

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**



RİBOZOMAL PROTEİN L10 VE L41'İN MEME KANSERİ MOLEKÜLER ALT TIPLERİYLE İLİŞKİSİ

Doktora Tezi

Sebati Sinan ÜRKMEZ

Danışman
Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.21.016 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

03/12/2022

Sebatı Sinan ÜRKMEZ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: RİBOZOMAL PROTEİN L10 VE L41'İN MEME KANSERİ MOLEKÜLER ALT TİPLERİYLE İLİŞKİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 03/12/2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 4 çıkmıştır.

03/12/2022

Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ

ÖZET

RİBOZOMAL PROTEİN L10 VE L41'İN MEME KANSERİ MOLEKÜLER ALT TİPLERİYLE İLİŞKİSİ

Sebati Sinan ÜRKMEZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora, Aralık/2022
Danışman: Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Meme kanserinin moleküler alt tiplemesi uygun tedavinin seçilmesi için karar noktasıdır ve bu amaçla immunohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ribozomal proteinler, ribozom biyogenezinde görevli yapısal proteinlerdir. Ribozomal proteinlerin, DNA onarımı, apoptoz, ilaç direnci, proliferasyon ve büyüme inhibisyonu gibi hücresel işlemlerde ve kanser gibi patolojik süreçlerde karakterize edilememiş ikincil fonksiyonlar sergiledikleri bildirilmiştir.

RPL10 Wilms tümörü, T hücreli akut lenfoblastik lenfoma, epitelyal over kanseri, atipik teratoid/rabdoid tümör, prostat kanseri ve pankreas kanseri gibi farklı kanserlerde araştırılmıştır. RPL41 ise, meme kanseri, intrahepatik kolanjiokarsinom ve nazofaringeal karsinom gibi kanserlerde araştırılmıştır. Çalışmamızın amacı, RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonunun meme kanseri alt tiplerindeki değişimini araştırarak edinilen bilgilerle, meme kanserinin moleküler alt tiplemesinde bir biyobelirteç olarak kullanım alanının araştırılmasıdır.

Çalışmada, hasta gruplarını oluşturan örnekler, meme kanseri tanısı alan 63 adet hastadan rutin mastektomi işlemi ile elde edilmiştir. Kontrol grubu ise redüksiyon mamoplasti gibi kanser cerrahisi uygulamaları dışında kalan hastalardan alınan 17 adet sağlıklı meme dokusu numunesinden oluşmaktadır. İmmunohistokimyasal incelemede her bir örnek için östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, insan epidermal büyüme faktörü-2 ve Ki67 proliferasyon indeksi parametreleri değerlendirildi ve bu parametrelere göre örnekler luminal A (n=17), luminal B (n=17), HER2 zengin (n=17) ve üçlü negatif meme kanseri (n=17) olmak üzere dört moleküler alt gruba ayrıldı. Sonrasında numunelerde RPL10 ve RPL41 genleri için qRT-qPCR analizi yapıldı.

RPL10 gen ekspresyonunda tüm meme kanseri moleküler alt gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim görülmedi. RPL41 gen ekspresyonunda ise sağlıklı meme dokularına göre HER2 zengin ve TNBC meme kanseri gruplarında sırasıyla 0.253 (p<0.05) ve 0,257 (p<0.05) kat azalma görülürken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, Ribozomal protein L10, Ribozomal Protein L41

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP OF RIBOSOMAL PROTEIN L10 AND L41 WITH BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES

Sebatı Sinan ÜRKMEZ
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Medical Biochemistry
Ph.D., December/2022
Supervisor: Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ

Breast cancer is the most common type of cancer amongst women. Molecular subtyping of breast cancer is the decision point for choosing the appropriate treatment and immunohistochemical methods are used for this purpose. Ribosomal proteins are structural proteins involved in ribosome biogenesis. It has been reported that ribosomal proteins exhibit uncharacterized secondary functions in cellular processes such as DNA repair, apoptosis, drug resistance and growth inhibition, and in pathological processes such as cancer.

RPL10 has been investigated in different cancers such as Wilms tumor, T-cell acute lymphoblastic lymphoma, epithelial ovarian cancer, atypical teratoid/rhabdoid tumor, prostate cancer, and pancreatic cancer. RPL41 has been investigated in cancers such as breast cancer, intrahepatic cholangiocarcinoma, and nasopharyngeal carcinoma. The aim of our study is to investigate the use of RPL10 and RPL41 gene expression as a biomarker in the molecular subtyping of breast cancer with the information obtained by investigating the changes in breast cancer subtypes.

In the study, samples constituting the patient groups were obtained from 63 patients diagnosed with breast cancer by routine mastectomy procedure. The control group consists of 17 healthy breast tissue samples taken from patients excluded from cancer surgery applications such as reduction mammoplasty. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor-2 and Ki67 proliferation index parameters were evaluated for each sample in the immunohistochemical examination, and according to these parameters, the samples were luminal A (n=17), luminal B (n=17), HER2 rich (n=17) and triple negative breast cancer (n=17). Afterwards, RT-qPCR analysis was performed for the RPL10 and RPL41 genes in the samples.

There was no significant difference in RPL10 gene expression in all breast cancer molecular subgroups compared to the control group. While in HER2 rich and TNBC breast cancer groups, RPL41 gene expression was decreased by 0.253 ($p<0.05$) and 0.257 ($p<0.05$) times, respectively, compared to healthy breast tissues, while no statistically significant change was observed in the other groups.

Keywords: Breast cancer, Ribosomal protein L10, Ribosomal Protein L41

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bütün doktora eğitim sürecim boyunca yanımda olan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışma sürecimde bana yol gösteren, desteklerini, bilgisini, vaktini ve emeklerini benden esirgemeyen, danışman hocam olmasından gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. Birşen BİLGİCİ'ye;

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dal'ında doktora eğitimim boyunca edindiğim tüm bilgilerin temelini atan, manevi desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bölümümüz anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Nermin KILIÇ'a;

Eğitim sürecim boyunca bilimsel bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle bana destek olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Bahattin AVCI'ya, Sayın Doç. Dr. Özgür Korhan TUNÇEL'e ve Doç. Dr. Edem NUGLOZEH'e;

Tezimin metodolojik düzenlenmesinde ve doğru bilgiye ulaşmamda kıymetli yardımlarını benden esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN'a

Analiz süreçleri boyunca sabırla ve içtenlikle karşılaştığım problemleri çözen, KİTAM Öğretim Görevlisi Sayın Dr. Eda UĞURTAY'a

Birlikte yol aldığım, birlikte yanıldığım, birlikte öğrendiğim değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Emil RZAYEV'e, Uzm. Dr. Dilek GÜL'e, Uzm. Dr. Köksal ŞEREFLİ'ye, Araş. Gör. Eser ÇAKMAK'a ve tüm biyokimya ailesine;

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, iyi dileklerini, desteklerini, sevgilerini bana hep hissettiren annem Aynur ÜRKMEZ'e ve kardeşim Deniz ÜRKMEZ'e;

Tez yazımının stresli sürecinde desteğini benden esirgemeyen, benim için neşenin, mantığın ve sağ duyunun sesi olan hem çalışma hem hayat arkadaşım, kıymetli eşim Dr. Yeşim CİVİL ÜRKMEZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sebati Sinan ÜRKMEZ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KONU VE LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri.....	3
2.2.1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri	6
2.3. Ribozomal Proteinler	9
2.3.1. Ribozom Biyogenezi.....	9
2.3.2. Ribozomal Proteinlerin Ribozomla İlişkili Fonksiyonları	11
2.3.3. Ribozomal Proteinlerin Ekstra Ribozomal Fonksiyonları	11
2.3.4. Ribozomal Proteinler ve Kanser	14
2.3.5. Ribozomal Proteinler ve Meme Kanseri	19
2.3.6. Ribozomal Protein L10	20
2.3.7. Ribozomal Protein L41	21
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. Kullanılan Materyaller	24
3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	24
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Çalışma Popülasyonunun Özellikleri.....	25
3.2.2. İmmunohistokimyasal Analizler ve Örneklerin Moleküler Alt Tiplerinin Belirlenmesi	25
3.2.3. Doku Homojenizasyon Protokolü	26
3.2.4. Total RNA İzolasyon Yöntemi	26
3.2.5. Total RNA analizi	28
3.2.6. İzole Edilen RNA’lardan cDNA Elde Edilmesi.....	28
3.2.7. GAPDH, RPL10 ve RPL41 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Ölçümü.....	29
3.2.8. Jel Elektroforezi	33
3.2.9. Relatif Kantitasyon	35
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ	57
KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-FU	: 5-Fluorourasil
ASNS	: Asparajin Sentetaz
ATF/CREB	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü/Siklik AMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF5	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 5
ATF6 α	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 α
BAD	: Bcl-2 İlişkili Ölüm Promoter
BAK	: Bcl-2 Antagonist/Killer
BAX	: Bcl-2-İlişkili X Protein
BBC3	: Bcl-2-Bağlayıcı Komponent 3
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma 2
Bcl-xl	: B Hücre Lenfoma-Xl
BER	: Baz Eksizyon Tamiri
BIM	: Bcl-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracısı
BMRP	: BCL-2 Etkileşimli Mitokondriyal Ribozomal Protein
Bp	: Base Pair
BRCA1	: Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
BRCA2	: Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein
bRPS1	: Bakteriyel Ribozomal Protein S1
C/EBP	: CCAAT Enhancer Binding Protein
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CARE	: C/EBP-ATF Yanıt Öğeleri
CBL-C	: Casitas B-Lineage Lymphoma
CCAAT	: Sitozin-Sitozin-Adenozin-Adenozin-Timidin
CDK	: Sikline Bağımlı Kinaz
cDNA	: Komplementer DNA
CDKN1B	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1B
CHAC1	: Glutasyon-Spesifik Gama-Glutamilsiklotransferaz 1
CI	: Confidence Interval
CK 8/18	: Cytokeratin 8/18
CKI	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
C _p	: Crossing Point
CRE	: cAMP Yanıt Veren Öğeler

Ct	: Threshold Cycle
DAP3	: Ölüm İlişkili Protein 3
DMAPT	: Dimetilaminopartenolid
DDIT3	: DNA Hasar İndükleyici Transkript 3
DUSP1	: Dual Spesifite Fosfataz 1
E2F1	: E2F Transkripsiyon Faktörü 1
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: EGF Reseptörü
eIF2D	: Ökaryotik Başlangıç Faktörü 2D
EIF4EBP1	: Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktör 4E-Bağlayıcı Protein 1
ER stres	: Endoplazmik Retikulum Stres
ER	: Östrojen Reseptör
EtBr	: Etidyum Bromür
FISH	: Floresan In-situ Hybridization
GAPDH	: Gliseralaldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GRB10	: Büyüme Faktörü Reseptör-Bağlayıcı Protein 10
GSH	: Glutasyon
H2AX	: H2A Histon Ailesi Üyesi X
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör-2
HO-1	: Hem Oksijenaz 1
HR	: Homolog Rekombinasyon
HSPA5	: Isı Şok Protein A Ailesi Üye 5
IL-1p	: İnterlökin 1p
IL-6	: İnterlökin 6
IRE1α/XBP1	: İnositol Gerektiren Enzim 1α/X-Kutu Bağlayıcı Protein 1
JAK	: Janus Kinaz
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
LAMP3	: Lizozomla İlişkili Zar Glikoproteini 3
L-OHP	: Oksaliplatin
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MDC1	: DNA Hasar Kontrol Noktası 1
MDM2	: Mouse Double Minute 2 Homolog
MDM4	: Mouse Double Minute 4 Homolog
Met-tRNA _i ^{Met}	: Başlatıcı Metiyonil-tRNA

miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
mRPL41	: Mitokondriyal Ribozomal Protein L41
mRPS29	: Mitokondriyal Ribozomal Protein S29
mRPS36	: Mitokondriyal Ribozomal Protein S36
NBS1	: Nibrin
NF- κ B	: Nükleer Faktör- κ B
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NPM	: Nükleofosmin
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
p21	: Protein 21
PARP	: Poli-(ADP-riboz) Polimeraz
PERK/eIF2 α	: Protein Kinaz RNA Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz/Ökaryotik Başlama Faktörü 2 α
PMAIP1	: Forbol-12-Miristat-13-Asetat-İndükte Protein 1
Pol I	: RNA Polimeraz I
Pol II	: RNA Polimeraz II
Pol III	: RNA Polimeraz III
PR	: Progesteron Reseptör
PYCR1	: Pirolin-5-Karboksilat Reduktaz 1
rDNA	: Ribozomal DNA
REST	: Relative Expression Software
RNV	: Retinal Neovaskülerizasyon
RP	: Ribozomal Proteinler
RPL10	: Ribozomal Protein L10
RPL11	: Ribozomal Protein L11
RPL14	: Ribozomal Protein 14
RPL16	: Ribozomal Protein L16
RPL18	: Ribozomal Protein L18
RPL19	: Ribozomal Protein L19
RPL20	: Ribozomal Protein L20
RPL23	: Ribozomal Protein L23
RPL24	: Ribozomal Protein L24
RPL26	: Ribozomal Protein L26
RPL3	: Ribozomal Protein L3

RPL32	: Ribozomal Protein L32
RPL37	: Ribozomal Protein L37
RPL39	: Ribozomal Protein L39
RPL41	: Ribozomal protein L41
RPL5	: Ribozomal Protein L5
RPL8	: Ribozomal Protein L8
RPS11	: Ribozomal Protein S11
RPS13	: Ribozomal Protein S13
RPS14	: Ribozomal Protein S14
RPS15	: Ribozomal Protein S15
RPS17	: Ribozomal Protein S17
RPS19	: Ribozomal Protein S19
RPS21	: Ribozomal Protein S21
RPS24	: Ribozomal Protein S24
RPS26	: Ribozomal Protein S26
RPS3	: Ribozomal Protein S3
RPS5	: Ribozomal Protein S5
RPS6	: Ribozomal Protein S6
RPS7	: Ribozomal Protein S7
RPS8	: Ribozomal Protein S8
RPS9	: Ribozomal Protein S9
rRNA	: Ribozomal RNA
S6K1	: RPS6 Kinaz 1
SHMT2	: Serin Hidroksimetil Transferaz 2
shRNA	: Short-Hairpin RNA
SISH	: Silver In-Situ Hybridization
siRNA	: Küçük İnterferans Yapan RNA
SLC1A4	: Solüt Taşıyıcı Aile 1 Üye 4
SP1	: Özgüllük Protein 1
SRA	: Sequence Read Archive
STAT	: Transkripsiyonun Sinyal İleticileri Ve Aktivatörleri
T-ALL	: T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör α

TOP2	: Topoizomeraz 2
TRADD	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü Tip 1-İlişkili Ölüm Alanı Proteini
TRIB3	: Tribbles Psödokinaz 3
tRNA	: Taşıyıcı RNA
uORF	: Upstream ORF
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2020 yılında her iki cinsiyette meme kanseri tanı sayısı ve yüzde oranı.....	4
Şekil 2.2. 2020 yılında kadınlarda meme kanseri tanı sayısı ve yüzde oranı.....	4
Şekil 2.3. Memenin anatomisi	5
Şekil 2.4. Meme kanseri moleküler alt tiplerinin genel özellikleri	7
Şekil 2.5. Ribozom biyogenezi	10
Şekil 2.6. RPL10'un kromozomal lokalizasyonu	20
Şekil 2.7. RPL41'un kromozomal lokalizasyonu	22
Şekil 3.1. Amplifikasyon grafiği.....	30
Şekil 3.2. Melt-curve grafiği.....	30
Şekil 3.3. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü	35
Şekil 3.4. qRT-PCR sonucu elden edilen ampliconların jel elektroforez görüntüsü	35
Şekil 4.1. Total meme kanseri gen ekspresyon grafiği	42
Şekil 4.2. Luminal A grubu gen ekspresyon grafiği	43
Şekil 4.3. Luminal B grubu gen ekspresyon grafiği	44
Şekil 4.4. HER2 zengin grubu gen ekspresyon grafiği	45
Şekil 4.5. TNBC grubu gen ekspresyon grafiği	46
Şekil 4.6. Tüm çalışma gruplarının gen ekspresyon grafiği.....	47
Şekil 4.7. RPL41 gen ekspresyon düzeyleri için ROC analizi.....	48
Şekil 5.1. Tüm çalışma gruplarında RPL10 gen ekspresyon grafiği.....	56

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. RPL10'un alternatif protein ve gen adlandırmaları	20
Tablo 2.2. RPL10'un moleküler fonksiyonları, yer aldığı biyolojik ve patolojiler süreçler ..	20
Tablo 2.3. RPL41'in alternatif protein ve gen adlandırmaları	22
Tablo 2.4. RPL41'in moleküler fonksiyonları ve yer aldığı biyolojik süreçler	22
Tablo 3.1. Hasta ve kontrol gruplarının immunohistokimya profili	26
Tablo 3.2. cDNA sentez reaksiyon kurulumu	29
Tablo 3.3. cDNA sentez için kullanılan termal profil	29
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri	31
Tablo 3.5. GAPDH qRT-PCR için reaksiyon kurulumu	31
Tablo 3.6. GAPDH qRT-PCR programı	31
Tablo 3.7. RPL10 qRT-PCR için reaksiyon kurulumu	32
Tablo 3.8. RPL10 qRT-PCR programı	32
Tablo 3.9. RPL41 qRT-PCR için reaksiyon kurulumu	32
Tablo 3.10. RPL41 qRT-PCR programı	33
Tablo 3.11. TBE yürütme tamponu	33
Tablo 3.12. Agaroz jel içeriği	34
Tablo 3.13. Jele yükleme öncesi numuneleri hazırlanışı	34
Tablo 4.1. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucu moleküler alttıplerin dağılımı	38
Tablo 4.2. Çalışmaya katılan bireylerin yaşlarının gruplara göre dağılımları	39
Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan kanser numunelerinin histolojik değerlendirmeleri	39
Tablo 4.4. Çalışmada kullanılan kanser numunelerinin immunohistokimya profili	39
Tablo 4.5. qRT-PCR analizi elden edilen Ct değerleri	40
Tablo 4.6. Total meme kanseri ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	41
Tablo 4.7. Luminal A ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	42
Tablo 4.8. Luminal B ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	43
Tablo 4.9. HER2 zengin ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	44
Tablo 4.10. TNBC zengin ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	46
Tablo 4.11. RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonlarının immunohistokimya parametreleriyle korelasyonu	48
Tablo 5.1. ATF4'ün hedef genleri	52

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir ve akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin en çok görülen ikinci nedenidir (Jemal, et al., 2011). Meme kanseri, süt kanallarını veya lobüllerini oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine metastazları sonucu invaze oldukları organ ya da dokuda çoğalmaya devam etmeleriyle meydana gelmektedir. Östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme faktör reseptör-2 (HER2) gibi immünohistokimya belirteçleri ise meme kanserinin moleküler alt tiplerinde önemli bir rol oynamaktadır (Viale, 2012). Gallen Consensus 2013'e göre meme kanserinin moleküler alt tipleri Luminal A [ER (+/-); PR (+/-); HER (-); düşük Ki67]; Luminal B [ER (+/-); PR (+/-); HER2 (+/-); yüksek Ki67]; HER2 zengin [ER (-); PR (-); HER2 (+)] ve üçlü negatif meme kanserleri [ER (-); PR (-); HER2 (-)] olarak ayrılmıştır (Goldhirsch, et al., 2013).

Translasyon, ökaryotik hücrelerde koordine ve çok adımlı bir işlemdir. Translasyon mekanizması, translasyon faktörleri ve ribozomlardan oluşmaktadır. Ribozomal bileşenler ise, ribozomal proteinleri (RP) ve ribozomal RNA (rRNA)'yı içermektedir. Birçok RP, ribozomal partiküllerin montajı sırasında ve/veya rRNA'nın önemli bölgelerinin stabilizasyonunda RNA şaperonları olarak işlev göstermektedir (Fatica and Tollervey, 2002; Tschochner and Hurt, 2003). RP'lerin, ribozomu stabilize etmedeki rollerinin yanı sıra, DNA onarımı, apoptoz, ilaç direnci, proliferasyon ve büyüme inhibisyonu gibi diğer hücresel işlemlerde de henüz tam olarak karakterize edilmemiş ikincil fonksiyonlar sergiledikleri bildirilmiştir (Shen, et al., 2006; Du, et al., 2005).

Sürekli büyüyen ve prolifere olan kanser hücreleri çok miktarda proteine gereksinim duyduğundan protein sentezinde rölatif bir artış meydana gelmektedir. Bu olgu, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre çok daha verimli çalışan ribozomlara ihtiyaç duyduğu anlamına gelmektedir. Bu görüşle tutarlı olarak, bir dizi tümör baskılayıcı ve onkojenik protein, ribozom biyogenezini ve protein sentezini düzenleyerek kanser hücrelerinin ilerlemesini kontrol etmektedir (Ruggero and Pandolfi, 2003; Silvera, et al., 2010). İlginç bir şekilde, ribozomun kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için öneminin yanı sıra, serbest RP'lerinde tümör oluşumunda veya baskılanmasında rolleri vardır. RP'lerin tümör baskılayıcıları aktive ederek veya onkoproteinleri etkisizleştirerek tümör oluşumunu baskılamada rol oynadığı

gösterilmiştir (de Las Heras-Rubio, et al., 2014).

Ribozomal protein L10 (RPL10), mayadan insana birçok türde ribozomun 60S alt birimlerinde bulunan yaklaşık 24 kDa molekül ağırlığına sahip bir yapısal proteindir. RPL10, X kromozomu üzerinde q28 bölgesinde bulunan bir gen tarafından kodlanmakta ve QM veya DXS648 olarak da adlandırılmaktadır (Farmer et al., 1994; Eisinger et al., 1997). RPL10'un, hücre çoğalması, migrasyon, organogenez ve diferansiyasyon gibi hücresel süreçlerde yer almaktadır (Oh, et al., 2002). Bu veriler RPL10'un onkojenetik sürecine dahil olabileceğini düşündürmekte ve nitekim RPL10 Wilms tümörü (Dowdy, et al., 1991), T hücreli akut lenfoblastik lenfoma (Girardi, et al., 2018), epitelial over kanseri (Shi, et al., 2018), atipik teratoid/rabdoid tümör (Ren, et al., 2018), prostat kanseri (Altınok, et al., 2006) ve pankreas kanseri (Yang, et al., 2018) gibi farklı kanser türlerinde araştırılmıştır.

Ribozomal protein L41 (RPL41) 3,4 kDa'lık 25 amino asitten oluşan küçük bir peptittir. RPL41, 12. kromozom üzerinde 12q13.2 bölgesinde bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır (Odinstova, et al., 2003). RPL41'in ise, aşağı regüle olduğunda anormal mikrotübül iğleri oluşumuna yol açarak malign transformasyona neden olabileceği gibi ayrıca RPL41'in tümör hücrelerinin kemoterapiye duyarlı hale getirilmesine katkı sağlayabileceği de öne sürülmektedir (Wang, et al., 2010). RPL41 kanserle olan doğrudan ve/veya dolaylı ilişkisi nedeniyle intrahepatik kolanjiokarsinom (Yang and Zong, 2016), nazofaringeal karsinom (Sim, et al., 2017) gibi farklı kanser türlerinde araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile meme kanseri moleküler alt tiplerinin RPL10 ve RPL41 ile ilişkisi moleküler düzeyde incelenmiştir. Elde edilen sonuçların hastalığın prognozu ve tedavisi ile ilgili mevcut bilgi bankasına katkı sağlayacağını ve araştırmacılara yol gösterici olacağını öngörmekteyiz. Literatürdeki yapılan önceki çalışmalarda meme kanserinin moleküler alt tiplerinde kullanılan parametrelerin bazılarının çalışmamız dışında kalan bazı ribozomal proteinlerle ilişkisi araştırılmış olsa da alt sınıflar arasındaki ekspresyon farklılıkları ya da spesifik olarak herhangi bir alt tipteki ekspresyon araştırılmamıştır. Çalışmamızın RPL10 ve RPL41'in hem meme kanserinin bütününde hem de meme kanseri moleküler alt tiplerinde protein ekspresyonu düzeyinde araştırılacak olması nedeniyle literatürde bir ilk olması beklenmektedir.

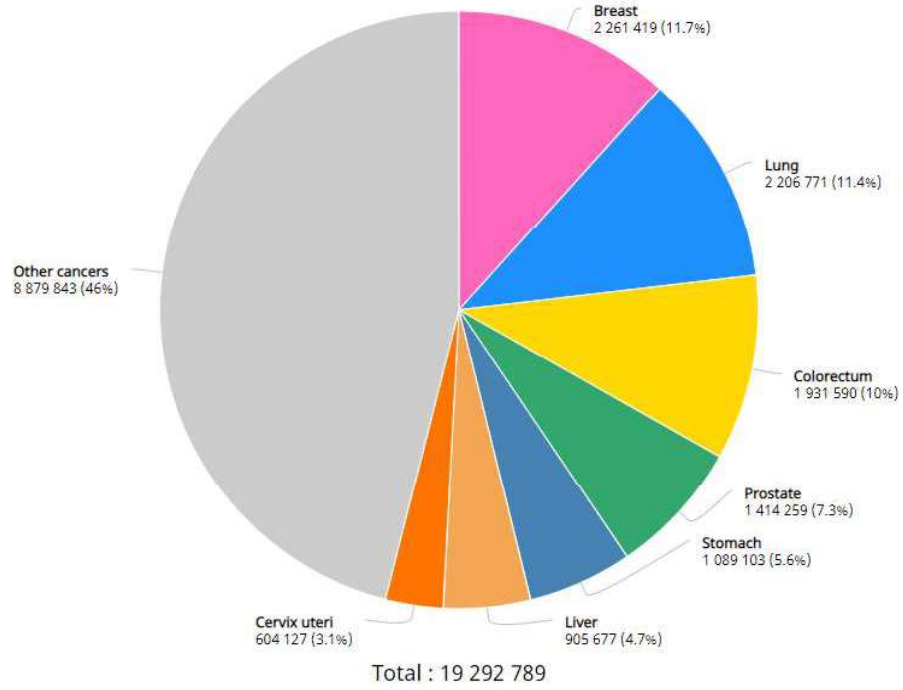
2. KONU VE LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kanser

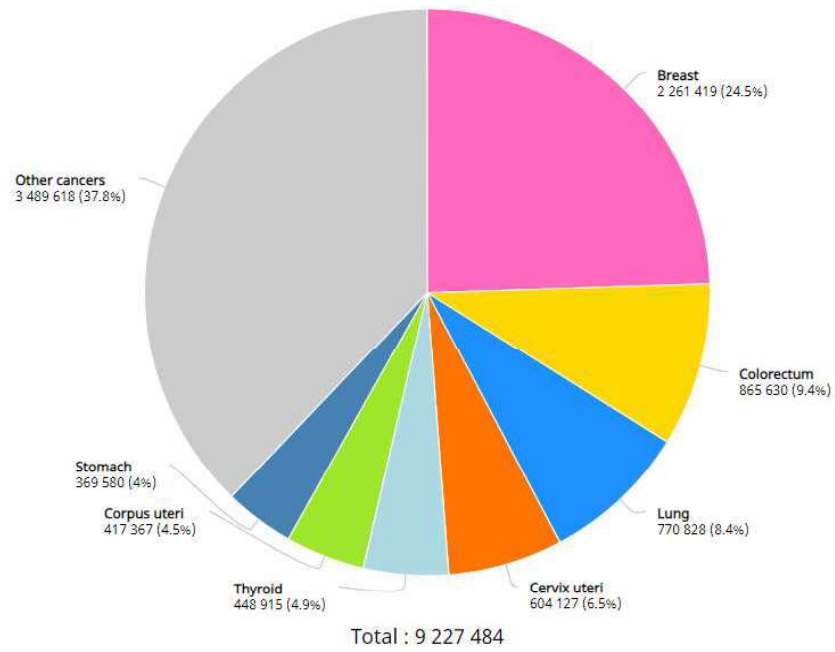
Kanser, vücuttaki hemen hemen her hücre tipinden kaynaklanabilen heterojen bir hastalıktır. Uzun zamandır bilinen bir hastalık olmasına rağmen günümüzde kanserin halen yıkıcı etkileri vardır ve kansere karşı savaş devam etmektedir. Her 5 kişiden 1'i yaşamları boyunca kansere yakalanmaktadır. 2020 yılında kanser nedeniyle 10 milyon insan ölmüştür (WHO, 2020a). Ayrıca WHO, 2040 yılında 30,2 milyon yeni kanser vakasının teşhis edileceğini tahmin etmektedir (WHO, 2020b). Kanser çok aşamalı bir süreçtir ve genetik mutasyonların kümülatif etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanser sürecinde hücre bölünmesini denetleyen mekanizmaların etkilerini kaybetmesiyle birlikte, hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlamaktadırlar. Birçok kanser türü bulunmasına rağmen kanserlerin bazı ortak noktaları vardır. Tüm kanser hücrelerinde, hücre döngüsünü ve apoptozu kontrol eden mekanizmalar bir şekilde sekteye uğramıştır. Ayrıca kanserler kontrolsüz proliferasyon süreciyle birlikte anjiyogenezin indüksiyonu, büyüme/çoğalma sinyalinin devamlılığı, büyüme inhibitörlerinden sakınma, invazyonun aktivasyonu ve sınırsız replikasyon potansiyeli gibi diğer fizyopatolojik süreçlere sahiptir (Hanahan and Weinberg, 2011). Kanserler invazyon kapasitelerine göre benign veya malign olarak sınıflandırılmaktadırlar. Benign kanserler lokalize tutulum göstermektedirler. Öte yandan, malign tümörler ise primer odaklarından diğer dokulara metastaz yapar ve kanser ölümlerinin çoğundan sorumludur (Weinberg, 2014). Kanser heterojenliği ve karmaşıklığı, anlaşılması ve tedavisinin önündeki ana zorluklardır. Kanser, dünyada en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen, mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve daha iyi tedavi seçeneklerine hala ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Meme Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü'nün Global Cancer Observatory 2020 verilerine göre meme kanserinin, her iki cinsiyette %11.7 (Şekil 2.1.), kadınlarda ise %24.5'lik oran ile ilk defa en fazla tanı alan kanser olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.2.). Bununla birlikte, kansere bağlı ölümlerde her iki cinsiyette akciğer kanseri, kolorektal kanser, hepatosellüler kanser ve mide kanserinden sonra %6.9 ile 5. sırada, kadınlarda ise %15.5 ile ilk sırada yer almaktadır (Sung, et al., 2021).

