

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DNAJA1* VE *DNAJA2* GENLERİNİN MEME KANSERİNDEKİ
İFADELERİ VE GENETİK/EPİGENETİK ALTERASYONLARI**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURKAN ÇELEBİ İLERİ

Temmuz 2020

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DNAJA1* VE *DNAJA2* GENLERİNİN MEME KANSERİNDEKİ
İFADELERİ VE GENETİK/EPİGENETİK ALTERASYONLARI**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Furkan Çelebi İLERİ

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

ZONGULDAK
Temmuz 2020

KABUL:

Furkan Çelebi İLERİ tarafından hazırlanan “*DNAJA1* ve *DNAJA2* genlerinin meme kanserindeki ifadeleri ve genetik/epigenetik alterasyonları” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle/oyçokluğuyla kabul edilmiştir./...../2020

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

.....
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM

.....
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Kerem Mert ŞENSES

.....
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./...../2020

Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Furkan Çelebi İLERİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***DNAJA1* VE *DNAJA2* GENLERİNİN MEME KANSERİNDEKİ İFADELERİ VE GENETİK/EPİGENETİK ALTERASYONLARI**

Furkan Çelebi İLERİ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

Temmuz 2020, 61 sayfa

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserini hedef alan biyobelirteçlerin ve anti-kanser ilaç hedeflerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, Isı Şoku Proteinleri (Heat-Shock Proteins, HSP) ailesinden *DNAJA1* ve *DNAJA2* genlerinin meme kanserindeki ifade düzeyleri ve genetik/epigenetik alterasyonları araştırıldı. *DNAJA1* ve *DNAJA2*, kanserleşme ile ilişkilendirilmiş ama meme kanserlerinde daha önce çalışılmamış genlerdir. Bu çalışmada, meme hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerindeki *DNAJA1* ve *DNAJA2* ifadesi, Q-RT-PCR, semi-kantitatif RT-PCR, UALCAN web aracı ve immunohistokimya yöntemleri ile araştırıldı. Ardından, bu genlerin meme kanseri hastalarındaki genetik alterasyonları Sanger-COSMIC veri tabanında incelendi. İncelenen genlerin promotor metilasyonu gibi epigenetik etmenlerle regüle edilip edilmediği, birleşik bisülfid restriksiyon analizi (COBRA) yöntemi ve in-siliko araçlarla (UALCAN, Morpheus) araştırıldı.

ÖZET (Devam ediyor)

Çalışma sonunda, *DNAJA1* geninin mRNA ifadesinin, meme hücre hatlarında regüle olduğu bulunmuştur. *DNAJA1* mRNA ifadesi tümör örneklerinde (n=1097) normal örneklerle (n=114) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($P<1e-12$). *DNAJA1* protein ifadesi invaziv duktal karsinoma örneklerinde (n=115), normal meme örneklerine (n=26) kıyasla anlamlı oranda daha sık görülmektedir ($P<0,0001$). *DNAJA1* mRNA ifadesi meme kanseri hastalarında zayıf tam-sağ kalım (n=1402), nüksetmeden sağ kalım (n=3955) ve uzak metastazsız sağ kalım (n=1747) ile ilişkili bulunmuştur (sırasıyla; $P=0,00027$, $P=2e-14$, $P=9,2e-05$). Meme kanseri klinik örneklerinde *DNAJA1* geninin genetik alterasyonları nadirdir. Meme hücre hatlarında ve klinik örneklerde *DNAJA1* promotor bölgesi hipometiledir. Meme hücre hatları arasında *DNAJA2* mRNA ifadesinde dikkate değer bir fark gözlenmedi. *DNAJA2* mRNA ifadesi tümör örneklerinde (n=1097) normal örneklerle (n=114) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($P=4.36e-05$). *DNAJA2* protein ifadesine ise hem invaziv duktal karsinoma örneklerinde (n=115), hem de normal meme örneklerinde (n=21) sık rastlanmıştır (sırasıyla, %90,48; %88,7). *DNAJA2* mRNA ifadesi meme kanseri hastalarının tam sağ kalım (n=626) ve nüksetmeden sağ kalımları (n=1764) için olumsuzdur (sırasıyla; $P=0,047$, $P=0,00033$). Meme kanseri klinik örneklerinde *DNAJA2* geninin genetik alterasyonları nadirdir. *DNAJA2* promotor bölgesi meme hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerinde hipometiledir. Sonuç olarak, *DNAJA1* geni meme kanserinde fazla ifade olmaktadır ve hasta sağ kalımı için olumsuzdur. Bu bakımdan *DNAJA1* ifadesi prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilir. *DNAJA1* geni, promotor metilasyonu dışında başka bir epigenetik mekanizma ile regüle ediliyor olabilir. *DNAJA2* mRNA ifadesi meme kanserinde prognostik öneme sahiptir. Meme kanserinde *DNAJA2* genetik alterasyonları nadirdir ve promotor hipometilasyonu yolu ile regüle ediliyor olabilir. *DNAJA1* ve *DNAJA2* genlerinin meme karsinogenezindeki rollerini daha iyi anlamak için yüksek hasta sayılı klinik çalışmalara ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *DNAJA1*, *DNAJA2*, biyobelirteç epigenetik, meme kanseri

