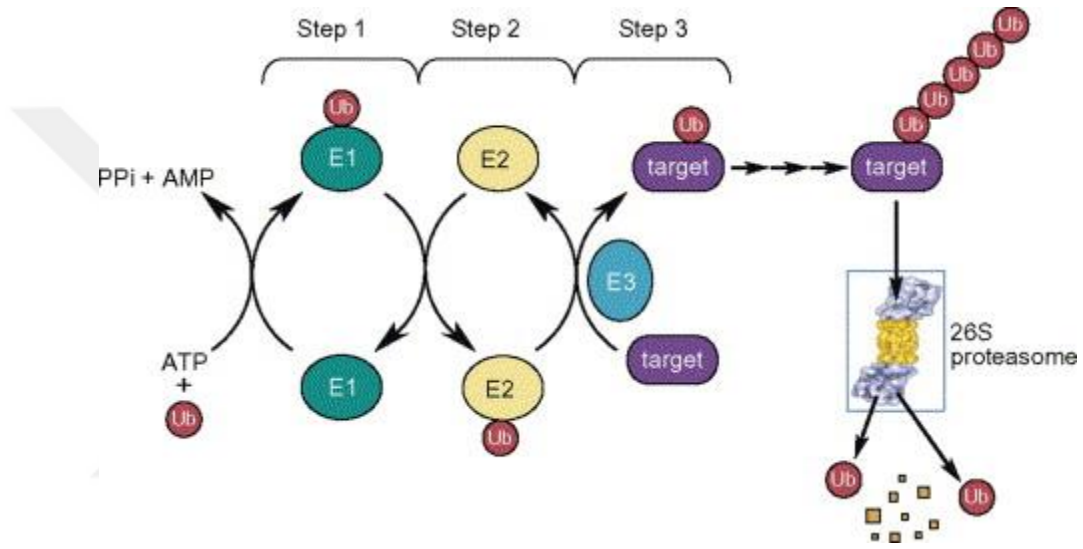
Ubikitin, yapısı Şekil 2-8’de gösterilen 76 amino asitlik bir proteindir. Ubikitin tümü ubikitine olabilen yedi Lys kalıntısı (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ve K63) içermekle birlikte uygun hedef Lizin kalıntılarıyla geri dönüşümlü izopeptit bağları oluşturmaktadır. Metiyonin 1 (Met1) bağlantılı sekizinci zincir tipi, ubikitin ikinci bir ubikitin N-terminaline eklendiğinde üretilir (48).



Şekil 2-8: Ubikitin yapısı (48)

Bir proteinin proteazom tarafından tanınması için, önce hedef proteine küçük bir peptit (ubikitin) eklenmelidir. Bu işlem, serbest ubikitin'i aktive eden ve onu hedef proteine taşıyan bir dizi enzim tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2-9). Bu enzimler E1, E2 ve E3 olarak adlandırılır (49). Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), hücre içinde gerçekleşen bir protein degradasyon sistemidir (50). İlk olarak ubikitin, ubikitin aktive edici enzimin (E1) aktif bölge sistemi ve ubikitin karboksil terminusu arasındaki yüksek enerjili tiyoester bağı ATP'ye bağımlı oluşumu aracılığıyla aktive edilir.

Ubikitin daha sonrasında ubikitin konjugaz'a (E2) transfer edilir. Son olarak substrat içindeki lizin kalıntılara veya bir ubiquitin (E3) ligase tarafından N-terminal amino grubuna konjuge edilir. Ek ubiquitin molekülleri, substrat bozulmasına yol açan 26S proteazomu tarafından tanınan poliubikitinlenmiş bir eklenti oluşturarak birincisine konjuge edilir (51,52). UPS, birkaç basamaktan oluşan bir reaksiyondur. Yanlış katlanmış, kısa ömüre sahip ve hasarlı proteinlerin bozulmasında rol oynar (53). UPS hücrelerde %80'den fazla proteinin degradasyonunda etkindir (54).



Şekil 2-9: Ubikitin-proteazom sisteminin (UPS) üç aşaması (52)

2.4. Ubikitin E3 Ligazlar ve Sınıflandırması

İnsan genomu 600'den fazla E3 ligaz kodlamaktadır (55). Yapı ve fonksiyon farklılıklarına göre, E3 ligazları RING-finger, HECT, U-box ve RBR tipi olmak üzere dört kategoriye ayrılabilir (56). BRCA1, BARD1, FBXW7 ve STUB1 tümör baskılayıcı E3 ligaz olarak görev alırken, MDM2 onkogenik E3 ligaz olarak görev alır (57).

2.4.1. Ring Tipi E3 Ligazlar

RING E3 ligazları, E3 ligazlarının başlıca türüdür ve *RING* domaini ile karakterize edilir (58). Ubikitinasyon işlemi sırasında, *RING* E3 ligazlarının *RING* domaini, E2 konjugasyon enzimine bağlanır.

Şekil 2-10'da gösterildiği gibi HECT E3 ligazlarının aksine, bir E3-Ub ara maddesi olmadan E2'den doğrudan alt tabakaya aktarılır (59). *RING* E3 ligazları iki büyük aileye ayrılır: Monomerik “*RING finger*” ve çok alt birimli E3 ligazlar. Çok alt birimli E3 ligazlardan olan “*Cullin-RING*” ligazlar (CRL'ler) birkaç ortak özellikle karakterize edilen, çeşitli bir ubiquitin ligaz sınıfıdır. Cullin yapısı, N terminali “*RING-box*” proteini, bir adaptör proteini ve C terminali substrat reseptörünü içerir (60). *SCF* E3 ligazları, Skp1, Cullin1 ve F-box proteinleri dahil olmak üzere en büyük E3 ligaz kompleksidir. Bu proteinler birbirleriyle bağlantı kurar ve farklı işlevler gerçekleştirir (61).

2.4.2. HECT Tipi E3 Ligazlar

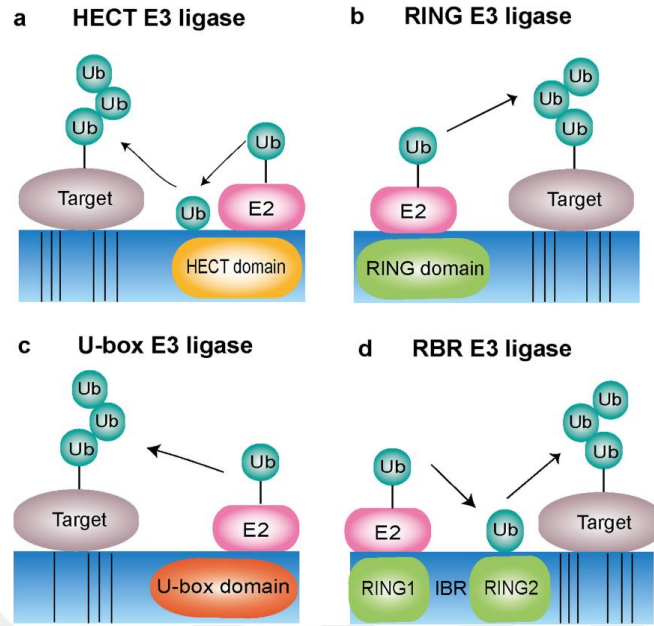
HECT (E6AP karboksil terminaline homolog) E3 ligaz ailesi, en geniş ve en erken çalışılan E3 ligazlardan biridir (62).

2.4.3. U-box Tipi E3 Ligazlar

U-box E3 ubiquitin ligazları, ökaryotik hücrelerde post-translasyonel proteinin kalitesini kontrol etmek için gerekli olan nispeten küçük bir ailedir (63). U-box E3 ligazlarının C-terminali, mayadan insanlara yaklaşık 70 amino asit rezidüsünden oluşan korunmuş bir U-box alanı içerir. U-box'ın üç boyutlu yapısı, enzimatik aktivite için gerekli olan “*RING finger*” alanına benzemektedir (64).

2.4.4. RBR Tipi E2 Ligazlar

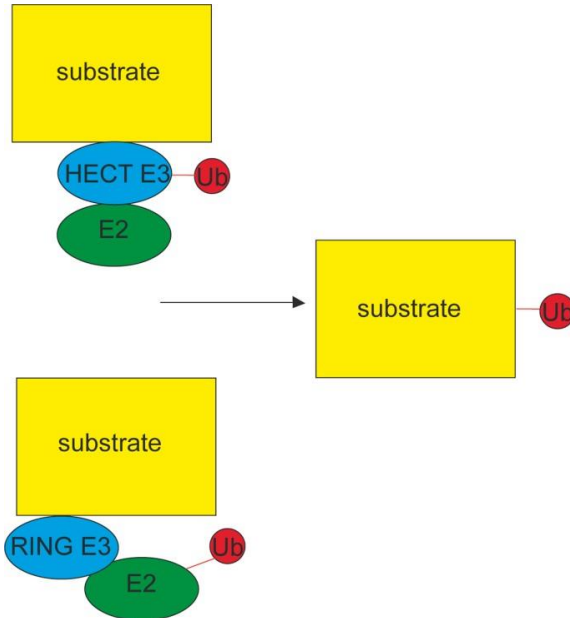
Yeni keşfedilen *RING-IBR-RING* (RBR) E3 ligazlarının, *RING* ve HECT türleri ile aynı olmayan benzersiz bir *RING*-HECT hibrit E3 ligaz ailesi olduğu kanıtlanmıştır. RBR E3 ligazlar, *RING1*, *RING2* ve *RING* katalitik korunmuş bölge (IBR) ile karakterizedir (59).



Şekil 2-10: Ubikitin Ligaz Tipleri (59)

2.5. Ubikitin E3 Ligazların Aktivasyonu

HECT ve *RING* ligazlarının mekanizmaları farklı hareket eder. *HECT* E3 ligazları ubiquitin substrata bağlanmasını doğrudan katalize ederken, *RING* ligazlarında ubiquitin, substratla birlikte E3'e bağlanan E2'den aktarılır. E2'nin katalitik etkisinin *RING* E3 tarafından tam olarak nasıl kolaylaştırıldığı bilinmemektedir (Şekil 2-11) (65).

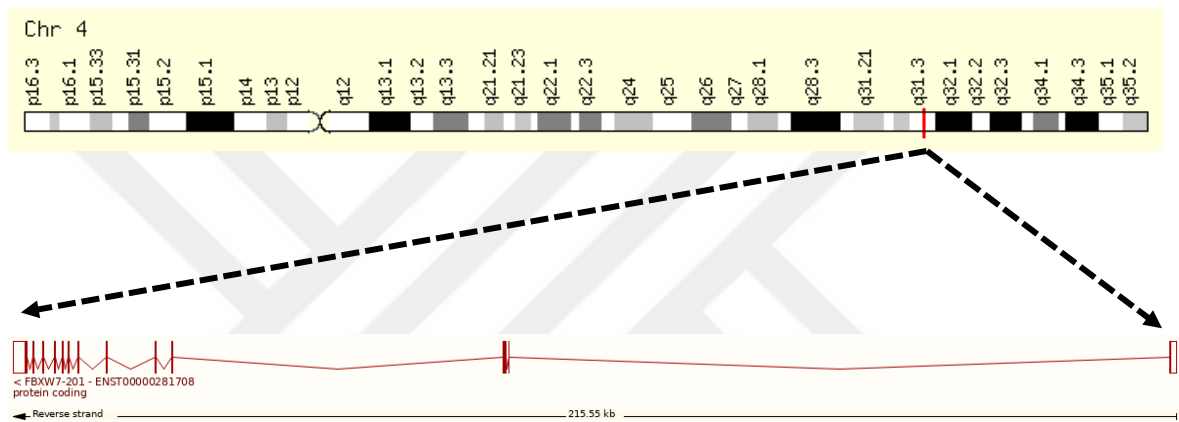


Şekil 2-11: *HECT* ve *RING* ligazlarının mekanizmaları (65)

2.6. FBXW7, CCNE1, MYC, TRIM6, STUB1, TRUSS, BRCA1, BRCA2, BARD1 Genleri

2.6.1. FBXW7

FBXW7 geni 4q31.3 bölgesinde lokalizedir. 4 intron ve 13 ekzondan oluşur. (Şekil 2-12). FBXW7'nin ilk eksonu, transkripsiyonun pozitif düzenleyicisi olarak işlev gören bir TP53 bağlama bölgesi içerir (66). FBXW7, Skp1-Cdc53/Cullin-F-box-protein kompleksinin (SCF/ β -TrCP) bir parçası olan F-Box protein ailesinin bir üyesidir. F-Box proteinleri, dönüşümlerini düzenleyen fosforile edilmiş substratları tanımaktan ve bunlara bağlanmaktan sorumludur (67).



Şekil 2-12: FBXW7 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (68,69)

Memeli hücrelerinde FBXW7'nin FBXW7 α , FBXW7 β ve FBXW7 γ olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. 5'-UTR ve N-terminal kodlama bölgelerinde farklılık gösterir. FBXW7 α nükleoplazma-çekirdek, FBXW7 β sitoplazmada ve FBXW7 γ çekirdekçik olmak üzere farklı hücresel lokalizasyonlara sahiptir (67). Alfa formu en bol bulunan izoformdur. FBXW7, bir tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. FBXW7 ekspresyonu, TP53 aktivasyonunu takiben artar (70). FBXW7 α , dokuların hepsinde ifade edilirken, FBXW7 β hücre hatlarında ve hatta aynı dokunun farklı bölgelerinde değişik ifade edilebilir. FBXW7 β promotörü, DNA ve histon modifikasyonları yoluyla epigenetik olarak düzenlenebilmektedir. Bazı kanser hücre hatlarının %43'ünde ve primer meme kanseri tümörlerinin %51'inde metile olduğu belirlenmiştir. Metilasyon sebebiyle FBXW7 β gen ifadesinde azalma meydana gelmektedir.

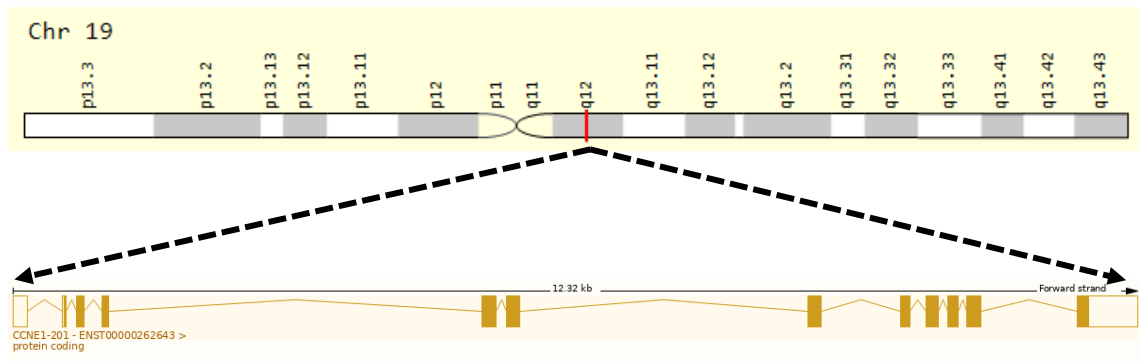
Diğer yandan lenf nodu pozitif meme kanseri hastalarında FBXW7'nin metilasyonunun, uzun sağkalım süresi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (71).

TP53'teki mutasyonlar, FBXW7 promotörünün hipermetilasyonu ile ilişkilidir. Bu durum FBXW7 gen seviyelerinin azalmasına neden olur. Bu, TP53'ün DNA metiltransferaz 1'in (DNMT1) ifadesinin artırması ile ilgili olabilmektedir. DNA modifikasyonlarına ek olarak, histon modifikasyonlarının FBXW7 ekspresyonunu kontrol ettiği belirtilmiştir (72). FBXW7 mRNA ekspresyonu, normal dokulara kıyasla meme kanserinde daha düşüktür (73). Buna ek olarak FBXW7'deki nokta mutasyonları meme kanseri hastalarında nispeten nadirdir. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %1'i FBXW7'de nokta mutasyonları içerirken, buna kıyasla meme kanseri hücre hatlarının ve hastaların %30'unda FBXW7 kromozomu 4q31'de delesyonlar vardır (73–75).

Farklı meme kanseri moleküler alt tipleri analiz edildiğinde (normal benzeri, luminal A, luminal B, ERBB2 (Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 ve bazal), ERBB2 ve bazal tümörler, normal benzeri tümörlere kıyasla önemli ölçüde daha düşük FBXW7 ekspresyonu göstermektedir (73). FBXW7'nin azalmış ekspresyonu, hücre döngüsü elemanı olan pozitif CCNE1 (Siklin E) protein ekspresyonu ile ilişkilidir (76).

2.6.2. CCNE1

Siklin E/sikline bağımlı kinaz Cdk2 (siklin E/CDK2), G1-S faz geçişinde DNA replikasyonunu onaylayarak hücre döngüsü ilerlemesini düzenler (77). CCNE1 geni 19q12 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2-13) (78).