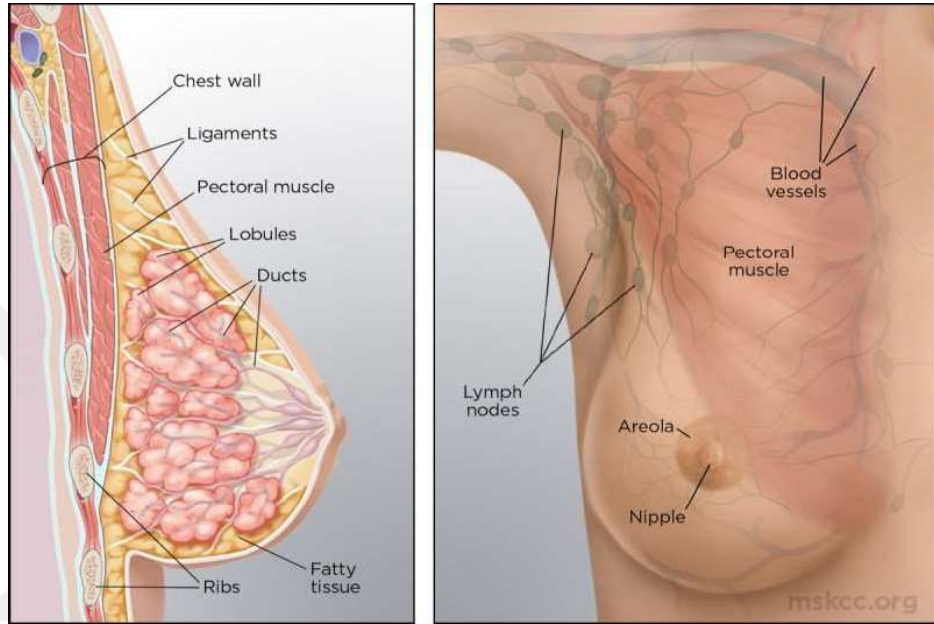


Şekil 2.1. 2020 yılında her iki cinsiyette meme kanseri tanı sayısı ve yüzde oranı (WHO, 2020c)



Şekil 2.2. 2020 yılında kadınlarda meme kanseri tanı sayısı ve yüzde oranı (WHO, 2020c)

Meme kanseri, en basit tanımı ile meme dokusundan köken alarak başkalaşan hücrelerin düzensiz büyümesi ve çoğalmasdır. Memenin yapısı, glandüler ve stromal adı verilen iki ana doku bileşeninden oluşmaktadır. Glandüler doku, süt üreten lobüllerin birleşmesiyle oluşan loblar ve süt geçişlerini sağlayan duktus adı verilen kanallardan oluşmaktadır (Şekil 2.3.). Bütün bu yapıların boşluklarını, etrafını yağ ve bağ dokulardan oluşan stromal ana doku kaplamaktadır.



Şekil 2.3. Memenin anatomisi (MSKCC, 2021)

Kanser transisyonu memenin herhangi bir doku bölümünde başlayabilmekle beraber genelde süt kanallarını oluşturan hücrelerde başlar ki bu formu duktal kanser olarak adlandırılmaktadır (Keen and Lenan, 2011). Loblarda başlayan meme kanseri ise lobüler kanser olarak adlandırılmaktadır. Memenin stromal dokusunda kanser çok nadiren görülmekle birlikte daha çok enflamatuvar meme kanseri olarak ortaya çıkmaktadır. Yayılma durumuna göre meme kanseri invaziv ve invaziv olmayan (in situ) şeklinde ikiye ayrılmaktadır. İnvaziv formda kanser hücreleri, kanal ve lobüler duvarını geçerek, memenin çevresindeki diğer dokuları istila etme kabiliyetine sahiptirler. İnvaziv olmayan formda ise kanser hücrelerinin büyümeleri ve yayılmaları süt kanallarında ve/veya lobüllerde sınırlıdır. Bu formda kanser hücreleri çevrelerindeki yağ ve bağ dokularını invaze edemezler. Hem lobüler karsinomun hem de duktal karsinomların invaziv ve invaziv olmayan tipleri vardır (Keen and Lenan, 2011). Meme kanserine yakalanma riski birçok nedene bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca anamnezinde daha önce meme kanserine yakalandığı

belirtilen birinin tekrar meme kanserine yakalanma riski fazladır. Hasta anamnezinde aile bireylerinin belirli kanser türlerine sahip olması da kişinin meme kanserine yakalanma riskini artıran etmenlerden biridir. Meme kanserlerinin birçoğu kendiliğinden ortaya çıksa da BRCA1 (Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein) ve BRCA2 (Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein) gen çalışmaları, kalıtsal olarak aileden gelen risk faktörünün olduğunu ortaya koymaktadır (King, et al., 2003). Ayrıca hormonal nedenler, alkol kullanımı, obezite, düşük dozlarda radyasyona maruz kalma gibi nedenler de meme kanserine yakalanma riskini artırmaktadır.

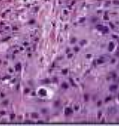
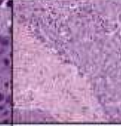
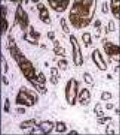
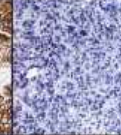
Meme kanseri hastalarda, meme ağrısı, ciltte kızarıklık, kalınlaşma ile birlikte şişme ve meme başı anormallikleri gibi semptomlar ile kendisini gösterebilmektedir. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte gelişen semptomlar aksiller bölgede şişkinlik, kemik ağrısı, nefes darlığı, iştahsızlık ve baş ağrısı şeklinde görülmektedir (Dowsett, 2001).

Meme kanseri için klasik tedavi yöntemleri cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi olarak sıralanmaktadır. Ek olarak hastalara hormon tedavileri de uygulanabilmektedir. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte nanoteknoloji ürünü ilaçlar ve tedavide yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır (Dowsett, 2001). Tarama, tanı ve tedavide son yıllardaki yenilikler ile birlikte meme kanseri ölüm oranı ciddi şekilde azalmaktadır. Daha etkin tarama ve tedavi programları geliştirmek için araştırmalara devam edilmektedir.

2.2.1. Meme Kanserin Moleküler Alt Tipleri

2013 yılında toplanan 13. St. Gallen Uluslararası Meme Konferansı konsensüs kararına göre meme kanseri moleküler olarak 4 ayrı alt tipe ayrılmıştır (Goldhirsch, et al., 2013). Meme kanserinin moleküler alt tiplendirmesi uygun cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavi ve hedeflenmiş tedavi gibi integratif tedavi rejimlerinin belirlenmesine katkı sağlayarak genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalımı kapsayan tedavi etkinliğini arttırmaktadır (Edenfield, et al., 2017; Ma, et al., 2020). Meme kanserinin alt tiplendirmesi son 20 yılda önem kazanan ER, PR, HER-2 reseptör ekspresyon durumuna ve Ki67 proliferasyon indeksine göre yapılmaktadır (Prat, et al., 2015). ER ve PR ekspresyon durumları için yapılan araştırmalarda %1'in üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilmektedir (Guerra, et al., 2003). HER-2 pozitifliği ise iki gruba ayrılmakta olup 3+ olanlar ikinci bir incelemeye gerek kalmadan pozitif olarak kabul edilmekte, 2+ olanlarda ise ileri bir incelemeye gerek duyulmaktadır; bu ileri inceleme floresan insitu hibridizasyon (FISH) veya silver in-situ hibridizasyon (SISH) yöntemidir. FISH/SISH sonucuna göre reseptör ekspresyonu pozitif veya

negatif kabul edilmektedir. Geri kalan değerler yani Skor 0 ve 1+ olanlar ise doğrudan ileri bir incelemeye gerek duyulmadan negatif olarak kabul edilmektedir. Ki67 proliferasyon indeksi için ise %14 ve üzerindeki değerler pozitif kabul edilmektedir (Cheang, et al., 2009). ER ve/veya PR pozitif, HER-2 negatif, ki- 67 proliferasyon indeksi %14'ün altı olan hastalar Luminal-A; ER ve/veya PR pozitif, HER-2 negatif veya pozitif, ki- 67 proliferasyon indeksi %14 ve üzeri olan hastalar Luminal-B; herhangi bir Ki67 proliferasyon indeksine sahip olup ER, PR negatif, HER-2 pozitif olan hastalar HER-2 pozitif; herhangi bir Ki67 proliferasyon indeksine sahip olup ER, PR ve HER-2'nin her üçü de negatif olan hastalar Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) olarak sınıflandırılmaktadır (Prat, et al., 2015). Meme kanseri moleküler alt tiplerinin genel özellikleri Şekil 2.4.'te verilmiştir.

Molecular subtype	Luminal (A and B)		HER2	Basal
Genetic profile	↑Luminal CKs and ER-related genes (A>B) B↑ in proliferation-related genes		↑HER2-related genes	↑Basal CKs
Histologic correlates				
Surrogate markers	A Lower-grade ER+	B Higher-grade ER+	High-grade, ± apocrine features	High-grade, sheet-like, necrosis inflammation
	 A Strong ER+, PR+, HER2-, low Ki67	 B Weaker ER+, PR+, HER2±, ↑Ki67	 HER2+, ± ER/PR	 ER/PR-HER2- CK5/6±, EGFR±
Prognosis	Good	Intermediate	Worse	Worse
Response to chemotherapy	Lower	Intermediate	Higher	Higher
Targeted therapies	Hormone therapies		HER2-targeted therapies	Currently investigational

Şekil 2.4. Meme kanseri moleküler alt tiplerinin genel özellikleri (Allison, 2017)

2.2.1.1. Luminal A Meme Kanseri

Luminal A alt tipi, meme kanserlerinin ortalama %40'ını oluşturmaktadır ve en sık görülen alt tiptir. Bu alt tipte kanser hücreleri ER, PR, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ve CK 8/18 (Cytokeratin 8/18) ekspresyonu gösterirlerken, HER2 eksprese etmemektedirler. Bu alt tip genel karakteristiği itibariyle düşük dereceli ve proliferasyon indeksi düşük olan bir kanser fenotipi çizmektedir. En iyi prognozlu alt tiptir. Hormon terapiye yanıtı iyidir (Loi, et al., 2007).

2.2.1.2. Luminal B Meme Kanseri

Luminal B alt tipi meme kanserlerinin ortalama %20'sini oluşturmaktadır. Luminal A ile benzer genotipik özellikleri taşımakla birlikte farklı olarak yüksek dereceli, proliferasyon indeksi yüksek, daha agresif seyreden tümörlerdir. Luminal B tümörleri, Luminal A tümörlerinden daha kötü prognoza sahiptir. HER2 +/- olabilmektedirler. Bu alt tipte kemik metastazları daha sık görülmektedir. Sıklıkla daha genç hastalarda ve genellikle daha büyük kitleler şeklinde görülmektedir. Lenf nodu metastazları itibariyle de Luminal A alt tipi ile karşılaştırıldığında daha agresif bir metastatik karakter sergilemektedirler (Voduc, et al., 2010).

2.2.1.3. HER2 Zengin Meme Kanseri

HER2 zengin alt tipi meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadır. 17q12 kromozomu üzerindeki HER geninin aşırı ekspresyonu ile karakterize bir alt tiptir. Diğer immunohistokimya belirteçleri olan ER ve PR açısından negatif, prognoz itibariyle kötü bir karaktere sahiptir. HER2 zengin alt tip, yüksek proliferasyon indeksine sahiptir, kötü diferansiye kanserlerdir ve 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %12 civarındadır (Cheang, et al., 2015).

2.2.1.4. Üçlü Negatif Meme Kanseri

TNBC, meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Luminal ve HER2 gen kümelerinin düşük ekspresyonu veya negatifliği ile karakterizedir. Ortaya çıkışı itibariyle genelde genç yaşta görülmektedirler. Histolojik olarak yüksek dereceli, genel karakteristiği ise en agresif olan alt tiptir. Genellikle tanı anında daha büyük boyutlarda ve lenf nodu metastazı gösteren tümörlerdir (Bosch, et al., 2010). Üçlü negatif meme kanseri ilk 3 yılda yüksek rekürrens ya da relaps oranlarına sahiptir. Kemoterapiye iyi cevap vermekle beraber sağ kalım oranları yine de düşüktür. Akciğerlere, santral sinir sistemine ve diğer viseral organlara metastazları sıkça görülmekte, güçlü bir invaziv ve metastatik karakter sergilemektedirler (Pizot, et al., 2016).

2.3. Ribozomal Proteinler

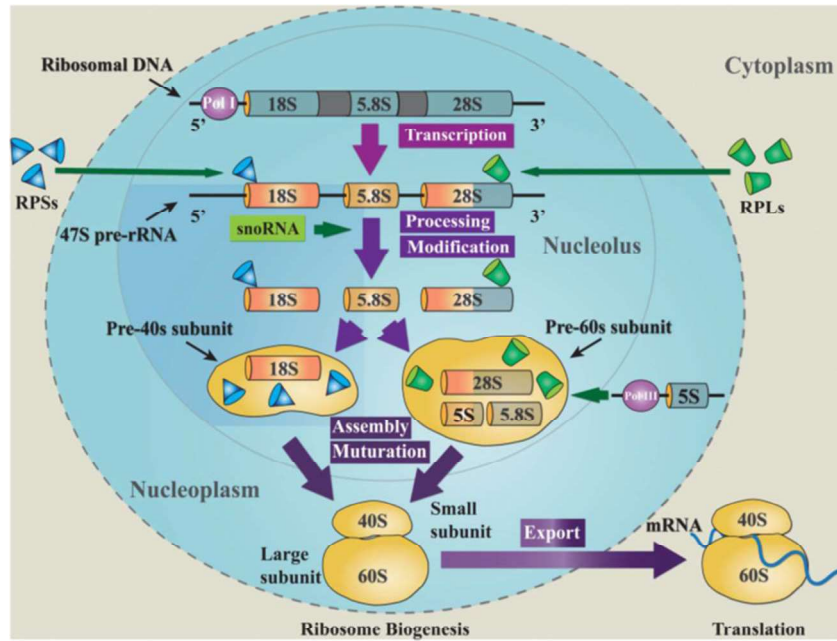
Hücre, yaşamın metabolik olarak işlevsel en küçük birimidir. Hücreler dış sinyalleri algılayabilmekte ve bu sinyallere transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenmiş tepkiler verebilmektedirler. Translasyon, ökaryotik hücrelerde koordineli ve çok adımlı bir süreçtir. Translasyon mekanizması, translasyon faktörleri ve ribozomlardan oluşmaktadır. Ribozomal bileşenler, RP'leri ve rRNA'yı içermektedir. Ökaryotik ribozomların biyogenezi, nükleolus içinde meydana gelir ve dört farklı rRNA'nın ve de yaklaşık 80 RP'nin koordineli bir şekilde birleşmesini içerir (Fatica and Tollervey, 2002; Tschochner and Hurt, 2003). RP'ler ribozom oluşumu için önemli bileşenlerdir ve RNA polimeraz II (Pol II) tarafından sentezlenmektedirler. Ribozomun oluşumu ve RP'lerin sentezi birleştirilmiş süreçlerdir; Translasyondan sonra, RP'ler 40S ve 60S ribozomal alt birimlerini birleştirmek için nükleusa göç etmektedirler. Ribozomun yapısı, birçok RP'nin, ribozomal parçacıkların montajı ve/veya rRNA'nın önemli bölgelerinin stabilizasyonu sırasında RNA şaperonları olarak işlev görebileceğini ortaya koymuştur (Fatica and Tollervey, 2002; Tschochner and Hurt, 2003). Bazı RP'ler 40 ve 60S alt birimleri (S13, S15, S19, L2, L5 ve L14) arasındaki etkileşime katılırken, bazıları ise tRNA (S7, S9, S12, S13, L1 ve L5) ile ilişkili veya ribozom stabilizasyonunda rol oynamaktadır (L22, L24 ve L29). Ribozomu stabilize etmedeki rollerinin yanı sıra, RP'lerin, DNA onarımı, apoptoz, ilaç direnci, büyüme ve çoğalma inhibisyonu gibi diğer hücresel süreçlerde henüz tam olarak karakterize edilmemiş ikincil işlevler sergiledikleri de bildirilmiştir (Shen, et al., 2006; Du, et al., 2005).

2.3.1. Ribozom Biyogenezi

Ribozom biyogenezi, RP'lerin sadece ribozomun yapısal bileşenleri olarak değil, öncül ribozom bileşenlerinin düzenlenmesinde de önemli roller oynadığı, bir hücrenin yaşam döngüsünde translasyon mekanizmasını işler halde kılmak ve devamlılığını sağlamak için kritik bir süreçtir (Fromont-Racine, et al., 2003; Wilson and Doudna Cate, 2012). Ribozom biyogenezi nükleolusta başlamakta ve çok sayıda yardımcı faktörle birlikte dört farklı rRNA türü, 80 RP ve üç RNA polimeraz (Pol I, Pol II ve Pol III) gerektirmektedir (Fromont-Racine, et al., 2003; Sollner- Webb and Mougey, 1991; Uechi, et al., 2001). Ribozomal sentez sırasında üç temel adım vardır: pre-rRNA'ların üretimi için rDNA transkripsiyonu; pre-rRNA'lardan olgun rRNA'lar üretmek için post-translasyonel düzenleme; rRNA'ların RP'lerle alt birimler halinde birleştirilmesi (Fatica and Tollervey, 2002; Fromont-Racine, et al., 2003; Lafontaine

and Tollervey, 2001).

Ökaryotlarda ribozomlar, sitoplazmaya aktarılmadan önce nükleolusta önceden birleştirilmektedir. Ribozom sentezi süreci, nükleolusta pre-ribozomal komponentlerin oluşumunu ve sitoplazmada iki alt birimin birleştirilmesini içermektedir. rRNA transkripsiyon hızı, ribozomların üretiminde sınırlayıcı bir faktördür ve olgun rRNA'lar, transkripsiyon sonrası işleme tabi tutulan pre-rRNA'lardan üretilmektedir. Pre-rRNA transkripsiyonu ve post-translasyonel düzenlenmesi sırasında, RPS15, RPS19, RPS24 gibi birçok RP, pre-rRNA'nın yeni olgunlaşan bölgeleri üzerinde toplanarak rRNA maturasyon sürecinin çeşitli aşamalarında yer almaktadır (Choesmel, et al., 2008; Flygare, et al., 2007; Idol, et al., 2007; Rouquette, et al., 2005). Ek olarak, RPL22, RPL24 ve RPL29 gibi bazı RP'ler, küçük ve büyük alt birimler arasındaki etkileşimde yer alırken RPS7, RPS9, RPS12 gibi diğer RP'ler polipeptit çıkış kanalını çevreleyerek ribozomun stabilizasyonunda yer almaktadır. RPS13, RPL1 ve RPL5 ise tRNA'larla doğrudan temastan sorumludur (de las Heras-Rubio, et al., 2014; Wilson and Doudna Cate, 2012). Ribozom biyosentezi şekil 2.5.'te verilmiştir. Ribozom biyogenezi sürecindeki herhangi bir adımın, örneğin DNA hasarı, RP mutasyonları, ilaç/kimyasal etkileşimi, besin yoksunluğu veya onkojenik aktivasyon tarafından disregülasyonu, nükleolar stresi tetikler ve de serbest RP'lerin salınmasına neden olmaktadır. Bu süreç ribozomal stres olarak da adlandırılmaktadır (Boulon, et al., 2010).



Şekil 2.5. Ribozom biyogenezi (Xie, et al., 2018)

2.3.2. Ribozomal Proteinlerin Ribozomla İlişkili Fonksiyonları

Ribozomal proteinler ribozom içerisinde rRNA'nın katlanmasına yardımcı olmaktadır (Traub and Nomura, 1969; Roth and Nierhaus, 1980). RP'lerin yokluğunda, rRNA'nın hızla katlandığı ancak süreç esnasında lokal enerjetik olarak elverişli tuzaklarda kolayca hapsediği belirtilmiştir. Katlanma sırasında RP'lerin varlığı, rRNA'nın bu enerjik tuzaklara düşmesini engeller ve ayrıca, RP'ler karmaşık RNA kıvrımlarının stabilizasyonunda da rol oynamaktadırlar (Woodson, 2011).

Bazı RP'ler translasyon sırasında sürece katkıda bulunmaktadır. Bakterilerde Ribozomal Protein S1 (bRPS1)'in, muhtemelen mRNA ile etkileşerek mRNA'yı ribozoma yönlendirdiği ve translasyonun başlamasına aktif olarak katıldığı öne sürülmüştür (Suryanarayana and Subramanian, 1983). Ayrıca, bakterilerde, birkaç RP, kod çözmenin (detranskripsiyonun) doğruluğunu ve nihayetinde ribozomun mRNA sekansını bir proteine çevirmesinin aslına uygunluğunu denetlemektedir (Agrawal, et al., 1998). Ökaryotik RP'lerin genel olarak translasyondaki rolü henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, çeşitli metodolojik yaklaşımlar, ökaryotlardaki RP'lerin translasyon makineleri ile birçok etkileşimde yer aldığını ortaya koymuştur (Graifer and Karpova, 2015).

2.3.3. Ribozomal Proteinlerin Ekstra Ribozomal Fonksiyonları

Genel olarak, RP'lerin ekstra ribozomal işlevleri, hücre döngüsü, DNA onarımı ve apoptoz ve bunlarla ilişkili çeşitli hücresel süreçler altında toplanmaktadır.

2.3.3.1. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Çeşitli çalışmalarda, RP'ler ve hücre döngüsünün ilerlemesi arasında birtakım bağlantılar kurulmuştur. RP'ler spesifik fonksiyonlara sahip protein aileleri ile etkileşime girerek, hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol etmektedirler.

Bazı RP'ler, siklinler veya sikline bağımlı kinazlar (CDK) gibi fosforilasyon yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini koordine eden heterodimerik protein kinazları modüle etmektedirler (Penzo, et al., 2019). Örneğin, RPL10m, geç G2'den mitozaya hücre döngüsü geçişinde kilit bir oyuncu olan Siklin B1/CDK1'in aktivitesini düzenlemektedir (Li, et al., 2016).

Bazı RP'ler ise, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) p21 ve p27 gibi hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan modülatörlerin ekspresyonu ve/veya aktivitesi üzerinde etki ederek hücre döngüsünü dolaylı olarak modüle edebilmektedir (Molavi, et al., 2019). Ribozomal Protein L3 (RPL3), p21 ekspresyonu ve stabilitesinin düzenlenmesinde rol oynayan nükleofosmin (NPM) ve özgüllük protein 1 (SP1) ile

protein kompleksleri oluşturarak G1 hücre döngüsü durmasını indüklemektedir (Russo, et al., 2013; Russo, et al., 2016). RPS15, p27 mRNA ekspresyonunu inhibe ederek G1/S faz geçişini hızlandırmaktadır (Guo, et al., 2011).

Siklinler ve CDK'lerin ötesinde, Akt ve E2F Transkripsiyon Faktörü 1 (E2F1) gibi diğer önemli efektörler hücre döngüsü düzenlemesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Ribozomal Protein S8 (RPS8)'in yıkılması, fosforile Akt seviyesini azaltarak, bunun sonucunda G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına yol açmaktadır (Yao, et al., 2016). Ribozomal Protein L21 (RPL21) ise E2F1 transkripsiyon faktörü ve E2F1 hedef genlerinin düzenlenmesi yoluyla G1/S faz ilerlemesini kontrol etmektedir (Li, et al., 2020).

Ayrıca mitokondriyal Ribozomal Protein S36 (mRPS36)'nın, p53'ü ve p53'ün aşağı akışında yer alan p21'in ekspresyonunu ve post-translasyonel modifikasyonunu değiştirerek hücre döngüsünün yavaşlamasına yol açtığı gösterilmiştir. Spesifik olarak, mRPS36, p53'ü Serin 15 üzerinden fosforile ederek stabil bir form kazanmasına yol açmaktadır (Chen, et al., 2007). Ek olarak mitokondriyal RPL41 (mRPL41)'in de p53'ü stabilize ettiği ve mitokondriye taşınmasını arttırdığı, böylece apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir. İlgi çekici olan, p53'ten yoksun hücrelerde mRPL41, siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B (CDKN1B)'yi stabilize ederek ve G1 fazında hücre döngüsü durmasını indüklemiştir (Yoo, et al., 2005).

2.3.3.2. DNA Onarımı

Son birkaç dekatta, birçok çalışma, farklı RP'lerin DNA onarımında yer aldığını göstermiştir. Örneğin, Ribozomal Protein S3 (RPS3), baz eksizyon onarımı (BER) yolunda yer almaktadır (Ogaw and Baserga, 2017). Hücre içi RPL3 seviyeleri ile de homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) gibi spesifik DNA onarım işlemlerinin aktivitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Esposito, et al., 2014).