Bilim Kodu: 401.02.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

EXPRESSION AND GENETIC/EPIGENETIC ALTERATIONS OF *DNAJA1* AND *DNAJA2* GENES IN BREAST CANCER

Furkan Çelebi İLERİ

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology**

Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Tolga ACUN

July 2020, 61 pages

It is particularly important to determine the biomarkers and anti-cancer drug targeting breast cancer, which is the most common cancer type in women. In this study, the expression levels and genetic / epigenetic alterations of *DNAJA1* and *DNAJA2* genes from the Heat Shock Proteins (HSP) family were investigated. *DNAJA1* and *DNAJA2* are the genes which have been associated with cancer but have not been studied in breast cancers. In this study, *DNAJA1* and *DNAJA2* expression in breast cell lines and breast cancer clinical samples were investigated by Q-RT-PCR, semi-quantitative RT-PCR, UALCAN web tool and immunohistochemistry methods. Genetic alterations of these genes in breast cancer patients were then examined in the Sanger-COSMIC database. Whether the genes examined were regulated by epigenetic factors such as promoter methylation, was investigated by combined bisulfite restriction analysis (COBRA) method and in-silico tools (UALCAN, Morpheus).

ABSTRACT (continued)

At the end of the study, the mRNA expression of the *DNAJA1* gene is found to be regulated in the breast cell lines. *DNAJA1* mRNA expression was significantly higher in tumor samples (n=1097) than in normal samples (n=114) ($P < 1e-12$). *DNAJA1* protein expression is significantly more common in invasive ductal carcinoma specimens (n=115) than normal breast specimens (n=26) ($P < 0.0001$). *DNAJA1* mRNA expression is associated with poor overall survival (n=1402), relapse-free survival (n=3955) and distant metastasis-free survival (n=1747) in breast cancer patients, ($P=0.00027$, $P=2e-14$, $P=9.2e-05$). Genetic alterations of the *DNAJA1* gene are infrequent in clinical breast cancer samples. Promoter region of the *DNAJA1* gene is hypomethylated in breast cell lines and clinical breast cancer samples. There is no notable difference observed in *DNAJA2* mRNA expression among the breast cell lines. *DNAJA2* mRNA expression was significantly lower in tumor samples (n=1097) compared to normal samples (n=114) ($P=4.36e-05$). *DNAJA2* protein expression was frequently observed in both invasive ductal carcinoma samples (n=115) and normal breast samples (n=21) (90.48%, 88.7%, respectively). *DNAJA2* mRNA expression is unfavorable for overall-survival (n=626) and relapse-free survival (n=1764) in breast cancer patients ($P=0.047$, $P=0.00033$; respectively). Genetic alterations of the *DNAJA2* gene is uncommon in breast cancer clinical samples. Promoter region of the *DNAJA2* gene is hypomethylated in breast cell lines and clinical breast cancer samples. As a result, the *DNAJA1* gene is overexpressed in breast cancer and unfavorable for survival. In this regard, *DNAJA1* expression can be used as a prognostic biomarker. The *DNAJA1* gene could be regulated by an epigenetic mechanism other than promoter methylation. *DNAJA2* mRNA expression has prognostic significance in breast cancer. Genetic alterations of *DNAJA2* is rare in breast cancer and it could be regulated by promoter hypomethylation. Clinical and functional studies with a larger cohort is needed to better understand the role of *DNAJA1* and *DNAJA2* genes in breast carcinogenesis.