Şekil 2-13: CCNE1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (78,79)

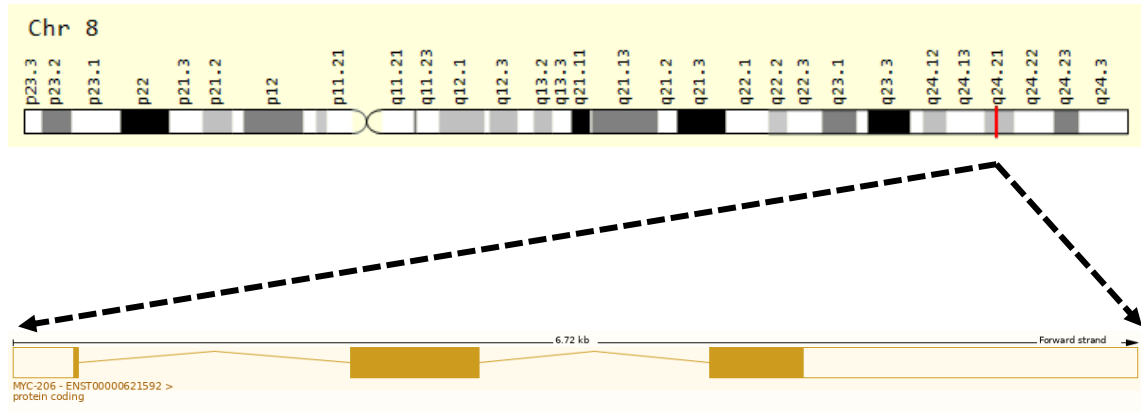
Kanser türlerinin birçoğunda yüksek seviyelerde CCNE1 ifadesi görülür. CCNE1'in aşırı ifadesi, agresif tümör ilişkilidir (80,81). Ayrıca, CCNE1 regülasyonunun bozularak tümör gelişiminde temel bir rolü olduğu düşünülmektedir.

CCNE1 aktivitesi arttığında S-fazına ilerleyerek DNA replikasyonunun bozulmasına sebep olur. Bunun sonucunda hücre G1 fazına geçer ve genomik kararsızlığa sebep olur (82,83). Dolayısıyla, hücrelerin CCNE1 aktivitesinin düzenlemesi oldukça önemlidir. CCNE1 E2F'nin hedef genidir. CCNE1 promotörü E2F bağlanma bölgeleri içermektedir (84). CCNE1 ubiquitinasyonunu iki yolak teşvik eder. Cdk2'ye bağlı olmayan Siklin E, Cul3'ü içeren bir pathway tarafından ubiquitinasyona uğrar (15). “CCNE1, Cdk2'ye bağlandığında, Skp1-Cullin1 F-box proteini (SCF) ubiquitin ligaz FBXW7 tarafından ubiquitinasyon için hedeflenir. Bu ubiquitinasyon, spesifik CCNE1 fosforilasyonunu gerektirir. FBXW7, fosforile edilmiş CCNE1'e bağlanır”. CCNE1'i SCF ubiquitin ligazın kalanıyla birlikte yakınlaştırarak ubiquitinasyonunu katalize eder. (81,85).

2.6.3. MYC

Fbxw7 ubiquitinasyon için MYC'i hedefler ve kanserlerdeki mutasyonu hücre büyümesini, bölünmesini ve farklılaşmasını düzenleyen yolları da etkileyebilir (86,87). MYC hücrel gen transkripsiyonunun ana düzenleyicisidir ve insan genomundaki promotörlerin %15'ine kadar bağlandığı bildirilmiştir (88).

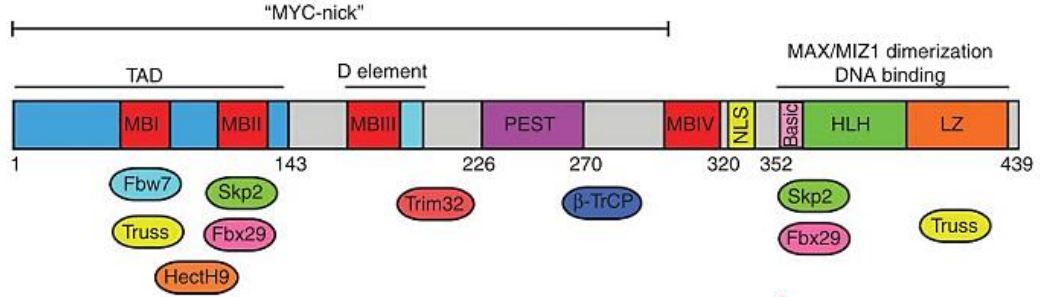
MYC hücrel proliferasyonu, sağkalımı etkiler ve insan tümörlerinde işlevi farklı yönlerde olabilir (89). MYC geni 8q24.21 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2-14) (90).



Şekil 2-14: c-MYC geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (90,91)

Hücre içi iletim yollarında MYC'in önemli rolü bulunmaktadır. Bu sebeple ekspresyonu ve sonrasında aktivitesinin düzenlenmesi bu yolların işleyişinde son derece önemlidir.

FBXW7 geni susturulduğunda c-MYC ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (92). Skp2 ve Fbxw7 proteinleri, c-Myc proteinin tekrar dönüşümünde (recycling) görev almaktadır (Şekil 2-15) (87).

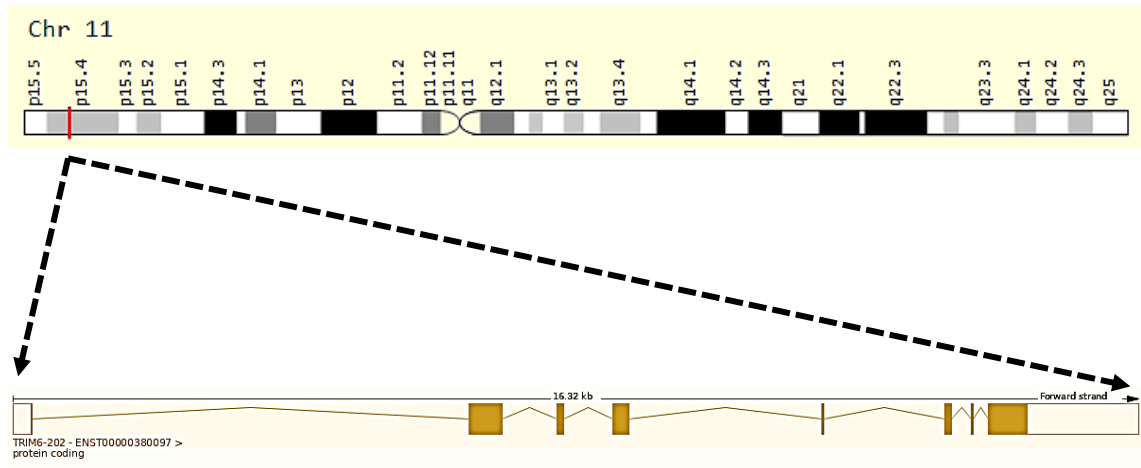


Şekil 2-15: MYC Yapısı (93)

2.6.4. TRIM6

Üçlü motif içeren protein (TRIM) ailesindeki proteinler, RING-B-box-coiled-coil proteinleri olarak da bilinir ve hücre gelişimi, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere biyolojik sürece katılmak için E3 ubiquitin ligaz olarak işlev görür (94). TRIM'in düzensizliği, gelişimsel bozukluklar, immünolojik hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilir.

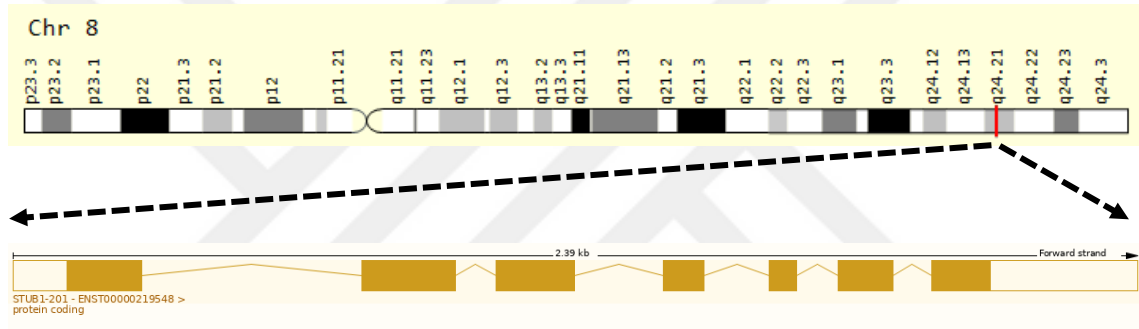
TRIM6, STUB1'in ubiquitinasyon aracılı bozulmasını teşvik etmek için bir E3 ligaz olarak işlev görmektedir (95). TRIM6 geni 11p15.4 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2-16) (96).



Şekil 2-16: TRIM6 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (96,97)

2.6.5. STUB1

STUB1 (“*chaperone-associated U-box-containing*”) E3 ligaz olarak görev yapmaktadır ve aynı zamanda CHIP olarak isimlendirilir. STUB1 öncelikle şaperonun substratına bağlanır ve proteinin üç boyutlu yapısını ubikitine eder. 26S protein kompleksi olan proteozoma yönlendirilmesinde görevli proteini kodlar. MYC'yi 26S proteazomu tarafından yıkım için hedefler. MYC ile etkileşime giren en son ubikitin ligaz STUB1'dir. STUB1'in aracılık ettiği Myc proteinin degradasyonu, Myc'in transkripsiyonel aktivitesinin azalması ve sonucunda hedeflediği genlerin ekspresyonun azalması ile doğru orantılıdır (44). STUB1 geni 8q24.21 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2-17) (98).



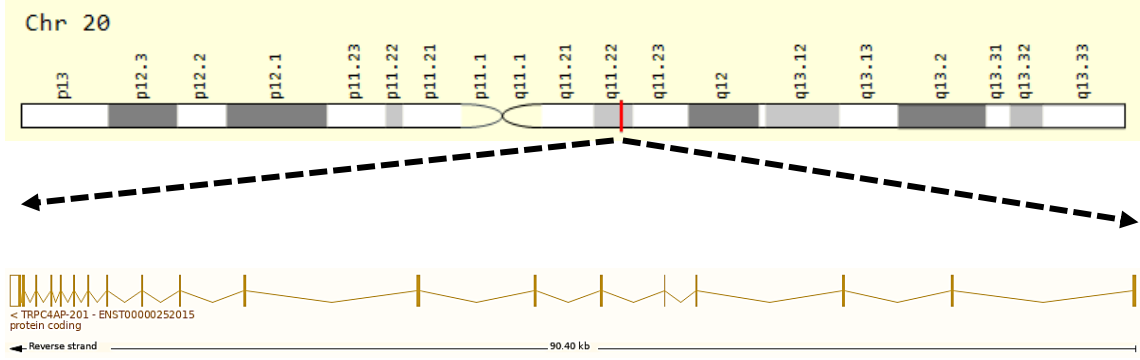
Şekil 2-17: STUB1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (98,99)

MYC-STUB1 etkileşiminin doğrudan olup olmadığını belirlemek ve etkileşim için önemli olan MYC bölgelerini belirlemek ve bu etkileşimin fizyolojik ilişkisini tespit etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (46).

2.6.6. TRUSS

TRUSS aynı zamanda TRPC4AP (tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili) her yerde bulunan scaffold ve sinyal proteini olarak da bilinir (100). TRUSS, “*cullin-RING-FINGER ubiquitin ligaz*” süper ailesine ait olan DDB1-CUL4 ubikitin ligaz kompleksi için bir adaptör proteini kodlar (47). TRUSS tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili hücre içerisinde özellikle hücre zarında bulunan sinyal proteindir. TRUSS geni 20q11.22 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2-18) (101).

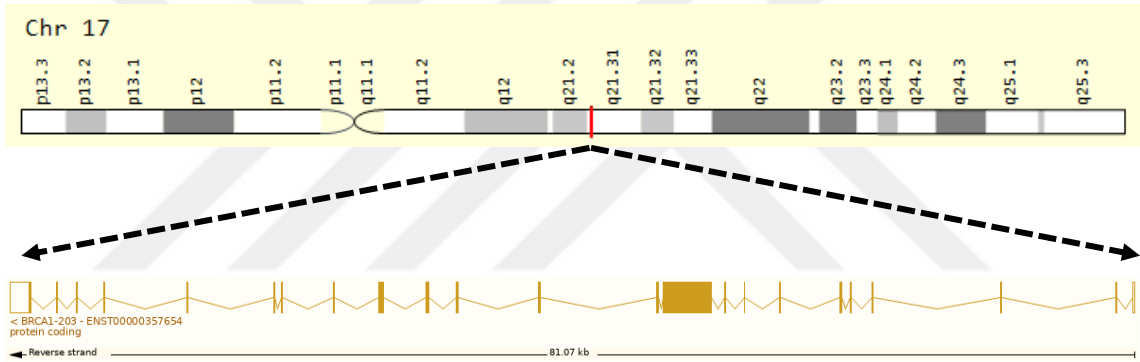
Yapılan çalışmalarda, TRUSS'ın hem c-MYC hem de n-MYC'yi bağladığı ve MYC ile DDB1-CUL4 E3 ligaz arasındaki etkileşime aracılık ettiği, böylece MYC ubikitinasyon ve degradasyonunu uyardığı gösterilmiştir.



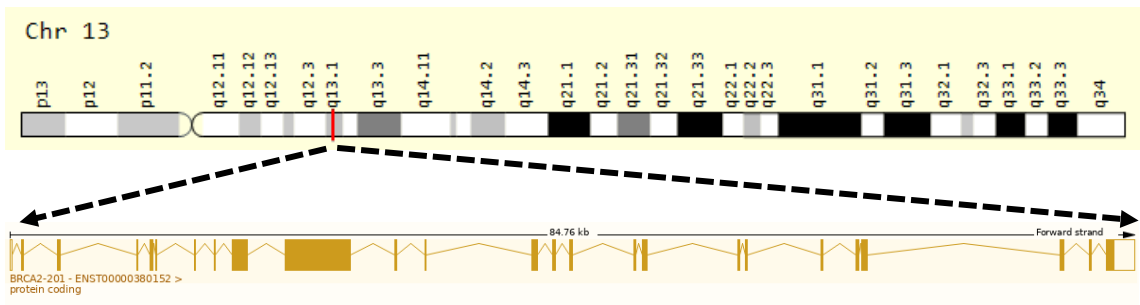
Şekil 2-18:TRUSS geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (101,102)

2.6.7. BRCA1, BRCA2 ve BARD1

BRCA1 ve BRCA2, 1990'larda kalıtsal meme ve yumurtalık kanserlerinin sebep olan genleri olarak tanımlandı (49). BRCA1 ve BRCA2, sırasıyla 17q21 ve 13q12 kromozomlarında bulunan (Şekil 2-19 ve 2-20) tümör baskılayıcı genlerdir (103).



Şekil 2-19:BRCA1 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (104,105)



Şekil 2-20: BRCA2 geninin yapısı ve kromozom lokasyonu (106,107)

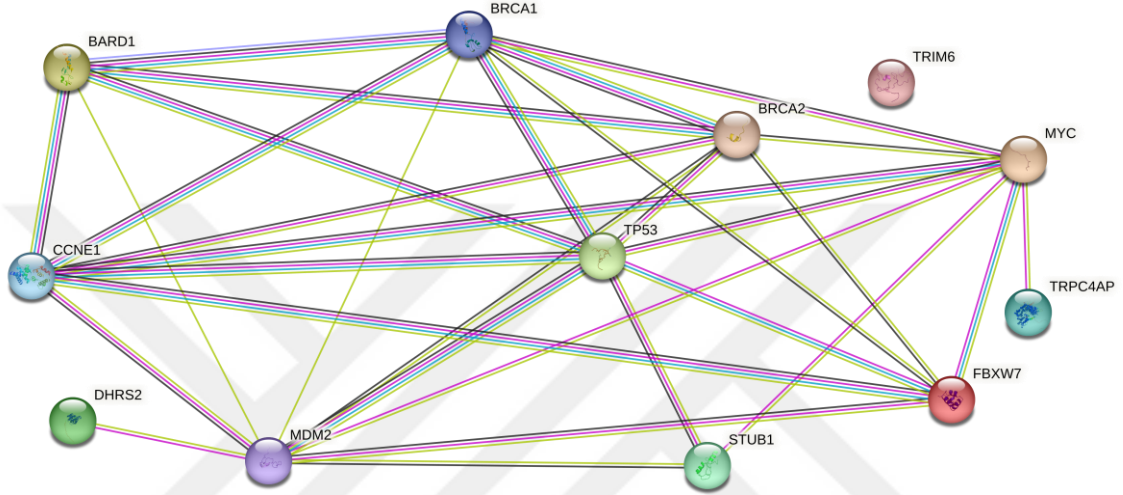
Fonksiyonel BRCA proteinleri, homolog rekombinasyon (HR), hücre büyümesi regülasyonu ve hücre bölünmesinin kontrolü ile DNA çift zincir kırıklarının (DSB'ler) onarımı yoluyla genom stabilitesinin korunmasında rol oynar (103).

BRCA1 temel olarak, bir N-terminal RING motifi içerir. C terminalinin yakınında bulunan BRCT alanlarına önemli derecede homolojiye sahip bir C-terminal sekansı içeren RING alanı proteini ile bir heterodimer oluşturur (108). Bu BRCA1-BARD1 kompleksi, bir E3 ubiquitin ligaz olarak işlev görür. Heterodimer, bu aktivitede bileşen proteinlerinden çok daha etkilidir (109). Onu BARD1'den ayıran ve E3 ligaz aktivitesini ortadan kaldıran BRCA1 RING alanı mutasyonları genellikle kanser yatkınlığı ile ilişkilidir. Hem E3 ligaz aktivitesini hem de BARD1 bağlanmasını azaltan kanserle ilişkili bir BRCA1 RING (C61G) mutasyonu, meme kanserinin baskılanması için önemlidir (110).