Yapılan bir çalışmada Ribozomal Protein L6 (RPL6), DNA hasar yanıtında rol oynayan önemli bir düzenleyici faktör olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, RPL6'nın histon H2A ile etkileşerek poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) bağımlı bir şekilde DNA hasar bölgelerine alındığını göstermişlerdir. Ek olarak Ribozomal Protein L8 (RPL8) ve Ribozomal Protein S11 (RPS11) gibi diğer RP'lerin de RPL6 ile birlikte DNA hasar bölgelerine alındığı rapor edilmiştir. RPL6'nın susturulması, DNA hasar kontrol noktası 1 (MDC1) ve H2A histon ailesi üyesi X (H2AX) mediatörlerinin DNA hasar bölgelerine bağlanmasını engelleyerek ve H2A/H2AX

ubikitinasyonunu azaltmaktadır. Sonuç olarak, RPL6'nın susturulması, DNA hasarı onarımında ve hücrenin yaşam kabiliyetinde kusurlara neden olmaktadır (Yang, et al., 2019).

Ayrıca, MDM2 (Mouse double minute 2 homolog)'nin spesifik bir DNA onarım kompleksinin bir bileşeni olan telomer bakım proteini nibrinini (NBS1) spesifik olarak bağladığı ve genomik stabiliteyi önemli ölçüde tehlikeye attığı bildirilmiştir. İlginç bir şekilde, MDM2 üzerindeki NBS1 bağlanma bölgesi, Ribozomal Protein 14 (RPL14), Ribozomal Protein L24 (RPL24) ve Ribozomal Protein S11 (RPS11) dahil olmak üzere bazı RP'ler için bağlanma bölgeleri ile yapısal olarak örtüşmektedir. Bu nedenle, genomik stabilitenin korunması, muhtemelen bu RP'ler tarafından MDM2 üzerindeki NBS1 bağlanma bölgesinin maskelenmesinden kaynaklanmaktadır (Kim, et al., 2014; Zhang, et al., 2006).

Son olarak, Ribozomal Protein S26 (RPS26), DNA hasarına yanıt olarak p53 transkripsiyonel aktivitesini doğrudan modüle ederek DNA onarım sürecine katılmaktadır (Cui, et al., 2014).

2.3.3.3. Apoptozun Düzenlenmesi

RP'lerin birkaç ekstra ribozomal işlevi arasında, iyi tanımlanmış olanlardan biri de apoptotik yolun düzenlenmesidir.

RPS3, pro-apoptotik bir işlev sergileyen bir ribozomal proteindir. Bu etkinin RPS3 ile tümör nekroz faktörü reseptörü tip 1-ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD) arasındaki fiziksel etkileşimden kaynaklandığı gösterilmiştir. RPS3 aracılı pro-apoptotik sinyalinin, kaspaz-8/kaspaz-3 kaskadı ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolunun aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (Jang, et al., 2012). Laringeal karsinom hücrelerinde, Ribozomal Protein S14 (RPS14)'ün arttırılmış ekspresyonu, p38, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve JNK sinyalini indükleyerek apoptozun aktivasyonuna yol açmaktadır. RPS14'ün apoptotik işlevini her iki apoptotik yolun (ölüm reseptörü aracılı ve mitokondriyal aracılı) aktivasyonu yoluyla gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (Saini, et al., 2009).

Yapılan bir çalışmada RPL3, p53 delesyonu olan kolon kanseri hücrelerinde proapoptotik bir faktör olarak tanımlanmıştır (Pagliara, et al., 2016). Ayrıca p53 mutasyonlu ilaç dirençli akciğer kanseri hücrelerinde, RPL3 ekspresyonunun aşağı regüle edildiği, RPL3 restorasyonun, ise reaktif oksijen seviyelerini, glutatyon (GSH) içeriğini, glutamat salınımını ve sistin alımını düzenleyerek hücreleri ilaca karşı yeniden duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Pecoraro, et al., 2019).

Ribozomal Protein S8 (RPS8) yıkımının glioblastoma kanser hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada ise RPS8 susturma işleminin Bcl-2 protein seviyelerinin modülasyonu yoluyla intrensek mitokondriyal apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Zhang, et al., 2016).

Over kanseri hücrelerinde Ribozomal Protein S7 (RPS7)'nin yıkılması, pro- ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu farklı şekilde düzenler ve atenüe apoptoza neden olmaktadır. RPS7 susturmanın, CDKN1, Bcl-2 ilişkili X protein (BAX), Bcl-2 antagonist/killer (BAK) ve Bcl-2 ilişkili ölüm promoter (BAD) gibi pro-apoptotik faktörlerin spesifik aşağı regülasyonuna yol açarken, Bcl-2 ve de B hücre lenfoma-xl (Bcl-xl) gibi anti-apoptotik faktörlerin ise yukarı regülasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Wang, et al., 2013).

İntrensek apoptotik yolun çoklu düzenleyicileri arasına, son çalışmalar bazı mitokondriyal RP'lerin de dahil olduğunu bildirmiştir (Huang, et al., 2020). BMRP (BCL-2 etkileşimli mitokondriyal ribozomal protein) olarak da adlandırılan mRPL41, p53 stabilitesine katkıda bulunur ve bald farelerde kanser hücrelerinin büyümesini baskılayarak p53'e bağlı apoptozu indüklemektedir (Yoo, et al., 2005). mRPL41, N-terminalinin yakınında Bcl-2 bağlanma bölgeleri içermektedir. Bu bölgeler olgun proteinde bulunmadığından, mRPL41'in Bcl-2 ile etkileşimi ve apoptotik aktivitesinin sitozolde meydana gelmesi muhtemeldir (Conde, et al., 2012).

Mitokondriyal Ribozomal Protein S29 (mRPS29) ilk olarak ölüm ilişkili protein (DAP) ailesinin bir üyesi olarak keşfedilmiş ve DAP3 olarak adlandırılmıştır. mRPS29 insan laringeal karsinom hücre hattında p38, MAPK ve JNK sinyalleşmesinin aktivasyonu yoluyla mitokondri aracılı apoptozu indüklemektedir (Kim, et al., 2017).

2.3.4. Ribozomal Proteinler ve Kanser

Sürekli büyüyen ve çoğalan kanser hücreleri yüksek miktarda proteine ihtiyaç duymakta ve bu da protein sentezinde rölatif bir artışa neden olmaktadır. Bu fenomen, kanser hücrelerinin normal hücrelerden çok daha verimli ribozomlara ihtiyaç duyduğu anlamına gelmektedir. Bu görüşle tutarlı olarak, bir dizi tümör baskılayıcı ve onkojenik proteinin, ribozom biyogenezini ve genel protein sentezini düzenleyerek kanser hücrelerinin ilerlemesini sıklıkla kontrol ettiği öne sürülmüştür (Silvera, et al., 2010). Kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için ribozomun öneminin yanı sıra, ribozom yapısında yer almayan RP'ler de tümör oluşumunda rol oynamaktadır. Çeşitli insan tümörlerinde mRNA veya protein seviyesinde çok sayıda RP'nin yukarı regüle edildiği bulunmuştur (Artero-Castro, et al., 2011; Chen, et al., 2014). RPS3A'nın aşırı

ekspresyonunun NIH-3T3 hücre hattının neoplastik transformasyonuna yol açtığı ve farelerde tümör büyümesini desteklediği bildirilmiştir (Naora, et al., 1998). Ek olarak, mide kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen RPS13'ün, ilaca bağlı apoptozu inhibe ettiği ve kanser hücresi proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Guo, et al., 2011). Bazı RP'lerin onkojenik fonksiyonlarının aksine, tümör baskılayıcıları aktive ederek veya onkoproteinleri etkisiz hale getirerek tümör oluşumunu baskılamada rol oynadığı da gösterilmiştir (de Las Heras-Rubio, et al., 2014). Yapılan bir dizi çalışmada birçok RP'nin, MDM2 (Mouse double minute 2 homolog)/MDM4 (Mouse double minute 4 homolog)-p53 kaskadını düzenleyerek tümör hücresi proliferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. RP-MDM2 etkileşimi ilk olarak MDM2-p53 geri besleme döngüsünün Ribozomal Protein L11 (RPL11), RPL5 ve RPL23 tarafından düzenlenmesinin keşfi ile ortaya çıkarılmıştır (Lohrum, et al., 2003; Zhang, et al., 2003; Dai and Lu, 2004; Dai, et al., 2004; Jin, et al., 2004). Hücreler, çeşitli dış faktörler veya diğer RP'lerin tükenmesi tarafından tetiklenen nükleolar stres altında olduklarında, bu üç spesifik RP'nin ribozom biyogeneze katılması önlenerek, pre-ribozomlardan nükleoplazmaya salınmaktadır. Burada bu proteinler MDM2'ye bağlanarak ve MDM2 aracılı p53 ubiquitinasyonunu inhibe etmekte ve kompleksin ayrılmasına, hücre döngüsü ve proliferasyonun durmasına yol açmaktadırlar. RP'lerin çoğunun doğrudan MDM2 ile etkileşime girmesine rağmen, RPS15, RPS20 ve RPL37'nin de MDM2'nin homologue olan MDM4'e bağlandığı da gösterilmiştir (Daftuar, et al., 2013). RPL26 en sıra dışı RP'lerden biridir çünkü sadece MDM2 ile etkileşime girmekle kalmaz, aynı zamanda p53 mRNA'sı ile de etkileşime girmekte ve translasyonunu arttırmaktadır (Takagi, et al., 2005).

2.3.4.1. Kanser Tanısında Biyobelirteç Olarak Ribozomal Proteinler

Kanser hücrelerinde ribozom biyogeneze sürecindeki değişikliklerin incelenmesi, erken tanı, prognoz ve tedavi seyrinin öngörülmesi için çeşitli biyobelirteçlerin ortaya çıkması açısından umut vericidir. Ribozomal Protein L18 (RPL18) ve Ribozomal Protein L16 (RPL16)'daki somatik mutasyonlar, T hücreli akut lenfoblastik lösemide (T-ALL) tanımlanmıştır (Mushtaq, et al., 2018). RPL3 mutasyonları, kemik iliği aplazisi ve artmış hematolojik kanser ile karakterize bir ribozomopati olan Diamond-Blackfan anemisinde bulunmaktadır (Engidaye, et al., 2019). Bir çalışma, p53 delesyonu olan kolon kanseri dokularında azalmış RPL3 ekspresyonunun, malign progresyon ve tümör derecesi ile ve ayrıca 5-Fluorourasil (5-FU) ve Oksaliplatin (OHP) gibi farklı kemoterapötik ajanlara direnç gelişimi ile ilişkili olduğunu

göstermiştir (Esposito, et al., 2014). İnsan prostat kanseri dokularının kantitatif analiziyle, prostat kanseri hastalarında aşırı eksprese edilen üç RP; Ribozomal Protein S19 (RPS19), Ribozomal Protein S21 (RPS21) ve Ribozomal Protein S24 (RPS24) tanımlanmıştır (Arthurs, et al., 2017). Ayrıca RPS24'ün bir biyobelirteç olarak etkinliği, insan kolon karsinomu için de rapor edilmiştir (Arthurs, et al., 2017). Ribozomal Protein S17 (RPS17), hepatoselüler karsinomda potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak tanımlanmıştır. 182 hastadan oluşan bir kohortta yürütülen çalışmada, yüksek RPS17 düzeylerinin cerrahi rezeksiyondan sonra daha kısa sağkalım ve nüksüz sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhou, et al., 2020). RPS17, RPS9 (Ribozomal Protein S9) ve RPS13, yetişkin bireylerde kötü huylu beyin tümörü olan glioblastoma tedavisinde Topoizomeraz II'ye (TOP2) yanıt için varsayılan biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır (Awah, et al., 2020). Mutasyonların karakterizasyonu ve RP'lerin anormal ekspresyonu, kanser teşhisi, prognozu ve tedavi tahminlerinde faydalı araçların ortaya çıkması için umut vaat etmektedir.

2.3.4.2. Kanser Tedavisinde Ribozomal Proteinler

Bir dizi çalışma, farklı insan kanser türlerinde birkaç bireysel RP'nin değiştirilmiş ekspresyonunu göstermiştir. Bazı RP'lerin ise yeni ekstra ribozomal fonksiyonlarının tanımlanması, bu proteinleri yeni bir onkojenik veya tümör baskılayıcı faktör olarak öne çıkarmıştır (Penzo, et al., 2019; Russo and Russo, 2017).

Prostat kanserinde, Ribozomal Protein S5 (RPS5) ve Ribozomal Protein L19 (RPL19)'un ekspresyonu önemli ölçüde yükselmekte ve bazı çalışmalar bu proteinleri yeni terapötik hedefler olarak tanımlamaktadır. Lokal veya sistemik olarak uygulanan ribozim benzeri bir oligonükleotit yoluyla RS5'in susturulmasının, farelerde metastatik tümörleri eradike ettiği bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışma grubu tarafından RPS5'in pre-let-7a-1 miRNA (mikro RNA) olgunlaşma sürecini bloke ettiği, bu olgunun Ras ve c-Myc gibi onkogenlerin ekspresyonunu ve primer prostat hücre hatlarının malign bir fenotipe dönüşümünü desteklediği rapor edilmiştir. Buradan yola çıkarak, RPS5'in susturulmasının prostat kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini düşünülmektedir (Wang, et al., 2012).

Ribozomal Protein L39 (RPL39) ve Ribozomal Protein L32 (RPL32), meme kanseri tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olarak tanımlanmaktadır. Bahsi geçen RP'lerin fonksiyonlarını engellemek için gen susturma uygulamalarının antikanser etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Dave, et al., 2014; Xu, et al., 2020). Ubikitöz doğaları göz önüne alındığında, spesifik RP'leri kodlayan genlerin

susturulması, sadece tümör hücrelerini değil aynı zamanda sağlıklı hücreleri de öldürebilecek bir stratejidir. Buna karşı bir takım yönlendirilmiş, hedef spesifik tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Bu bağlamda, kanser hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen reseptörlere özgü etiketler taşıyan nanopartiküller kullanılarak kanser hücrelerini seçici olarak hedefleme umut verici bir terapötik stratejidir (d'Angelo, et al., 2018). RPL39'un lipozom nanopartikülleri içinde paketlenmiş spesifik küçük interferans yapan RNA (siRNA) tarafından susturulması, nitrik oksit sentaz sinyalinin inhibisyonu üzerinden, meme kanseri deneysel ksenograft tümörlerde kanserin başlangıç ve metastatik evrelerini geriletği bildirilmiştir (Dave, et al., 2014). Lentivirüs ile iletilen siRNA kullanılarak RPL32'nin susturulması ise meme kanser hücresi migrasyonunu ve invazyon kabiliyetini *in vitro/in vivo* olarak azalttığı bildirilmiştir (Xu, et al., 2020).

Yapılan bazı çalışmalar, RPL32'nin akciğer kanseri için umut verici bir terapötik hedef olabileceğini göstermiştir. RPL32'nin aşırı ekspresyonu, akciğer kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. RPL32 gen susturmanın ribozom biyogenez stresini indüklediği, RPL18 ve RPL5'in çekirdekten nükleoplazmaya yer değiştirmesine neden olarak MDM2'yi bağlamalarına ve akciğer kanseri proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanan p53 birikimine yol açtığı bildirilmiştir (Xie, et al., 2020). RPS6'nın, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, skuamöz hücreli özofagus karsinomu, pankreas nöroendokrin tümörleri ve sarkomlar dahil olmak üzere birçok kanserde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve özellikle over kanseri için terapötik bir hedef olabileceği bildirilmiştir. Ribozomal Protein S6 (RPS6)'nın Lentivirus-shRNA (short-hairpin RNA) tarafından yıkılması, over kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon kabiliyetini önemli ölçüde inhibe ettiği ve G0/G1 fazının durmasını indüklediği belirtilmiştir (Yang, et al., 2020).

Aşırı ekspresyonda olduğu gibi, bazı bireysel RP'lerin kaybı da hücrel fenotipteki spesifik değişikliklerle ilişkilidir. RPL3, hücrel stres yanıtında önemli bir belirleyicidir; RPL3 hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indüklerken otofajiyi inhibe eder (Russo, et al., 2016; Pagliara, et al., 2016; Pecoraro, et al., 2019). RPL3'ün aşırı ekspresyonu, bazı antikanser ilaçlarının antitümöral etkisini artırırken (Guo, et al., 2011; Pecoraro, et al., 2020), RPL3'ün susturulması, p53 mutasyonlu akciğer ve p53 delesyonlu kolon kanseri hücrelerinde 5-FU gibi ilaçlara direnç kazandırır (Pecoraro, et al., 2019; Ebright, et al., 2020; Mosca, et al., 2020; Barbato, et al., 2020). Yapılan bir çalışmada RPL3 ekspresyon vektörünün transfeksiyonu yoluyla RPL3

protein seviyesinin restorasyonu, reaktif oksijen türlerinin seviyelerini, GSH içeriğini ve sistin alımını düzenleyerek ilaç dirençli hücreleri kemoterapiye yeniden duyarlı hale getirmiştir (Pecoraro, et al., 2019).

RPL14'ün ko-transdüksiyonu, p53 mutasyonlu kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamada adenoviral vektörlü p53'ün terapötik etkinliğini arttırmıştır. Ektopik RPL14 proteini, p53'ü stabilize eder ve hücrelerde birikimine yol açar ve bu olguya *in vitro/in vivo* olarak p53 aşağı akış hedef genleri olan MDM2 ve p21'in artan ekspresyon seviyeleri eşlik eder (Zhang, et al., 2013).

Embriyogenez sırasında ribozom biyogenezinin pertürbasyonunun çeşitli genetik hastalıklarına yol açan ciddi gelişimsel kusurlara neden olmasına rağmen, kanserli hücrelerde kısıtlı ribozomal stresin çeşitli klinik uygulamaları vardır. Ribozomal stres tarafından indüklenen bir dizi RP, tümör baskılayıcıların aktivitelerini arttırmaktadır. Örneğin, p53 aktivitesi ribozomal stres üzerine RP'ler tarafından büyük ölçüde arttırılmaktadır. RPL5 ve RPL11 gibi RP'lerin azaltılması, ribozomal stresin neden olduğu p53'e bağlı hücre döngüsü durmasını ve birçok tipte tümör hücresinde apoptozu önemli ölçüde bozmaktadır (Zhang and Lu, 2009; Zhou, et al., 2012). RP'ler ayrıca onkojenik c-Myc gibi proteinleri etkisiz hale getirmektedir (Dai, et al., 2007; Challagundla, et al., 2011; Liao, et al., 2014; Zhou, et al., 2013). Ek olarak, hızlı ve aktif olarak büyüyen ve çoğalan tümör hücrelerindeki, gelişmiş ribozom biyogenezinin normale indirgendiği zaman, c-Myc destekli tümör büyümesinin önemli ölçüde ortadan kalktığı ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin normal somatik hücrelere kıyasla daha fazla ribozom makinesine ihtiyaç duyduğu kanıtlanmıştır (Barna, et al., 2008). Bu olgu, tümör hücrelerinin ribozomal strese normal somatik hücrelerden daha duyarlı olduğunu ve dolayısıyla tümör hücrelerinde ribozom biyogenezinin hedeflenmesinin yenilikçi anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesinde makul bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Anti-ribozom biyogenez ilaçları normal ve farklılaşmış hücrelere daha az genotoksiktir, çünkü DNA hasarına genellikle neden olmadan ribozomal stresi indükleyebilmektedirler. Seçici olarak RNA Pol I'i hedefleyen ve böylece ribozomal stresi indükleyen birkaç anti-kanser kemoterapötik ajan tanımlanmıştır. İnsan guanin-sitozin açısından zengin rDNA'nın transkripsiyonuna, şablon DNA'nın renatürasyonunu önleyen şablon yapıda olmayan G-quadruplex DNA/nükleolin kompleksi oluşumu eşlik etmektedir. Küçük bir molekül olan ve CX-3543 olarak adlandırılan bir ajan, G-quadruplex yapılarına bağlanma için nükleolin ile rekabet eder ve sonuç olarak RNA Pol I'e bağlı

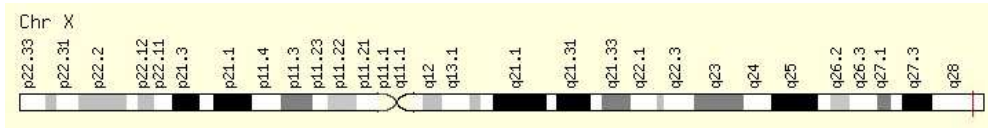
transkripsiyonun spesifik inhibisyonuna yol açar (Drygin, et al., 2009). Aynı grup tarafından tanımlanan bir başka spesifik RNAPol I inhibitörü olan CX-5461, transkripsiyon faktörü SL1'in RNA Pol I'e duyarlı promotere alınmasını önler ve rDNA transkripsiyonun başlamasını inhibe eder (Drygin, et al., 2011). Bahsi geçen inhibitör, yapılan bir çalışmada, RNA lenfoma tümör modelinde spesifik olarak RNA Pol I'e özgü transkripsiyonu hedefleyerek normal B hücrelerine zarar vermeden anlamlı bir p53 bağımlı anti-kanser etkisi sergilemiştir (Bywater, et al., 2012). Bu çalışma tümör hücrelerinin ribozomal strese oldukça duyarlı olduğunu ve potansiyel bir anti-kanser tedavisi olarak ribozom biyogenezinin hedeflenmesine bir örnek sunmaktadır. RNA Pol I'in yanı sıra, ribozom biyogenezinin RP'ler, RNA Pol III ve diğer ribozomal olmayan nükleolar faktörler dahil yüzlerce proteine de ihtiyacı vardır. Teorik olarak, ribozomal proteinlerin herhangi birinin hedeflenmesi ribozomal strese neden olabileceğinden, anti-kanser tedavisinin gelişimi için potansiyel taşımaktadır.

2.3.5. Ribozomal Proteinler ve Meme Kanseri

Bazı ribozomal proteinlerin meme kanseri olgularında sağ kalım oranlarıyla, meme kanser hücrelerinde ise hücre döngüsü, endoplazmik stres ve apoptoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Henry, et al., 1993; Fancello, et al., 2017). Meme kanserlerinin bazı moleküler alt sınıflarında, hücre proliferasyonu vücuttaki steroid hormon düzeylerine (özellikle östrojen) oldukça bağımlıdır. Başka bir deyişle, hormon reseptör sinyali, hücre büyümesi için ana uyarıcıdır. Meme kanseri hücrelerinde rRNA gen transkripsiyonunun (ribozom biyogenezinin ilk aşaması) aktivasyonu ER'ye bağlıdır ve hormon antagonistleri tarafından bastırılması konvansiyonel hormon tedavisinin de temelini oluşturmaktadır (Ray, et al., 2013). Yapılan bir çalışmada, ribozomal 40S proteini RPS6 kinaz 1'in (S6K1) aşırı ekspresyonunun meme kanseri moleküler sınıflandırmasında da yer alan ER- α 'yı serin 167 üzerinde fosforile ederek ER- α 'nın transkripsiyonel aktivasyonu üzerinden serum starvasyonu koşullarında meme kanser hücrelerine proliferatif bir avantaj sağladığı gösterilmiştir (Yamnik, et al., 2009). Bir diğer meme kanseri moleküler sınıflandırmasında kullanılan belirteç olan Her-2'nin (ErbB-2/neu) yüksek seviyelerinde, RPL19 mRNA ekspresyonun arttığı bulunmuştur (Henry, et al., 1993). Buradan yola çıkarak meme kanserinin tümünde ve/veya moleküler alt tiplerinde, ektopik artış gösteren ribozomal proteinlerin hedeflenmesi hem ribozomal strese yol açarak apoptozun uyarılması hem de bu proteinlerin kanser lehine olan ekstra-ribozomal etkilerinin ortadan kaldırılması açısından terapötik potansiyel taşımaktadır.

2.3.6. Ribozomal Protein L10

Ribozomal protein L10 (RPL10), mayadan insana birçok türde ribozomun 60S alt birimlerinde bulunan yaklaşık 24 kDa molekül ağırlığına sahip bir yapısal proteindir. RPL10, X kromozomu üzerinde q28 bölgesinde bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır (Şekil 2.6) (Eisinger, et al., 1997). RPL10 protein ve genine ait alternatif adlandırmalar Tablo 2.1.'de, UNIPROT veri bankasından elde edilen moleküler fonksiyonları, yer aldığı biyolojik süreçler ve ilişkili olduğu patolojiler Tablo 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.6. RPL10'un kromozomal lokalizasyonu (GeneCards, 2021)

Tablo 2.1. RPL10 alternatif protein ve gen adlandırmaları (GeneCards, 2021a; NCBI, 2021a)

Protein İsimleri	Önerilen isim: 60S ribosomal protein L10
	Alternatif isimler: Wilms tumor-related protein laminin receptor homolog large ribosomal subunit protein uL16 tumor suppressor QM
Gen isimleri	Adı: RPL10 Sinonimler: QM; L10; NOV; AUTSX5; DXS648; MRXS35; DXS648E
Organizma	Homo sapiens (insan)

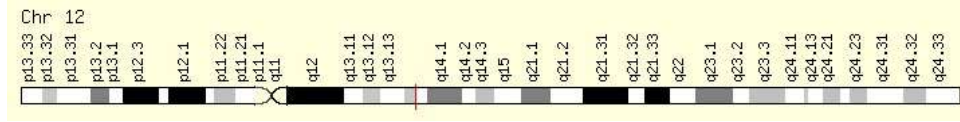
Tablo 2.2. RPL10'un moleküler fonksiyonları, yer aldığı biyolojik ve patolojiler süreçler (UNIPROT, 2021a)

Moleküler Fonksiyonları
RNA bağlama
Ribozomun yapısal bileşeni
Translasyon düzenleyici aktivite
Yer Aldığı Biyolojik Süreçler
Embriyonik beyin gelişimi
Apoptotik sürecin negatif düzenlenmesi
RNA polimeraz 2 kaynaklı transkripsiyonunun negatif düzenlenmesi
Nükleer transkripsiyonlu mRNA disregülasyonu
Translasyonun düzenlenmesi/başlatılması
Ribozomun büyük alt biriminin oluşturulması
İlişkili Olduğu Patolojiler
Otizm spektrum bozukluğu
Mental retardasyon
Kanser

RPL10'un protein sentezindeki yapısal rolünün yansıra, ekstra ribozomal fonksiyonlara sahip olduğuna dair birçok veri bulunmaktadır. İlk olarak, RPL10 komplementer DNA (cDNA)'sı Wilms tümöründe (Nefroblastoma) keşfedilmiş ve onkogeneze üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu düşünülmüştür (Loftus, et al., 1997; Dowdy, et al., 1991). Sonrasında RPL10'un, hücre çoğalması, migrasyon ve diferansiyasyon gibi çeşitli hücre biyolojik süreçlere ait sinyal iletim yollarında yer alabileceği gösterilmiştir (Oh, et al., 2002). Prostat kanserinde ise erken evrede RPL10 seviyelerinin düşük, geç evrede ise yüksek düzeyde olduğu bildirilmiş ve RPL10 düzeyleri ile tümör prognozunun bağlantılı olabileceğini öne sürülmüştür (Altinok, et al., 2006). Başka bir çalışmada ise T-hücre akut lenfoblastik lösemide RPL10 geninin bir mutasyonu (R98S) tanımlanmış (Girardi, et al., 2018) ve aynı çalışma grubu tarafından da bu mutasyonun Janus kinaz/Transkripsiyonun sinyal iletilicileri ve aktivatörleri (JAK/STAT) sinyal yolunun uyarılmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kampen, et al., 2019). İnsan epitelyal over kanserinde ise RPL10 seviyeleri sağlıklı over dokularına göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. RPL10'un düşük ekspresyon düzeyinde apoptozu arttırdığı, hücre canlılığını, migrasyonu ve invazyonu ise azalttığı bulunmuştur. Buna karşılık aşırı eksprese edildiğinde ise, apoptozu azaltırken hücre canlılığını, migrasyonu ve invazyonu arttırdığı bildirilmiştir (Shi, et al., 2018). Ayrıca RPL10, atipik teratoid/rabdoid tümörler için biyopsi ve immünohistokimya gibi standart tanı araçlarına ek olarak potansiyel bir diagnostik belirteç olarak tanımlanmıştır (Ren, et al., 2018). Sonuç olarak RPL10 proteininin hem onkogeneze üzerinde etkisi hem de prognoz tayini açısından çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Bununla birlikte RPL10'un tanı aracı olarak değer taşıyabileceği de ifade edilmiştir.