Keywords *DNAJA1*, *DNAJA2*, epigenetic, breast cancer

Science Code: 401.02.00

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni iyi bir bilim insanı olarak yetiştirme gayretinde olan aynı zamanda değerli bilgilerini ve engin tecrübelerini zaman kavramı gözetmeksizin esirgmeden aktarmaya çalışan, çalışma azmi ve hürmanistliğiyle örnek aldığım sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tolga Acun’a teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıdığım ilk andan itibaren desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sayın hocalarım Prof. Dr. Ender Büyükgözel, Doç. Dr. Sevim Karakaş Çelik, Dr. Öğr. Üyesi Arzu Erol’a ve Araştırma Görevlisi Utku Can Atılgan’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi, manevi desteğini esirgemeyen babam Sebahattin İleri ve bu dünyada olmasa da kendisini her zaman yanımda hissettiğim ve hissedeceğim annem Meryem İleri’ye sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 ve MCF 10A hücre hatlarını bize sağlayan Doç. Dr. Işık Yuluğ’a (Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye) ve projemizi destekleyen Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi’ne (BAP Proje No: 2019-50737594-02) ve TÜBİTAK’a (Proje No: 217S251) teşekkürlerimi iletirim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL:	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 MEME KANSERİ	1
1.2 HSP	4
1.2.1 DNAJA1	9
1.2.2 DNAJA2	10
BÖLÜM 2 MATERYAL ve YÖNTEMLER	13
2.2.1 DNA İzolasyonu	14
2.2.2 RNA İzolasyonu	15
2.2.3 cDNA Sentezi	16
2.2.4 Bisüfit Modifikasyonu.....	16
2.2.5 PCR.....	17
2.2.6 Q-RT-PCR, Semi Kantitatif RT-PCR	18
2.2.7 İmmünohistokimya (IHC)	19
2.2.8 Yararlanılan İn-Siliko Araçlar	20
2.2.9 Mutasyon Analizi	20
2.2.10 Metilasyon Analizi	21
2.2.10.1 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis).....	21
2.2.10.2 Metilasyon Analizi İçin İn-Siliko Araçlar	22

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

BÖLÜM 3 BULGULAR.....	23
3.1 <i>DNAJA1</i> GENİ İLE İLGİLİ BULGULAR	23
3.1.1 Meme Hücre Hatlarında mRNA İfade Analizi.....	23
3.1.2 Meme Kanseri Hastalarında Protein İfade Analizi.....	24
3.1.3 <i>DNAJA1</i> Geninin Meme Kanseri Örneklerinde İfade ve Sağ-Kalım Analizi Sonuçları.....	27
3.1.3.1 UALCAN Aracı İle Yapılan İfade Analizi Sonuçları	27
3.1.3.2 KM-Plotter Aracı İle Yapılan Sağ-Kalım Analizi Sonuçları	27
3.1.4 <i>DNAJA1</i> Geninin Genetik Alterasyonları	28
3.1.4.1 Meme Kanseri Hastalarındaki Nokta Mutasyon ve Kopya Sayısı Değişimleri	28
3.1.4.2 Meme Hücre Hatlarında Promotor Mutasyon Analizi Sonuçları.....	29
3.1.5 Meme Kanserinde <i>DNAJA1</i> Metilasyon Analizi Sonuçları	30
3.1.5.1 COBRA Sonucu	30
3.1.5.2 UALCAN Verileri.....	31
3.1.5.3 Morpheus Verileri	32
3.2 <i>DNAJA2</i> GENİ İLE İLGİLİ BULGULAR	33
3.2.1 Meme Hücre Hatlarında mRNA İfade Analizi.....	33
3.2.2 Meme Kanseri Hastalarında Protein İfade Analizi.....	33
3.2.3 <i>DNAJA2</i> Geninin İn-Siliko Araçlar İle Meme Kanseri Örneklerinde İfade ve Sağ- Kalım Analizi Sonuçları.....	36
3.2.3.1 UALCAN Aracı İle Yapılan İfade Analizi Sonuçları	36
3.2.3.2 KM-Plotter Aracı İle Yapılan Sağ-Kalım Analizi Sonuçları	37
3.2.4 <i>DNAJA2</i> Geninin Genetik Alterasyonları	38
3.2.4.1 Meme Kanseri Hastalarındaki Nokta Mutasyon ve Kopya Sayısı Değişimleri	38
3.2.4.2 Meme Hücre Hatlarında Promotor Mutasyon Analizi Sonuçları.....	39
3.2.5 Meme Kanserinde <i>DNAJA2</i> Metilasyon Analizi Sonuçları	40
3.2.5.1 COBRA Sonucu	40
3.2.5.2 UALCAN Verileri.....	41
3.2.5.3 Morpheus Verileri	42
BÖLÜM 4 SONUÇ ve TARTIŞMA.....	43
KAYNAKLAR.....	47
EK AÇIKLAMALAR.....	55