BRCA1 gen mutasyonları kadınlarda %60-80 oranında meme kanserine neden olur. Erken başlangıçlı meme kanseri olan ailelerin %35'inde BRCA2 geninde ki germline mutasyonları görülür (111). Östrojen reseptör, progesteron reseptör ve HER-2 reseptör negatif hücrelerde TP53 geninde somatik mutasyonlar tespit edilmektedir (112,113). BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme ve yumurtalık kanserinin otozomal dominant formu ve yüksek penetrasyonlu formlarını oluşturan en yaygın genlerden ikisidir (111).

2.6.8. Aday Genlerin Pathway Üzerindeki Etkileşimi

STRING veri tabanı (114), proteinlerin fonksiyonel etkileşimlerini tahmin etmek için kullanılır. Şekil 2-21'de gösterildiği gibi network 24 “edge” ile birlikte 11 “node”dan oluşur; burada “node” ve “edge” , sırasıyla genleri ve deneysel anlamda birlikteliklerindeki ifade etkileşimlerini temsil eder.



Şekil 2-21: String veri tabanında MYC-MDM2-TP53 yolağı üzerinden DHRS2 geninin aday genler ile etkileşimi (115)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Hücre Soyları

Laboratuvarımızda öncesinde yapılan bir çalışmada MCF-10A (sağlıklı meme hücre hattı), MCF7 (metastatik olmayan meme kanseri hücre hattı), MDA-MB-231 (metastatik meme kanseri hücre hattı) ve T47D (duktal karsinom hücre hattı) yaklaşık %80 büyüme kapasitesine ulaşana Kadar büyütülmüş ve hücrelerde DHRS2 geninin ekspresyonu DHRS2 hedefli siRNA türü ile transfekte edilmiş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overeksprese edilmiştir. Reseptör durumları ve moleküler alt tipleri Tablo 3-1; de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Meme kanseri reseptör durumları ve moleküler alt tipleri

Hücre Hattı	ER	PR	HER2	TP53	Alt Tip
MCF-7(ATCC® HTB-22™)	+	+	-	Yabanıl	Luminal A
MDA-MB-231 (ATCC®HTB-26™)	-	-	-	Mutant	Üçlü Negatif (Claudin-Low)
T47D(ATCC® HTB-133™)	+	+	-	Yabanıl	Luminal A

3.1.2. Cihazlar

Buzdolabı -80 C° (Thermo)
Buzdolabı +4 C°ve -20 C° (Beko)
Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)
Sıvı azot tankı
Distile Su Cihazı (Milipore)
Buz Makinesi (Cornelius)
Real Time PCR (Roche , Light Cycler 480)
Santrifüj (Thermo/ Beckman Coulter)
Spektrofotometre (Nanodrop – Thermo Scientific)
Vorteks (Stuart)
Mikrosantrifuj (Beckman Coulter)
Pipet Seti (Gilson)
Otoklav (Sümer)
PCR Cihazı (Eppendorf, Techne 412)
Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)
Hassas Terazı (Kern)
Mikrodalga Fırın (Arçelik)

3.1.3. Kitler

PureLink, RNA Mini Kit (İnvitrogen,1762380)
High-Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (Roche)
AMPIGENE qPCR Probe Mix No-ROX
SensiFast Bioline, Sybr Green

3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında meme kanseri hücre hatları olan MCF-7, T47D, MDA-MB-231 ve kontrol meme hücre hattı olarak MCF-10A kullanıldı. Bu hücre hatlarında laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada, DHRS2 geninin ekspresyonu siRNA yöntemi ile susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overeksprese edilmiştir. İfadesi baskılanan ve arttırılan hücreler -80C° de saklanmaktadır. DHRS2'nin susma ve aşırı ifadelenme oranı en yüksek olan deney grupları seçildi ve çalışma için kullanıldı. -80 C°'den alınan örneklerle RNA izolasyonu ardından cDNA sentezi yapıldı. Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) için primerlerin optimizasyonun sağlanmasından sonra siRNA grubu için DHRS2 siRNA ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış hücreler (NTC) negatif kontrol olarak ikili tekrar halinde çalışıldı. Vektör grubu ise DHRS2 vektör pozitif ve NTC ikili tekrar olarak çalışıldı.

Aday genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR kullanılarak belirlendi. Bu hücrelerde (DHRS2 susturulan, overeksprese edilen ve yabancı tip) belirlenen aday genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. MDM2 bir E3 ubiquitin ligaz olmakla birlikte, DHRS2 geni ile doğrudan etkileşimdedir. Amacımız DHRS2'nin MDM2 geni üzerinden hedeflediğimiz ubiquitin ligaz yolağındaki genler ile olan ifade değişimini incelemek ve aday genlerin birbirleri ile olan ilişkisini aydınlatmaktır. Bu tezde DHRS2'nin hücre içerisindeki miktarının ubiquitin ligaz genlerinin gen ifadelerine olan etkisinin incelenmesi hedeflendi.

3.2.1. Optimizasyon Deneyleri

3.2.1.1. Uygulanacak Primer Miktarının ve Tm Derecelerinin Belirlenmesi

STUB1, BRCA1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, TRUSS, BARD1, MYC, MDM2, CCNE1 genleri için 60-61-62-64-65 C° sıcaklıkları denenmiş olmakla birlikte her genin normalize edildiği sıcaklık aşağıda Tablo 3-2’de verilmiştir ;

Tablo 3-2: Aday genlerin normalizasyon sıcaklıkları

GEN	SICAKLIK (C°)
<i>STUB1</i>	62
<i>BRCA1</i>	65
<i>BRCA2</i>	64
<i>TRIM6</i>	64
<i>FBXW7</i>	64
<i>TRUSS</i>	62
<i>BARD1</i>	64
<i>MYC</i>	65
<i>MDM2</i>	64
<i>CCNE1</i>	62

3.2.1.2. DHRS2 Gen Anlatımı Arttırılan ve Baskılanan Örneklerin Seçimi

Vektör grubu için ekspresyon artış oranı hesaplandığında tüm hücre hatları için 24.saat dilimindeki örnekler ele alındı. siRNA grubu için ekspresyon baskılanma oranı hesaplandığında hücre hattı bazında saat dilimlerinde farklılık göstermekle birlikte susma oranı %70’in üzerindeki örnekler kullanıldı.

3.2.2. RNA İzolasyonu

DHRS2 geninin ekspresyonu siRNA yöntemi ile susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overeksprese edilmiş olan hücreler (MCF-7, MCF-10A, T47D MDA-MB-231) -80 °C'den alındı.

PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) kullanılarak total RNA izolasyonu aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi:

1. 1,5 µl'lik eppendorflara toplanan örnekler -80°C'den alındı.
2. -80°C'den alınan RLT içindeki örnekler çözüldükten sonra örnek miktarının 1:1 oranında ve tüpün total Hacmine göre %70 etanol eklendi.
3. Etanol eklendikten sonra pipetaj yapılarak spin kolonlara aktarıldı ve 12.000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu adım örnek miktarı bitinceye kadar tekrarlandı.
4. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı. Kolonların üzerine 700 µl Wash I solüsyonu eklenildi. 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi.
5. Kolonların üzerine 500 µl Wash II Solüsyonu eklenildi. 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu aşama 2 defa tekrar edildi.
6. Tekrar toplama tüpünde kalan sıvı uzaklaştırıldı ve spin kolonlar 12.000 x g'de 2 dakika boş şekilde santrifüj edildi.
7. Spin kolonlar asıl RNA tüplerine yerleştirildikten sonra filtre merkezine 30 µl Rnase-free su eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrasında 15.000g'de 2 dakika santrifüj edildi ve RNA içeren tüpler buza alındı

3.2.3. RNA Miktarlarının ve Kalitelerinin Ölçülmesi

Buza alınan RNA'ların Nanodrop-2000 cihazı kullanılarak saflık ve konsantrasyonları ölçüldü. A260/280 nm dalga boylarında, RNA örneklerinin absorbans değerleri tayin edildi ve -80 °C'de saklandı.

3.2.4. cDNA Sentezi

Çalışmamızda RNA izolasyonu gerçekleştirdiğimiz örneklerden cDNA eldesi için “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” kullanıldı.

Reaksiyonun final hacmi 20 µl olacak şekilde gerekli hesaplama yapıldı. Aşağıda belirtilen adımlar gerçekleştirildi:

Hazırlanan Master Mix karışımı buzda bekletildi.

1. Total RNA’lar 1000 ng’a sabitlendi. RNA örnekleri ve su miktarlarının birleşimi 13.2 µl olacak şekilde sulandırıldı.
2. Bileşenleri; 10X tampon çözelti, RNase inhibitör, Ters transkriptaz, Deoksinükleotit Primer olan Master mix aşağıda Tablo 3-3’de belirtilen miktarlarda hazırlandı.

Tablo 3-3: cDNA reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
RT Buffer (10x)	2 µl
Rnase İnhibitör	1 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
25x dNTP	0,8 µl
10X Randomize Primer	2 µl
Toplam	6,8 µl

3. Soğuk blok üzerine alınan örneklerin her birine Tablo 3-3’de belirtilen karışımdan 6,8 µl dağıtıldı.
4. Thermal Cycler cihazı aşağıdaki kondisyonlarda ayarlandı ve reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3-4: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

SICAKLIK (C°)	ZAMAN
25 C°	10 dk
37 C°	2 h
85 C°	5 dk

5. Elde edilen örnekler Nanodrop-2000 cihazı kullanılarak ölçüldü ve 20°C’de saklandı.

3.2.5. Primerlerin Tasarımı

Kantitatif PCR için NCBI ve ENSEMBL “primer designing tool” online web sitesi “Integrated DNA Technologies (IDT)”, “Thermo Multiple Primer Analyzer” ve “UCSC In-Silico PCR” araçları kullanılarak STUB1, BRCA1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, TRUSS, BARD1, C-MYC, MDM2, CCNE1 genlerinin ekspresyonlarını tayin etmek üzere her biri için forward (F) ve reverse (R) yönlü primer dizaynı yapıldı. Primerler dizayn edilirken self-dimer, heterodimer oluşturma ihtimallerine dikkat edildi.

Analiz için enstitümüzde mevcut olan Real-Time Kantitatif PCR cihazı (Light Cycler, Roche Diagnostic) kullanıldı. Liyofilize halde gelen primerler belirtilen miktar doğrultusunda TE tampon çözelti veya distile su ile 100 pmol/ul ‘ye sulandırılarak ana stok hazırlandı. Çalışma esnasında 10 pmol/ul ‘ye seyreltildi.

Tablo 3-5: STUB1, BRCA1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, TRUSS, BARD1, MYC, MDM2, DHRS2, CCNE1 genlerine özgü tasarlanan primer dizileri (GRCh38)

Gen Adı	5'	Primer Dizisi	3'
FBXW7-F	-	ACTAACTGGAGGCGAGGAGA	-
FBXW7-R	-	GCCTGTGACTGCTGACCAAA	-
CCNE1-F	-	CCCAAACCTCAACGTGCAAGC	-
CCNE1-R	-	TTGCTCGCATTTTTGGCTGC	-
MYC-F	-	CAGGACTGTATGTGGAGCGG	-
MYC-R	-	GCTGTCGTTGAGAGGGTAGG	-
STUB1-F	-	GAGGCCAAGCACGACAAGTA	-
STUB1-R	-	ATGTCCTTGCGGTCGTAGGT	-
BRCA1-F	-	CCGAAGAGGGGCCAAGAAAT	-
BRCA1-R	-	ACAGACACTCGGTAGCAACG	-

TRIM6-F	-	GGAAGAGAAGAAGGGGCTACG	-
TRIM6-R	-	CAGGGTCCAGAACTCACTCC	-
TRUSS-F	-	GCAGCTCGCTAATTTCTGCC	-
TRUSS-R	-	TCTGACACCTTTTCGAGTCGC	-
MDM2-F	-	CTACAGGGACGCCATCGAAT	-
MDM2-R	-	ACTCTCCCCTGCCTGATACA	-
BRCA2-F	-	CAGCAGACCCAGCTTACCTT	-
BRCA2-R	-	TACGCAACTTCCACACGGTT	-
BARD1-F	-	CAAACGGTGCCCTCAGAAAA	-
BARD1-R	-	GGACTAGACATCACTCGCCT	-
DHRS2-F	-	GCTGTCATCCTGGTCTCTTCC	-
DHRS2-R	-	CTGGAACCACGCAGTTTACC	-

3.2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR)

RNA seviyesinin ifadesi Roche-Light Cycler Real-Time PCR cihazı ile ölçülmüştür. Kantitasyon için floresan boya olarak *LightCycler 480* cihazına uyumlu *Bioline*

SensiFAST SYBR® No-ROX kullanıldı ve döngü eşik değerini (Ct) normalize edebilmek için referans gen olarak “*TATA binding protein*” (TBP) seçildi.

Referans gen ve ekspresyonu belirlenecek genlere özgü primerler kullanıldı. *STUB1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TRIM6*, *FBXW7*, *TRUSS*, *BARD1*, *C-MYC*, *MDM2*, *CCNE1* ve referans gen için mix tüpleri hazırlandı.

Hazırlık basamakları aşağıdaki gibidir;

Tablo 3-6: Kuyu başı qRT-PCR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
2x Sybr Green Master Mix	5
H ₂ O	1
cDNA	2
Toplam	10 µl

1. Referans gen olarak seçilen TBP ve her gen için ayrı karışım hazırlandı.
2. Hazırlanan karışım 96 kuyulu qRT-PCR plate’inde belirlenen kuyulara 8µl olarak dağıtıldı. Her örnek çift kopya halinde 96 kuyulu plate dağıtıldı.
3. Negatif kontrollerin her birine karışım aynı miktarda dağıtıldı ancak cDNA eklenmedi.
4. Dağıtılan karışımın üzerine her bir örneğin kendi cDNA’sı uygun kuyulara

2 µl koyuldu. Seri dilüsyon yapılmış standartlar TBP karışımlarının olduğu kuyulara eklendi.

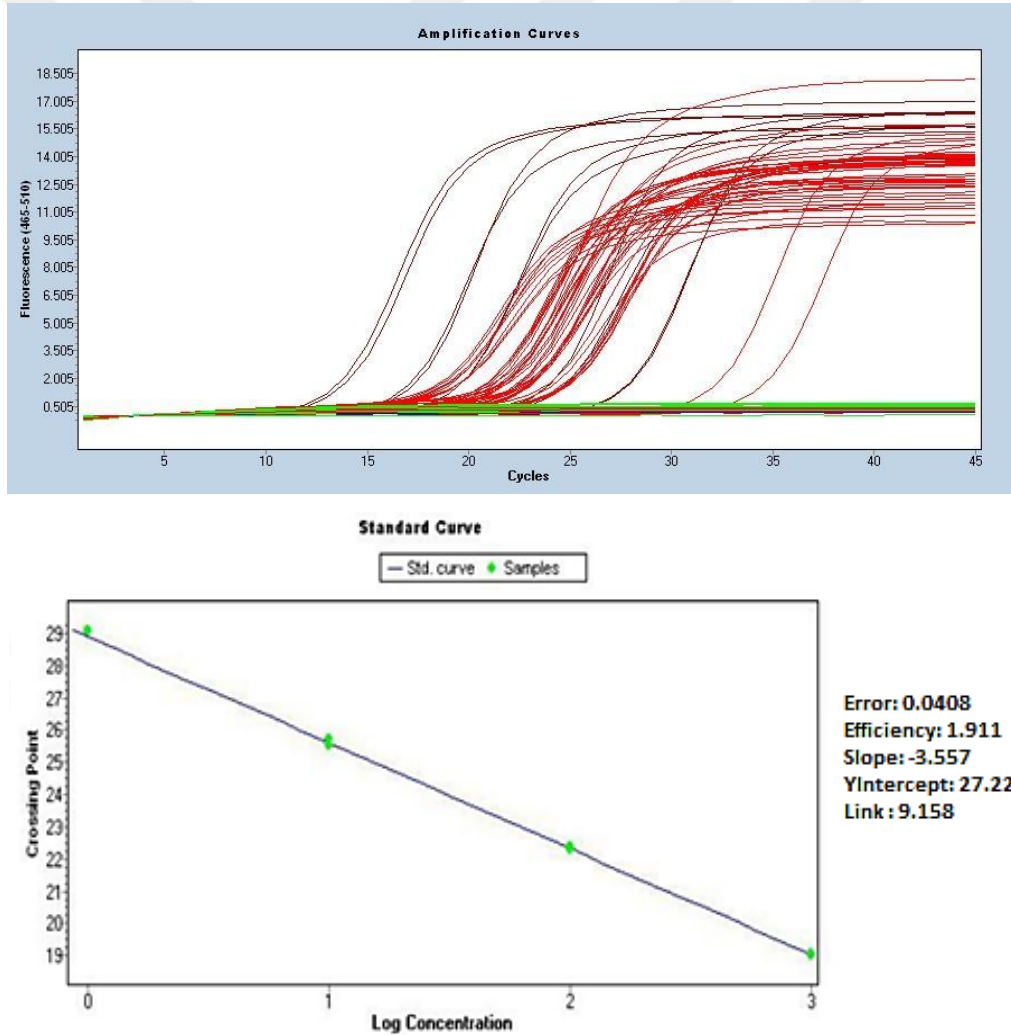
5. Üzerine plate spesifik film yapıştırıldı .
6. 3000 rpm de kısa süreli santrifüj edilerek cihaza koyuldu.
7. Aşağıda Tablo 3-7’de belirtilen koşullarda qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3-7: Real Time PCR koşulları

AŞAMALAR	SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
ÖN DENATÜRASYO N	95	5 DK	1
AMPLİFİKASYO N	95 62-64-65 (gen spesifik) 72	10 sn 20 sn 10 sn	45
ERİME EĞRİSİ	95 65 97	5 dk 1 dk -	1
SOĞUTMA	4	30 sn	1

3.2.7. qRT-PCR yöntemi ile 10 Aday Genin İfadesinin Baskılanmasının ve Artışının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

10 farklı gen 3 ayrı meme kanseri hücre hattı ve bir sağlıklı kontrol meme hücre hattı için vektör ve siRNA grubu olarak ele alındığında hücre hattına özgü baskılanma ve overeksprese edilme oranı dikkate alınarak saat bazında seçilen örneklerle daha önceki bölümde açıklandığı şekilde ilk olarak total RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi uygulandı. Vektör grubu için DHRS2 overeksprese ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış kontrol görevi gören hücreler, siRNA grubu için DHRS2 siRNA, madde eklenmemiş kontrol hücreleri ile TBP (referans gen) ve STUB1, BRCA1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, TRUSS, BARD1, C-MYC, MDM2, CCNE1 genlerinin ifade oranları qRT-PCR cihazı ile kantitatif olarak elde edildi.