2.3.7. Ribozomal Protein L41

Ribozomal protein L41 (RPL41) 3,4 kDa'lık küçük bir peptittir (Odintsova, et al., 2003). RPL41, 12. kromozom üzerinde 12q13.2 bölgesinde bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır (Şekil 2.7) (GeneCards, 2021b). RPL41 protein ve genine ait alternatif adlandırmalar Tablo 2.3.'de, UNIPROT veri bankasından elde edilen moleküler fonksiyonları ve yer aldığı biyolojik süreçler Tablo 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.7. RPL41'un kromozomal lokalizasyonu (GeneCards, 2021b)

Tablo 2.3. RPL41 alternatif protein ve gen adlandırmaları (GeneCards, 2021b; NCBI, 2021b)

Protein İsimleri	Önerilen isim: 60S ribosomal protein L41 Alternatif isimler: HG12 protein homologue of yeast ribosomal protein YL41 large ribosomal subunit protein eL41
Gen isimleri	Adı: RPL41 Sinonimler: QM; L41; HG12
Organizma	Homo sapiens (insan)

Tablo 2.4. RPL41'in moleküler fonksiyonları ve yer aldığı biyolojik süreçler (UNIPROT, 2021b)

Moleküler Fonksiyonları
mRNA 3'-UTR bağlama
mRNA 5'-UTR bağlama
Ribozomun yapısal bileşeni
Yer Aldığı Biyolojik Süreçler
Sitoplazmik translasyon
Translasyonun düzenlenmesi/başlatılması
Protein kinaz CK II'nin beta alt birimi ile etkileşime girer ve DNA topoizomeraz II alfa'nın CKII tarafından fosforilasyonunu uyarır

Yapılan bir çalışmada yedi intrahepatik kolanjiokarsinom tümör ve tümör çevresi sağlık doku örnek çiftlerinde RNA-Seq verileri analiz edilmiştir. Diferansiyel gen ekspresyon analizi ile RPL41 geninin tümör dokularında yukarı yönlü regüle edildiği gösterilmiştir (Yang and Zong, 2016). Nazofaringeal karsinoma hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada ise RPL41 geni normal nazofarenks epitel hücrelerine kıyasla çalışmadaki tüm nazofaringeal karsinoma hücre hatlarında aşırı ekspresyon göstermiştir (Sim, et al., 2016). RPL41'in, tümör hücresi sağ kalımının ana düzenleyicisi ve insan kanserlerinin potansiyel bir terapötik hedefi olan aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4) nükleustan bir proteazom belirteci ile birlikte boyandığı sitoplazmaya relokasyonunu indüklediği böylece RPL41'in hızlı ir ATF4 yıkımına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışma grubu tarafından RPL41 yıkımına sahip hücrelerde, ATF4 ekspresyonun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir, bu olgular birlikte ele alındığında RPL41'in hücresel ATF4 seviyesinin düzenlenmesinde fizyolojik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca RPL41'in, tümör hücresi

ölümünü ve hücre siklusunun durmasını uyarma yeteneğine sahip olduğu da gösterilmiştir; düşük dozda, rekombinant RPL41 uygulaması, akciğer kanseri hücre hattında, tümör hücrelerini DNA hasar ajanı cisplatine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Wang, et al., 2011). Anti-sense tabanlı bir fonksiyonel tarama modelinin kullanıldığı bir çalışmada, RPL41'in aşağı regülasyonunun, yumuşak agar plakalarında NIH3T3 hücrelerinin agar yüzeyine bağlanmadan bağımsız büyümesine yol açtığını bildirilmiştir. Aynı çalışmada gene spesifik küçük interferans yapan RNA ile RPL41 susturulması, fare modelinde artan tümör büyümesi dahil olmak üzere, NIH3T3 hücrelerinin malign transformasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. RPL41 delesyonun, floresan in situ hibridizasyon analizleri ile tümör hücre hatlarının %59'unda ve kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile primer meme kanserlerinin %75'inde RPL41 aşağı regülasyonu ile tespit edilmiştir. Ayrıca kütle spektrometrisi ile RPL41, tubulin beta, gama ve miyosin IIA dahil olmak üzere çeşitli hücre iskeleti bileşenleri ile ilişkilendirilmiştir. RPL41'in doğrudan polimerize tübüllere bağlandığı, RPL41'i aşırı eksprese eden hücrelerin, nocodazol kaynaklı mikrotübül depolimerizasyonuna dirençli olduğu ve rekombinant RPL41 uygulamasının hücresel alfa-tübülün asetilasyonunu ve G(2)/M hücre döngüsü durdurmasını indüklediği aynı çalışma içinde bildirilmiştir. Bu sonuçlar, RPL41'in mikrotübüller üzerinde stabilize edici bir rolü olduğunu göstermektedir. RPL41 yıkımına sahip hücrelerde anormal iğcikler, başarısız bir sitokinez süreci ve polinükleer hücre formasyonu gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, RPL41'in sağlıklı ve fonksiyonel bir iğ formasyonu ve sentrozomun bütünlüğü için gerekli olan mikrotübüller ile ilişkili bir protein olduğuna, RPL41 aşağı regülasyonu ile ilişkili anormal mitoz ve disregüle sentrozomun malign transformasyona yol açabileceğine dair kanıtlar sağlamaktadır (Wang, et al., 2010). Bu bulgular RPL41'in bir tümör baskılama rolüne sahip olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan önceki çalışmalarda meme kanserinin moleküler alt tiplerinde kullanılan parametrelerin bazılarının ribozomal proteinlerle ilişkisi araştırılmış olsa da RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonlarının spesifik olarak herhangi bir alt tipteki ekspresyon düzeyi araştırılmamıştır. Çalışmamızın amacı, RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonunun meme kanseri alt tiplerindeki değişimini araştırarak edinilen bilgilerle, meme kanserinde bir biyobelirteç olarak kullanım alanının araştırılmasıdır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Hassas terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, Japonya)

Yüksek hızlı, soğutmalı santrifüj (Hermle, Z 32 HK, Almanya)

Mikrosantrifüj (SIGMA, 3K30, ABD)

Mikrosantrifüj (Jouan, A-14, Fransa)

Vorteks VM3, (Windaus, 3392, Almanya)

Sıvı azot tankı (International Cryogenics, Inc. IC 20D Storage Dewor, ABD)

Otoklav (Nüve, OT 4060, Türkiye)

Nano-Drop spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000, ABD)

PCR döngü cihazı (Kyrotech, SuperCycler Trinity, Avustralya)

qRT-PCR cihazı (Bio-Rad, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, ABD)

Mikropipetler (Eppendorf 20, 100, 200, 1000, Almanya).

1.5 ml nükleaz içermeyen eppendorf (Grenier Bio-one, ABD)

0.2 ml PCR tüp (Grenier Bio-one, ABD)

Derin dondurucu -80 °C, (NUAIRE, ABD)

10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, steril pipet uçları (Grenier bio-one, Avusturya)

Elektroforez tankı (Bio-Rad, Wide Mini-Sub Cell GT, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, PowerPac Basic, ABD)

Jel görüntülme (Bio-Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System, ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, Tayvan)

SsoAdvanced™ UNIVERSAL SYBR® Green Supermix (Bio-rad, ABD)

iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad, ABD)

GAPDH için qRT-PCR F/R primer 20 bp (Oligomer, Türkiye)

RPL10 için qRT-PCR F/R primer 20 bp (Oligomer, Türkiye)

RPL41 için qRT-PCR F/R primer 20 bp (Oligomer, Türkiye)

B-merkaptotanol (Sigma-aldrich, ABD)

Trizol (Hibrizol, Hibrigen, Türkiye)

Kloroform (Sigma-aldrich, ABD)

GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific, ABD)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD)

Tris (Sigma-aldrich, ABD)

Borik Asit (Sigma-aldrich, ABD)

EDTA Disodyum (Sigma-aldrich, ABD)

Agaroz (Sigma-aldrich, ABD)

Etidyum bromür (Sigma-aldrich, ABD)

DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, ABD)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Popülasyonunun Özellikleri

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından OMÜ KAEK 2020/78 nolu kararla etik açıdan uygun bulunup onaylanmıştır. Çalışma, dört adet hasta, bir adet kontrol grubunda bulunmak üzere toplam 74 numune içerecek şekilde tasarlanmıştır. Çalışmada kullanılacak hasta ve kontrol grubunu oluşturan doku örnekleri, aydınlatılmış onam formunu imzalayan 18 yaş üstü gönüllü kadın bireylerden alınmıştır.

Hasta gruplarını oluşturan örnekler (n=58), Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalına başvuran meme kanseri tanısı alan hastalardan rutin mastektomi işlemi ile elde edilmiştir.

Kontrol grubunu oluşturan örnekler (n=16) ise redüksiyon mamoplasti gibi kanser cerrahisi uygulamaları dışında kalan, gönüllü hastalardan elde edilen ve histopatolojik muayene sonucu herhangi neoplastik ve enflamatorik bulgular göstermeyen sağlıklı dokulardan oluşturulmuştur.

3.2.2. İmmunohistokimyasal Analizler ve Örneklerin Moleküler Alt Tiplerinin Belirlenmesi

Operasyonu takiben tespit edilmeden Pataloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen numunelerin makroskopik incelemeleri yapıldıktan sonra parçalara ayrılarak örneklendirilmiştir. Her bir numune için bir parça tümör örneği qRT-PCR yöntemiyle gen ekspresyon analizi için DNAase ve RNAase free koşullarda -80°C dondurularak çalışma gününe kadar muhafaza edilmiştir, diğer tümör dokusu örnekleri ise 24 saat %10'luk nötral formalinde tespit edildikten sonra doku takibine alınmıştır. Doku takibi sonrası hazırlanan parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler alınıp hematoksilin-eozin ile boyanarak, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Tümörlerin histolojik tiplendirmesi ve derecelendirmesi yapılmıştır (Tan, et al., 2019). Lenf

nodları ve cerrahi sınırlar değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal incelemede her bir örnek için östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, insan epidermal büyüme faktörü 2 ve Ki67 proliferasyon indeksi parametreleri değerlendirilerek ve bu parametrelere göre örnekler dört moleküler alt gruba ayrılmıştır (Goldhirsch, et al., 2013). Hasta ve kontrol gruplarının immunohistokimya profili tablo 3.1.'de verilmiştir.

Kontrol grubu için ise kanser cerrahisi uygulamaları dışında elde edilen meme dokuları kullanılmıştır. Her bir kontrol numunesi için Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında makroskopik inceleme yapılmış ve sonrasında spesmenler parçalanarak bir parça qRT-PCR yöntemiyle gen ekspresyon analizi için DNAase ve RNAase free koşullarda -80 °C'de dondurularak çalışma gününe kadar muhafaza edilmiştir. Diğer doku parçaları ise 24 saat %10'luk nötral formalinde fikse edildikten sonra doku takibine alınmıştır. Doku takibi sonrası hazırlanan parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler alınıp hematoksilin-eozin ile boyanarak, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Herhangi bir neoplastik bulgu göstermeyen örnekler kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Tablo 3.1. Hasta ve kontrol gruplarının immunohistokimya profili

Luminal A grubu	ER+ ve/veya PR+, HER2-, düşük Ki67
Luminal B grubu	ER+ ve/veya PR+, HER2+ (Veya HER2-), yüksek Ki67
HER2 zengin grup	ER-, PR-, HER2+
TNBC grubu	ER-, PR-, HER2
Kontrol grubu	Sağlıklı meme dokuları

3.2.3. Doku Homojenizasyon Protokolü

- qRT-PCR analizi amacıyla çalışmada yer alan her bir numuneden 30 mg doku örneği tartıldı.
- Numune önceden sıvı azotla soğutulmuş bir havanda sıvı nitrojen içinde toz haline gelinceye kadar tokmak yardımıyla pulverize edildi.
- Elde edilen toz, buz içinde bekletilen yeni bir RNAase/DNAase free mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Homojenizasyon işlemi boyunca örneklerin çözünmemesine özen gösterildi.

3.2.4. Total RNA İzolasyon Yöntemi

Trizol yöntemi ve FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit yıkama solüsyonları kullanılarak numunelerden RNA izolasyonu yapıldı.

- Pulverize numune içeren tüp içerisine 1 ml Trizol pipetlendi.
- Lizat oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 10 dakika, +4 °C’de, 12.000x g’de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpün tabanında oluşan pellet ve sıvı kısım dikkatli bir şekilde pipetlenerek ayrıldı, sıvı kısım yeni bir RNAase/DNAase mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüp içerisine 200 µl Kloroform ilave edildi.
- 15 saniye ters düz yapıldı ve lizat 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 15 dakika, +4 °C’de, 12.000x g’de santrifüj edildi.
- FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit içreğindeki temiz bir *Collection Tube*’e, *FARB Mini Column* yerleştirildi.
- Santrifüj sonrası tüp içerisinde oluşan fazlardan üstte bulunan renksiz aköz faz dikkatli bir şekilde *FARB Mini Column*’a pipetlendi.
- *FARB Mini Column* içerisine 500 µl *Wash Buffer 1* (kit içinden çıkan) eklendi.
- 30 saniye, +4 °C’de, 18.000x g’de santrifüj edildi.
- *Collection Tube* içerisindeki sıvı atıldı ve *FARB Mini Column*, *Collection Tube* geri koyuldu.
- *FARB Mini Column* içerisine 750 µl *Wash Buffer 2* (kit içinden çıkan) eklendi.
- 30 saniye, +4 °C’de, 18.000x g’de santrifüj edildi.
- *Collection Tube* içerisindeki sıvı atıldı ve *FARB Mini Column*, *Collection Tube* geri koyuldu.
- *FARB Mini Column* içerisine 750 µl *Wash Buffer 2* (kit içinden çıkan) eklendi.
- 30 saniye, +4 °C’de, 18.000x g’de santrifüj edildi.
- *FARB Mini Column*’un kurutmak için;
 - Kolon 3 dakika, +4 °C’de, 18.000x g’de santrifüj edildi.
 - *Collection Tube* içerisindeki sıvı atıldı ve *FARB Mini Column*, *Elution Tube* (kit içinden çıkan) içine yerleştirildi.
- *FARB Mini Column* membran merkezine 30-50 µl RNaz free ddH₂O (kit içinden çıkan) eklendi.
- Kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.

- RNA'yı ayırtmak için *FARB Mini Column*, 30 saniye, +4 °C'de, 18.000x g'de santrifüj edildi.
- *Elution Tube* içinde elde edilen RNA -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.5. Total RNA analizi

İzole edilen RNA'ların nicelik ve nitelik değerlendirmeleri Nano-Drop spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. 1-2 µl RNA izolatu cihazın haznesine yerleştirilerek elde edilen RNA miktarı ng/µl cinsinden bulundu. DNA/protein ve organik madde kontaminasyonun değerlendirilmesi ise sırasıyla 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında absorbansların oranlarının hesaplanmasıyla yapıldı (DNA/Protein için 260/280; organik bileşikler için 260/230). cDNA sentezi için 100 ng/µl ve üzeri RNA konsantrasyonuna sahip numuneler kullanıldı. Ayrıca numunelerin agaroz jel elektroforez yöntemiyle nitel olarak RNA içerdikleri doğrulandı (Şekil 3.3.).

3.2.6. İzole Edilen RNA'lardan cDNA Elde Edilmesi

iScript cDNA Synthesis Kit™ (BIORAD, USA) kullanılarak thermal cycler cihazında cDNA sentezi yapıldı. Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 2'şer tane cDNA elde edildi. cDNA'nın oluşturulması için uygulanan revers transkripsiyon reaktif içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

cDNA sentez protokolü;

- İzole edilen örnekler buz üzerinde çözdürüldü.
- Kullanım öncesi tüm reaktifler çözdürüldü.
- Tüm reaktifler vorteks ile karıştırıldı ve sonrasında kısa süreli santrifüj edildi.
- Tüm işlem boyunca reaktifler buz üzerinde tutuldu.
- Buz üzerinde tutulan steril, RNAase/DNAase free PCR tüpte, aşağıdaki Tablo 3.2'de belirtilen miktarlarda pipetleme yapılarak karışım reaksiyon başına 20 µl olacak şekilde hazırlandı.
- Her bir örnek için kullanılan total RNA ve PCR-grade distile su miktarları final konsantrasyonu 400 ng total RNA olacak şekilde düzenlendi, total hacim 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 3.2. Bir reaksiyon için DNA sentez reaksiyon kurulumu

Komponent	Hacim
5x iScript Reaction mix	4 µl
Nükleaz free su	-
RNA numunesi	-
iScript Reverse transcriptase	1 µl
Total Hacim	20 µl

- Tüpteki reaktifler karıştırıldı.
- Örnekler buz üzerinde 5 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler thermal cycler cihazına yerleştirildi.
- Tablo 3.3.'te verilen revers transkripsiyon PCR programı ile reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için kullanılan program

Aşama	Süre	Sıcaklık (°C)
Priming	5 dakika	25
Reverse transcription	20 dakika	46
RT inactivation hold	1 dakika	95

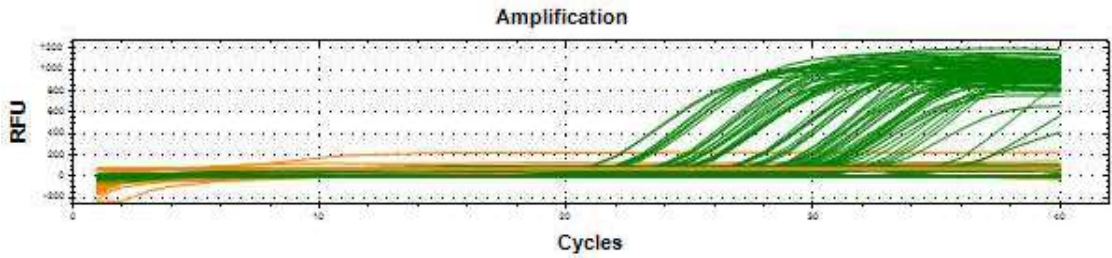
- Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR uygulamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.7. GAPDH, RPL10 ve RPL41 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Ölçümü

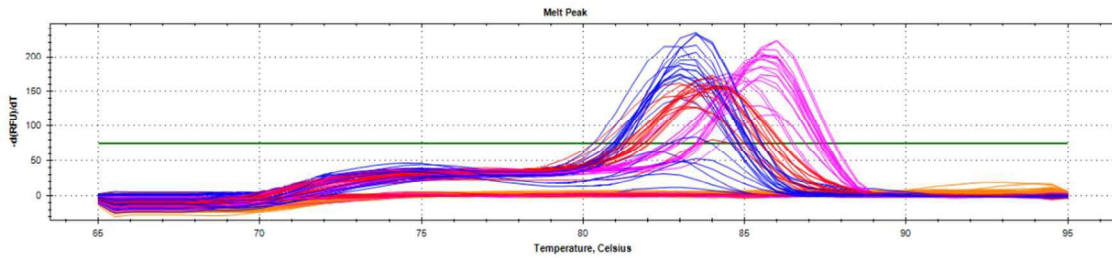
- Örneklerden elde edilen cDNA'lar, SsoAdvanced™ UNIVERSAL SYBR® Green Supermix, RPL10, RPL41 ve GAPDH primerleri (Tablo 3.4.) buz üzerinde çözündürüldü.
- Reaksiyon bileşenleri nazıkçe vortekslendi ve santrifüj edildi.
- Her bir analiz için reaksiyon sayıları ikişerli olacak şekilde hesaplandı.
- Elde edilen cDNA'ların her biri için bir GAPDH, RPL10 ve RPL41 analizi yapılacak şekilde reaksiyonlar kuruldu, plate üzerinde her bir gen için negatif kontrol amacıyla template içermeyen kuyucuklar hazırlandı.
- qRT-PCR reaksiyonu için buz üzerinde aşağıda verilen tablolara uygun olacak şekilde reaksiyon miks hazırlandı ve cDNA örnekleri ve PCR grade su hariç bileşenler hassas bir şekilde plate üzerindeki kuyucuklara pipetlendi.
- cDNA örnekleri ve uygun miktarda PCR grade su kuyucuklara eklendi ve plate saydam bir film ile kapatılarak en az 30 saniye vortekslendi.
- qRT-PCR programı uygun termal profil seçilerek gerçekleştirildi.

Amplifikasyon grafiği Şekil 3.1.'de; melt-curve grafiği Şekil 3.2.'de verilmiştir

- Yapılan tekrarlı analizler sonucunda Luminal A grubunda RPL10 için 3, RPL41 için 4 numunede; Luminal B grubunda RPL10 için 2, RPL41 için 2 numunede; HER2 zengin grupta RPL10 için 4, RPL41 için 4 numunede; TNBC grubunda RPL10 için 5, RPL41 için 5 numunede; kontrol grubunda RPL10 için 4, RPL41 için 3 numunede; Ct sinyali alınamadığı için numuneler çalışmadan çıkarıldı.
- Alınan Ct sinyaline göre gruplar; Luminal A grubunda RPL10 için n=14, RPL41 için n=13; Luminal B grubunda RPL10 için n=15, RPL41 için n=15; HER2 zengin grupta RPL10 için n=13, RPL41 için n=13, TNBC grubunda RPL10 için n=12, RPL41 için n=12; kontrol grubunda RPL10 için n=13, RPL41 için n=14 olacak şekilde yeniden düzenlendi.
- qRT-PCR sonrası çalışmadaki her bir gen için üretilen ampikonların hedeflenen uzunluklarda (GAPDH için 181bp; RPL10 için 100; RPL41 için 219 bp) oldukları agaroz jel elektroforez yöntemiyle görsel olarak doğrulandı.



Şekil 3.1. Amplifikasyon grafiği



Şekil 3.4. Melt-curve grafiği; mavi: GAPDH; kırmızı: RPL10; mor: RPL41

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri

	Forward primer	Reverse primer
Human GAPDH	5'- TCGGAGTCAACGGATTTGGT -3'	5'- TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC -3'
Human RPL10	5'-AGCTGCAGAACAAGGAGCAT-3'	5'-GTGAAGCCCCCACTTCTTTGA-3'
Human RPL41	5'-ATGAGAGCCAAGTGGAGGAA-3'	5'-TCAGAGGGCGATGAAGTTCT-3'

Amplikon uzunlukları: GAPDH için 181bp; RPL10 için 100; RPL41 için 219 bp

3.2.7.1. GAPDH

Her reaksiyon için toplam 10 µl olacak şekilde reaktifler hazırlandı (Tablo 3.5.) ve qRT-PCR programı oluşturuldu (Tablo 3.6.).

Tablo 3.5. GAPDH qRT-PCR için reaksiyon kurulumu

	Hacim (1 numune)	Hacim (74 numune)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	370 µl	2X	1X
GAPDH Forward Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
GAPDH Reverse Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
DNA template	2 µl	148 µl	-	-
PCR Grade Su	2 µl	148 µl	-	-
Toplam Hacim	10 µl			

Tablo 3.6. GAPDH qRT-PCR programı

Süreç Adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu	1	95 °C	30 saniye
Denatürasyon		95 °C	5 saniye
Amplifikasyon	40	60 °C	30 saniye
Annealing Elongasyon			

3.2.7.2. RPL10 Gen İfade Düzeylerinin Ölçümü

Her reaksiyon için toplam 10 µl olacak şekilde reaktifler hazırlandı (Tablo 3.7.) ve qRT-PCR programı oluşturuldu (Tablo 3.8.).

Tablo 3.7. RPL10 qRT-PCR için reaksiyon kurulumu

	Hacim (1 numune)	Hacim (74 numune)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	370 µl	2X	1X
GAPDH Forward Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
GAPDH Reverse Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
DNA template	2 µl	148 µl	-	-
PCR Grade Su	2 µl	148 µl	-	-
Toplam Hacim	10 µl			

Tablo 3.8. RPL10 qRT-PCR programı

Süreç Adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu	1	95 °C	30 saniye
Denatürasyon		95 °C	5 saniye
Amplifikasyon	40	60 °C	30 saniye
Annealing Elongasyon			

3.2.7.3. RPL41 Gen İfade Düzeylerinin Ölçümü

Her reaksiyon için toplam 10 µl olacak şekilde reaktifler hazırlandı (Tablo 3.9.) ve qRT-PCR programı oluşturuldu (Tablo 3.10.).

Tablo 3.9. RPL41 qRT-PCR için reaksiyon kurulumu

	Hacim (1 numune)	Hacim (74 numune)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	370 µl	2X	1X
GAPDH Forward Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
GAPDH Reverse Primer	0.5 µl	37 µl	10 µM	0.5 µM
DNA template	2 µl	148 µl	-	-
PCR Grade Su	2 µl	148 µl	-	-
Toplam Hacim	10 µl			

Tablo 3.10. RPL41 qRT-PCR programı

Süreç Adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu	1	95 °C	30 saniye
Denatürasyon		95 °C	5 saniye
Amplifikasyon	40	60 °C	30 saniye
Annealing Elongasyon			

3.2.8. Jel Elektroforezi

RNA izolasyonu ile elde edilen numunelerin RNA içeriğinin nitel olarak doğrulanması ve yine qRT-PCR sonrası üretilen amplikonların her bir gen için hedeflenen uzunluklarda olup olmadıkları belirlenmesi için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı.

3.2.8.1. 10x TBE Yürütme Tamponunun Hazırlanması

10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) yürütme tamponu içeriği tablo 3.11’te verilmiştir.

- 108 g Tris tartıldı (moleküler ağırlık=121.14) ve bir behere eklendi.
- 55 g Borik asit (moleküler ağırlık=61.83) tartıldı ve behere eklendi.
- Beher içerisine 750 ml dH₂O eklendi ve kimyasallar tamamen çözdürüldü.
- 40 ml 0.5M (7.5 g) Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) eklendi (moleküler ağırlık=372.24).
- Karışım balon jojeye alındı dH₂O ile 1 lt son hacme kadar dolduruldu.
- Çalışma öncesi 10x TBE stok solüsyonunun dH₂O ile 1:10 oranında seyreltilerek 1x çalışma solüsyonu hazırlandı.

Tablo 3.11. TBE yürütme tamponu

	Miktar (10X)	Miktar (1X)	Konsantrasyon (1X)
Tris	108 g	10.8 g	89 mM
Borik asit	55 g	5.5 g	89 mM
0,5M EDTA	40 ml	4 ml	2 mM
dH ₂ O	1 lt'ye kadar	1 lt'ye kadar	-

3.2.8.2. Jelin Hazırlanması

%1’lik (w/v) agaroz jel Tablo 3.12’te belirtildiği şekilde hazırlandı.

- 1 g agaroz tartıldı ve Erlenmeyer behere aktarıldı.
- Beher içerisine 100 ml 1X TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) yürütme tamponu eklendi.
- Agaroz/tampon karışımı mikrodalga fırında 30 saniyelik aralıklarla ısıtılarak

ve dairesel hareketlerle agaroz tamamen eritilinceye kadar karıştırıldı.

- 0.5 µg/ml konsantrasyon olacak şekilde %1'lik etidyum bromür (EtBr) solüsyonundan 5 µl behere eklendi.
- Jel solüsyonunun bir süre soğuması beklendi (~65 °C).
- Jel döküm kalıbı hazırlandı, kalıp tabanı ve yan duvarları yürütme tamponu ile ıslatıldı. Kalıbın sızdırmazlığı kontrol edildi.
- Plastik tarak kuyucuk oluşturmak için kalıba yerleştirildi.
- Jel solüsyonu yavaşça kalıba döküldü ve soğumaya bırakıldı.
- Jel kuruduktan sonra tarak çıkarıldı.

Tablo 3.12. %1 Agaroz jel içeriği

	Miktar (15 X 10 X 1.5 cm jel için)
Agaroz	1 g
1X TBE	100 ml
%1 EtBr	5 µl

3.2.8.3. Örneklerin hazırlanması ve kuyucuklara yüklenmesi

Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin yüzeyini kaplayacak kadar 1x TBE yürütme tamponu tank içerisine eklendi.