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

ÖZGEÇMİŞ	61
----------------	----





ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Meme dokusunun yapısı.	1
Şekil 1.2 2018 yılında tüm yaştaki kadınların dünya genelindeki (a) ve Türkiye’deki (b) kanser görülme sıklıkları (mavi bar) ve ölüm oranları (kırmızı bar).	4
Şekil 1.3 Denatüre proteinlerin (DP) HSP aktivasyon ve onarım mekanizması.....	5
Şekil 1.4 İlerlemiş kanserli hastalarda şu anda klinik değerlendirmede bulunan birkaç Hsp90 inhibitörünün kimyasal yapısı.	6
Şekil 1.5 DNAJ’ların sınıflandırılması ve fonksiyonel bölgeleri.....	7
Şekil 1.6 HSP70-DNAJ kompleksinden önerilen şaperon destekli protein katlama modeli özet.	8
Şekil 1.7 <i>DNAJA2</i> geninin paralogları.	11
Şekil 2.1 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan GeneRuler™ DNA Ladder Mix.....	18
Şekil 2.2 CpG Metiltransferazla (M.SssI) metillenme.	21
Şekil 3.1 <i>DNAJA1</i> ’in meme kanseri hücre hatlarında tümörjenik olmayan epitel meme hücre hattına (MCF10A) göre mRNA ifadesi.....	23
Şekil 3.2 Meme kanseri klinik örneklerinde <i>DNAJA1</i> protein ifadesi.	24
Şekil 3.3 <i>DNAJA1</i> ’in klinik meme kanseri örneklerinde ve normal örneklerdeki ifadesi.	27
Şekil 3.4 Meme kanseri hastalarında <i>DNAJA1</i> mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerleri. a)OS b) RFS c) DMFS.	28
Şekil 3.5 EPD veri tabanı ve UCSC genom tarayıcısına göre <i>DNAJA1</i> geninin promotor bölgesi CpG adası ile çakışmaktadır.	29
Şekil 3.6 SK-BR-3 hücre hattında <i>DNAJA1</i> ’in promotor bölgesindeki heterozigot SNP.	30

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.7 <i>DNAJA1</i> COBRA sonucu.	31
Şekil 3.8 <i>DNAJA1</i> promotör bölgesi meme kanseri klinik örneklerinde hipometiledir.....	32
Şekil 3.9 <i>DNAJA1</i> geninin meme kanseri ve normal meme örneklerindeki metilasyon durumu	32
Şekil 3.10 Semi-kantitatif RT-PCR sonucuna göre <i>DNAJA2</i> 'nin meme hücre hatlarındaki mRNA ifadesi.....	33
Şekil 3.11 Meme kanseri klinik örneklerinde <i>DNAJA2</i> protein ifadesi.	34
Şekil 3.12 <i>DNAJA2</i> 'nin klinik meme kanseri örneklerinde ve normal örneklerdeki ifadesi. ..	37
Şekil 3.13 Meme kanseri hastalarında <i>DNAJA2</i> mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerleri a) OS b) RFS c) DMFS.	38
Şekil 3.14 EPD veri tabanı ve UCSC genom tarayıcısına göre <i>DNAJA2</i> geninin promotor bölgesi CpG adası ile çakışmaktadır.	39
Şekil 3.15 Meme hücre hatlarında genomik delesyon.	40
Şekil 3.16 <i>DNAJA2</i> COBRA Sonucu.....	41
Şekil 3.17 <i>DNAJA2</i> promotör bölgesi meme kanseri örneklerinde hipometiledir.	42
Şekil 3.18 <i>DNAJA2</i> geninin meme kanseri ve normal meme örneklerindeki metilasyon durumu.	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Meme tümörü moleküler alt tiplerinin özeti	2
Çizelge 1.2 Kanseri gelişimi ve metastazında rol oynayan insan DNAJ izoformlarından bazıları	9
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarının moleküler alt tip bilgileri.....	14
Çizelge 3.1 <i>DNAJA1</i> protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki.....	26
Çizelge 3.2 <i>DNAJA1</i> geninin Sanger-COSMIC veritabanında genetik alterasyonu.....	28
Çizelge 3.3 <i>DNAJA2</i> protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki.....	36
Çizelge 3.4 <i>DNAJA2</i> geninin Sanger-COSMIC veritabanında genetik alterasyonu	38



EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Ek A.1 Genomik DNA ve RNA konsantrasyonları.	55
Ek A.2 <i>DNAJA1</i> ve <i>DNAJA2</i> Bisülfıt/Bisülfıt Nested Primerleri.	55
Ek A.3 <i>DNAJA1</i> ve <i>DNAJA2</i> Dizileme Primerleri.....	56
Ek A.4 <i>DNAJA1</i> ve <i>DNAJA2</i> Q-PCR Primerleri.	56
Ek A.5 Çalışmada kullanılan ticari doku mikrodizisinin (TMA) örnek bilgi formu (BC081116b).....	57
Ek A.6 Çalışmada kullanılan ticari doku mikrodizisinin (TMA) örnek bilgi formu (BR486).....	59
Ek B.1 <i>DNAJA1</i> Nested PCR Koşulları.	60
Ek B.2 <i>DNAJA2</i> Nested PCR Koşulları.	60



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

©	: Copyright Sign
Δ	: Delta
μ	: Mikro
M	: Molar
®	: Registered Sign
°C	: Santigrat Derece

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BAX	: Bcl-2-associated X protein
BP	: Base Pair
CHIP	: Chromatin Immunoprecipitation
COBRA	: Combined Bisulfite Restriction Analysis
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
COSMIC	: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CT	: Cycle Threshold
DAB	: Diaminobenzidin
Dk	: Dakika
DMFS	: Distant Metastasis Free Relapse
DNA	: Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DPX	: Distyrene-Plasticizer-Xylene
EPD	: Eukaryotic Promoter Database
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIPAA	: Health Insurance Portability and Accountability Act
HSP	: Heat Shock Protein
HSP27	: Heat Shock Protein 27
HSP40	: Heat Shock Protein 40
HSP60	: Heat Shock Protein 60
HSP70	: Heat Shock Protein 70
HSP90	: Heat Shock Protein 90
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
ER	: Endoplasmic Reticulum
ER	: Estrogen Receptor
ER-	: Estrogen Receptor Negative
ER+	: Estrogen Receptor Positive
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
HK	: Hepatosellüler Karsinoma
IHC	: İmmünohistokimya
KM	: Kaplan Meier
KSHV	: Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus
LncRNA	: Long non-coding RNA
m-RNA	: Messenger RNA
mi-RNA	: mikro RNA
MBC	: Metastatic Breast Cancer
MSP	: Metylation Spesific Polimerase Chain Reaction
NO	: Nitric Oxide
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
OS	: Overall Survival
PR	: Progesterone Receptor
Q-RT-PCR	: Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction
RFS	: Relapse Free Survival
RPM	: Repeat Per Minute

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

SAM	: S-adenosil metionin
Sn	: Saniye
STAT5b	: Signal transducer and activator of transcription 5b
UV	: Ultraviyole
TAE	: Tris Acetic Acid
TBS	: Tris Buffered Saline
TE Buffer	: Tris-Edta Buffer
TMA	: Tissue Microarray
TNM	: Tümör-Nod Metastaz
BEÜ	: Bülent Ecevit Üniversitesi
FBE	: Fen Bilimleri Enstitüsü