Şekil 3-1: Örneklerle ait amplifikasyon eğrileri ve standart eğri

4. BULGULAR

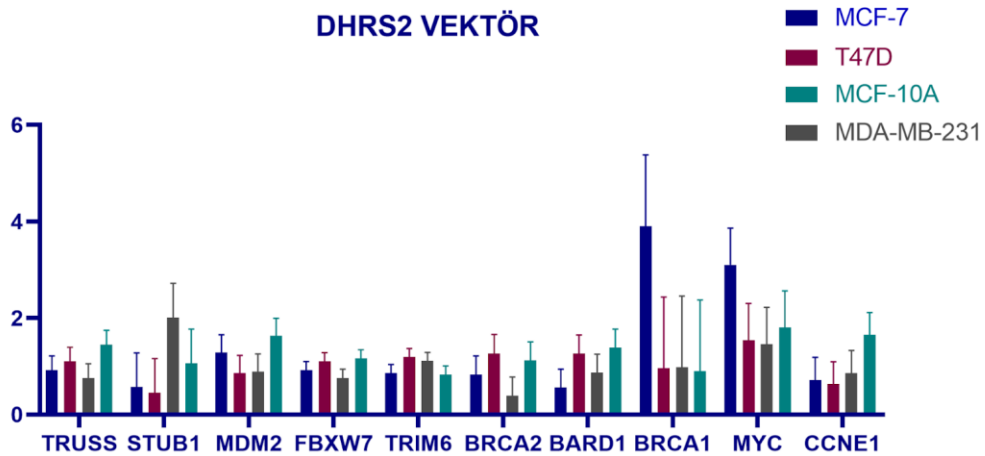
4.1. DHRS2 Gen İfadesinin Arttırılması Sonucunda Aday Genlerdeki Değişim Sonuçları

4.1.1. Vektör Grubu

Önceki çalışmamızda qRT- PCR sonuçlarının analiz edilmesiyle en yüksek ifade artışı yüzdesi vektör grubu için 24. saatte tespit edildiğinden bu saat dilimindeki örnekler kullanıldı. Örnekler ikili tekrar halinde çalışıldı. Vektör grubu, negatif kontrol grubu olan NTC grubu ile karşılaştırıldı. RT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçların kat değişim değeri hedef genler ve referans gen olarak ele alınan TBP üzerinden $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodu ile aşağıdaki gibi hesaplandı :

1. CT değerlerinin ortalaması
2. $\Delta CT = \text{Gene Ct} - \text{Referans gen CT}$
3. Kontrol grubu için ortalama ΔCT değeri hesaplanır
4. $\Delta\Delta CT = \text{Örnek } \Delta CT - \text{Ortalama Kontrol Grup } \Delta CT$
5. $2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Kat Değişim Değeri}$

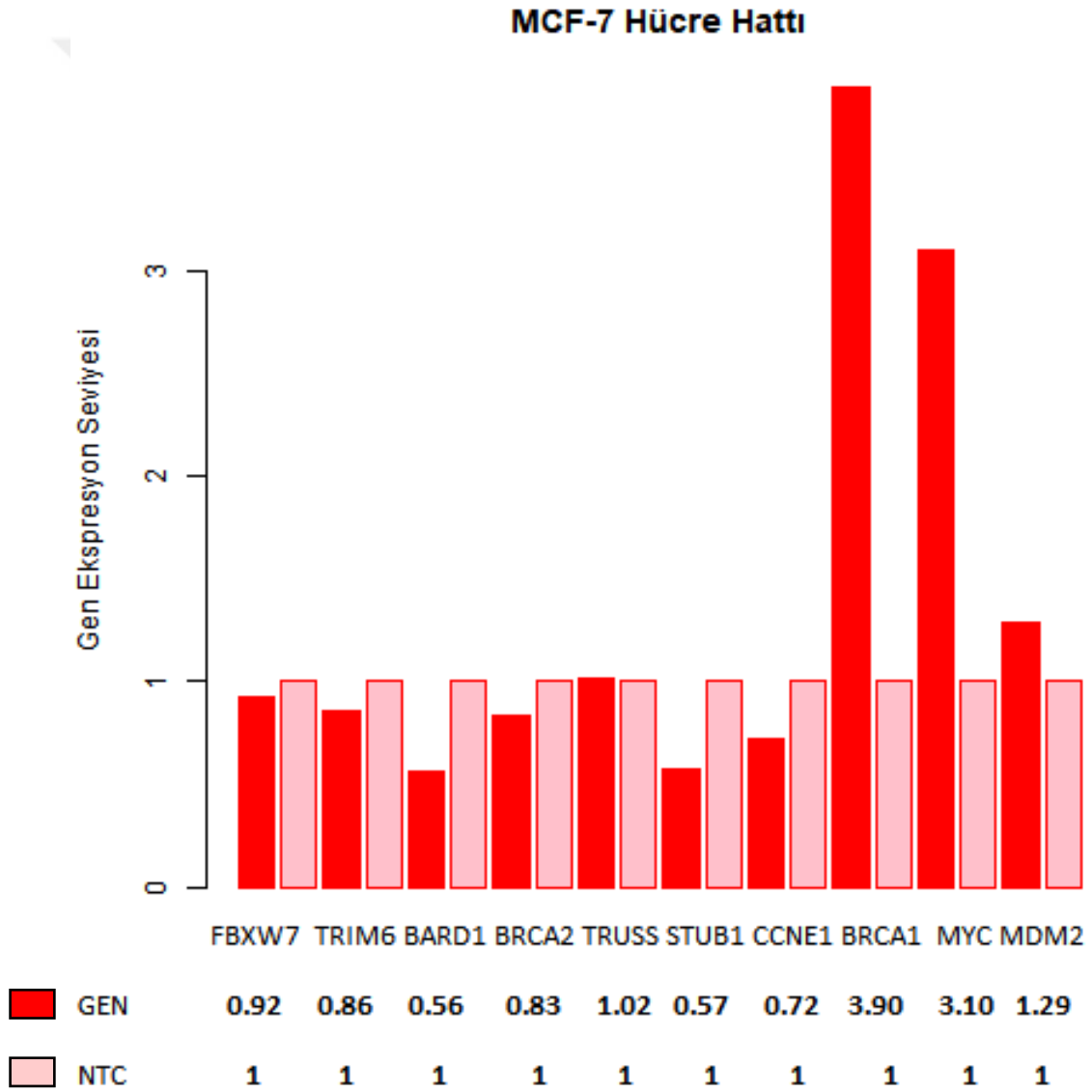
Ekspresyon değerleri ele alınarak R Studio (version 4.1.3) ve Graphpad Prism (version 9.5.1) aracılığı ile bar grafikleri elde edildi. DHRS2 geninin ifadesi overeksprese edildiğinde bu genlerin fonksiyonundaki değişiklik hem hücre hattı bakımından hem de MDM2-MYC-TP53 yolağı ilişkisinden doğrudan ve dolaylı olarak etkileşimde bulunan genler üzerinden analizleri yapılmıştır.



Şekil 4-1: Vektör grubu qRT-PCR ekspresyon sonuçları

4.1.1.1. MCF-7 Hücre Hattı Vektör Grubu

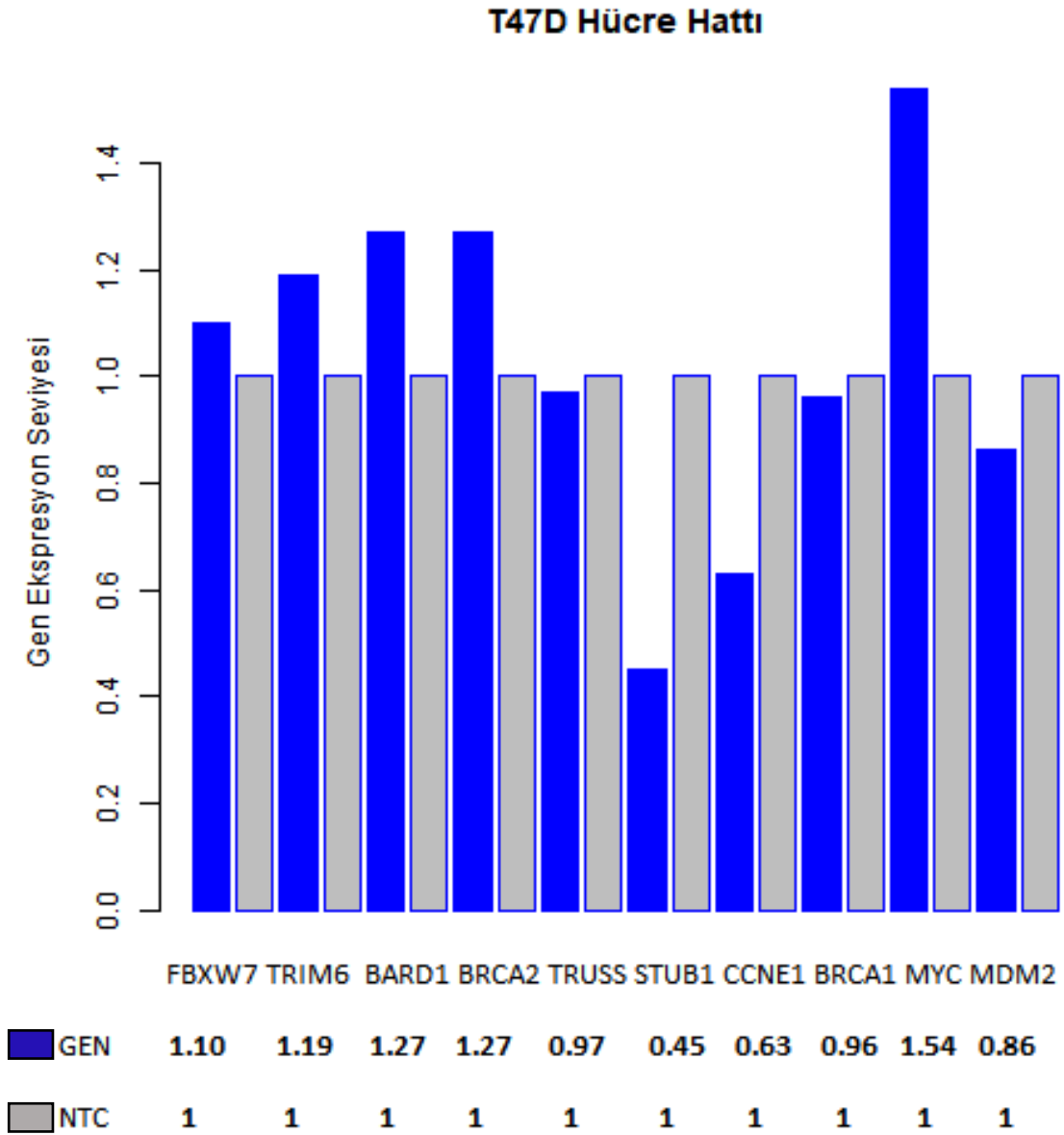
Vektör grubu için hücre hattı açısından Şekil 4-1'e baktığımızda MCF-7 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırıldığında en yüksek artışın kontrol grubuna kıyasla yaklaşık dört kat artışla BRCA1'de olduğu görülmektedir. BRCA1'i takiben MYC geninde üç kat artış olmuştur. MDM2 geninin ekspresyonunda artış, FBXW7, TRIM6, BARD1, BRCA2, STUB1 ve CCNE1 genlerinin ifadesinde azalış gözlemlenmiştir. TRUSS geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişiklik göstermemiştir. DHRS2 geninin overekspresyonu varlığında ifadesi en fazla azalan gen %44 ile BARD1 olmuştur.



Şekil 4-2: MCF-7 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.1.1.2. T47D Hücre Hattı Vektör Grubu

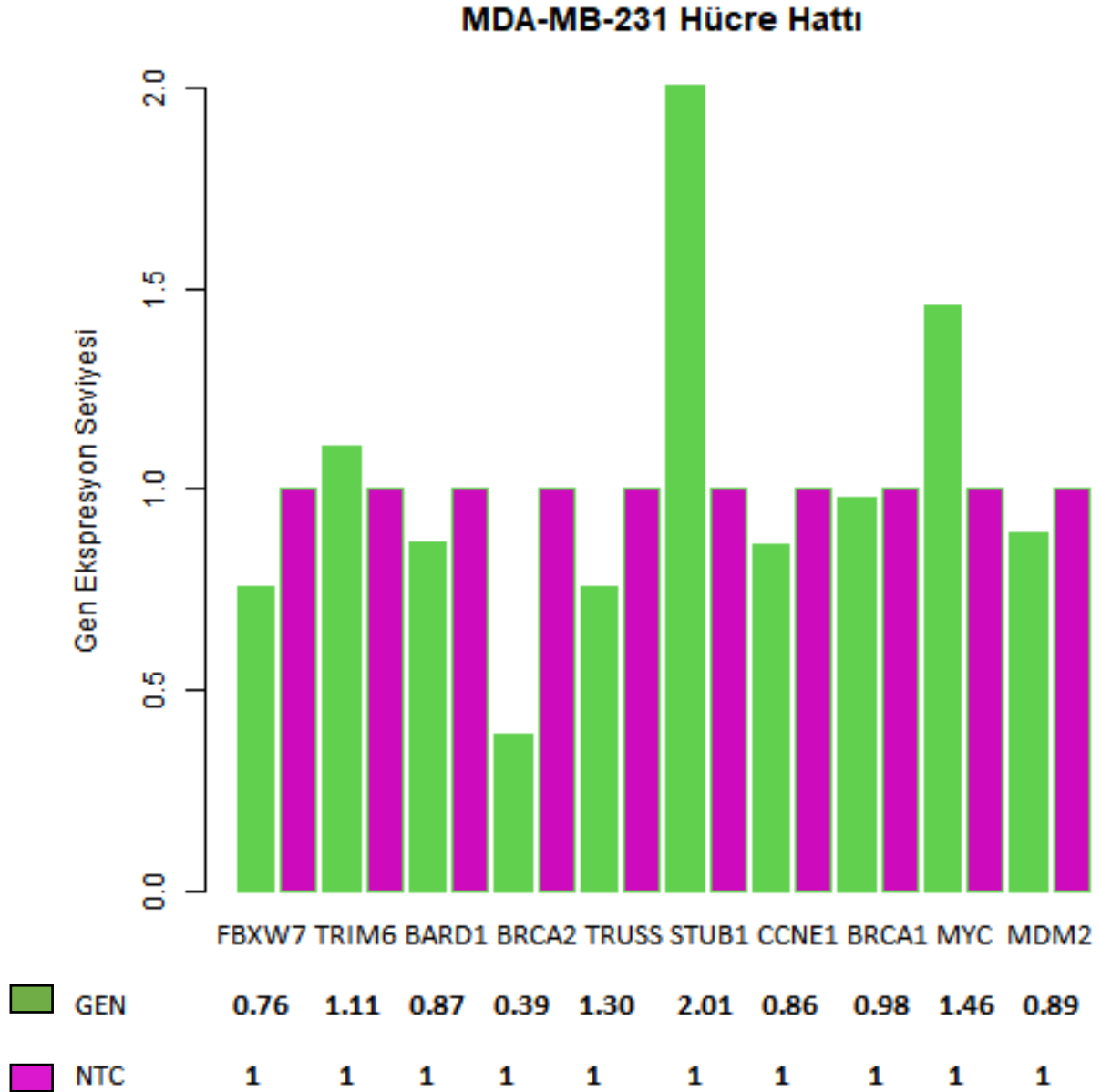
T47D hücre hattının diğer hücre hatlarından farklı olarak duktal meme hücre hattı olduğu bilinmektedir. Şekil 4-2’de en yüksek ifade artışının MYC geninde olduğu bununla birlikte FBXW7, TRIM6, BARD1, BRCA2 genlerinde artış, STUB1 geninin ifadesinde %55 azalış saptanırken, CCNE1 ifadesinde %37 azalış saptanmıştır. MDM2, BRCA1 ve TRUSS genleri kontrole yakın ekspresyon göstermiştir.