RNA izolasyonu ile elde edilen numuneler (kuyucuk başına 0.6-0.9 µg RNA) ve qRT-PCR sonrası üretilen ampliconlar jele yükleme öncesinde, 6x jel yükleme boyası (%0.25 bromfenol mavisi, %0.25 ksilen siyanol, %30 gliserol) Tablo 3.13'te gösterilen hacimlerde karıştırılarak miks oluşturuldu.

RNA numunelerini görüntülemek için 1 kb DNA Ladder (1000-250 bp) jel üzerinde bir kuyucuğa eklendi. Ampliconları görüntülemek için ise Low Range DNA Ladder (750-25 bp) jel üzerinde bir kuyucuğa eklendi.

Ardından oluşturulan numune miksleri jel üzerindeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklendi.

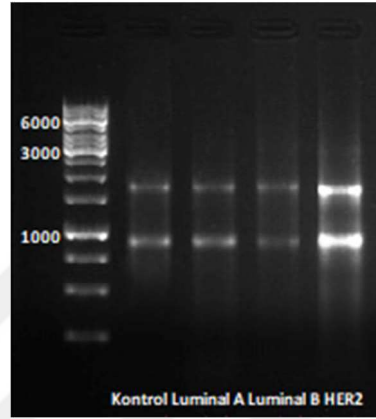
Tablo 3.13. Jele yükleme öncesi numuneleri hazırlanışı

	Numune / Ladder	6X yükleme boyası	dH₂O
RNA numunleri	5 µl	1 µl	-
Ampliconlar	5 µl	1 µl	-
1 kb DNA Ladder (RNA'lar için)	1 µl	1 µl	4 µl
Low Range DNA Ladder (Ampliconlar için)	2 µl	-	4 µl

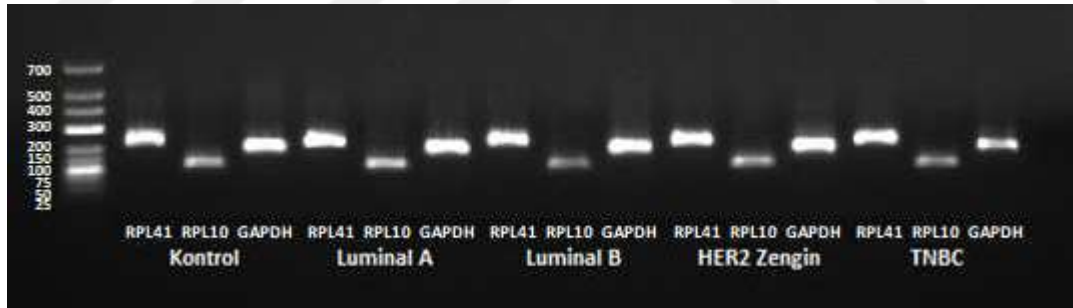
3.2.8.4. Elektroforez ve Görüntüleme

Numunelerin jele yüklenmesinden sonra güç kaynağı 90 dakika süre ile 100V'a programlandı. Elektrotlar tank üzerinden uygun yerlerine takıldıktan sonra elektroforez işlemi başladı. Elektrotlardan kabarcık çıkışı ile elektroforez doğrulandı.

Süre sonunda jel, görüntüleme cihazında UV spektrumda görüntülendi. RNA numuneleri ve qRT-PCR ürünü ampliconların jel görüntüsü Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.4. qRT-PCR sonucu elden edilen ampliconların jel elektroforez görüntüsü; Amplicon uzunlukları: GAPDH için 181bp; RPL10 için 100; RPL41 için 219 bp

3.2.9. Relatif Kantitasyon

Relatif kantitasyon veya komperatif kantitasyon yöntemi, mRNA ekspresyon seviyelerindeki nispi değişikliği belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu değişiklik, n-katı şeklinde ifade edilmektedir. Bu yöntem çoklu numunelerde bir genin kararlı durum mRNA seviyelerindeki değişikliklerini belirleyerek ve bunu başka bir RNA'nın seviyelerindeki değişime göre ifade etmektedir (Pfaffl, 2006). Relatif kantitasyon, bir kalibrasyon eğrisi veya bilinen konsantrasyonlara sahip standartlar gerektirmez ve

referans gen dizisi bilindiği sürece herhangi bir transkriptin analizi mümkündür (Bustin, 2002). Referans genler veya ‘housekeeping gen’ler organizmada sıklıkla sabit ve sürekli olarak eksprese edilen ve analizi hedeflenen genlerle ilgisiz genler olmalıdır (Wittwer, et al., 2001; Livak and Schmittgen, 2001; Morse, et al., 2005). Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

Relatif ekspresyon düzeylerini belirlemek için, “Threshold Cycle” (Ct) arasındaki farklar (Δ) ölçülmektedir. Bu yöntemler Δ Ct yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Morse, et al., 2005; Livak and Schmittgen, 2001). $\Delta\Delta$ Ct metodunda hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oranlanarak normalize edilmektedir. Daha sonra normalize Ct değerleri kontrol grubuna oranlanarak sonuçlar kontrolün n-katı şeklinde verilmektedir. Komparatif Ct metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{deney grubu; hedef gen}) - \Delta Ct (\text{kontrol grubu; hedef gen})$$

$$\Delta Ct (\text{deney grubu; hedef gen}) = Ct (\text{deney grubu; hedef gen}) - Ct (\text{deney grubu; referans gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrol grubu; hedef gen}) = Ct (\text{kontrol grubu; hedef gen}) - Ct (\text{kontrol grubu; referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve %100’e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında Δ Ct değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı Δ Ct grafiğinde eğim değerinin sıfıra yakın (<0.1) olmasıdır (Wong and Medrano, 2005).

3.2.10. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (v21.0 Illionis, US) programıyla yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD), ortanca (min-maks) olarak frekans (%) olarak sunuldu. Nicel sonuçların normal dağılım varsayımını analiz etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Korelasyon analizi için qRT-PCR ile elde edilen kat değişim sonuçlarına logartimik dönüşüm ($\log_2$) uygulandı. Değişkenler arasındaki ilişki, normal dağılıma uymayan veriler için Spearman rank korelasyon analizi ile değerlendirildi. Frekanslar Pearson Ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Çalışma verilerinin tanısal değerini belirlemek için ROC eğrisi kullanıldı. ROC eğrisinin (AUC) altındaki alan, tanı testinin ayırt edici gücünün ölçüsü olarak değerlendirildi. AUC için güven aralıkları hesaplandı. Bu çalışmada duyarlılık ve özgüllük değerleri belirlendi ve P değeri 0.05’ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

qRT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı. REST, deney grubunun birden fazla gen ekspresyonu verisini kontrol grubuna göre ikili karşılaştırmasını, gruplar arasındaki relatif ekspresyon değerlerini hesaplayarak yapmaktadır. Kullanılan matematiksel model, bir referans genin ortalama Ct sapması ile normalize edilen, hedef genlerin numune ve kontrol grubu arasındaki ortalama Ct sapmasına dayanmaktadır. REST programı Ct değerlerinin bir “Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test” modeli ile analiz ederek istatistiksel data çıktısı vermektedir (Pfaffl, et al., 2002). Hedef genlerin analiz sonuçları logaritma10 tabanında, kat değeri olarak logaritmik dönüşüm yapılmadan ifade edildi (log10 tabanında). Ekspresyon grafikleri ise logaritmik dönüşüm (log2) yapılarak gösterildi.

4. BULGULAR

RT-qPCR analizinde alınan ct sinyaline göre Luminal A grubunda RPL10 için n=14, RPL41 için n=13; Luminal B grubunda RPL10 için n=15, RPL41 için n=15; HER2 zengin grupta RPL10 için n=13, RPL41 için n=13, TNBC grubunda RPL10 için n=12, RPL41 için n=12; kontrol grubunda RPL10 için n=13, RPL41 için n=14 olmak üzere 58 meme kanseri, 16 sağlıklı kontrol numunesi çalışmaya dahil edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucu numuneler moleküler alt tiplere ayrıldı (Tablo 4.1.). Çalışmaya alınan bireylerin yaşları 29 ile 78 arasında değişmekte olup ortalamaları 51.41 ± 10.89 olarak bulundu (Tablo 4.2.). Modifiye Scarff-Bloom-Richardson derecelendirme sistemine göre tubul formasyonu, pleomorfizm ve mitoz sayısı değerlendirilerek tümörlerin derecelendirilmesi yapıldı. Buna göre 1. derece olguların %100'ü (n=4) Luminal A grubunda; 2. derece olguların %53.3'ü (n=8) Luminal A grubunda, %20'si (n=3) Luminal B grubunda, %26.7'si (n=4) HER2 zengin grupta; 3. derece olguların %10.3'ü (n=4) Luminal A grubunda, %35.9'u (n=14) Luminal B grubunda, %23.1'i (n=9) HER2 zengin grupta, %30.8'i (n=12) TNBC grubunda yer aldı. Histolojik tiplendirmede ise invaziv duktal karsinom olarak tespit edilen olguların %31.3'ü (n=15) Luminal A grubunda, %29.2'si (n=14) Luminal B grubunda, %20.08'i (n=10) HER2 zengin grupta, %18.8'i (n=9) TNBC grubunda yer alırken, invaziv lobüler karsinom olgularının %10'u (n=1) Luminal A grubunda, %30'u (n=3) Luminal B grubunda, %30'u (n=3) HER2 zengin grupta, %30'u (n=3) TNBC grubunda yer aldı (Tablo 4.3.). Yapılan immunohistokimyasal analize göre toplam meme kanseri numunelerinin içinde 32'si (%55.2) ER (+), 30'u (%51.7) PR (+), 17'si (%29.3) HER2 (+) olarak bulunurken, Ki67 proliferasyon indeksi ise 42 (%72.4) olguda %14'ün üzerinde, 16 (%27.6) olguda ise %14'ün altında olarak tespit edildi (Tablo 4.4.).

Tablo 4.1. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucu moleküler alt tiplerin dağılımı

	Moleküler alt sınıf					Total
	Luminal A	Luminal B	HER2 zengin	TNBC	Kontrol	
n, (%)	16 (21.6)	17 (23.0)	13 (17.6)	12 (16.2)	16 (21.6)	74 (100)

Tablo 4.2. Çalışmaya katılan bireylerin yaşlarının gruplara göre dağılımı

	Kontrol (n=16)	Luminal A (n=16)	Luminal B (n=17)	HER2 zengin (n=13)	TNBC (n=12)	Total (n=74)
Yaş (Ort.±Std. Sap.)	43.94 ± 8.82	54.94 ± 12.23	55.06 ± 10.62	54.23 ± 8.05	48.42 ± 10.19	51.41± 10.89

Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan kanser numunlerinin histolojik değerlendirmeleri

		Luminal A	Luminal B	HER2 zengin	TNBC	Total (n=58)
Histolojik derecelendirme* [n, (%)]	1. Derece	4 (100)	-	-	-	4 (100)
	2. Derece	8 (53.3)	3 (20)	4 (26.7)	-	15 (100)
	3. Derece	4 (10.3)	14 (35.9)	9 (23.1)	12 (30.8)	39 (100)
Histolojik tip [n, (%)]	İnvaziv duktal karsinom	15 (31.3)	14 (29.2)	10 (20.08)	9 (18.8)	48 (100)
	İnvaziv lobüler karsinom	1 (10)	3 (30)	3 (30)	3 (30)	10 (100)

*Modifiye Scarff Bloom Richardson derecelendirme sistemi

Tablo 4.4. Çalışmada kullanılan kanser numunlerinin immunohistokimya profili

	ER [n, (%)]		PR [n, (%)]		HER2 [n, (%)]		Ki67 [n, (%)]	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Yüksek	Düşük
Meme Tümörü (Total)	32 (55.2)	26 (44.8)	30 (51.7)	28 (48.3)	17 (29.3)	41 (70.7)	42 (72.4)	16 (27.6)
Luminal A	16 (100)	-	16 (100)	-	-	16 (100)	-	16 (100)
Luminal B	16 (94.1)	1 (5.9)	14 (82.4)	3 (17.6)	4 (23.5)	13 (76.5)	17 (100)	-
HER2 zengin	-	13 (100)	-	13 (100)	13 (100)	-	13 (100)	-
TNBC	-	12 (100)	-	12 (100)	-	12 (100)	12 (100)	-

Çalışma gruplarının RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon analizi qRT-PCR yöntemi ile yapıldı. Elde edilen Ct değerleri Tablo 4.5.'te verilmiştir. Relatif gen ekspresyon analizi, GAPDH geni referans gen ve kontrol grupları da kalibratör olarak kabul edilerek, QIAGEN 2009 REST programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar kat (fold) cinsinden ifade edildi.

Çalışma popülasyonunu moleküler alt sınıflara ayırmadan, total meme kanseri grubu sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığında RPL41 gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (p=0.022) 0.37 kat aşağı yönlü düzenlendiği

görüldü. RPL10 gen ekspresyonunun ise bir azalma eğiliminde olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.824$) görülmüştür (Tablo 4.6 ve Şekil 4.1.).

Tablo 4.5. qRT-PCR analizi ile elde edilen Ct değerleri

Numune	GAPDH (Ct)	RPL10 (Ct)	Numune	GAPDH (Ct)	RPL41 (Ct)
K1	28.03	27.57	K1	28.03	30.05
K3	27.65	28.14	K2	23.91	20.61
K4	27.18	25.58	K3	27.65	26.28
K5	27.45	25.51	K4	27.18	23.53
K6	26.26	22.85	K5	27.45	26.02
K7	27.02	29.60	K6	26.26	21.44
K8	27.30	32.37	K7	27.02	28.23
K9	27.31	26.78	K9	27.31	23.14
K10	27.42	26.79	K10	27.42	23.99
K11	24.23	24.22	K11	24.23	22.51
K12	26.99	29.25	K13	24.03	21.85
K13	24.03	27.67	K14	28.50	31.00
K16	27.06	27.83	K15	27.57	26.38
			K16	27.06	29.86
LA1	28.62	26.20	LA1	28.62	30.39
LA2	29.09	33.52	LA3	28.62	31.34
LA3	28.62	33.13	LA4	28.68	32.40
LA4	28.68	31.85	LA6	28.11	29.14
LA5	28.65	32.72	LA7	24.65	23.23
LA6	28.11	28.41	LA9	23.38	20.78
LA7	24.65	24.52	LA10	31.61	28.53
LA8	28.00	33.16	LA11	25.09	24.85
LA9	23.38	21.34	LA12	28.03	24.85
LA11	25.09	24.17	LA13	28.91	26.69
LA12	28.03	28.12	LA14	20.86	23.23
LA13	28.91	28.54	LA15	28.97	30.06
LA14	20.86	26.07	LA16	23.69	24.42
LA16	23.69	27.90			
LB1	24.01	22.40	LB1	24.01	23.35
LB2	28.11	28.52	LB2	28.11	28.03
LB3	27.17	25.89	LB3	27.17	24.71
LB4	28.17	33.41	LB5	26.01	26.06
LB5	26.01	25.00	LB7	27.37	28.66
LB6	28.27	31.06	LB8	23.03	23.15
LB7	27.37	29.86	LB9	21.39	20.34
LB8	23.03	23.44	LB10	27.81	30.43
LB9	21.39	23.36	LB11	23.97	23.18
LB11	23.97	21.29	LB12	26.28	26.00

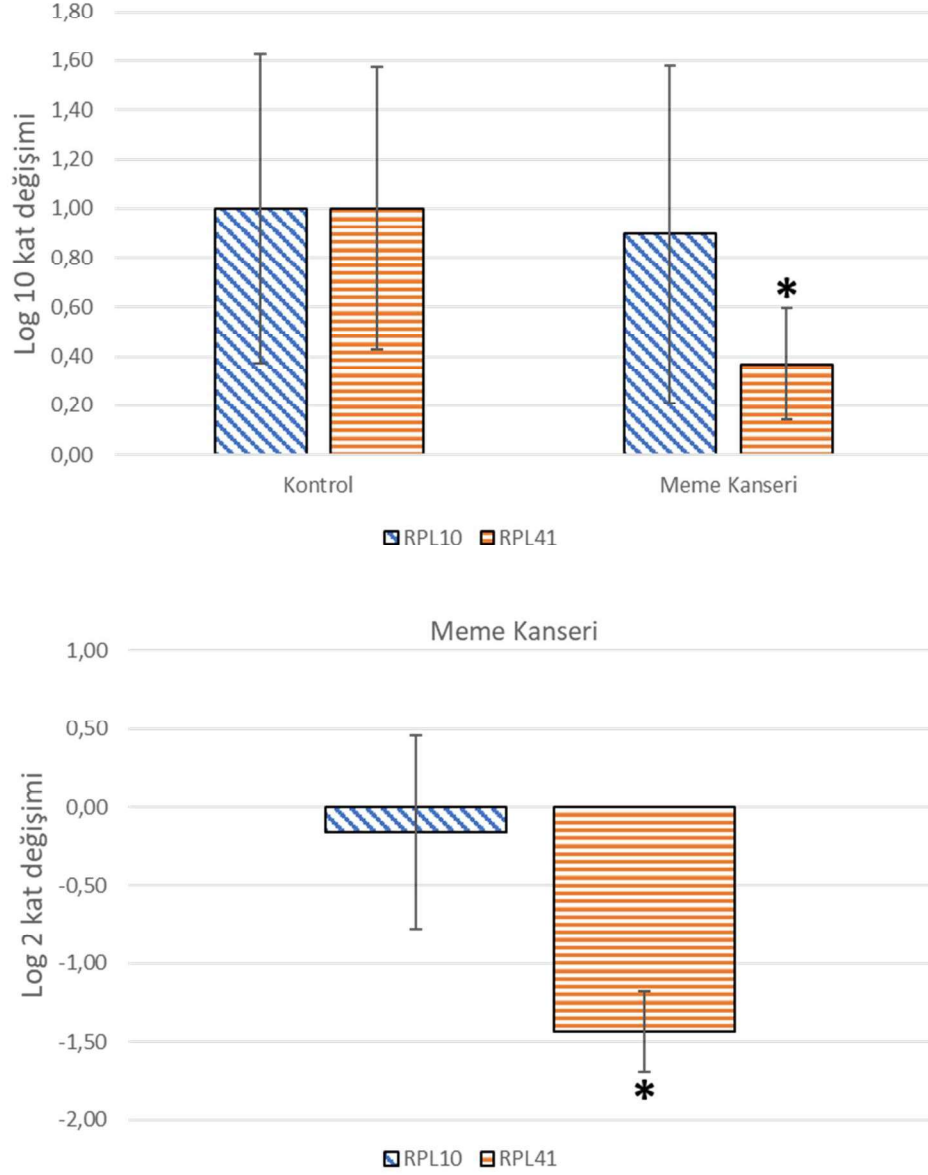
Tablo 4.5. qRT-PCR analizi elden edilen Ct değerleri (devam)

Numune	GAPDH (Ct)	RPL10 (Ct)	Numune	GAPDH (Ct)	RPL41 (Ct)
LB12	26.28	25.96	LB13	20.16	21.74
LB14	25.08	27.20	LB14	25.08	23.74
LB15	28.08	32.68	LB15	28.08	24.67
LB16	24.75	23.25	LB16	24.75	22.55
LB17	23.14	21.65	LB17	23.14	19.99
H1	27.15	28.75	H1	27.15	30.94
H2	27.51	24.80	H2	27.51	27.07
H3	24.03	23.44	H3	24.03	22.98
H4	28.49	26.70	H4	28.49	28.97
H5	26.42	26.43	H5	26.42	26.42
H6	23.42	21.88	H6	23.42	21.31
H7	28.22	28.07	H7	28.22	31.93
H8	27.15	29.81	H8	27.15	29.61
H9	27.84	33.20	H	27.84	31.24
H10	25.80	26.59	H10	25.80	25.65
H11	23.92	23.13	H11	23.92	23.52
H12	24.48	24.43	H12	24.48	24.51
H13	26.64	29.30	H13	26.64	25.32
T1	26.44	25.20	T1	26.44	26.49
T2	26.85	25.45	T2	26.85	25.98
T3	24.73	23.97	T3	24.73	24.17
T4	20.43	19.93	T4	20.43	19.90
T5	23.23	22.68	T5	23.23	22.91
T	20.43	21.55	T6	20.43	21.06
T7	24.00	23.43	T7	24.00	23.07
T8	26.99	28.33	T8	26.99	28.13
T9	29.83	29.04	T9	29.83	31.95
T10	28.74	27.68	T10	28.74	29.76
T11	21.44	20.38	T11	21.44	21.69
T12	28.46	27.55	T12	28.46	32.20

Tablo 4.6. Total meme kanseri ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (REST analiz sonucu)

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% CI	p	Sonuç
GAPDH	1.0	1.000				
RPL10	1.0	0.895	0.090 - 9.034	0.011 - 65.059	0.824	
RPL41	1.0	0.37	0.042 - 3.972	0.007 - 28.117	0.022	DOWN

CI: Confidence interval/Güven aralığı



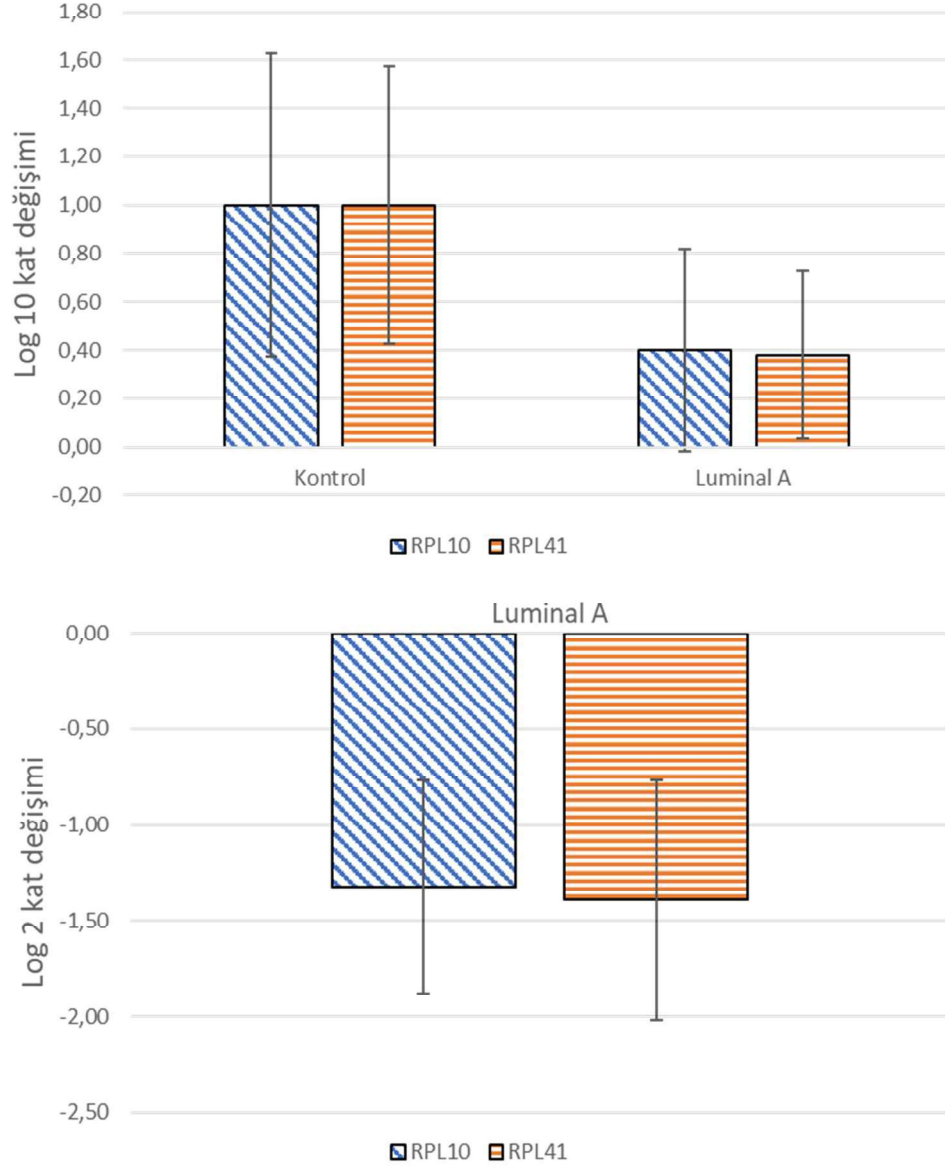
Şekil 4.1. Total meme kanseri ve kontrol grubu gen ekspresyonları; *: $p < 0.05$

Luminal A grubu RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon analizi sonuçları Tablo 4.7. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Yapılan analize göre hem RPL10 hem de RPL41 gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.201$, $p=0.161$) görülmüştür.

Tablo 4.7. Luminal A ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (REST analiz sonucu)

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% CI	p	Sonuç
GAPDH	1.0	1.000				
RPL10	1.0	0.399	0.030 – 5.258	0.005 – 47.143	0.201	
RPL41	1.0	0.381	0.032 – 3.374	0.007 – 39.355	0.161	

CI: Confidence interval/Güven aralığı



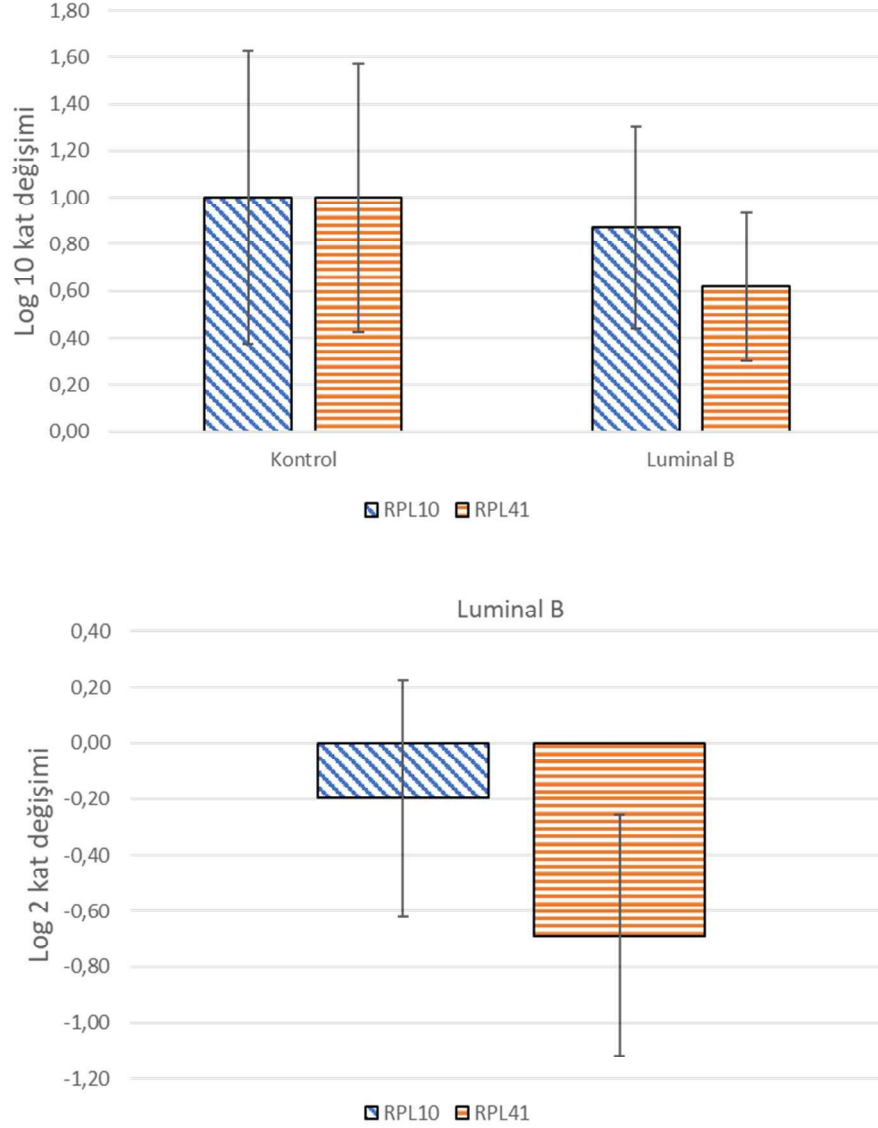
Şekil 4.2. Luminal A ve kontrol grubu gen ekspresyonları

Luminal B grubu RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon analizi sonuçları Tablo 4.8. ve Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Yapılan analizde hem RPL10 hem de RPL41 gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir azalma eğiliminin olduğu fakat bu olgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.82$, $p=0.381$) görülmüştür.