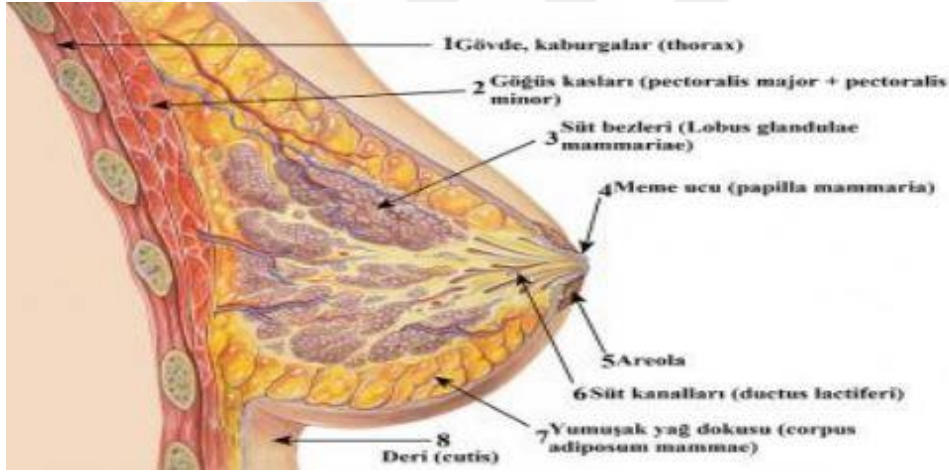


BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 MEME KANSERİ

Lobüller (süt bezleri) ve duktuslar (süt kanalları) olarak iki kısımdan oluşan memede; lobüller ve duktuslar aralarındaki boşlukta destek ve yağ dokusu içermektedir. Memede süt salgılayan lobüller, duktuslar ile meme başına açılırlar. Memede lobüllerin birleşmesiyle loplar oluşur (Gül 2017) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Meme dokusunun yapısı (Kayar 2019).

Meme dokusu kaynaklı hücrelerin düzensiz çoğalması ve büyümesiyle meme kanseri oluşur (Khuwaja G ve Abu-Rezq 2004). Meme kanserinin çoğu duktal hattaki hücrelerde oluşum gösterirken, bazıları lobüllerde ve çok az bir kısım ise diğer dokularda oluşum gösterir. Duktal hatta oluşan meme kanseri duktal karsinom ve lobüllerde oluşan meme kanseri ise lobüler karsinom olarak isimlendirilir (Bomford ve Kunkler 1993).

Sørlie ve ark. 456 cDNA klonu kullanarak meme kanserinin belirgin bir "moleküler betimlemesi"ni sundu, bunun sonucunda tümörlerin farklı klinik sonuçlara sahip beş esas alt tipe, yani luminal A, luminal B, HER2 aşırı eksprese, bazal ve normal benzeri tümörlere sahip

olduğu sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmayla, kanser alt tipleri arasındaki gen ifade patern farkları, moleküler düzeydeki tümörlerin temel farklarını yansıtır.

Çizelge 1.1 Meme tümörü moleküler alt tiplerinin özeti (Dai vd. 2015).

Alt tipler	IHC Durumu	Aşama	Sonuç	Yaygınlık ^Δ
Luminal A*	[ER + PR +] HER2-KI67-	1 2	İyi	%27.3 [p1] (Cheang vd. 2009)
Luminal B*	[ER + PR +] HER2-KI67+	2 3	Orta	%38.8 [p1]
	[ER + PR +] HER2+KI67+		Kötü	%14 [p1] (Cheang vd. 2009)
HER2 Aşırı Ekspresyon	[ER – PR-] HER2+	2 3	Kötü	%11.2 [p1] (Cheang vd. 2009)
Bazal	[ER – PR-] HER2-, Bazal Markör	3	Kötü	%12.3 [p1] (Cheang vd. 2009)
Normal-benzeri	[ER + PR +] HER2-KI67-	1 2 3	Orta	%7.8 [p2] (Smid vd. 2008)

*Meme tümörü vakalarının çoğunu kapsayan ve yaygın olarak atıfta bulunulan, ayrıntılı ifade kalıpları olan alt tipler. ^ΔHer bir alt tipin yaygınlığı, köşeli parantez içinde belirtilen yayından alınır.