Şekil 4-3: T47D hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.1.1.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı Vektör Grubu

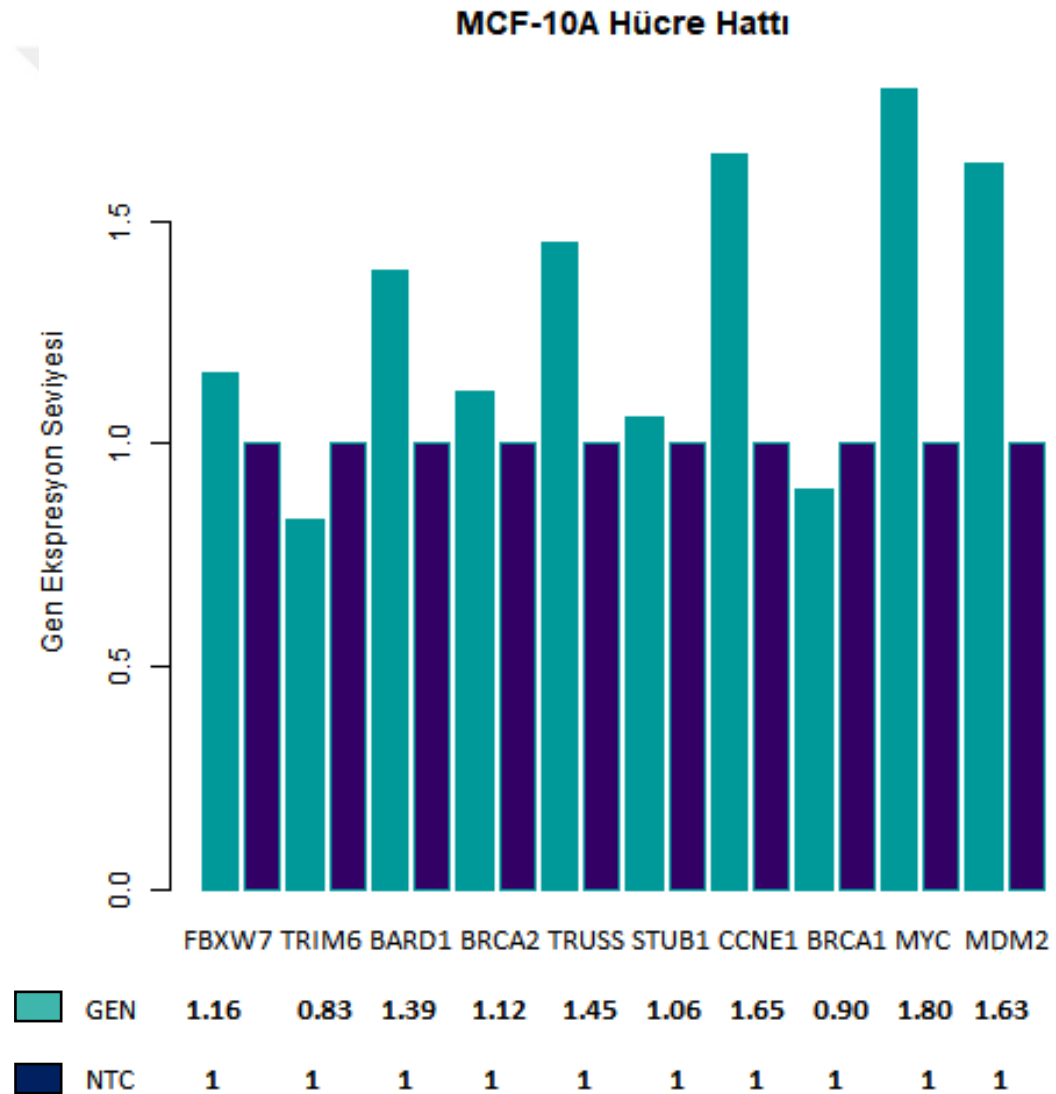
Bir diğer araştırılan TP53 mutant hücre hattı olan MDA-MB-231’de en yüksek seviyedeki gen ekspresyonu Şekil 4-3’de kontrol grubuna kıyasla iki kat artışla STUB1’de gözlemlenmiştir. STUB1’i takiben TRIM6, TRUSS ve c-MYC genlerinde de artış tespit edilmiştir. Diğer genlerdeki oran NTC’ye göre azalmıştır. BRCA2 geninin ifadesinde %61 oranında azalma söz konusudur.



Şekil 4-4:MDA-MB-231 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.1.1.4. MCF-10A Hücre Hattı Vektör Grubu

MCF-10A hücre hattında ise; MYC geninin ifadesi kontrol grubuna oranla yaklaşık 2 kat ekspresyon artışı göstermiştir. CCNE1, MDM2, BARD1 genleri yüksek oranda ekspresyon göstermektedir. Bununla birlikte FBXW7 ve BRCA2 genlerinde ekspresyonları artmıştır. TRUSS geninin ifadesi kontrol grubuna kıyasla bir buçuk kat artmıştır. STUB1 geninin ifadesi kontrol grubuna kıyasla neredeyse sabit kalmıştır. BRCA1 ekspresyonu kontrol grubuna oranlar düşük seviyede azalmıştır. DHRS2 ifadesi arttığında en yüksek ekspresyon azalış oranı %17 ile TRIM6 genine aittir.



Şekil 4-5: MCF-10A hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi arttırılan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

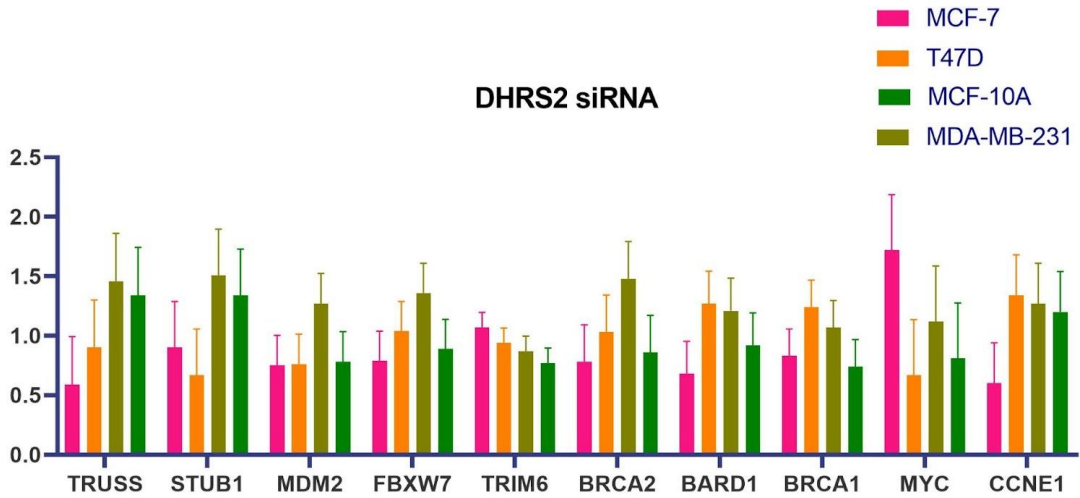
4.2. DHRS2 Gen İfadesinin Baskılanma Sonuçları

4.2.1. siRNA Grubu

siRNA grubu için önceki çalışmada hücre hatlarındaki gen anlatımının baskılanma seviyesi qRT-PCR ile analiz edilmesi sonucunda 72. saat diliminde MCF-7 hücre hattında %74 baskılanma oranı, T47D hücre hattında %80 baskılanma oranı tespit edilmiş olan örnekler kullanıldı. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında ise en yüksek baskılanma oranı 24. saat diliminde MDA-MB-231 için %73, MCF-10A için %70 tespit edilmiş olan örnekler ele alındı. siRNA grubunda FBXW7, TRIM6, BARD1, BRCA2, BRCA1, MYC, STUB1, TRUSS, CCNE1 ve MDM2 genlerinin hücre hatlarındaki ifadeleri RT-PCR yöntemi ile elde edildi.

RT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçların kat değişim değeri hedef genler ve referans gen olarak ele alınan TBP üzerinden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methodu ile aşağıdaki gibi hesaplandı. Ekspresyon değerleri ele alınarak R Studio (version 4.1.3) ve Graphpad Prism (version 9.5.1) aracılığı ile bar grafikleri elde edildi.

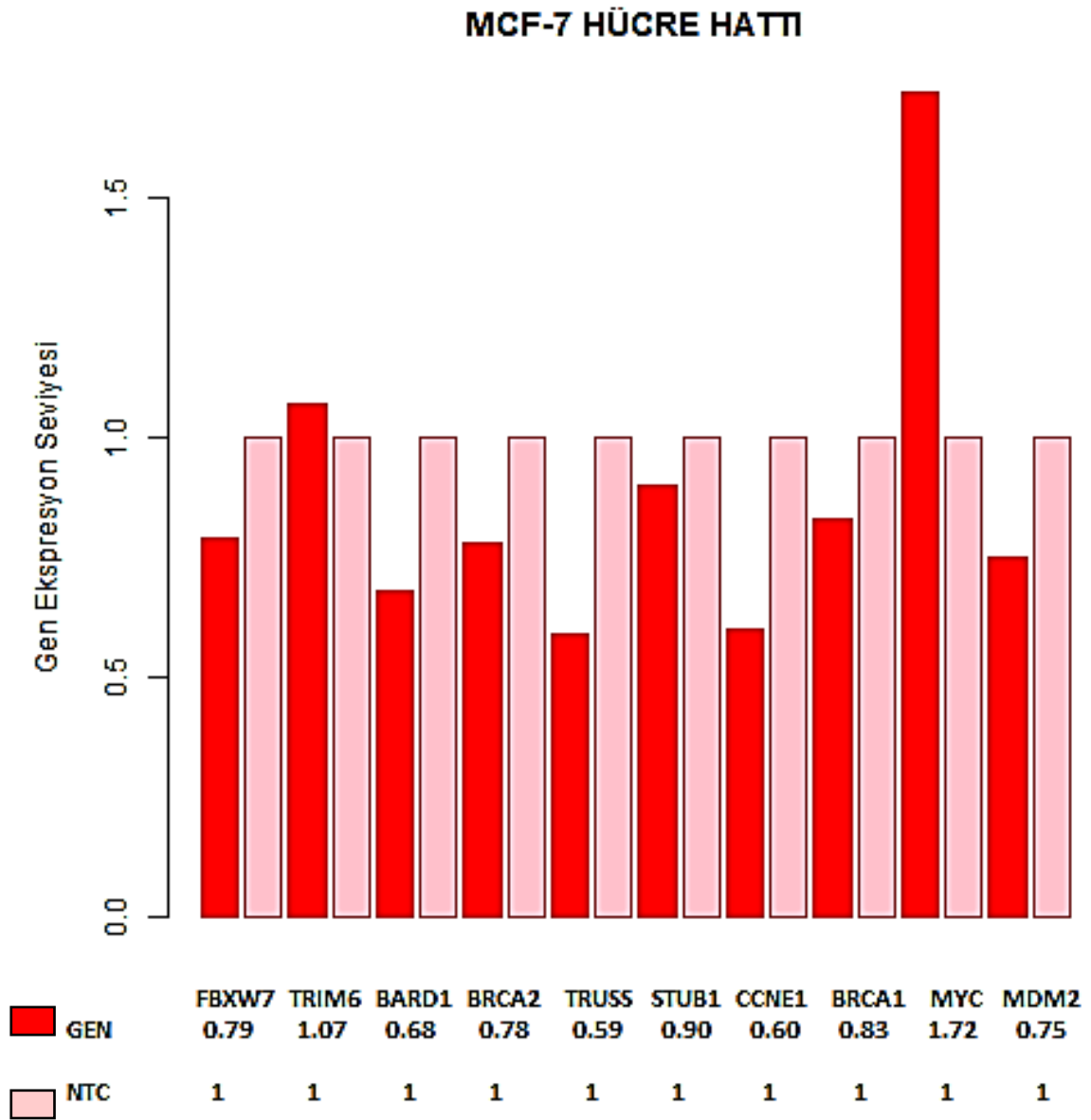
1. CT değerlerinin ortalaması
2. $\Delta C_t = \text{Gene Ct} - \text{Referans gen CT}$
3. Kontrol grubu için ortalama ΔC_t değerini hesapla
4. $\Delta\Delta C_t = \text{Örnek } \Delta C_t - \text{Ortalama Kontrol Grup } \Delta C_t$
5. $2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{Kat Değişim Değeri}$



Şekil 4-6: siRNA grubu qRT-PCR ekspresyon sonuçları

4.2.1.1. MCF-7 Hücre Hattı siRNA Grubu

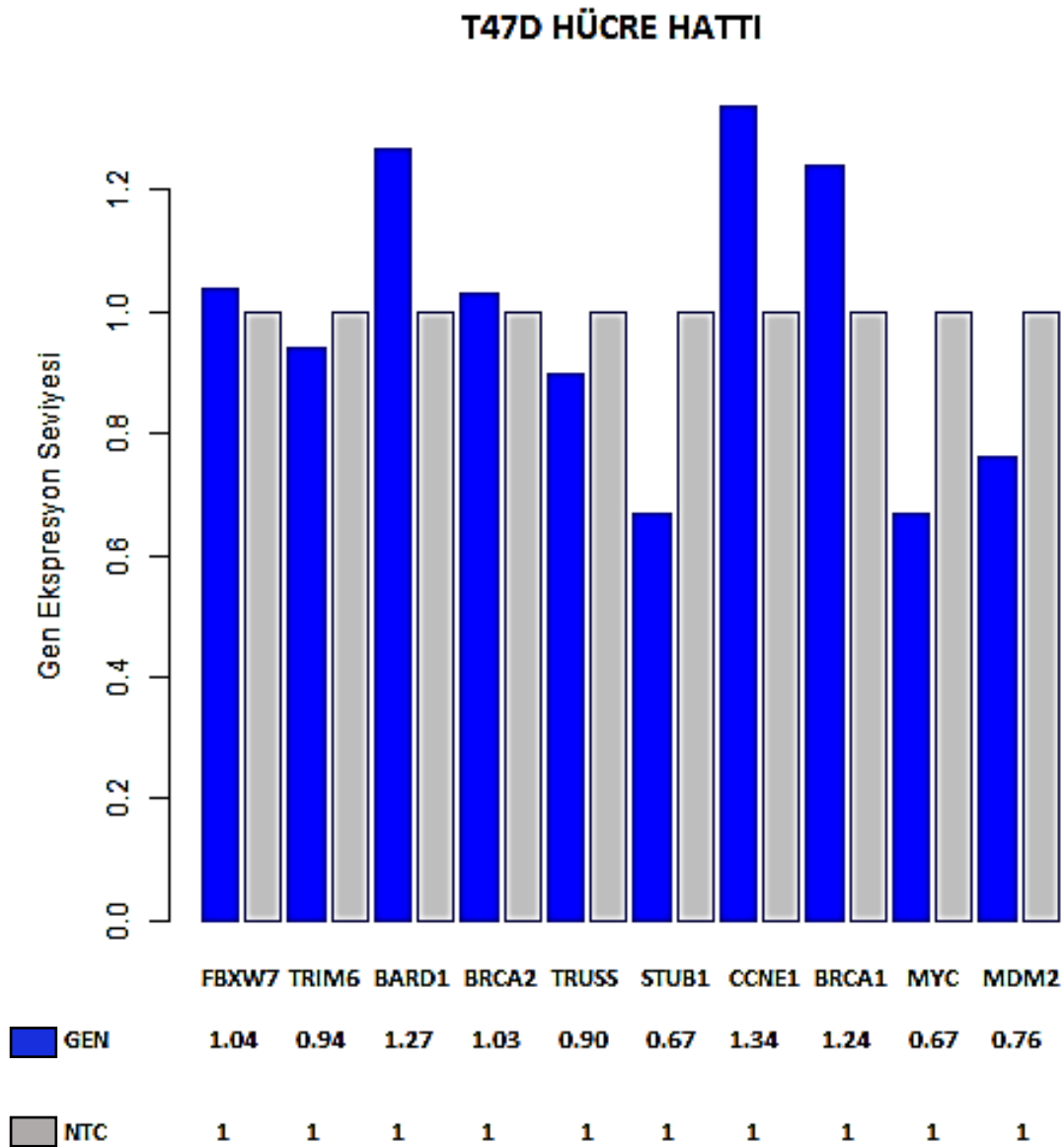
Hücre hattı bazında incelediğimizde, MCF-7 hücre hattında kontrol örneğine göre MYC geninin ekspresyonunun iki kat'a yakın tespit edilmekle birlikte TRIM6'da kontrole kıyasla benzer seviyede artış göstermiştir. TRUSS ve CCNE1 genlerinin ekspresyon seviyeleri %40 azalmakla birlikte bunları takiben diğer genlerin ekspresyon seviyelerinde de azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4-7: MCF-7 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.2.1.2. T47D Hücre Hattı siRNA Grubu