Tablo 4.8. Luminal B ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (REST analiz sonucu)

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% CI	p	Sonuç
GAPDH	1.0	1.000				
RPL10	1.0	0.873	0.083 – 9.059	0.013 – 80.145	0.82	
RPL41	1.0	0.621	0.079 – 5.951	0.015 – 37.798	0.381	

CI: Confidence interval/Güven aralığı



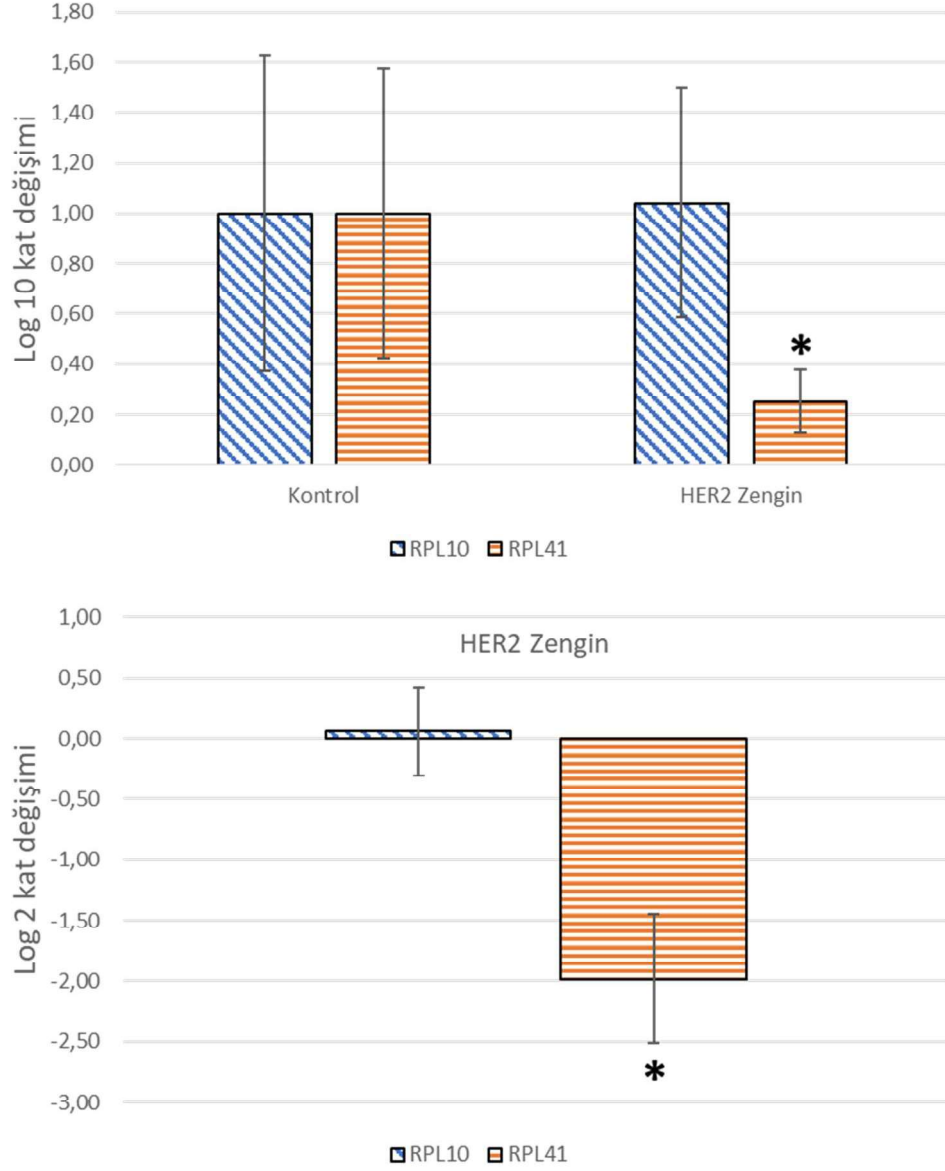
Şekil 4.3. Luminal B ve kontrol grubu gen ekspresyonları

HER2 zengin grubu RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon analizi sonuçları Tablo 4.9. ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda RPL41 gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p=0.027$) 0.253 kat aşağı yönlü düzenlendiği görüldü. RPL10 gen ekspresyonunun ise kontrol grubuna kıyasla değişmediği ($p=0.953$) görüldü.

Tablo 4.9. HER2 zengin ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (REST analiz sonucu)

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% CI	p	Sonuç
GAPDH	1.0	1.000				
RPL10	1.0	1.042	0.115 - 9.055	0.015 - 56.578	0.953	
RPL41	1.0	0.253	0.029 - 3.323	0.005 - 14.264	0.027	DOWN

CI: Confidence interval/Güven aralığı



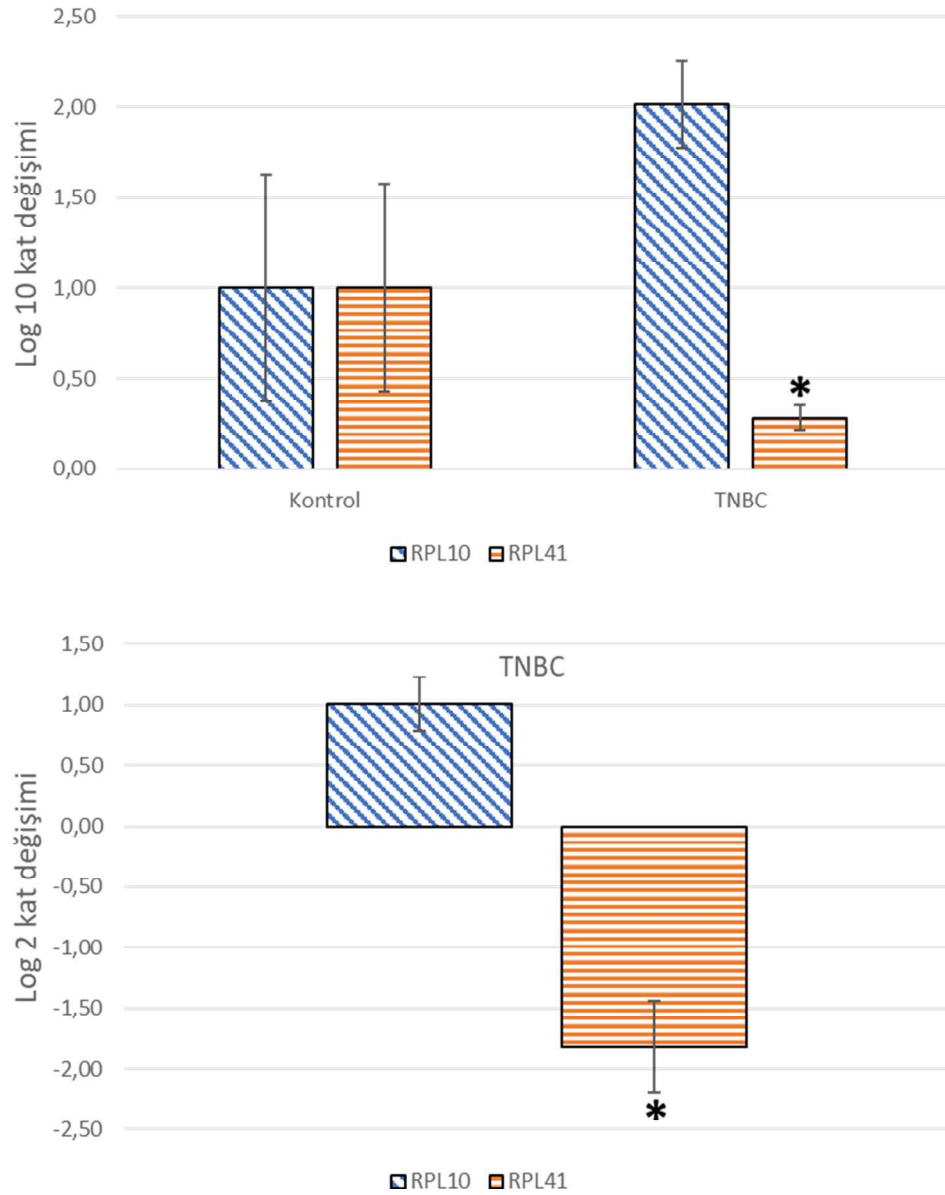
Şekil 4.4. HER2 zengin ve kontrol grubu gen ekspresyonları; *: $p < 0.05$

TNBC grubu RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon analizi sonuçları Tablo 4.10. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda RPL10 gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir artış eğiliminin olduğu fakat bu olgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.176$) görüldü. RPL41 gen ekspresyonunun ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p=0.035$) 0.284 kat aşağı yönlü düzenlendiği görüldü. Tüm çalışma gruplarının gen ekspresyon grafiği Şekil 4.6.'da verilmiştir.

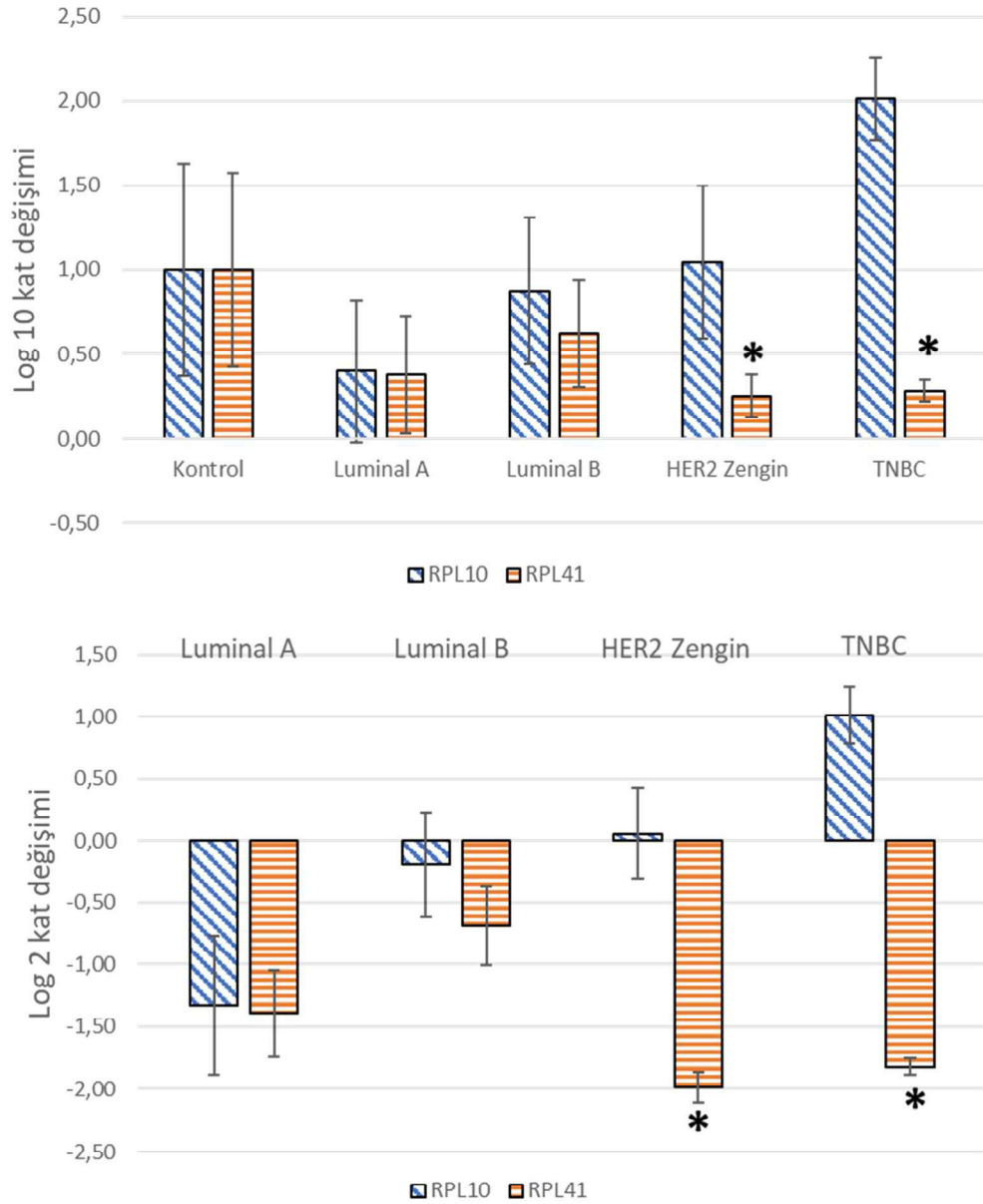
Tablo 4.10. TNBC grubu ve kontrol grubu gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (REST analiz sonucu)

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% CI	P	Sonuç
GAPDH	1.0	1.000				
RPL10	1.0	2.015	0.390 - 12.528	0.129 - 63.983	0.176	
RPL41	1.0	0.284	0.045 - 3.372	0.008 - 10.230	0.035	DOWN

CI: Confidence interval/Güven aralığı



Şekil 4.5. TNBC grubu ve kontrol grubu gen ekspresyonları; *: $p < 0.05$



Şekil 4.6. Tüm çalışma gruplarının gen ekspresyon grafiği: *: $p < 0.05$

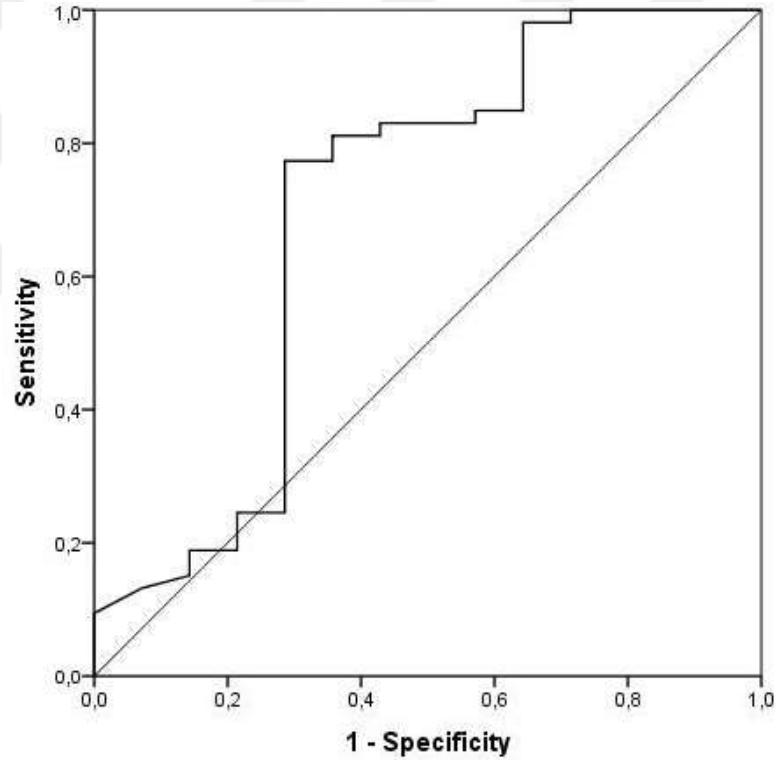
RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonlarının meme kanseri gruplarındaki immunohistokimya parametreleri ile arasındaki korelasyon incelendiğinde RPL10 gen ekspresyonu ve progesteron reseptör boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$; $r = -0.284$) zayıf düzeyde negatif korelasyon; RPL10 gen ekspresyonu ve Ki67 indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$; $r = 0.276$) zayıf düzeyde pozitif korelasyon; RPL10 ve RPL41 parametreleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$; $r = 0.331$) zayıf düzeyde pozitif korelasyon bulunurken bu parametrelerin diğer immunohistokimya parametreleriyle istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir ilişkisi bulunamamıştır (Tablo 4.11.).

Tablo 4.11. RPL10 ve RPL41 gen ekspresyonlarının immunohistokimya parametreleriyle korelasyonu

		ER	PR	HER2	Ki67 indeks	RPL10	RPL41
RPL10	r	-0.174	-0.284*	0.032	0.276*	-	0.331*
	p	0.208	0.038	0.819	0.043	-	0.020
RPL41	r	0.228	0.126	-0.204	-0.163	0.331*	-
	p	0.101	0.368	0.143	0.243	0.020	-

*p<0.05

Yaptığımız ROC analizine göre meme kanseri grubunda RPL41 gen ekspresyon düzeyinin 0.86 katın altında ($p=0.02$) olması bu parametrenin meme kanserinin teşhisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Cutoff değeri 0.86 alındığında sensitivite %77, spesifite %71 AUC ise 0.697 olarak bulunmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. RPL41 gen ekspresyon düzeyleri için ROC analizi

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda RPL41 gen ekspresyonu, HER2 zengin ve TNBC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Ayrıca çalışma grupları alt sınıflara ayrılmadan total meme kanseri ve sağlıklı kontrol olarak iki gruba ayrıldığında yine RPL41 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde, RPL41 knockout fibroblast hücre hatlarında malign transformasyon şekillendiği gösterilmiştir. Ayrıca primer meme kanserlerinin %75'inde RPL41'in aşağı regüle edildiği, ek olarak FISH analizleri ile tümör hücre hatlarının %59'unda RPL41 delesyonunun varlığı tespit edilmiştir (Wang, et al., 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise RPL41 protein seviyelerinin retinoblastom numunelerinde önemli ölçüde azalma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Geng, et al., 2021). İnsan nazofarengeal karsinom ve sağlıklı nazofarengeal epitellerinden türetilen primer hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, RPL41 gen ekspresyonun sağlıklı hücre hatlarına göre karsinom hücre hatlarında anlamlı derecede aşağı yönlü ifade edildiği görülmüştür (Sim, et al., 2009). Verilen sonuçlar incelendiğinde, çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla paralellik gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte literatürde yapılan bazı çalışmalarda ise elde ettiğimiz verilerle çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir; Yapılan bir çalışmada yedi intrahepatik kolanjiokarsinom tümör ve tümör çevresi sağlıklı doku örnek çiftlerinde RNA-Seq verileri analiz edilmiş ve RPL41 geninin tümör dokularında yukarı yönlü regüle edildiği gösterilmiştir (Yang and Zong, 2016). Başka bir çalışma grubu tarafından çeşitli veri tabanlarında epitelyal over kanseri ve normal over örneklerine ait RNA sekans verileri Diferansiyel Gen Ekspresyon analizi ile incelendiğinde RPL41 ve ATF4 gen ekspresyonlarının yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Siavoshi, et al., 2022). Burada ATF4'ün artan ekspresyonuna karşılık cevap olarak RPL41 ekspresyonun artması olasıdır. Bu olgunun detayları aşağıda tartışılmaktadır.

Primer meme kanseri ve normal doku çiftlerinin araştırıldığı bir çalışmada RPL41 ekspresyonun, kanserin derecesi, ER veya PR ekspresyonu ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (Gur-Dedeoglu, et al., 2009). Benzer şekilde elde ettiğimiz verilere göre de RPL41 gen ekspresyonun kanserin derecesi, ER, PR, HER2 ve Ki67 parametreleri ile herhangi bir ilişkisi bulunmamaktadır.

Literatürde kanser olgularında RPL41 gen ekspresyonun gerek azalmasının gerekse artışının neden kaynaklandığına dair bir veri bulunmamaktadır. Bununla

birlikte RPL41 gen ekspresyonunun azalmasının yol açtığı birtakım moleküler değişikliklerle ilgili çeşitli veriler bulunmaktadır. Bu verileri incelediğimizde RPL41 gen ekspresyonunun çalışmamızda moleküler alt gruplar özelinde azalmasını indirekt olarak destekleyen bazı moleküler ilişkiler literatürde göze çarpmaktadır; HER2 zengin grup immunohistokimyasal olarak östrojen reseptör, progesteron reseptör negatif ve belirgin HER2 ekspresyonu gösteren bir meme kanseri alt grubudur. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %10-15'ini oluşturmaktadır. Yüksek proliferasyon indeksine sahip kötü diferansiye kanserlerdir ve 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %12'dir (Cheang, et al., 2015). Trastuzumab, HER2 zengin meme kanseri için oldukça etkili bir tedavi yöntemidir (Perez, et al., 2014; Piccart-Gebhart, et al., 2005; Romond, et al., 2012; Goldhirsch, et al., 2013). Ancak HER2 zengin meme kanserli hastaların %70'i Trastuzumab'a intrensek veya sekonder direnç göstermektedir (Baselga and Swain, 2009). Yapılan bir çalışmada 80 erken dönem HER2 zengin meme kanserinde tek doz Trastuzumab uygulamasından sonra HER2 ekspresyonu aşağı yönlü regüle edilen ve edilemeyen her iki grupta da yapısal olarak değişmiş RPL41 alternatif splicing ürünleri tespit edilmiştir (Galanina, et al., 2012).

HER2 zengin meme kanseri örneklerinde ATF4 ekspresyonunun yukarı yönlü regüle edildiği bulunmuştur (Zeng, et al., 2019). Ayrıca bazı çalışmalar ATF4'ün trastuzumab direncinin potansiyel biyobelirteçlerinden biri olabileceğini belirtmektedir (Darini, et al., 2019; Nam, et al., 2015). ATF/CREB (aktive edici transkripsiyon faktörü/siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) ailesinin bir üyesi olan ATF4, temel bölge-lösin fermuar (bZip) transkripsiyon faktörlerine aittir. ATF4'ün homodimer oluşturma yeteneğine rağmen bu homodimerlerin kararsız olması nedeniyle ATF4'ün diğer ATF'ler, FOS/JUN ve sitozin-sitozin-adenozin-adenozin-timidin (CCAAT) enhancer binding protein (C/EBP) gibi diğer bZIP transkripsiyon faktörü alt aileleri üyeleriyle fonksiyonel olarak aktif heterodimerler oluşturduğu düşünülmektedir (Huggins, et al., 2015; Hai and Curran, 1991; Vallejo, et al., 1993; Chevray and Nathans, 1992). ATF4, hedef gen ekspresyonunu kontrol etmek için siklik adenoazin monofosfata (cAMP) yanıt veren öğeler (CRE) veya C/EBP-ATF yanıt öğeleri (CARE) olarak adlandırılan DNA dizilerine bağlanmaktadır (Hai and Curran, 1991; Vallejo, et al., 1993). ATF aile üyeleri tümör oluşumu ve ilerlemesinde kritik roller oynar (Lau, et al., 2015; Yin, et al., 2008; Yin, et al., 2010). Bunun haricinde ATF4'ün adipogenez, lipogenez, osteogenez ve yağ asidi ve amino asit metabolizmasında da önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir (Chen, et al., 2016;

Ameri and Harris, 2008). ATF4 endoplazmik retikulum strese (ER) ve oksidatif strese hücrel yanıtta yer alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. ER stres, üç paralel sinyal yolu aracılığıyla katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetikler: PERK/eIF2 α (protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz/ökaryotik başlangıç faktörü 2 α), IRE1 α /XBP1 (İnositol gerektiren enzim 1 α /X-kutu bağlayıcı protein 1) ve ATF6 α (aktif edici transkripsiyon faktörü 6 α) (Wang and Kaufman, 2014). Bu UPR sinyal yolları arasında yalnızca PERK/eIF2 α sinyali ATF4 ekspresyonunu yukarı doğru düzenlemektedir. ER stres üzerine, PERK homodimerizasyon ve otofosforilasyon yoluyla aktive edilmekte ve aktive olan kinaz eIF2 kompleksinin α -alt birimini fosforile ederek, translasyonu başlatan metiyonil-tRNA'nın (Met-tRNA^{Met}) ribozomlara taşınmasını inhibe etmektedir (Dever, et al., 1992; Berry, et al., 1985; Chen and London, 1995; Shi, et al., 1998; Harding, et al., 1999). Stres koşulları altında hücrelerde genel mRNA translasyonu azalmaktadır, fakat aynı zamanda spesifik olarak ATF4 ana açık okuma çerçevelerinin (ORF) translasyonunu da uyarılmaktadır (Dever, et al., 1992; Harding, et al., 2000; Harding, et al., 2003; Hetz and Papa, 2018). Stres altında olmayan hücrelerde eIF2, ATF4 translasyonunun başlatılmasında yer almakta ancak bu koşullarda ATF4 mRNA'sı üzerinde bulunan çoklu upstream ORF (uORF) bölgeleri üzerinden translasyon belirli bir seviyede baskılanmaktadır. Stres koşulları altında ise global mRNA translasyonu baskılanırken kanonik olmayan bir başlatma faktörü olan ökaryotik başlangıç faktörü 2D (eIF2D) tarafından ATF4 translasyonu hızlandırılmaktadır (Vasudevan, et al. 2020). ATF4, hedef genlerinin ekspresyonu ER stres altında hücrenin yaşam veya ölüm sürecine girmesi üzerinde belirleyicidir. ATF4, amino asit taşıyıcılarının, metabolik enzimlerin, redoks homeostazında yer alan enzimlerin ve ER şaperonlarının ekspresyonunu indükleyerek, stresin giderilmesine ve hayatta kalmaya katkıda bulunmaktadır (Harding, et al., 2003; Novoa, et al., 2003). Bununla birlikte, ATF4 tarafından aktive edilen transkripsiyonel süreç anti-apoptotik BCL2 proteinini aşağı regüle eder ve Bcl-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracısı (BIM), Forbol-12-Miristat-13-Asetat-İndükte Protein 1 (PMAIP1) ve Bcl-2-bağlayıcı komponent 3 (BBC3) proteinleri aracılığıyla pro-apoptotik sinyali yukarı regüle etmektedir (Hetz, 2012; Szegezdi, et al., 2006). ATF4'ün ekspresyonu kanserlerde yukarı doğru düzenlenmekte ve proliferasyonu, hücre sağ kalımını, ilaç direncini, migrasyonu ve metastazı desteklediği gösterilmiştir (Singleton and Harris, 2012). ATF4'ün hedef genleri tablo 5.1.'de verilmiştir.

Tablo 5.1. ATF4'ün hedef genleri (Chen, et al., 2021; Chen and Zhang, 2022)

Gen	Düzenlenme Yönü
HSPA5 (Isı Şok Protein A Ailesi Üye 5)	İndüksiyon/baskılama
EIF4EBP1 (Ökaryotik translasyon başlatma faktör 4E-bağlayıcı protein 1)	İndüksiyon
CBL-C (Casitas B-lineage Lymphoma)	İndüksiyon
p21 (protein 21)	İndüksiyon
DUSP1 (Dual Spesifite Fosfataz 1)	Baskılama
GRB10 (Büyüme Faktörü Reseptör-Bağlayıcı Protein 10)	İndüksiyon
ATF5 (Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 5)	İndüksiyon
ASNS (Asparajin Sentetaz)	İndüksiyon
DDIT3 (DNA Hasar İndükleyici Transkript 3)	İndüksiyon
CHAC1 (Glutasyon-Spesifik Gama-Glutamilsiklotransferaz 1)	İndüksiyon
VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	İndüksiyon
SLC1A4 (Solüt Taşıyıcı Aile 1 Üye 4)	İndüksiyon
TRIB3 (Tribbles Psödokinaz 3)	İndüksiyon
PYCR1 (Pirolin-5-Karboksilat Reduktaz 1)	İndüksiyon
SHMT2 (Serin Hidroksimetil Transferaz 2)	İndüksiyon

ATF4'ün meme kanseri hücre migrasyonunu kolaylaştırmada, lizozom ilişkili zar glikoproteini 3 (LAMP3) ekspresyonunu uyardığı ve anoikisi inhibe etmek ve de tümör metastazını teşvik etmek için hem oksijenaz 1 (HO-1) gen ekspresyonunu doğrudan transaktive ettiği gösterilmiştir (Nagelkerke, et al., 2013; Dey, et al., 2015).