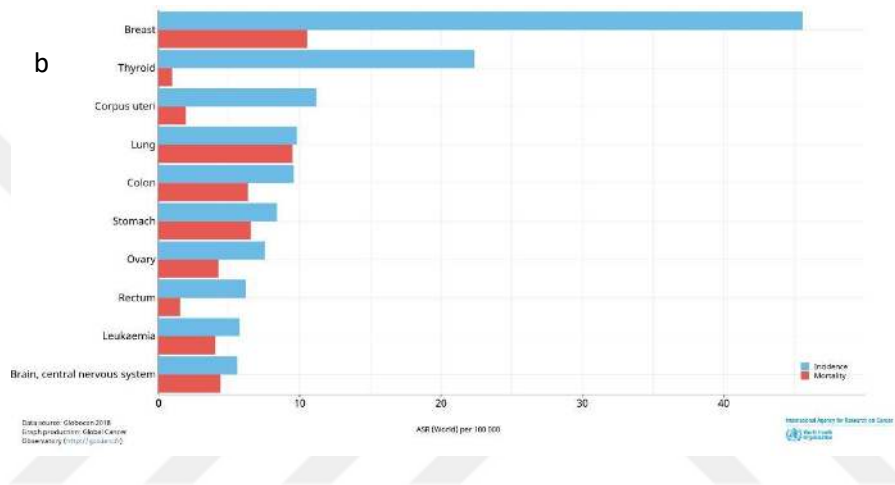
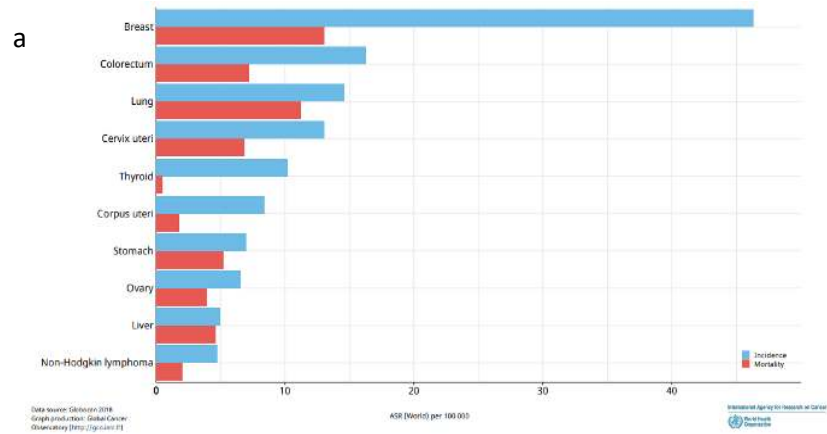
Luminal A ve luminal B gibi alt tiplere sahip olan luminal benzeri tümörler immünohistokimya isimlendirmesini kullanarak her biri sırasıyla,[ER + | PR +] HER2- (ER veya PR bulunduran ve HER2 bulundurmeyen tümörler) ve [ER + | PR +] HER2 + (ER veya PR bulunduran ve ayrıca HER2 ‘da bulunduran tümörler) alt tipini temsil eder (Vallejos vd. 2010). Luminal B tümörlerinde bazı durumlarda HER2 bulunur (Cheang vd. 2009). ER ile ilişkili genlerin ifadesi luminal A tümörlerinde daha yüksektir. Proliferatif genlerin ifadeleri ise luminal B kanserlerinde daha düşüktür (Dai vd. 2015) (Çizelge 1.1). Genellikle iyi prognoza sahip olan luminal alt tiplerinde luminal B, luminal A’ya oranla daha kötü prognoz göstermektedir (Sorlie vd. 2003).

Meme kanserinde HER2'nun aşırı ifadesi kötü prognoz gösterir (Sotiriou vd. 2003). Ayrıca luminal meme tümörlerinden anlamlı derecede daha yüksek klinik tedavi cevabına sahiptirler (Brenton vd. 2005).

Bazal alt tip, triple negatif de denilen ER-/PR-/HER2- tümörlerinden oluşmaktadır. Triple negatif tümörler normal meme miyoepitelyal hücrelerini ve vücutta bulunan diğer bölgelerdeki bazal epitel hücrelerin ifade paternlerini taklit eder (Perou vd. 2000). Ayrıca bu ifade paternlerinde proliferasyonla bağlantılı genlerin ve EGFR gibi bazal markırların yüksek oranda ifadesi bulunmakla beraber hormon reseptörleri ve HER2 düşük ifade gösterirler (Sotiriou vd. 2003).

Triple negatif vakaların %60 'la %90'ını oluşturan bazal tümörler agresif klinik süreci ve standart tedaviden yoksun olduklarından ilgi çekicidir (Dai vd. 2015). Bu grup tümörler çok hızlı büyürler (Ho-Yen vd. 2012).