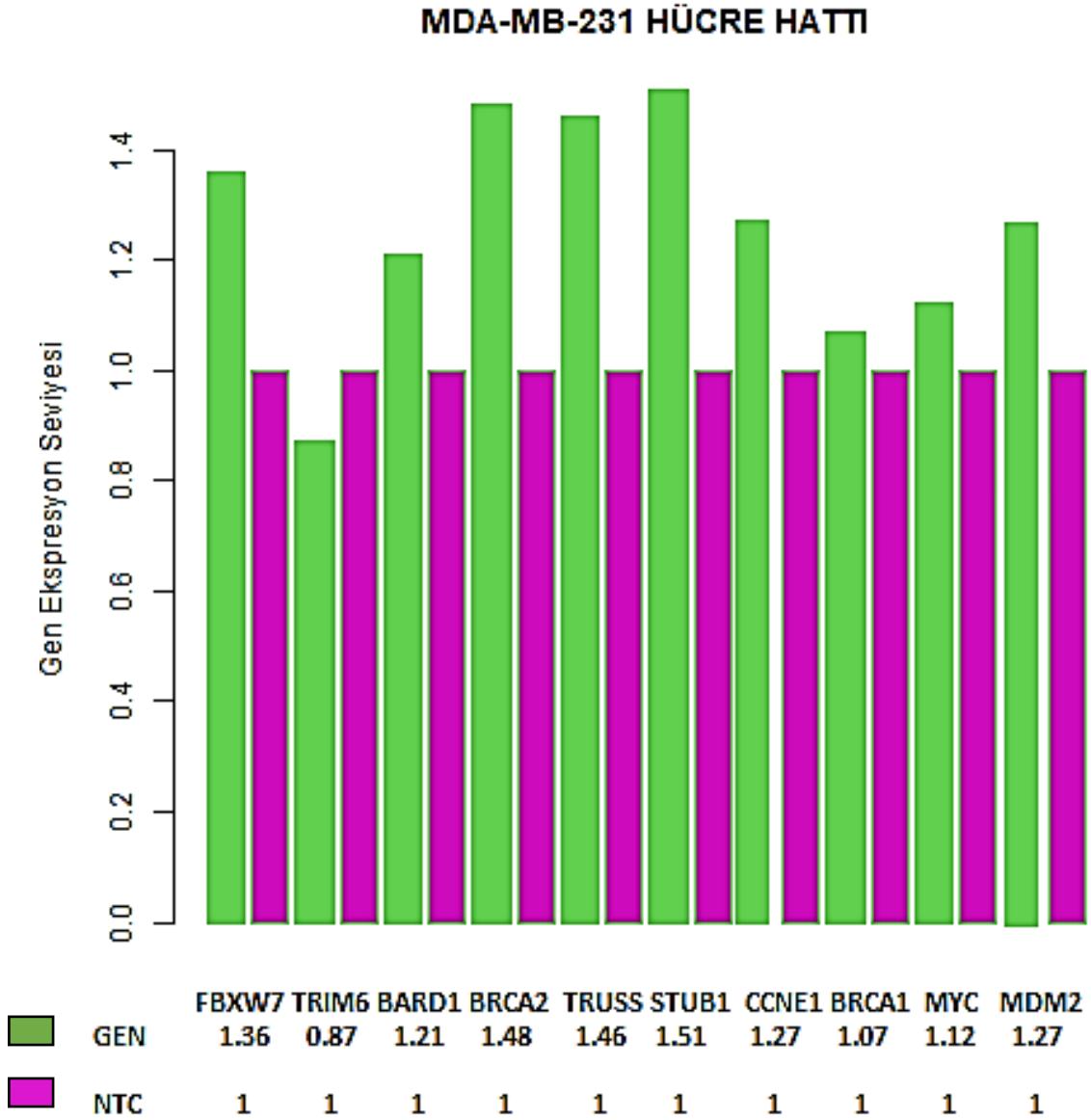
T47D hücre hattında CCNE1 en yüksek ekspresyonu gösterirken BARD1 ve BRCA1 geni takip etmektedir. FBXW7 ve BRCA2 geni kontrole yakın seviyede artış göstermiştir. TRIM6 ve TRUSS genlerinin ekspresyonları kontrole yakın seviyede azalma göstermektedir. T47D hücre hattında en düşük ekspresyonu %33 oranında MYC ve STUB1 genleri göstermektedir. MDM2 geninin ekspresyonunda da %24 oranında azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4-8:T47D hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.2.1.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı siRNA Grubu

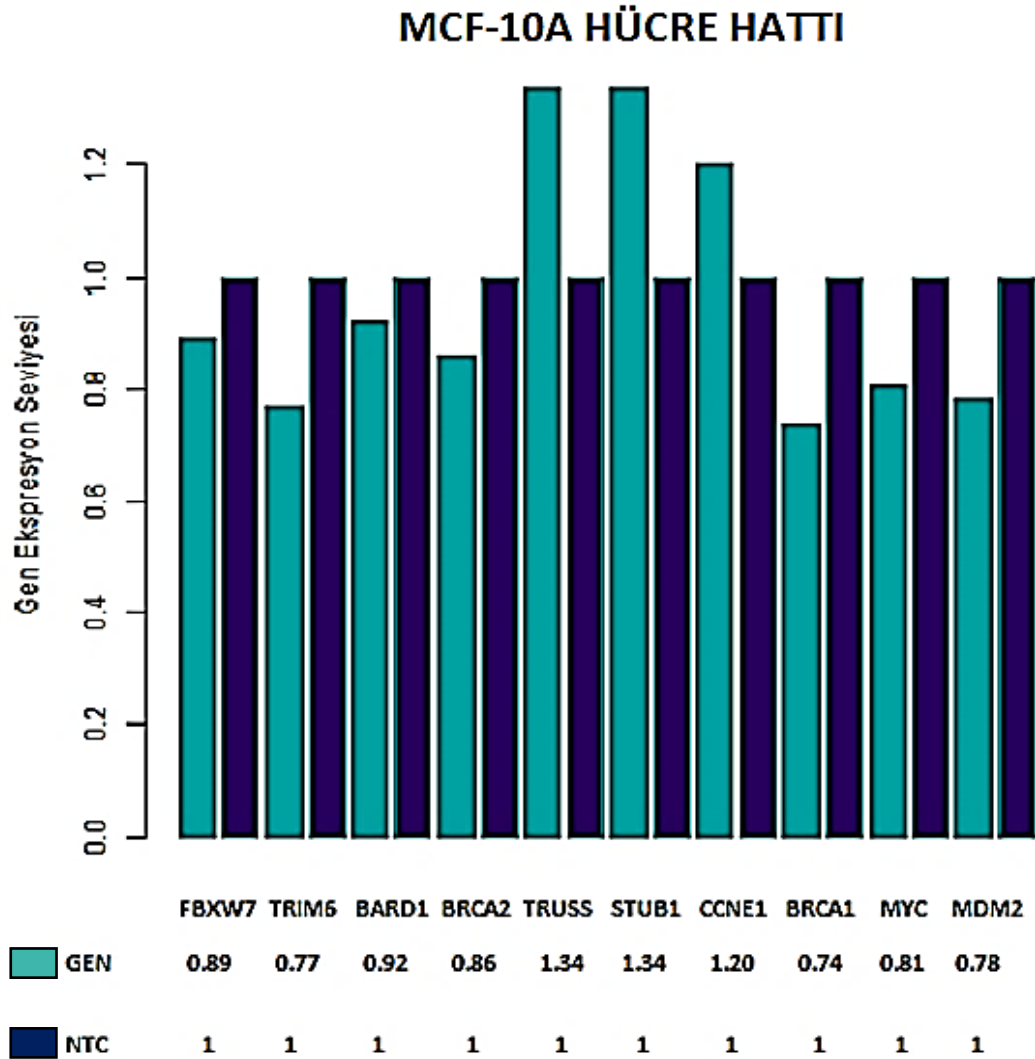
MDA-MB-231 hücre hattı incelendiğinde STUB1, BRCA2 ve TRUSS genlerinin ifade artışları en yüksektir. Bu genleri takiben FBXW7, CCNE1, MDM2, BARD1 genlerinin ekspresyonları artmıştır. BRCA1 ve MYC’de kontrole yakın ifade artışı tespit edilmiştir. TRIM6 dışında ise ifadesi azaldığı tespit edilen gen bulunmamaktadır.



Şekil 4-9: MDA-MB-231 hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.2.1.4. MCF-10A Hücre Hattı siRNA Grubu

MCF-10A hücre hattı incelendiğinde STUB1 ve TRUSS genlerinin ifade artışları eşit seviyede en yüksek olmakla birlikte CCNE1 geninin de ekspresyonu artmıştır. BARD1’de kontrole yakın ifade artışı tespit edilmiştir. FBXW7, TRIM6, BRCA2, BRCA1, MYC, MDM2 genlerin ifadesinde azalış tespit edilmiştir. En fazla ekspresyon kaybı %26 oranında BRCA1 geninde gözlenmektedir.



Şekil 4-10: MCF10-A hücre hattında DHRS2 geninin ifadesi baskılanan örneklerin aday genler ile etkileşim sonuçları

4.3. siRNA ve Vektör Grubu Network Analizi

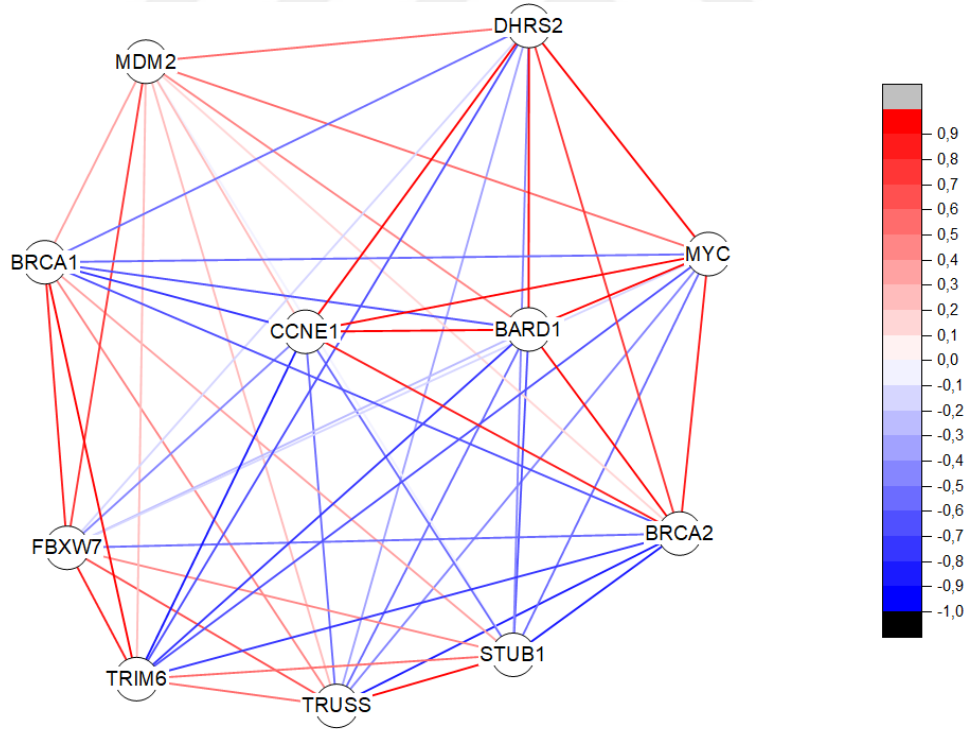
DHRS2 geninin ekspresyonu siRNA yöntemi ile susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile overekspres edilmiş örneklerin ifadesi protein kodlayan ve ubiquitinasyon ile ilişkili 10 farklı gen açısından biyolojik ağlar, protein-protein etkileşimleri ve fonksiyonel zenginleştirme açısından ele alınarak deneysel doğrulama için OriginPro (OriginPro 2022 (OriginLab Corp.) yöntemi ile network oluşturularak analiz edildi. Network analizinde renk skalasında -0,4_0,4 seviyesinde olanlar benzer seviyede ki ilişkiyi, -0,5_-1 seviyesinde olanlar kuvvetli negatif yönlü ilişkiyi, 0,5_1 seviyesinde olanlar kuvvetli pozitif yönde ilişkiyi temsil etmektedir.



4.3.1. MCF-10A Hücre Hattı Network Analizi

DHRS2 geninin merkezdeki ifadesi ele alındığında ; MCF-10A hücre hattı için DHRS2 geni ile kuvvetli pozitif yönde ilişkisi direkt tespit edilen genler ; MYC-MDM2-BARD1-CCNE1-BRCA2'dir. STUB1, BRCA1, TRIM6 ile kuvvetli negatif ilişki içindedir.

DHRS2 ile ilişkisi direkt bulunmayan ancak birbiri arasında etkileşimi tespit edilen genler ; FBXW7; MDM2, BRCA1, TRIM6 ile kuvvetli yönde etkilenirken; TRUSS ve STUB1 ile benzer seviyede etkilenmiştir. TRIM6; FBXW7, BRCA1 ile kuvvetli yönde etkilenirken; MDM2, TRUSS ve STUB1 ile benzer seviyede etkilenmiştir. TRUSS; STUB1 ve FBXW7 ile kuvvetli yönde etkileşime girmiştir. MDM2, BRCA1, TRIM6 ile benzer seviyede etkilenmiştir. STUB1; TRUSS ile kuvvetli yönde etkileşime girmiştir. BRCA1, FBXW7 ve TRIM6 ile benzer seviyede etkilenmiştir. BRCA1; FBXW7 ve TRIM6 ile kuvvetli yönde etkileşime girmiştir. TRUSS, STUB1 ve MDM2 ile benzer seviyede etkilenmiştir.

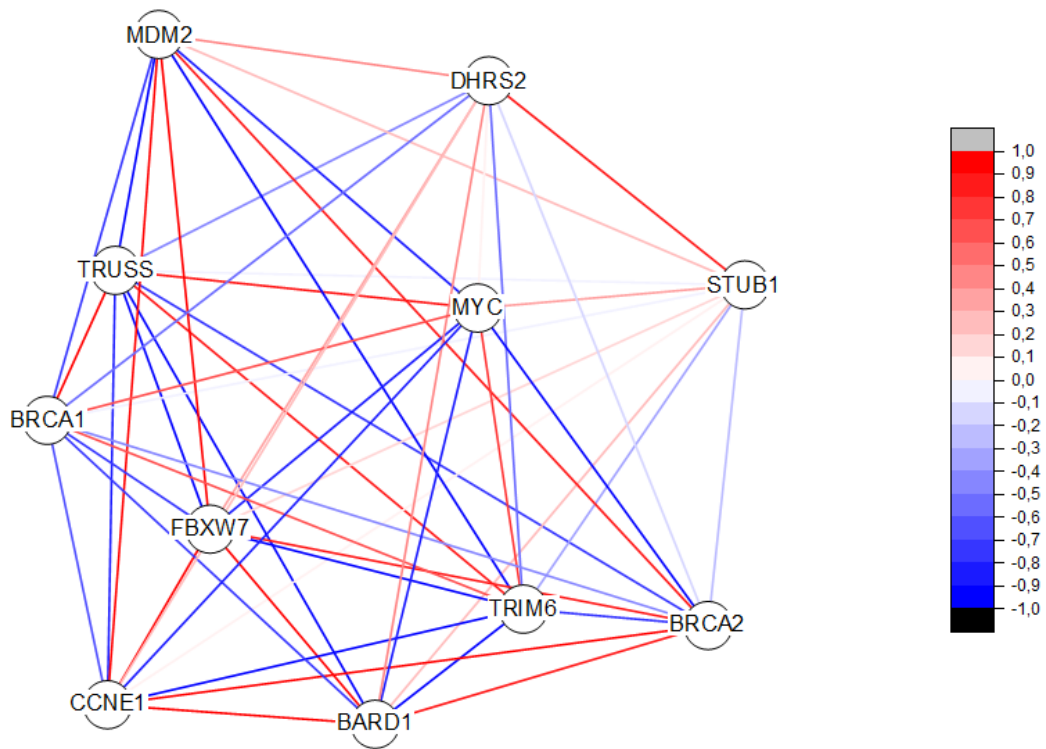


Şekil 4-11: MCF10A grubuna ait network analizi

4.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattı Network Analizi

DHRS2 geninin merkezdeki ifadesi ele alındığında ; MDA-MB-231 hücre hattı için DHRS2 geni ile kuvvetli pozitif yönde ilişkisi direkt tespit edilen genler ; STUB1'dir. FBXW7, CCNE1, BARD1 ile benzer seviyede etkilenmektedir.