TNBC, meme kanserlerinin %15-20 sini oluşturmaktadır. ER, PR ve HER2 gen kümelerinin düşük ekspresyonu veya negatifliği ile karakterizedir. Ortaya çıkışı itibariyle genelde genç yaşta görülmektedirler. Histolojik olarak yüksek dereceli, genel karakteristiği ise en agresif olan alt tiptir (Bosch, et al., 2010). Kemoterapiye iyi cevap vermekle beraber sağ kalım oranları yine de düşüktür. Akciğerlere, santral sinir sistemine ve diğer viseral organlara metastazları sıkça görülmekte, güçlü bir invaziv ve metastatik karakter sergilemektedirler (Pizot, et al., 2016).

ATF4, HER2 zengin meme kanserinde olduğu gibi TNBC moleküler alt grubunda yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (Singleton and Harris, 2012; van Geldermalsen, et al., 2016). Ayrıca bir çalışmada ATF4 aşırı ekspresyonun, TNBC moleküler alt gruplarında hasta sağkalımındaki azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. TNBC hücre hatlarında ise ATF4 gen ekspresyonunun inhibisyonu migrasyonun, invazyonun, mamosfer-oluşumunun, proliferasyonun ve epitelyal-mezenkimal transizyonun azalmasına neden olurken antiapoptotik ve indifferensiyasyon belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin düşmesine yol açmıştır. Benzer şekilde

ksenograft deney hayvanı modelinde ATF4 gen susturmanın, kemoterapi sonrası metastazları, tümör büyümesini ve nüksü azalttığı bildirilmiştir (González-González, et al., 2018).

ATF4 ve RPL41 arasındaki yakın ilişkiyi gösteren birçok çalışma vardır. Bir çalışmada immünofloresan yöntemi ile RPL41'in, ATF4'ün nükleustan bir proteazom belirteci ile birlikte sitoplazmaya relokasyonunu indüklediği, böylece RPL41'in hızlı ATF4 yıkımına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada RPL41 yıkımına sahip hücrelerde, ATF4 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca RPL41'in, tümör hücresi ölümünü ve hücre siklusunun durmasını uyardığı, düşük dozda rekombinant RPL41 uygulamasının, bir akciğer kanseri hücre hattında, tümör hücrelerini DNA hasar ajanı cisplatine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Wang, et al., 2011). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında RPL41'in hücresel ATF4 seviyelerinin düzenlenmesinde fizyolojik bir rol oynayabileceğini ve kimyasal olarak sentezlenebilen RPL41'in kanser tedavisi için bir anti-ATF4 ajanı olma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada ise SRA (Sequence Read Archive) ile elde edilen epitelyal over kanseri ve normal over örneklerinin RNA-seq ham verileri çeşitli veri tabanlarında incelenmiş ve Diferansiyel Gen Ekspresyon analizi ile, RPL41 ve ATF4 gen ekspresyonlarının yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Siavoshi, et al., 2022). Bu durum ATF4'ün artan ekspresyonuna karşılık RPL41'in bir cevap olabileceğini düşündürmektedir.

Retinopati deney hayvanı modelinde rekombinant RPL41 uygulamasının retinal neovaskülarizasyon (RNV) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, deney grubunda ER stres sinyalinin aktive olduğu ve ATF4'ün retinopatili dokularda aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Deney grubunda rekombinant RPL41'in intravitreal enjeksiyonundan sonra, RNV'nin boyutunun ve vazo-obliterasyonun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Western blot ve qRT-PCR analizi ile de RPL41'in intravitreal enjeksiyonundan sonra ATF4 ve VEGF ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca tümör nekroz faktör α (TNF- α), interlökin 1p (IL-1p) ve interlökin 6 (IL-6) dahil olmak üzere enflamatuar genlerin ekspresyon seviyeleri, enjeksiyon uygulanmayan retinopatili farelere göre önemli ölçüde azalmıştır (Geng, et al., 2018). Bu sonuçlar, RPL41'in önemli bir ER stres faktörü olan ATF4'ü parçalayarak patolojik neovaskülarizasyonu önlediğine ve anti-enflamatuar etkiler gösterdiğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Retinoblastoma hücre kültürü modelinde rekombinant RPL41 peptit uygulamasının, ATF4 yıkımına yol açarak Y79 ve Weri-Rb1 hücrelerinde apoptozu ve hücre döngüsünün durmasını teşvik etmenin yanı sıra hücrelerinin canlılığını, migrasyon ve invazyon yeteneklerini azalttığı bildirilmiştir. Retinoblastom numunlerinde ise RPL41 protein seviyelerinin önemli ölçüde azalma eğilimi gösterdiği, ATF4 protein seviyelerinin ise artma eğiliminde olduğu aynı çalışmada bildirilmiştir. Ek olarak retinoblastoma Y79 ve Weri-Rb1 hücrelerinde rekombinant RPL41 uygulamasının bir sonucu olarak ATF4 yıkımına yol açtığı, RPL41'in düşük dozda uygulanmasının karboplatinin antitümör etkisini önemli ölçüde arttırdığı ve RPL41'in dirençli retinoblastom hücrelerini tekrar karboplatine duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Geng, et al., 2021). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar RPL41'in potansiyel bir adjuvan olarak kanser tedavisinde önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda bir diğer dikkat çeken veri, RPL41 gen ekspresyonunun ER ve PR negatif profile sahip moleküler alt gruplarda (HER2 zengin ve TNBC) azalırken, ER ve/veya PR pozitif gruplarda (Luminal A ve Luminal B) herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermemesidir. Bu durum azalan RPL41 ekspresyonuna bağlı olarak artan ATF4 seviyelerinin yeniden düzenlediği global protein ekspresyonunda, steroid reseptörlerin sentezinin azaldığını düşündürmektedir. Bu düşüncemizle kısmen ilişkili olarak güncel bir çalışmada TNBC ve prostat kanserinde, bir steroid reseptör olan androjen reseptörünün hem gen hem de protein düzeyinde ekspresyonunun ER stres altında belirgin şekilde azaldığı ve bu etkinin PERK/eIF2 α /ATF4 sinyal aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kromatin immünopresipitasyon-PCR ve lusiferaz reporter gen analiz sonuçları, ATF4'ün androjen reseptör promotör bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Li, et al., 2022).

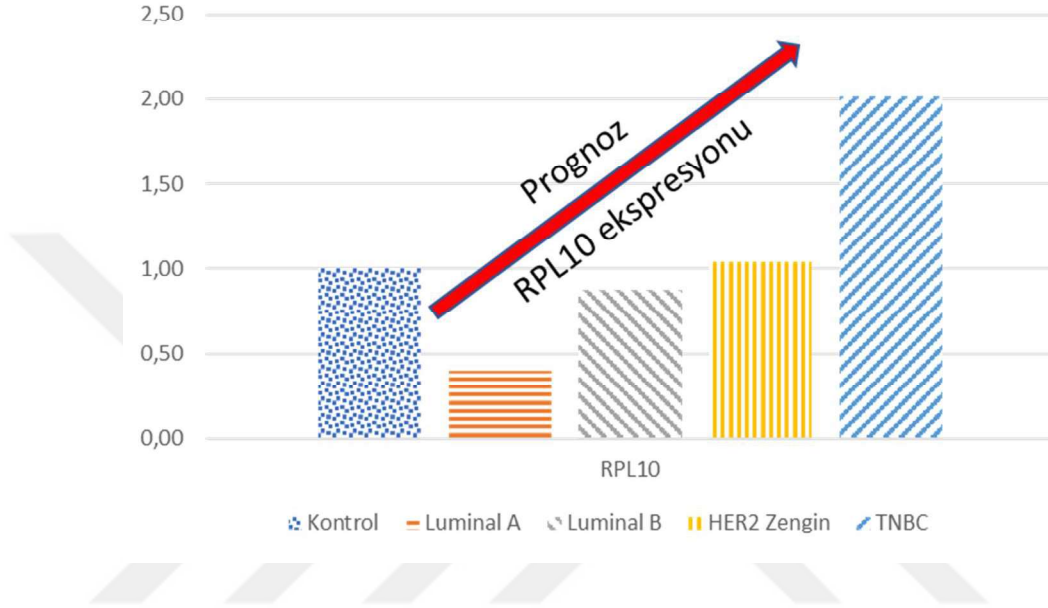
Yukarıda belirtilen çalışmalardan anlaşılabileceği üzere HER2 zengin ve TNBC moleküler alt tiplerde genel olarak bir ATF4 ekspresyon artışı görülmektedir. Bu durumun ATF4 seviyelerini düzenlediği düşünülen RPL41'in yokluğu veya aşağı regülasyonu ile ilişkili olması dahilinde bir olgudur. Çalışmamızda HER2 zengin ve TNBC gruplarında RPL41 gen ekspresyonunun azalmasını bu durum ile desteklemek mümkündür. Ayrıca ATF4'ün ilaç direncinin bir belirteci olabileceği literatürde üzerinde durulan bir konudur. Çalışma gruplarımızda HER2 zengin ve TNBC gruplarını oluşturan bireyler farklı doz, süre ve ilaç kombinasyonlarında kemoterapi tedavisi almış bireylerdir. RPL41'ekspresyonunun ilaç direnci ile ilgisi olabileceği

ATF4 ile olan ilişkisi nedeniyle teorikte mümkün olmasına rağmen çalışmamızda yer alan moleküler alt gruplarda örnek sayısının az olması ve gruplardaki hastaların üniform olmayan bir paternde kemoterapi almış olmaları nedeniyle böyle bir durumun varlığına dair çıkarım yapmak güçtür ve ancak yapılacak spesifik ileri çalışmalarla bu konunun aydınlatılması mümkündür. Bu konu üzerine spesifik daha ileri araştırmalar da planlanmaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre RPL10 gen ekspresyonu Luminal A, Luminal B grubunda azalma, HER2 zengin ve TNBC grubunda ise artış eğilimi göstermekle birlikte bahsi geçen değişimler istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. RPL10 ekspresyon seviyeleri bazı kanser türlerinde çalışma konusu olmuştur. İlk olarak, RPL10 komplementer DNA (cDNA)'sı Wilms tümöründe (Nefroblastoma) keşfedilmiş ve onkogeneze üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu düşünülmüştür (Loftus, et al., 1997; Dowdy, et al., 1991). Sonrasında RPL10'un, hücre çoğalması, migrasyon ve diferansiyasyon gibi çeşitli hücre biyolojik süreçlere ait sinyal iletim yollarında yer alabileceği gösterilmiştir (Oh, et al., 2002). Başka bir çalışmada ise T-hücre akut lenfoblastik lösemide RPL10 geninin bir mutasyonu (R98S) tanımlanmış (Girardi, et al., 2018) ve aynı çalışma grubu tarafından da bu mutasyonun Janus kinaz/Transkripsiyonun sinyal iletilicileri ve aktivatörleri (JAK/STAT) sinyal yolunun uyarılmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kampen, et al., 2019). Ayrıca RPL10, atipik teratoid/rabdoid tümörler için biyopsi ve immünohistokimya gibi standart tanı araçlarına ek olarak potansiyel bir diagnostik belirteç olarak tanımlanmıştır (Ren, et al., 2018). Pankreas kanserinde RPL10'un Kompleks I aktivitesini ve sonraki süreci etkileyerek ROS seviyesinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yang, et al., 2018). Pankreas hücre hatlarında ise bir kemoterapötik ajan olan Dimetilaminopartenolid'in (DMAPT) doğrudan RPL10'a bağlanarak Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolağını baskılandığı bildirilmiştir (Shi, et al., 2017). Bahsi geçen çalışmalarda elde edilen sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlarla çelişkilidir.

Ancak prognoz açısından baktığımızda çalışmamızda RPL10 gen ekspresyonu hasta gruplarının prognozu kötüleştikçe artış göstermiştir (Şekil 5.1.). Ayrıca RPL10 gen ekspresyonunun prognoz belirteçlerinden biri olan Ki67 proliferasyon indeksi ile istatistik olarak anlamlı zayıf korelasyon ($p < 0.05$; $r: 0.276$) gösterdiği bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalarla uyumludur. Prostat kanserinde erken evrede RPL10 seviyelerinin düşük, geç evrede ise yüksek düzeyde olduğunu bildirilmiş ve RPL10 düzeyleri ile tümör prognozunun bağlantılı olabileceğini öne

sürülmüştür (Altınok, vd., 2006). İnsan epitelyal over kanserinde ise RPL10 seviyeleri sağlıklı over dokularına göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. RPL10'un düşük ekspresyon düzeyinde apoptozu arttırdığı, hücre canlılığını, migrasyonu ve invazyonu ise azalttığı bulunmuştur. Buna karşılık aşırı eksprese edildiğinde ise apoptozu azaltırken hücre canlılığını, migrasyonu ve invazyonu arttırdığı bildirilmiştir (Shi, vd., 2018).



Şekil 5.1. Tüm çalışma gruplarında RPL10 gen ekspresyon grafiği

RPL10 genindeki bazı mutasyonların onkogeneze süreci ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. T-hücre akut lenfoblastik lösemide bir mutasyonu (R98S) keşfedilmiş bu mutasyonun (JAK/STAT) sinyal yolunun uyarılması ile ilişkili bulunmuştur (Girardi, et al., 2018; Kampen, et al., 2019). Multiple myeloma'da ise bazı RPL10 mutasyonlarının yer alabileceği gösterilmiştir (Hofman, et al., 2017). Gelecek çalışmalarda meme kanseri moleküler alt gruplarında RPL10 gen mutasyonlarının incelenmesinin meme kanserinin tanı ve tedavi sürecinde daha aydınlatıcı olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Meme kanseri Luminal A moleküler alt grubunda (n=14) RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Meme kanseri Luminal B moleküler alt grubunda (n=15) RPL10 ve RPL41 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Meme kanseri HER2 zengin moleküler alt grubunda (n=13) RPL10 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Meme kanseri HER2 zengin moleküler alt grubunda (n=13) RPL41 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir aşağı yönlü regülasyon görülmüştür.

Meme kanseri TNBC moleküler alt grubunda (n=12) RPL10 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Meme kanseri TNBC moleküler alt grubunda (n=12) RPL41 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (n=14) göre anlamlı bir aşağı yönlü regülasyon görülmüştür.

Meme kanseri (n=54) ve sağlıklı kontroller (n=14) kıyaslandığında RPL41 gen ekspresyon seviyelerinde aşağı yönlü bir regülasyon görülmüştür.

Yapılan ROC analizinde meme kanseri (n=54) ve sağlıklı kontroller (n=14) kıyaslandığında RPL41 gen ekspresyon düzeyinin 0.86 katın altında ($p=0.02$) olması bu parametrenin meme kanserinin teşhisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., & Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the Escherichia coli 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6134–6138.
- Allison, K. H. (2017). “Chapter 21 - Molecular Testing in Breast Cancer”. Coleman, W. B.-Tsongalis, G. J. (eds.). in: *Diagnostic Molecular Pathology; a guide to applied molecular testing* (s. 257-269). Amsterdam: Elsevier Science.
- Altinok, G., Powell, I. J., Che, M., Hormont, K., Sarkar, F. H., Sakr, W. A., Grignon, D., & Liao, D. J. (2006). Reduction of QM protein expression correlates with tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 9(1), 77–82.
- Artero-Castro, A., Castellvi, J., García, A., Hernández, J., Ramón y Cajal, S., & Lleonart, M. E. (2011). Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Human pathology*, 42(2), 194–203.
- Arthurs, C., Murtaza, B. N., Thomson, C., Dickens, K., Henrique, R., Patel, H., Beltran, M., Millar, M., Thrassivoulou, C., & Ahmed, A. (2017). Expression of ribosomal proteins in normal and cancerous human prostate tissue. *PloS one*, 12(10), e0186047.
- Awah, C. U., Chen, L., Bansal, M., Mahajan, A., Winter, J., Lad, M., Warnke, L., Gonzalez-Buendia, E., Park, C., Zhang, D., Feldstein, E., Yu, D., Zannikou, M., Balyasnikova, I. V., Martuscello, R., Konerman, S., Györfy, B., Burdett, K. B., Scholtens, D. M., Stupp, R., ... Sonabend, A. M. (2020). Ribosomal protein S11 influences glioma response to TOP2 poisons. *Oncogene*, 39(27penzo), 5068–5081.
- Ameri, K., & Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(1), 14–21.
- Barbato, A., Iuliano, A., Volpe, M., D'Alterio, R., Brillante, S., Massa, F., De Cegli, R., Carrella, S., Salati, M., Russo, A., Russo, G., Riccardo, S., Cacchiarelli, D., Capone, M., Madonna, G., Ascierto, P. A., Franco, B., Indrieri, A., & Carotenuto, P. (2021). Integrated Genomics Identifies miR-181/TFAM Pathway as a Critical Driver of Drug Resistance in Melanoma. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1801.
- Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., Rao, P. H., & Ruggero, D. (2008). Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature*, 456(7224), 971–975.
- Baselga, J., & Swain, S. M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews. Cancer*, 9(7), 463–475.
- Berry, M. J., Knutson, G. S., Lasky, S. R., Munemitsu, S. M., & Samuel, C. E. (1985). Mechanism of interferon action. Purification and substrate specificities of the double-stranded RNA-dependent protein kinase from untreated and interferon-treated mouse fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 260(20), 11240–11247.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J. R., & Lluch, A. (2010). Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer treatment reviews*, 36(3), 206–215.
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Molecular cell*, 40(2), 216–227.
- Bywater, M. J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., Huser, N., Proffitt, C., Bliesath, J., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Ryckman, D. M., Rice, W. G., Schmitt, C., Lowe, S. W., Johnstone, R. W., ...

- Hannan, R. D. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer cell*, 22(1), 51–65.
- Chevray, P. M., & Nathans, D. (1992). Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5789–5793.
- Challagundla, K. B., Sun, X. X., Zhang, X., DeVine, T., Zhang, Q., Sears, R. C., & Dai, M. S. (2011). Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress. *Molecular and cellular biology*, 31(19), 4007–4021.
- Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750.
- Cheang, M. C., Martin, M., Nielsen, T. O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., Ruiz, A., Chia, S., Shepherd, L., Ruiz-Borrego, M., Calvo, L., Alba, E., Carrasco, E., Caballero, R., Tu, D., Pritchard, K. I., Levine, M. N., Bramwell, V. H., Parker, J., Bernard, P. S., ... Carey, L. A. (2015). Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The oncologist*, 20(5), 474–482.
- Chen, B., Zhang, W., Gao, J., Chen, H., Jiang, L., Liu, D., Cao, Y., Zhao, S., Qiu, Z., Zeng, J., Zhang, S., & Li, W. (2014). Downregulation of ribosomal protein S6 inhibits the growth of non-small cell lung cancer by inducing cell cycle arrest, rather than apoptosis. *Cancer letters*, 354(2), 378–389.
- Chen, H., Yuan, R., Zhang, Y., Zhang, X., Chen, L., Zhou, X., Yuan, Z., Nie, Y., Li, M., Mo, D., & Chen, Y. (2016). ATF4 regulates SREBP1c expression to control fatty acids synthesis in 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Biochimica et biophysica acta*, 1859(11), 1459–1469.
- Chen, J. J., & London, I. M. (1995). Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends in biochemical sciences*, 20(3), 105–108.
- Chen, J. J., & Zhang, S. (2022). Translational control by heme-regulated eIF2 α kinase during erythropoiesis. *Current opinion in hematology*, 29(3), 103–111.
- Chen, M., Liu, Y., Yang, Y., Qiu, Y., Wang, Z., Li, X., & Zhang, W. (2021). Emerging roles of activating transcription factor (ATF) family members in tumourigenesis and immunity: Implications in cancer immunotherapy. *Genes & diseases*, 9(4), 981–999.
- Chen, Y. C., Chang, M. Y., Shiau, A. L., Yo, Y. T., & Wu, C. L. (2007). Mitochondrial ribosomal protein S36 delays cell cycle progression in association with p53 modification and p21(WAF1/CIP1) expression. *Journal of cellular biochemistry*, 100(4), 981–990.
- Choismel, V., Fribourg, S., Aguisa-Touré, A. H., Pinaud, N., Legrand, P., Gazda, H. T., & Gleizes, P. E. (2008). Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Human molecular genetics*, 17(9), 1253–1263.
- Conde, J. A., Claunch, C. J., Romo, H. E., Benito-Martín, A., Ballester, R. P., & González-García, M. (2012). Identification of a motif in BMRP required for interaction with Bcl-2 by site-directed mutagenesis studies. *Journal of cellular biochemistry*, 113(11), 3498–3508.
- Cui, D., Li, L., Lou, H., Sun, H., Ngai, S. M., Shao, G., & Tang, J. (2014). The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene*, 33(17), 2225–2235.

- Daftuar, L., Zhu, Y., Jacq, X., & Prives, C. (2013). Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network. *PloS one*, 8(7), e68667.
- Dai, M. S., & Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 44475–44482.
- Dai, M. S., Arnold, H., Sun, X. X., Sears, R., & Lu, H. (2007). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *The EMBO journal*, 26(14), 3332–3345.
- Dai, M. S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X. X., David, L., & Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7654–7668.
- d'Angelo, I., Costabile, G., Durantie, E., Brocca, P., Rondelli, V., Russo, A., Russo, G., Miro, A., Quaglia, F., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., & Ungaro, F. (2018). Hybrid Lipid/Polymer Nanoparticles for Pulmonary Delivery of siRNA: Development and Fate Upon *In Vitro* Deposition on the Human Epithelial Airway Barrier. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 31(3), 170–181.
- Darini, C., Ghaddar, N., Chabot, C., Assaker, G., Sabri, S., Wang, S., Krishnamoorthy, J., Buchanan, M., Aguilar-Mahecha, A., Abdulkarim, B., Deschenes, J., Torres, J., Ursini-Siegel, J., Basik, M., & Koromilas, A. E. (2019). An integrated stress response via PKR suppresses HER2+ cancers and improves trastuzumab therapy. *Nature communications*, 10(1), 2139.
- Dave, B., Granados-Principal, S., Zhu, R., Benz, S., Rabizadeh, S., Soon-Shiong, P., Yu, K. D., Shao, Z., Li, X., Gilcrease, M., Lai, Z., Chen, Y., Huang, T. H., Shen, H., Liu, X., Ferrari, M., Zhan, M., Wong, S. T., Kumaraswami, M., Mittal, V., ... Chang, J. C. (2014). Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), 8838–8843.
- de Las Heras-Rubio, A., Perucho, L., Paciucci, R., Vilardell, J., & LLeonart, M. E. (2014). Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis. *Cancer metastasis reviews*, 33(1), 115–141.
- Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F., & Hinnebusch, A. G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*, 68(3), 585–596.
- Dey, S., Sayers, C. M., Verginadis, I. I., Lehman, S. L., Cheng, Y., Cerniglia, G. J., Tuttle, S. W., Feldman, M. D., Zhang, P. J., Fuchs, S. Y., Diehl, J. A., & Koumenis, C. (2015). ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 125(7), 2592–2608.
- Dowdy, S. F., Lai, K. M., Weissman, B. E., Matsui, Y., Hogan, B. L., & Stanbridge, E. J. (1991). The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic acids research*, 19(20), 5763–5769.
- Dowsett M. (2001). Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 8(3), 191–195.
- Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., O'Brien, S. E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Siddiqui-Jain, A., Streiner, N., Quin, J. E., Sanij, E., Bywater, M. J., Hannan, R. D., Ryckman, D., Anderes, K., & Rice, W. G. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer research*, 71(4), 1418–1430.
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J. P., Lim, J. K., Von Hoff, D., Anderes, K., & Rice, W.

- G. (2009). Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer research*, 69(19), 7653–7661.
- Du, J., Shi, Y., Pan, Y., Jin, X., Liu, C., Liu, N., Han, Q., Lu, Y., Qiao, T., & Fan, D. (2005). Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein l6 in gastric cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 242–247.
- Ebright, R. Y., Lee, S., Wittner, B. S., Niederhoffer, K. L., Nicholson, B. T., Bardia, A., Truesdell, S., Wiley, D. F., Wesley, B., Li, S., Mai, A., Aceto, N., Vincent-Jordan, N., Szabolcs, A., Chirn, B., Kreuzer, J., Comaills, V., Kalinich, M., Haas, W., Ting, D. T., ... Micalizzi, D. S. (2020). Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis. *Science* (New York, N.Y.), 367(6485), 1468–1473.
- Edenfield, J., Schammel, C., Collins, J., Schammel, D., & Edenfield, W. J. (2017). Metaplastic Breast Cancer: Molecular Typing and Identification of Potential Targeted Therapies at a Single Institution. *Clinical breast cancer*, 17(1), e1–e10.
- Eisinger, D. P., Dick, F. A., & Trumpower, B. L. (1997). Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Molecular and cellular biology*, 17(9), 5136–5145.
- Engidaye, G., Melku, M., & Enawgaw, B. (2019). Diamond Blackfan Anemia: Genetics, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *EJIFCC*, 30(1), 67–81.
- Esposito, D., Crescenzi, E., Sagar, V., Loreni, F., Russo, A., & Russo, G. (2014). Human rpL3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP. *Oncotarget*, 5(22), 11737–11751.
- Fancello, L., Kampen, K. R., Hofman, I. J., Verbeeck, J., & De Keersmaecker, K. (2017). The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*, 8(9), 14462–14478.
- Farmer, A. A., Loftus, T. M., Mills, A. A., Sato, K. Y., Neill, J. D., Tron, T., Yang, M., Trumpower, B. L., & Stanbridge, E. J. (1994). Extreme evolutionary conservation of QM, a novel c-Jun associated transcription factor. *Human molecular genetics*, 3(5), 723–728.
- Fatica, A., & Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current opinion in cell biology*, 14(3), 313–318.
- Flygare, J., Aspesi, A., Bailey, J. C., Miyake, K., Caffrey, J. M., Karlsson, S., & Ellis, S. R. (2007). Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*, 109(3), 980–986.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313, 17–42.
- Galanina, N., Sprecher, S., Bossuyt, V., Sarkar, S., Krop, I., Winer, E., Tuck, D., P., Bruce, C., & Harris, L. (2012). Evaluation of gene expression by RNA-seq after single dose of trastuzumab (T) reveals predictors of pathologic complete response (pCR) in HER2-positive early breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 30(suppl) abstr 10558.
- GeneCards. (2021a) RPL10 Gene - Ribosomal Protein L10. *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPL10>.
- GeneCards. (2021b) RPL41 Gene - Ribosomal Protein L41. *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPL41>

- Geng, W., Qin, F., Ren, J., Xiao, S., & Wang, A. (2018). Mini-peptide RPL41 attenuated retinal neovascularization by inducing degradation of ATF4 in oxygen-induced retinopathy mice. *Experimental cell research*, 369(2), 243–250.
- Geng, W., Ren, J., Shi, H., Qin, F., Xu, X., Xiao, S., Jiao, Y., & Wang, A. (2021). RPL41 sensitizes retinoblastoma cells to chemotherapeutic drugs via ATF4 degradation. *Journal of cellular physiology*, 236(3), 2214–2225.
- Girardi, T., Vereecke, S., Sulima, S. O., Khan, Y., Fancello, L., Briggs, J. W., Schwab, C., de Beeck, J. O., Verbeeck, J., Royaert, J., Geerdens, E., Vicente, C., Bornschein, S., Harrison, C. J., Meijerink, J. P., Cools, J., Dinman, J. D., Kampen, K. R., & De Keersmaecker, K. (2018). The T-cell leukemia-associated ribosomal RPL10 R98S mutation enhances JAK-STAT signaling. *Leukemia*, 32(3), 809–819.
- Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M. J., de Azambuja, E., Procter, M., Suter, T. M., Jackisch, C., Cameron, D., Weber, H. A., Heinzmann, D., Dal Lago, L., McFadden, E., Dowsett, M., Untch, M., Gianni, L., Bell, R., Köhne, C. H., Vindevoghel, A., Andersson, M., Brunt, A. M., ... Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2013). 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* (London, England), 382(9897), 1021–1028.
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H. J., & Panel members (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(9), 2206–2223.
- González-González, A., Muñoz-Muela, E., Marchal, J. A., Cara, F. E., Molina, M. P., Cruz-Lozano, M., Jiménez, G., Verma, A., Ramírez, A., Qian, W., Chen, W., Kozielski, A. J., Elemento, O., Martín-Salvago, M. D., Luque, R. J., Rosa-Garrido, C., Landeira, D., Quintana-Romero, M., Rosato, R. R., García, M. A., ... Granados-Principal, S. (2018). Activating Transcription Factor 4 Modulates TGFβ-Induced Aggressiveness in Triple-Negative Breast Cancer via SMAD2/3/4 and mTORC2 Signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(22), 5697–5709.
- Graifer, D., & Karpova, G. (2015). Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes. *Biochimie*, 109, 1–17.
- Guerra, I., Algorta, J., Díaz de Otazu, R., Pelayo, A., & Fariña, J. (2003). Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Molecular pathology : MP*, 56(6), 323–327.
- Guo, X., Shi, Y., Gou, Y., Li, J., Han, S., Zhang, Y., Huo, J., Ning, X., Sun, L., Chen, Y., Sun, S., & Fan, D. (2011). Human ribosomal protein S13 promotes gastric cancer growth through down-regulating p27(Kip1). *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(2), 296–306.
- Gur-Dedeoglu, B., Konu, O., Bozkurt, B., Ergul, G., Seckin, S., & Yulug, I. G. (2009). Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. *Oncology research*, 17(8), 353–365.
- Hai, T., & Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3720–3724.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274.

- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell*, 6(5), 1099–1108.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., & Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*, 11(3), 619–633.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Henry, J. L., Coggin, D. L., & King, C. R. (1993). High-level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer research*, 53(6), 1403–1408.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(2), 89–102.
- Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular cell*, 69(2), 169–181.
- Hofman, I. J. F., Patchett, S., van Duin, M., Geerdens, E., Verbeeck, J., Michaux, L., Delforge, M., Sonneveld, P., Johnson, A. W., & De Keersmaecker, K. (2017). Low frequency mutations in ribosomal proteins RPL10 and RPL5 in multiple myeloma. *Haematologica*, 102(8), e317–e320.
- Huang, G., Li, H., & Zhang, H. (2020). Abnormal Expression of Mitochondrial Ribosomal Proteins and Their Encoding Genes with Cell Apoptosis and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8879.
- Huggins, C. J., Mayekar, M. K., Martin, N., Saylor, K. L., Gonit, M., Jailwala, P., Kasoji, M., Haines, D. C., Quiñones, O. A., & Johnson, P. F. (2015). C/EBP γ Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Molecular and cellular biology*, 36(5), 693–713.
- Idol, R. A., Robledo, S., Du, H. Y., Crimmins, D. L., Wilson, D. B., Ladenson, J. H., Bessler, M., & Mason, P. J. (2007). Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood cells, molecules & diseases*, 39(1), 35–43.
- Jang, C. Y., Kim, H. D., & Kim, J. (2012). Ribosomal protein S3 interacts with TRADD to induce apoptosis through caspase dependent JNK activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(3), 474–478.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). *Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69–90.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., & Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7669–7680.
- Kampen, K. R., Sulima, S. O., Verbelen, B., Girardi, T., Vereecke, S., Rinaldi, G., Verbeeck, J., Op de Beeck, J., Uytendaele, A., Meijerink, J., Moorman, A. V., Harrison, C. J., Spincemille, P., Cools, J., Cassiman, D., Fendt, S. M., Vermeersch, P., & De Keersmaecker, K. (2019). The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia*, 33(2), 319–332.
- Keen, A. and Lennan, E. (2011). Women's Cancers. *West Sussex: John Wiley & Sons*.
- Kim, H. J., Maiti, P., & Barrientos, A. (2017). Mitochondrial ribosomes in cancer. *Seminars in cancer biology*, 47, 67–81.

- Kim, T. H., Leslie, P., & Zhang, Y. (2014). Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. *Oncotarget*, 5(4), 860–871.
- King, M. C., Marks, J. H., Mandell, J. B., & New York Breast Cancer Study Group (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* (New York, N.Y.), 302(5645), 643–646.
- Lafontaine, D. L., & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(7), 514–520.
- Lau, E., Feng, Y., Claps, G., Fukuda, M. N., Perlina, A., Donn, D., Jilaveanu, L., Kluger, H., Freeze, H. H., & Ronai, Z. A. (2015). The transcription factor ATF2 promotes melanoma metastasis by suppressing protein fucosylation. *Science signaling*, 8(406), ra124.
- Li, C., Ge, M., Chen, D., Sun, T., Jiang, H., Xie, Y., Lu, H., Zhang, B., Han, L., Chen, J., & Zhu, J. (2020). RPL21 siRNA Blocks Proliferation in Pancreatic Cancer Cells by Inhibiting DNA Replication and Inducing G1 Arrest and Apoptosis. *Frontiers in oncology*, 10, 1730.
- Li, H. B., Wang, R. X., Jiang, H. B., Zhang, E. D., Tan, J. Q., Xu, H. Z., Zhou, R. R., & Xia, X. B. (2016). Mitochondrial Ribosomal Protein L10 Associates with Cyclin B1/Cdk1 Activity and Mitochondrial Function. *DNA and cell biology*, 35(11), 680–690.
- Li, X., Zhou, D., Cai, Y., Yu, X., Zheng, X., Chen, B., Li, W., Zeng, H., Hassan, M., Zhao, Y., & Zhou, W. (2022). Endoplasmic reticulum stress inhibits AR expression via the PERK/eIF2 α /ATF4 pathway in luminal androgen receptor triple-negative breast cancer and prostate cancer. *NPJ breast cancer*, 8(1), 2.
- Liao, J. M., Zhou, X., Gagnon, A., & Lu, H. (2014). Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene*, 33(41), 4916–4923.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408.
- Loftus, T. M., Nguyen, Y. H., & Stanbridge, E. J. (1997). The QM protein associates with ribosomes in the rough endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 36(27), 8224–8230.
- Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., & Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer cell*, 3(6), 577–587.
- Loi, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Lallemand, F., Tutt, A. M., Gillet, C., Ellis, P., Harris, A., Bergh, J., Foekens, J. A., Klijn, J. G., Larsimont, D., Buyse, M., Bontempi, G., Delorenzi, M., Piccart, M. J., & Sotiriou, C. (2007). Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(10), 1239–1246.
- Ma, F., Guan, Y., Yi, Z., Chang, L., Li, Q., Chen, S., Zhu, W., Guan, X., Li, C., Qian, H., Xia, X., Yang, L., Zhang, J., Husain, H., Liao, Z., Futreal, A., Huang, J., Yi, X., & Xu, B. (2020). Assessing tumor heterogeneity using ctDNA to predict and monitor therapeutic response in metastatic breast cancer. *International journal of cancer*, 146(5), 1359–1368.
- Molavi, G., Samadi, N., & Hosseingholi, E. Z. (2019). The roles of moonlight ribosomal proteins in the development of human cancers. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8327–8341.
- Morse, D. L., Carroll, D., Weberg, L., Borgstrom, M. C., Ranger-Moore, J., & Gillies, R. J. (2005). Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing

- cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 342(1), 69–77.
- Mosca, L., Pagano, M., Pecoraro, A., Borzacchiello, L., Mele, L., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Russo, G., & Russo, A. (2020). S-Adenosyl-L-Methionine Overcomes uL3-Mediated Drug Resistance in p53 Deleted Colon Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 103.
- MSKCC. (2021). Anatomy of the Breast. *Breast Cancer*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.mskcc.org/cancer-care/types/breast/anatomy-breast>.
- Mushtaq, M., Jensen, L., Davidsson, S., Grygoruk, O. V., Andrén, O., Kashuba, V., & Kashuba, E. (2018). The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Scientific reports*, 8(1), 2268.
- Nagelkerke, A., Bussink, J., Mujcic, H., Wouters, B. G., Lehmann, S., Sweep, F. C., & Span, P. N. (2013). Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast cancer research : BCR*, 15(1), R2.
- Nam, S., Chang, H. R., Jung, H. R., Gim, Y., Kim, N. Y., Grailhe, R., Seo, H. R., Park, H. S., Balch, C., Lee, J., Park, I., Jung, S. Y., Jeong, K. C., Powis, G., Liang, H., Lee, E. S., Ro, J., & Kim, Y. H. (2015). A pathway-based approach for identifying biomarkers of tumor progression to trastuzumab-resistant breast cancer. *Cancer letters*, 356(2 Pt B), 880–890.
- Naora, H., Takai, I., Adachi, M., & Naora, H. (1998). Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis. *The Journal of cell biology*, 141(3), 741–753.
- NCBI. (2021a) RPL10 – ribosomal protein L10. *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=RPL10>
- NCBI. (2021b) RPL41 – ribosomal protein L41. *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6171>
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P., & Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *The EMBO journal*, 22(5), 1180–1187.
- Odintsova, T. I., Müller, E. C., Ivanov, A. V., Egorov, T. A., Bienert, R., Vladimirov, S. N., Kostka, S., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., & Karpova, G. G. (2003). Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *Journal of protein chemistry*, 22(3), 249–258.
- Ogawa, L. M., & Baserga, S. J. (2017). Crosstalk between the nucleolus and the DNA damage response. *Molecular bioSystems*, 13(3), 443–455.
- Oh, H. S., Kwon, H., Sun, S. K., & Yang, C. H. (2002). QM, a putative tumor suppressor, regulates proto-oncogene c-yes. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), 36489–36498.
- Pagliara, V., Saide, A., Mitidieri, E., d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Russo, G., & Russo, A. (2016). 5-FU targets rpl3 to induce mitochondrial apoptosis via cystathionine- β -synthase in colon cancer cells lacking p53. *Oncotarget*, 7(31), 50333–50348.

- Pecoraro, A., Carotenuto, P., Russo, G., & Russo, A. (2019). Ribosomal protein uL3 targets E2F1 and Cyclin D1 in cancer cell response to nucleolar stress. *Scientific reports*, 9(1), 15431.
- Pecoraro, A., Virgilio, A., Esposito, V., Galeone, A., Russo, G., & Russo, A. (2020). uL3 Mediated Nucleolar Stress Pathway as a New Mechanism of Action of Antiproliferative G-quadruplex TBA Derivatives in Colon Cancer Cells. *Biomolecules*, 10(4), 583.
- Penzo, M., Montanaro, L., Treré, D., & Derenzini, M. (2019). The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection. *Cells*, 8(1), 55.
- Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J. H., Sledge, G., Geyer, C. E., Jr, Martino, S., Rastogi, P., Gralow, J., Swain, S. M., Winer, E. P., Colon-Otero, G., Davidson, N. E., Mamounas, E., Zujewski, J. A., & Wolmark, N. (2014). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(33), 3744–3752..
- Pfaffl, M. W. (2006). “Relative quantification”. T. Dorak, (ed.). in: *Real-time PCR* (s. 63-82). New York: Taylor & Francis Group.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C. S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U. Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*, 353(16), 1659–1672.
- Piccart-Gebhart. M. J.. Procter. M.. Leyland-Jones. B.. Goldhirsch. A.. Untch. M.. Smith. I.. Gianni. L.. Baselga. J.. Bell. R.. Jackisch. C.. Cameron. D.. Dowsett. M.. Barrios. C. H.. Steger. G.. Huang. C. S.. Andersson. M.. Inbar. M.. Lichinitser. M.. Láng. I.. Nitz. U.. ... Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 353(16). 1659–1672.
- Pizot, C., Boniol, M., Mullie, P., Koechlin, A., Boniol, M., Boyle, P., & Autier, P. (2016). Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 52, 138–154.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* (Edinburgh, Scotland), 24 Suppl 2, S26–S35.
- Ray, S., Johnston, R., Campbell, D. C., Nugent, S., McDade, S. S., Waugh, D., & Panov, K. I. (2013). Androgens and estrogens stimulate ribosome biogenesis in prostate and breast cancer cells in receptor dependent manner. *Gene*, 526(1), 46–53.
- Ren, Y., Tao, C., Wang, X., & Ju, Y. (2018). Identification of RPL5 and RPL10 as novel diagnostic biomarkers of Atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cancer cell international*, 18, 190.
- Romond, E. H., Jeong, J. H., Rastogi, P., Swain, S. M., Geyer, C. E., Jr, Ewer, M. S., Rath, V., Fehrenbacher, L., Brufsky, A., Azar, C. A., Flynn, P. J., Zapas, J. L., Polikoff, J., Gross, H. M., Biggs, D. D., Atkins, J. N., Tan-Chiu, E., Zheng, P., Yothers, G., Mamounas, E. P., ... Wolmark, N. (2012). Seven-year follow-up assessment of cardiac

- function in NSABP B-31, a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel (ACP) with ACP plus trastuzumab as adjuvant therapy for patients with node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(31), 3792–3799.
- Roth, H. E., & Nierhaus, K. H. (1980). Assembly map of the 50-S subunit from *Escherichia coli* ribosomes, covering the proteins present in the first reconstitution intermediate particle. *European journal of biochemistry*, 103(1), 95–98.
- Rouquette, J., Choesmel, V., & Gleizes, P. E. (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *The EMBO journal*, 24(16), 2862–2872.
- Ruggero, D., & Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer?. *Nature reviews. Cancer*, 3(3), 179–192.
- Russo, A., & Russo, G. (2017). Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 140.
- Russo, A., Esposito, D., Catillo, M., Pietropaolo, C., Crescenzi, E., & Russo, G. (2013). Human rpL3 induces G₁/S arrest or apoptosis by modulating p21 (waf1/cip1) levels in a p53-independent manner. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(1), 76–87.
- Russo, A., Pagliara, V., Albano, F., Esposito, D., Sagar, V., Loreni, F., Irace, C., Santamaria, R., & Russo, G. (2016). Regulatory role of rpL3 in cell response to nucleolar stress induced by Act D in tumor cells lacking functional p53. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(1), 41–51.
- Saini, N., Balhara, J., Adlakha, Y.K., Singh, N. (2009). S29 ribosomal protein induces mitochondria mediated apoptosis of Hep2 cells via the activation of p38 MAPK and JNK signaling. *International journal of integrative biology*, 5, 49–57.
- Shen, D. W., Liang, X. J., Suzuki, T., & Gottesman, M. M. (2006). Identification by functional cloning from a retroviral cDNA library of cDNAs for ribosomal protein L36 and the 10-kDa heat shock protein that confer cisplatin resistance. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1383–1388.
- Shi, C., Wang, Y., Guo, Y., Chen, Y., & Liu, N. (2017). Cooperative down-regulation of ribosomal protein L10 and NF- κ B signaling pathway is responsible for the anti-proliferative effects by DMAPT in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 8(21), 35009–35018.
- Shi, J., Zhang, L., Zhou, D., Zhang, J., Lin, Q., Guan, W., Zhang, J., Ren, W., & Xu, G. (2018). Biological Function of Ribosomal Protein L10 on Cell Behavior in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Cancer*, 9(4), 745–756.
- Shi, Y., Vattam, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., & Wek, R. C. (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and cellular biology*, 18(12), 7499–7509.
- Siavoshi, A., Taghizadeh, M., Dookhe, E., & Piran, M. (2022). Gene expression profiles and pathway enrichment analysis to identification of differentially expressed gene and signaling pathways in epithelial ovarian cancer based on high-throughput RNA-seq data. *Genomics*, 114(1), 161–170.
- Silvera, D., Formenti, S. C., & Schneider, R. J. (2010). Translational control in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(4), 254–266.
- Sim, E. U., Ang, C. H., Ng, C. C., Lee, C. W., & Narayanan, K. (2010). Differential expression of a subset of ribosomal protein genes in cell lines derived from human nasopharyngeal

- epithelium. *Journal of human genetics*, 55(2), 118–120.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2009.124>.
- Sim, E. U., Chan, S. L., Ng, K. L., Lee, C. W., & Narayanan, K. (2016). Human Ribosomal Proteins RPeL27, RPeL43, and RPeL41 Are Upregulated in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines. *Disease markers*, 2016, 5179594.
<https://doi.org/10.1155/2016/5179594>.
- Singleton, D. C., & Harris, A. L. (2012). Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(12), 1189–1202.
- Sollner-Webb, B., & Mougey, E. B. (1991). News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends in biochemical sciences*, 16(2), 58–62.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Suryanarayana, T., & Subramanian, A. R. (1983). An essential function of ribosomal protein S1 in messenger ribonucleic acid translation. *Biochemistry*, 22(11), 2715–2719.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 7(9), 880–885.
- Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., & Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*, 123(1), 49–63.
- Tan, P. H., Ellis, I., Allison, K., Brogi, E., Fox, S. B., Lakhani, S., Lazar, A. J., Morris, E. A., Sahin, A., Salgado, R., Sapino, A., Sasano, H., Schnitt, S., Sotiriou, C., van Diest, P., White, V. A., Lokuhetty, D., Cree, I. A., & WHO Classification of Tumours Editorial Board (2020). The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*, 77(2), 181–185.
- Traub, P., & Nomura, M. (1969). Studies on the assembly of ribosomes *in vitro*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 34, 63–67.
- Tschochner, H., & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*, 13(5), 255–263.
- Uechi, T., Tanaka, T., & Kenmochi, N. (2001). A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics*, 72(3), 223–230.
- UNIPROT. (2021a) UniProtKB - P27635 (RL10_HUMAN). *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.uniprot.org/uniprot/P27635>
- UNIPROT. (2021b) UniProtKB - P62945 (RL41_HUMAN). *The Human Gene Database*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.uniprot.org/uniprot/P62945>
- Vallejo, M., Ron, D., Miller, C. P., & Habener, J. F. (1993). C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(10), 4679–4683.
- van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A. D., Thoeng, A., Gao, D., Ritchie, W., Feng, Y., Bailey, C. G., Deng, N., Harvey, K., Beith, J. M., Selinger, C. I., O'Toole, S. A., Rasko, J. E., & Holst, J. (2016). ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*, 35(24), 3201–3208.

- Vasudevan, D., Neuman, S. D., Yang, A., Lough, L., Brown, B., Bashirullah, A., Cardozo, T., & Ryoo, H. D. (2020). Translational induction of ATF4 during integrated stress response requires noncanonical initiation factors eIF2D and DENR. *Nature communications*, 11(1), 4677.
- Viale G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(10), 207–210.
- Voduc, K. D., Cheang, M. C., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., & Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(10), 1684–1691.
- Wang, A., Xu, S., Zhang, X., He, J., Yan, D., Yang, Z., & Xiao, S. (2011). Ribosomal protein RPL41 induces rapid degradation of ATF4, a transcription factor critical for tumour cell survival in stress. *The Journal of pathology*, 225(2), 285–292.
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 14(9), 581–597.
- Wang, M., Hu, Y., Amatangelo, M. D., & Stearns, M. E. (2011). Role of ribosomal protein RPS2 in controlling let-7a expression in human prostate cancer. *Molecular cancer research : MCR*, 9(1), 36–50.
- Wang, S., Huang, J., He, J., Wang, A., Xu, S., Huang, S. F., & Xiao, S. (2010). RPL41, a small ribosomal peptide deregulated in tumors, is essential for mitosis and centrosome integrity. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 12(3), 284–293.
- Wang, Z., Hou, J., Lu, L., Qi, Z., Sun, J., Gao, W., Meng, J., Wang, Y., Sun, H., Gu, H., Xin, Y., Guo, X., & Yang, G. (2013). Small ribosomal protein subunit S7 suppresses ovarian tumorigenesis through regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways. *PloS one*, 8(11), e79117.
- Weinberg, R., A. (2014). *The Biology Of Cancer*. London: Garland Science.
- WHO. (2020a). GLOBOCAN 2020: *New Global Cancer Data*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>.
- WHO. (2020b). Cancer Tomorrow. *IARC*. Retrieved July 20, 2021, from <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.
- WHO. (2020c). GLOBOCAN 2020: *Cancer Today*. Retrieved July 20, 2021, from https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- Wilson, D. N., & Doudna Cate, J. H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(5), a011536.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25(4): 430–442.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85..
- Woodson S. A. (2011). RNA folding pathways and the self-assembly of ribosomes. *Accounts of chemical research*, 44(12), 1312–1319.
- Xie, J., Zhang, W., Liang, X., Shuai, C., Zhou, Y., Pan, H., Yang, Y., & Han, W. (2020). RPL32 Promotes Lung Cancer Progression by Facilitating p53 Degradation. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 21, 75–85.

- Xie, X., Guo, P., Yu, H., Wang, Y., & Chen, G. (2018). Ribosomal proteins: insight into molecular roles and functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 37(3), 277–285.
- Xu, L., Wang, L., Jiang, C., Zhu, Q., Chen, R., Wang, J., & Wang, S. (2020). Biological effect of ribosomal protein L32 on human breast cancer cell behavior. *Molecular medicine reports*, 22(3), 2478–2486.
- Yamnik, R. L., Digilova, A., Davis, D. C., Brodt, Z. N., Murphy, C. J., & Holz, M. K. (2009). S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*, 284(10), 6361–6369.
- Yang, C., Zang, W., Ji, Y., Li, T., Yang, Y., & Zheng, X. (2019). Ribosomal protein L6 (RPL6) is recruited to DNA damage sites in a poly(ADP-ribose) polymerase-dependent manner and regulates the DNA damage response. *The Journal of biological chemistry*, 294(8), 2827–2838.
- Yang, G., & Zong, H. (2016). Overexpression of PDZK1IP1, EEF1A2 and RPL41 genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Molecular medicine reports*, 13(6), 4786–4790.
- Yang, J., Chen, Z., Liu, N., & Chen, Y. (2018). Ribosomal protein L10 in mitochondria serves as a regulator for ROS level in pancreatic cancer cells. *Redox biology*, 19, 158–165.
- Yang, X., Xu, L., Yang, Y. E., Xiong, C., Yu, J., Wang, Y., & Lin, Y. (2020). Knockdown of ribosomal protein S6 suppresses proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, 13(1), 100.
- Yao, Y., Liu, Y., Lv, X., Dong, B., Wang, F., Li, J., Zhang, Q., Xu, R., & Xu, Y. (2016). Down-regulation of ribosomal protein S15A inhibits proliferation of human glioblastoma cells *in vivo* and *in vitro* via AKT pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(4), 4979–4990.
- Yin, X., Dewille, J. W., & Hai, T. (2008). A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development. *Oncogene*, 27(15), 2118–2127.
- Yin, X., Wolford, C. C., Chang, Y. S., McConoughey, S. J., Ramsey, S. A., Aderem, A., & Hai, T. (2010). ATF3, an adaptive-response gene, enhances TGF{beta} signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *Journal of cell science*, 123(Pt 20), 3558–3565.
- Yoo, Y. A., Kim, M. J., Park, J. K., Chung, Y. M., Lee, J. H., Chi, S. G., Kim, J. S., & Yoo, Y. D. (2005). Mitochondrial ribosomal protein L41 suppresses cell growth in association with p53 and p27Kip1. *Molecular and cellular biology*, 25(15), 6603–6616.
- Zeng, P., Sun, S., Li, R., Xiao, Z. X., & Chen, H. (2019). HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2223.
- Zhang, C., Fu, J., Xue, F., Ryu, B., Zhang, T., Zhang, S., Sun, J., Xu, X., Shen, Z., Zheng, L., & Chen, X. (2016). Knockdown of ribosomal protein S15A induces human glioblastoma cell apoptosis. *World journal of surgical oncology*, 14, 129.
- Zhang, Y. F., Zhang, B. C., Zhang, A. R., Wu, T. T., Liu, J., Yu, L. F., Wang, W. X., Gao, J. F., Fang, D. C., & Rao, Z. G. (2013). Co-transduction of ribosomal protein L23 enhances the therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer in human gastric cancer. *Oncology reports*, 30(4), 1989–1995.
- Zhang, Y., & Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell*, 16(5), 369–377.
- Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., & Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-

- dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Molecular and cellular biology*, 23(23), 8902–8912.
- Zhang, Y., Zhou, J., & Lim, C. U. (2006). The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell research*, 16(1), 45–54.
- Zhou, C., Sun, J., Zheng, Z., Weng, J., Atyah, M., Zhou, Q., Chen, W., Zhang, Y., Huang, J., Yin, Y., Mao, H., Zhang, Z., Yi, Y., & Ren, N. (2020). High RPS11 level in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis after curative resection. *Annals of translational medicine*, 8(7), 466.
- Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q., & Lu, H. (2013). Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*, 32(3), 388–396.
- Zhou, X., Liao, J. M., Liao, W. J., & Lu, H. (2012). Scission of the p53-MDM2 Loop by Ribosomal Proteins. *Genes & cancer*, 3(3-4), 298–310.



ETİK KURUL KARARI



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/89-133

16.03.2020

Sayın Doç. Dr. Birşen BİLGİCİ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Ribozomal Protein L10 ve L41'in meme kanseri moleküler alt tipleriyle ilişkisi** başlıklı OMÜ KAEK 2020/78 Karar nolu Biyokimya çalışması+ Patoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 27.02.2020 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

Sebati Sinan ÜRKMEZ, Salihli Sekine Evren Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılında OMÜ LEE Tıbbi Biyokimya Doktora programına girdi. 2015 yılından beri araştırma görevlisi olarak görev yapan Sebati Sinan ÜRKMEZ, iyi derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0002-8821-1835>

Yayınlar:

1. Is There any Association Between Low Level of Serum Nesfatin-1 and Fibromyalgia Syndrome? Birşen BİLGİCİ, Yeşim AKYOL, Yasemin ULUS, Sebati Sinan ÜRKMEZ, Ömer KURU, Yayın Yeri:Archives of Rheumatology , 2021 Uluslararası Hakemli SCI-Expanded Özgün Makale <https://dx.doi.org/10.46497/ArchRheumatol.2021.7736>
2. Effects of smoking on the gingival crevicular fluid levels of interleukin-17A, interleukin-17E, and oxidative stress following periodontal treatment process. Müge LÜTFİOĞLU, Naci Umur SAKALLIOĞLU, Elif Eser SAKALLIOĞLU, Feyza OTAN ÖZDEN, Sebati Sinan ÜRKMEZ, Birşen BİLGİCİ , Yayın Yeri:Journal of Periodontal Research , 2021 Uluslararası Hakemli SCI Özgün Makale <https://dx.doi.org/10.1111/jre.12831>
3. Ovarian Metastatic Transmissible Venereal Tumour in a Bitch -A Case Report and Review. Firdevs BİNLİ, Serhan Serhat AY, Gülşah SARAL, Sebati Sinan ÜRKMEZ, Efe KARACA, Ishtiaq AHMET, Murat FINDIK , Yayın Yeri:Animal Health, Production and Hygiene , 2021 Ulusal Hakemli Endekste taranmıyor Vaka Takdimi.
4. Çok işlevli Proteinler: Moonlight Proteinler. Birşen BİLGİCİ, Sebati Sinan ÜRKMEZ, Yeşim CİVİL , Yayın Yeri:Turkish Journal of Clinics and Laboratory , 2020 Ulusal Hakemli TR DİZİN Derleme Makale.
5. Ribosomal Proteins and Cancer. Sebati Sinan ÜRKMEZ, Birşen BİLGİCİ , Yayın Yeri: The Eurasia Proceedings of Health, Environment and Life Sciences, 2021. Uluslararası, Hakemli, Alan endeksleri (CrossRef), Derleme Makale, <https://dx.doi.org/10.55549/ephels.19>