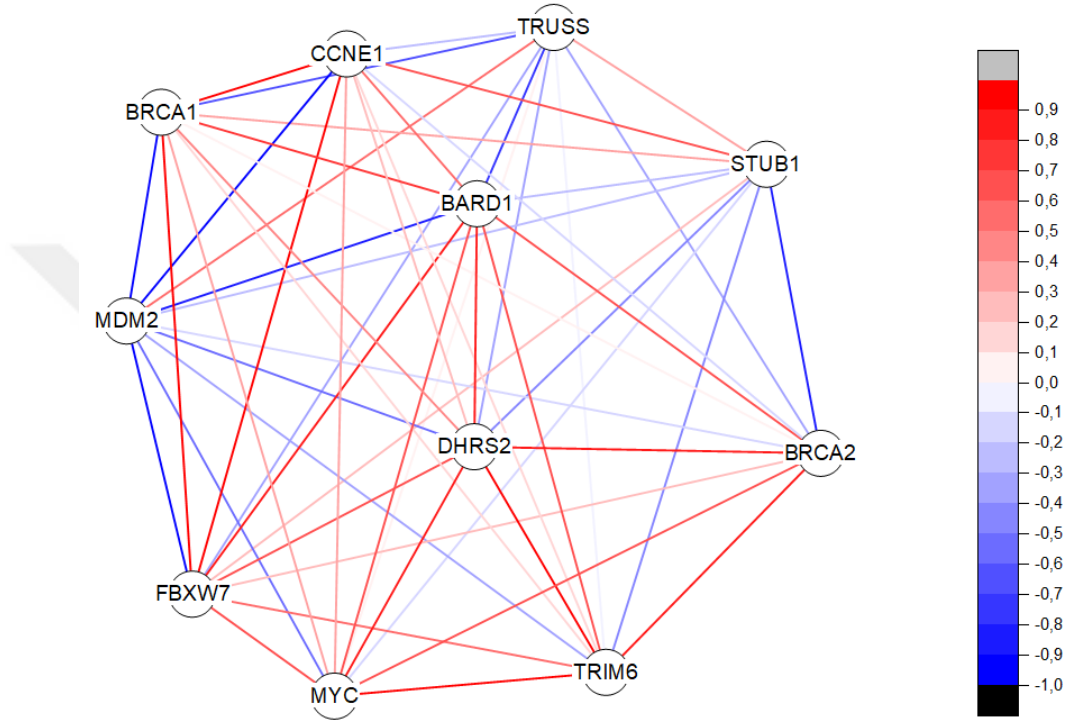
DHRS2 ile ilişkisi direkt bulunmayan ancak birbiri arasında etkileşimi tespit edilen genler; FBXW7'nin DHRS2 ile etkileşimi MDM2 üzerinden daha efektif gerçekleşmektedir. CCNE1, DHRS2 ile benzer seviyede etkilenmektedir ancak FBXW7 üzerinden etkileşimi artmaktadır.



Şekil 4-12: MDA-MB-231 grubuna ait network analizi

4.3.3. T47D Hücre Hattı Network Analizi

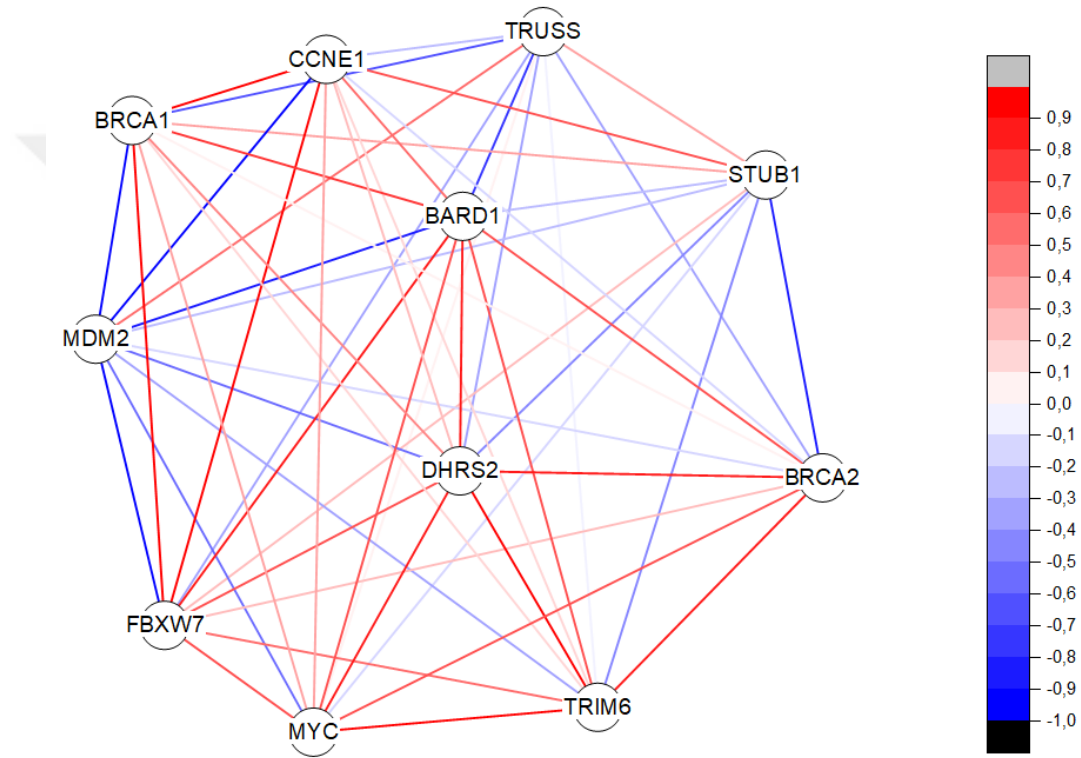
DHRS2 geninin merkezdeki ifadesi ele alındığında ; T47D hücre hattı için DHRS2 geni ile kuvvetli pozitif yönde ilişkisi direkt tespit edilen genler ; BARD1, BRCA2, TRIM6, FBXW7, MYC 'dir. CCNE1, BRCA1 benzer seviyede ilişki içindedir. TRUSS, STUB1 ve MDM2 ile negatif ilişki içindedir.



Şekil 4-13: T47D grubuna ait network analizi

4.3.4. MCF-7 Hücre Hattı Network Analizi

DHRS2 overekspres hücrelerde en önemli seviyede ekspresyonu artan gen BRCA1'dir. Buna karşılık si-DHRS2 hücrelerde BRCA1 ekspresyonu belirgin seviyede azalmıştır. DHRS2 varlığında artıp yokluğunda azalan BRCA1 geni network analizinde DHRS2 ile kuvvetli pozitif ilişki göstermektedir. Bununla birlikte FBXW7, MYC, BARD1, TRIM6, BRCA2 genleri ile de pozitif korelasyon içindedir. STUB1, MDM2 ve TRUSS ile negatif ilişki içindedir.



Şekil 4-14: MCF7 grubuna ait network analizi

5. TARTIŞMA

Meme kanserinin biyolojik ve klinik davranışı, bir hastadan diğerine açıkça değişiklik göstermekte, bu da hastalığın evrimi ve hasta sonuçlarının takibini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, klinisyenlerin her hasta için en iyi tedaviyi seçmelerine yardımcı olacak biyobelirteçlere ihtiyaçları vardır. Yıllardır meme kanseri tedavisine östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 durumu gibi doku bazlı biyobelirteçler öncülük etmiştir (116). Ancak meme kanserinin moleküler karakterizasyonunun daha iyi anlaşılması ve yeni hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkmasıyla birlikte, daha kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesi için daha fazla potansiyel biyobelirteç gereklidir.

Normal ve östrojen reseptörü negatif meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmada DHRS2, HMGCS2, HPGD ve ACSL genlerinin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bu genlerin işlevi lipid modifikasyonu, taşıma ve metabolizma ile bağlantılıdır; bu, ifadelerinin steroid metabolizmasında önemli roller oynayabileceğini ve ayrıca meme hücrelerinin östrojen reseptörü negatif veya pozitif kanserlere dönüşme durumunu belirleyebileceğini göstermektedir. Bu konuda altta yatan mekanizmaların daha fazla açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. DHRS2'nin, steroid metabolizmasındaki aktif işlevi göz önüne alındığında, ER meme kanserli hastalara özgü terapötik hedefler için potansiyel aday olabileceği öngörülmüştür (117).

TP53-MDM2 pathway'i, çeşitli hücresel yollarda yer alan geniş etkileşim ağına olduğundan, hem protein-nükleik asit hem de protein-protein etkileşimlerini (PPI) incelemek için kullanılan dinamik ve iyi karakterize edilmiş bir modeldir (118).

2020 yılında laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada Jurkat hücre soyunda LEF1 geni baskılandığında, tümör baskılayıcı olan DHRS2 gen ifadesinin önemli seviyede azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçla birlikte DHRS2 geninin işlevinin aydınlatılması üzerine çalışmalara devam edilmiştir (119). Sonrasında 2021 yılında laboratuvarımızda yapılan bir diğer çalışmada DHRS2 geninin, MCF7 hücre hattında hücre migrasyonunun bir düzenleyicisi olarak işlev gösterdiği bildirilmiştir. Ancak DHRS2 hakkındaki bilgileri genişletmek, etkilediği molekülleri tespit etmek ve meme kanserindeki rolünü ortaya çıkarmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (120).

Meme kanserinde DHRS2 ile ilgili yapılan çalışmalar sayıca sınırlı olduğu için gerçekleştirdiğimiz kapsamlı çalışmada, 4 farklı insan meme hücre hattında DHRS2 ile ilişkili olacağı düşünülen bazı ubiquitin ligaz genleri ile tümörleşme sürecinde önemli olan ve DHRS2 ile olan ilişkisi direkt bilinen MDM2 ve c-MYC genlerinin etkileşimi araştırıldı. Laboratuvarımızda son yürütülen bir çalışmada, MCF7, MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarında siRNA yöntemi ile DHRS2 geninin ekspresyonu susturulmuş ve DHRS2 ekspresyon vektörü ile aşırı eksprese edilmiştir. Bu hücrelerde (DHRS2 susturulan, overeksprese edilen ve yabancı tip) belirlenen aday genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Gerçekleştirilen çalışmada amaç, DHRS2'nin meme kanserindeki etkisinin hedeflenen genlerden hangileri ile etkileşimde olduğunu açığa çıkarmak ve DHRS2'nin tümör metabolizmasındaki rolünü aydınlatmaktır.

DHRS2 geninin susma ve aşırı ifadelenme oranı en yüksek olan saat dilimi seçildi ve analiz için kullanıldı. DHRS2 geninin susturulması ve arttırılmasının ubiquitin ligaz genleri üzerindeki etkisi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ denklemi ile qRT-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Bununla birlikte DHRS2 geninin ubiquitin ligaz genleri ile arasındaki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymak için network analizi yapıldı. MCF10A vektör grubumuzda genlerinin ekspresyonları normal seviyededir. En yüksek ekspresyonu MYC göstermektedir. siRNA grubunda ise STUB1, TRUSS ve CCNE1 ekspresyon seviyeleri artarken herhangi bir gende kayda değer ekspresyon azalışı tespit edilmemiştir. MCF10-A normal meme hücre hattı olduğu için diğer hücre hatlarına oranla sonuçlar beklenen seviyededir.

MDA-MB-231 hücre hattı vektör grubunda STUB1 kontrol grubuna kıyasla yüksek ekspresyon gösterirken BRCA2'nin ifadesi ciddi oranda azalmıştır. 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada, farklı insan meme kanseri hücre hatlarında ve bir grup meme kanseri dokusunda STUB1 ekspresyonu incelenmiştir. İlk kez STUB1 ifadesinin meme kanserinin moleküler alt tipi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. STUB1, ağırlıklı olarak üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olan meme kanserinin *basal-like* alt tipinde en az ifade edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde bir tümör baskılayıcı görevinde bulunan STUB1 için fonksiyonel veri sağlamaktadır. Dolayısıyla STUB1 ekspresyonu meme kanserinin moleküler alt tipini belirlemek için bir belirteç (121). Fakat çalışmamızda STUB1 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla 2 kat artış göstermiştir.

DHRS2 ifadesi overeksprese olan örnekler STUB1'in ifadesini desteklemekte ve DHRS2-STUB1 genlerinin korele çalıştığı çıkarımı yapılmıştır. Öte yandan diğer hücre hatlarında buna paralel sonuç belirlenmemiştir. Bu durumda MDA-MB-231 hücre hattının diğer hücre hatlarından farklı olarak metastatik ve ER, PR, HER2 reseptörlerden yoksun olduğu göz önüne alındığında STUB1'in MDA-MB-231 hücre hattı için bir biyobelirteç olduğu sonucu çıkarılmıştır. Buna ek olarak DHRS2 vektör uygulaması sonucu MCF-7'de yüksek seviyede eksprese olduğunu bildiğimiz DHRS2, BARD1'in ifadesini negatif yönde etkilediğinde STUB1 ve BARD1 genlerinin ifadelerinde network analizine pozitif yönlü etkileşim saptandı. Buna karşılık kontrol grubu olarak kullanılan MCF10A insan meme epitel hücre hattında DHRS2 geni BARD1'in ifadesini pozitif yönde etkilediğinde tam aksine STUB1 ve BARD1 negatif etkileşim içinde bulundu.

2021 yılında yapılan başka bir çalışmada MDA-MB-231 hücre hattında TRIM6'nın meme kanserindeki olası rolünü değerlendirmek için ekspresyon seviyesi, qRT-PCR, western blot ve immünohistokimya analizi ile belirlenmiştir. Yapılan analizler neticesinde TRIM6'nın mRNA ekspresyonu, normal dokuya kıyasla meme kanseri dokularında artmıştır. TRIM6'nın STUB1'e bağlandığını ve meme kanseri hücresinde STUB1'in ubiquitinasyon aracılı bozulmasına katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte STUB1'in aşırı ekspresyonu, meme kanseri hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunda TRIM6'nın neden olduğu artışı baskılamaktadır (122). Çalışmamızda TRIM6-STUB1'in belirgin oranda ki negatif ilişkisini vektör grubunda MDA-MB-231 ve T47D hücre hattında, siRNA grubunda ise T47D, MDA-MB-231 ve MCF10-A hücre hattında gerçekleştirdiğini gerekli analizler sonucunda doğruladık.

MCF7 hücre hattı vektör grubunda BRCA1 kontrol grubuna kıyasla 4 kat artış gösterirken, siRNA grubunda BRCA1'in ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. BRCA1'in DHRS2 ile ilişkisinin pozitif yönde olduğu tespit edildi. MYC geninin ifadesi MCF7 hücre hattı vektör grubunda 3 kat artmıştır. Yapılan çalışmalarda, meme epitel hücrelerinde (MEC) meme kanserinin başlangıç aşamasında c-MYC geninin aşırı eksprese olduğu bildirilmiştir. Epitelyal hücreler invaziv özelliklerini kaybederek mezankimal hücrelere dönüşürken fazla eksprese olan c-MYC'in bu geçişe etkisi henüz belirlenmemiştir (123).

Bununla birlikte STUB1 ve BARD1 ifadesi kontrol grubuna göre ciddi oranda azalmıştır. BRCA1'in, BARD1 ile bir E3 ubiquitin ligaz oluşturarak işlevini yerine getirdiği bilinmektedir. BRCA1'de kanserle ilişkili birçok mutasyon bilinmesine rağmen, BARD1 geninde mutasyon çok az bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada ER α -pozitif MCF-7 hücrelerinde BRCA1 – BARD1 kompleksini E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile olası ilişkisi araştırılmıştır. BRCA1 veya BARD1'in aşırı ekspresyonu, ER α ubiquitinasyonu ile sonuçlanmıştır (124).

Çalışmamızda BRCA1-BARD1 kompleksinin etkileşimi siRNA grubundaki tüm hücre hatlarında benzer seviyededir. Vektör grubunda MDA-MB-231, T47D ve MCF10A hücre hatlarında BRCA1'e ait kat değişimi kontrol grubu ile neredeyse eşit seviyede iken, BRCA1-BARD1 kompleksi MCF-7 hücre hattında kayda değer negatif yönlü ilişki içindedir. Bu sebeple, DHRS2'nin aşırı ekspresyonunun BRCA1-BARD1 kompleksinin aktivitesini etkilediğini düşünmekteyiz. siRNA grubunda incelediğimizde ise etkileşim içinde oldukları çıkarımı T47D hücre hattında eşit seviyede eksprese olmaları doğrultusunda yapılır. Aynı şekilde diğer hücre hatlarında da korele çalışmalar da T47D hücre hattındaki orana kıyasla net değildir.

MYC ifadesi T47D vektör grubunda en yüksek seviyede artarken STUB1'in ifadesi önemli ölçüde azalmıştır. STUB1'in aracılık ettiği MYC bozulmasındaki artış, azalan MYC transkripsiyonel aktivitesi ve MYC hedef genlerinin azalan ekspresyonu ile ilişkilidir (93). MYC-STUB1 ilişkisi hem vektör hem siRNA grubu için T47D gibi diğer hücre hatlarında da negatif yönlü çalışmaktadır. DHRS2 ifadesi MCF7 siRNA grubunda baskılandığında MYC ifadesi yüksek oranda ekspresyon gösterirken diğer genlerin ifadesi benzer seviyededir. MCF-7 hücrelerinde c-Myc protein seviyesi RNAi ile baskılandığında tümör büyümesi in vitro ve in vivo olarak engellendiği bildirilmiştir. Bu çalışma, meme kanserinin tedavisinde RNAi'nin terapötik potansiyelinin göstergesidir (125). Çalışmamızda MCF-7 siRNA grubunda, DHRS2 baskılandığı durumda, MDM2'nin ekspresyonunun artmasını beklemekteyiz. Ancak sonuçlarımızda ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu durumu hücre hattı açısından değerlendirdiğimizde; MDA-MB-231 hücre hattında MYC ve MDM2 genlerinin ekspresyonları artmıştır. Vektör grubunu ele aldığımızda DHRS2 geninin overekspresyonu sonucu, MDM2 geninin ekspresyonunun azalmasını beklemekteyiz. Sonuçları incelediğimizde MDA-MB-231 ve T47D'de MDM2 geninin ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla düşük seviyede azaldığını görmekteyiz.

Tam aksine MDM2-MYC etkileşimi MCF10A vektör grubu hariç diğer vektör grubu hücre hatlarında negatif korelasyon içindedir. Bu sonuç bize DHRS2 geninin MYC geninin stabilitesinde rol aldığını düşündürmektedir.

T47D siRNA grubunda ise en yüksek ekspresyonu CCNE1 gösterirken, STUB1 ve MYC'in ekspresyonu eşit oranda azalmıştır. T47D hücre hattında DHRS2'nin overeksprese olması durumunda STUB1-MYC ilişkisini zıt yönlü korele gözlemlerken DHRS2 ifadesinin susturulması durumunda bu iki genin eşit seviyede ekspresyon göstermesi DHRS2'nin belirtilen iki genle ilişkisini net bir şekilde ortaya koymaktadır.

MYC ve CCNE1, FBXW7'nin bir hedefidir. Hematopoetik tümörlerde FBXW7'nin tümör baskılayıcı olarak rol almaktadır. Bu tümörlerde FBXW7'deki mutasyonların tümöröenez ile bağlantılı olmasına rağmen diğer kanser türleriyle ilişkisi çok açık değildir. Örneğin, meme kanserlerinin bir alt grubunda FBXW7'nin inaktivasyonunun, prognoz ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu da FBXW7'nin fizyolojik rolünün ve kaybının hücre tiplerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir (126). Yapılan çalışmalarda, FBXW7 degrede olduğunda, c-MYC ve CCNE1 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. FBXW7, CCNE1'e ubiquitinasyonu için bağlanır (127). Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda FBXW7'nin ekspresyonu MDA-MB-231 hücre grubunda DHRS2 geninin hücre içindeki yokluğunda artarken varlığında azalmaktadır ancak her grup içinde ifadesi değişkenlik göstermiştir. FBXW7 hücre içinde farklı substratları hedefleyebildiğinden, FBXW7'nin meme kanserinin farklı alt tiplerindeki rolünü belirlemek için kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır (127).

TRUSS geninin MYC ubiquitinasyon ve degradasyonunu uyardığı çalışmalarda gösterilmiştir (93). MCF-7 vektör grubunda MYC geni TRUSS genine oranla 3 kat artış göstermiştir. DHRS2 gen ifadesi baskılanmış MDA-MB-231 hücre hattında TRUSS ve MYC genlerinin ifadelerinde zıt yönlü bir etkileşim bariz olarak saptandı. Hücre içerisinde DHRS2 yokluğunda TRUSS geninin mRNA ekspresyon miktarı artmıştır. Buna kıyasla DHRS2 varlığında TRUSS geninin ifadesinde baskılanma söz konusudur. MYC-TRUSS genlerinin ilişkileri hem siRNA hem vektör grubu içinde zıt yönlü ifade ile tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, moleküler düzeyde DHRS2 ile ubiquitin ligaz genleri arasındaki mekanizma da hedeflenen genler meme kanseri alt tipine bağılı olarak spesifikk göstermektedir. STUB1, BARD1, BRCA1 E3 ligazlarının ve ubiquitin ligaz kompleksi için bir adaptör proteini kodlayan TRUSS geninin ubiquitin ligaz tanıma bölgesine sahip olduğunu düşündüğümüz DHRS2 ile ilişkili olabileceğı ortaya konulmuştur. Bu tez çalışması, DHRS2'nin, hücre içerisindeki miktarının ubiquitin ligaz genlerinin gen ifadelerine olan etkisinin incelendiğı ilk çalışmadır. DHRS2 ile önemli hücre içi ubiquitin genlerinin ilişkisini göstermektedir. İleride, meme kanserinin patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir rolü olduğu düşüncesindeyiz. Bununla birlikte ilgili genlerin DHRS2 ile etkileşim mekanizmasının tespiti ve meme kanseri patogenezindeki rollerinin aydınlatılması için daha geniş çapta araştırmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Cooper GM. The cell: a molecular approach. 2nd ed. Washington D.C. Sunderland Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates; 2000. 673 p.
2. Ferlay J, Colombet M, Murielle, Soerjomataram I, Donald J, Parkin M, Piñeros M, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Wiley Online Libr
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin [Internet]. 2020 Jan [cited 2022 Jun 5];70(1):7–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31912902/>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. 2018 Nov [cited 2022 Jun 5];68(6):394–424.
5. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Sauer AG, et al. Breast cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Jun 5];69(6):438–51.
6. Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. Lancet (London, England)
7. Chen S, Parmigiani G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. J Clin Oncol
8. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Bloem M-J, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. JAMA
9. Simon A, Robb K. Breast Cancer. Cambridge Handb Psychol Heal Med Second Ed [Internet]. 2021 Aug 7 [cited 2022 Jul 17];577–80.
10. Nur U, El Reda D, Hashim D, Weiderpass E. A prospective investigation of oral contraceptive use and breast cancer mortality: Findings from the Swedish women's lifestyle and health cohort. BMC Cancer
11. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. Lancet. 2021 May 8;397(10286):1750–69.

12. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med*
13. Group on Hormonal Factors in Breast Cancer C. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet*
14. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet* (London, England)
15. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*
16. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*
17. Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*
18. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*
19. Gabrielli F, Gene ST-, 2012 undefined. Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. Elsevier
20. Li Z, Liu H, Bode A, Luo X. Emerging roles of dehydrogenase/reductase member 2 (DHRS2) in the pathology of disease. *Eur J Pharmacol*. 2021 May 5;898:173972.
21. Gabrielli F, Tofanelli S. Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene*. 2012 Dec 15;511(2):461–9.
22. Pellegrini S, Censini S, Guidotti S, Iacopetti P, Rocchi M, Bianchi M, et al. A human short-chain dehydrogenase/reductase gene: structure, chromosomal localization, tissue expression and subcellular localization of its product. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 2002 Apr 12;1574(3):215–22.

23. DHRS2 Gene - GeneCards | DHRS2 Protein | DHRS2 Antibody [Internet]. [cited 2022 Aug 20].
24. Transcript: ENST00000250383.11 (DHRS2-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 107 [Internet].
25. DHRS2 - Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt
26. Zhou Y, Wang L, Ban X, Zeng T, Zhu Y, Li M, et al. DHRS2 inhibits cell growth and motility in esophageal squamous cell carcinoma. *nature.com*
27. Gabrielli F, Tofanelli S. Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene*. 2012 Dec 15;511(2):461–9.
28. Pellegrini S, Censini S, Guidotti S, ... PI-... et BA (BBA, 2002 undefined. A human short-chain dehydrogenase/reductase gene: structure, chromosomal localization, tissue expression and subcellular localization of its product.
29. Shafqat N, Shafqat J, Eissner G, ... HM-C and M, 2006 undefined. Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue. *Springer*
30. Oda T, Sekimoto T, ... KK-J of C, 2018 undefined. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. *journals.biologists.com*
31. Shi ZZ, Jiang YY, Hao JJ, Zhang Y, Zhang TT, Shang L, et al. Identification of putative target genes for amplification within 11q13.2 and 3q27.1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(7):606–15.
32. Lane DP, Crawford L V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* [Internet]. 1979 [cited 2022 Sep 11];278(5701):261–3.
33. Monti P, Menichini P, Speciale A, Cutrona G, Fais F, Taiana E, et al. Heterogeneity of TP53 Mutations and P53 Protein Residual Function in Cancer: Does It Matter? *Front Oncol*. 2020 Oct 28;10.
34. TP53 Gene - GeneCards | P53 Protein | P53 Antibody.
35. Transcript: ENST00000269305.9 (TP53-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
36. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*

37. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1062–78.
38. Zhu H, Gao H, Ji Y, Zhou Q, Du Z, Tian L, et al. Targeting p53–MDM2 interaction by small-molecule inhibitors: learning from MDM2 inhibitors in clinical trials. *J Hematol Oncol* 2022 151
39. Juven-Gershon T, Oren M. MDM2: The ups and downs. *Mol Med*. 1999;5(2):71–83.
40. MDM2 Gene - GeneCards | MDM2 Protein | MDM2 Antibody [Internet]. [cited 2022 Oct 29].
41. Transcript: ENST00000258149.11 (MDM2-202) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108
42. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction. 2003 [cited 2023 Jan 1]; Available from: <http://aacrjournals.org/mcr/article-pdf/1/14/1001/3131545/1001-1008.pdf>
43. Zamaraev A V., Kopeina GS, Prokhorova EA, Zhivotovsky B, Lavrik IN. Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation. *Trends Cell Biol*
44. Chou KC. Progresses in Predicting Post-translational Modification. *Int J Pept Res Ther* [Internet]. 2020 Jun 1
45. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics* [Internet]. 2014 Mar 1
46. Bulatov E, Valiullina A, Sayarova R, Rizvanov A. Promising new therapeutic targets for regulation of inflammation and immunity: RING-type E3 ubiquitin ligases. *Immunol Lett*. 2018 Oct 1;202:44–51.
47. Deng L, Meng T, Chen L, Wei W, Wang P. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 Dec 1
48. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*
49. Pickart CM. Mechanisms Underlying Ubiquitination. <http://dx.doi.org/101146/annurev.biochem701503>
50. Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: Implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:73–96.

51. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* (80-). 2001 May 25;292(5521):1552–5.
52. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev.* 2003 May 1;29(SUPPL. 1):3–9.
53. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome.<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.0815.07101607>
54. Tokheim C, Wang X, Timms RT, Zhang B, Mena EL, Wang B, et al. Systematic characterization of mutations altering protein degradation in human cancers. *Mol Cell*
55. George AJ, Hoffiz YC, Charles AJ, Zhu Y, Mabb AM. A comprehensive atlas of E3 ubiquitin ligase mutations in neurological disorders. *Front Genet* [Internet]. 2018 Feb 14
56. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*
57. Chen C, Seth AK, Aplin AE. Genetic and Expression Aberrations of E3 Ubiquitin Ligases in Human Breast Cancer. *Mol Cancer Res*
58. Zheng N, Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem*
59. Yang Q, Zhao J, Chen D, Wang Y. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed.* 2021 Dec;2(1).
60. Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta*
61. Xie J, Jin Y, Wang G. The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life. *Reprod Biol Endocrinol*
62. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*
63. Ryu MY, Cho SK, Hong Y, Kim J, Kim JH, Kim GM, et al. Classification of barley U-box E3 ligases and their expression patterns in response to drought and pathogen stresses. *BMC Genomics*
64. Hu H, Dong C, Sun D, Hu Y, Xie J. Genome-Wide Identification and Analysis of U-Box E3 Ubiquitin-Protein Ligase Gene Family in Banana. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 3874
65. Dikic I, Robertson M. Ubiquitin ligases and beyond. *BMC Biol*

66. Fan J, Bellon M, Ju M, Zhao L, Wei M, Fu L, et al. Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. Vol. 21, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2022.
67. Welcker M, Orian A, Grim JA, Eisenman RN, Clurman BE. A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol*
68. FBXW7 Gene - GeneCards | FBXW7 Protein | FBXW7 Antibody [Internet].
69. Transcript: ENST00000281708.10 (FBXW7-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
70. Akhoondi S, Sun D, Von Der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res*
71. Akhoondi S, Lindström L, Widschwendter M, Corcoran M, Bergh J, Spruck C, et al. Inactivation of FBXW7/hCDC4- β expression by promoter hypermethylation is associated with favorable prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*
72. Zhao E, Maj T, Kryczek I, Li W, Wu K, Zhao L, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. *Nat Immunol* 2015 171
73. Wei G, Wang Y, Zhang P, Lu J, Mao JH. Evaluating the prognostic significance of FBXW7 expression level in human breast cancer by a meta-analysis of transcriptional profiles. *J Cancer Sci Ther*
74. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* (London, England)
75. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*
76. Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, Ando Y, Iwase H. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Cancer Sci*
77. Grim JE, Gustafson MP, Hirata RK, Hagar AC, Swanger J, Welcker M, et al. Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Biol*

78. CCNE1 Gene - GeneCards | CCNE1 Protein | CCNE1 Antibody [Internet].
79. Transcript: ENST00000262643.8 (CCNE1-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108
80. Minella AC, Grim JE, Welcker M, Clurman BE. p53 and SCFFbw7 cooperatively restrain cyclin E-associated genome instability. *Oncogene*
81. Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*
82. Ekholm-Reed S, Méndez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol*
83. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*
84. Möröy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2004 Aug
85. Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* (80-). 2001 Oct 5;294(5540):173–7.
86. Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JA, Harper JW, Eisenman RN, et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*
87. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J*
88. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*
89. Kress TR, Sabò A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer*
90. MYC Gene - GeneCards | MYC Protein | MYC Antibody [Internet].
91. Gene: MYC (ENSG00000136997) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
92. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J*

93. Farrell AS, Sears RC. MYC Degradation. Cold Spring Harb Perspect Med
94. Esposito D, Koliopoulos MG, Rittinger K. Structural determinants of TRIM protein function. Biochem Soc Trans
95. Wei C, Wu J, Liu W, Lu J, Li H, Hai B. Tripartite motif-containing protein 6 facilitates growth and migration of breast cancer through degradation of STUB1. Eur J Histochem
96. TRIM6 Gene - GeneCards | TRIM6 Protein | TRIM6 Antibody [Internet].
97. Gene: TRIM6 (ENSG00000121236) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
98. STUB1 Gene - GeneCards | STUB1 Protein | STUB1 Antibody [Internet].
99. Transcript: ENST00000219548.9 (STUB1-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet]
100. SH C, JB W, SA G, MD C. Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. Genes Dev
101. TRPC4AP Gene - GeneCards | TP4AP Protein | TP4AP Antibody [Internet].
102. Transcript: ENST00000252015.3 (TRPC4AP-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
103. Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? Eur J Hum Genet 2016 241 2016 Aug 12
104. BRCA1 Gene - GeneCards | BRCA1 Protein | BRCA1 Antibody
105. Transcript: ENST00000357654.9 (BRCA1-203) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet].
106. BRCA2 Gene - GeneCards | BRCA2 Protein | BRCA2 Antibody
107. Transcript: ENST00000380152.8 (BRCA2-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet]. [cited 2022 Oct 29]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32315086-32400268;t=ENST00000380152
108. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet
109. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. J Biol Chem

110. Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, Boon U, Schut E, Klarenbeek S, et al. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell*
111. Gazalla Ayub S, Rasool S, Ayub T, Khan SN, Wani KA, Andrabi KI. Mutational analysis of the BRCA2 gene in breast carcinoma patients of Kashmiri descent. *Mol Med Rep*
112. Lacroix M, Leclercq G. The “portrait” of hereditary breast cancer [Internet]. Available from: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
113. Chen W, Pan K, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, et al. BRCA1 germline mutations and tumor characteristics in Chinese women with familial or early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*
114. STRING: functional protein association networks
115. 12 items (human) - STRING interaction network
116. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. quantason.com
117. Scholtens D, Holko Booz M, Hamilton A, Ivancic DZ, Wang J, Holko M, et al. Lipid metabolism genes in contralateral unaffected breast and estrogen receptor status of breast cancer. *AACR*
118. Karakostis K, López I, Peña-Balderas AM, Fåhåreus R, Olivares-Illana V. Molecular and Biochemical Techniques for Deciphering p53-MDM2 Regulatory Mechanisms. *Biomol* 2021, Vol 11, Page 36
119. Ekmekci SS, Emrence Z, Abacı N, Sarıman M, Salman B, Ekmekci CG, et al. LEF1 Induces DHRS2 Gene Expression in Human Acute Leukemia Jurkat T-Cells. *Turkish J Haematol Off J Turkish Soc Haematol*
120. Salman Yaylaz B, Sırma Ekmekci S, Çınar S, Deniz G, Abacı N. DHRS2 is a potential marker of breast cancer metastasis. *Gene Reports*. 2021 Dec 1;25:101302.
121. Sci-Hub | E3 ubiquitin ligase STUB1 attenuates cellular proliferation and invasion abilities in triple-negative breast cancer cells. *Clinical and Experimental Medicine* | 10.1007/s10238-019-00594-3

122. Wei C, Wu J, Liu W, Lu J, Li H, Hai B. Tripartite motif-containing protein 6 facilitates growth and migration of breast cancer through degradation of STUB1. *Eur J Histochem*
123. Cho K Bin, Cho MK, Lee WY, Kang KW. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett.* 2010 Jul 28;293(2):230–9.
124. Dizin E, Irminger-Finger I. Negative feedback loop of BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase on estrogen receptor alpha stability and activity antagonized by cancer-associated isoform of BARD1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 May 1;42(5):693–700.
125. Wang Y hua, Liu S, Zhang G, Zhou C qi, Zhu H xia, Zhou X bo, et al. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res*
126. Akhoondi S, Lindström L, Widschwendter M, Corcoran M, Bergh J, Spruck C, et al. Inactivation of FBXW7/hCDC4-β expression by promoter hypermethylation is associated with favorable prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*
127. Yeh C-H, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer* 2018 171

HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİNDE DHRS2 GENİNİN UBİKİTİN LİGAZ GENLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 8	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Eskişehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	molecular-cancer.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	Submitted to National University of Singapore Öğrenci Ödevi	<% 1