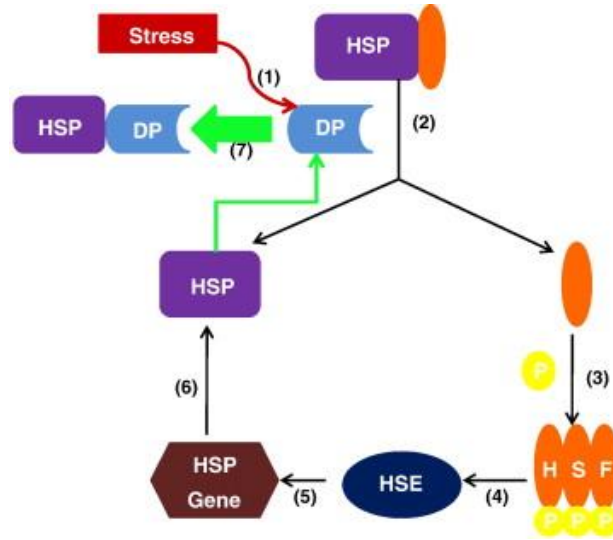
Meme kanseri, dünya genelinde ve Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen kanserdir ve kanser ile ilişkili ölümlerde birinci sıradadır (Bray vd. 2018) (Şekil 1.2). Bu yüzden meme karsinogenezinde önemli olan yeni genlerin belirlenmesi, meme kanserini daha iyi şekilde kavramak, meme kanserinin tedavisine veya tanısına yönelik araştırmalar açısından önemlidir. Isı Şoku Proteinleri (heat-shock proteins, HSP) bu noktada önemlidir. (Cho 2007; Khalil vd. 2011).



Şekil 1.2 2018 yılında tüm yaştaki kadınların dünya genelindeki (a) ve Türkiye'deki (b) kanser görülme sıklıkları (mavi bar) ve ölüm oranları (kırmızı bar) (Bray vd. 2018).

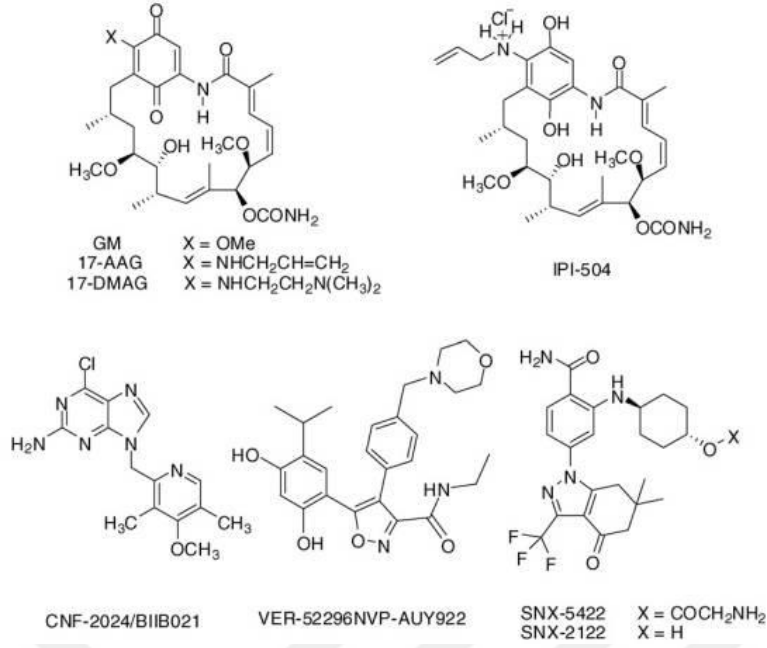
1.1 HSP

Sıcaklık, UV, çeşitli kimyasallar, viral ajanlar ve karsinojenler gibi çeşitli çevresel ve metabolik stres koşulları ile birlikte HSP'lerin hücrelerdeki sentezlenmeleri artar. Ayrıca HSP'ler türler arasında oldukça korunmuş, geniş bir protein ailesidir (Khalil vd. 2011) (Şekil 1.3). Moleküler şaperon olarak çalışan HSP'lerin; hücre proteinlerinin stabilitesini sağlamak, proteinleri doğru katlamak, hasara uğramış olanların tamirinde ve yeni sentezlenmiş proteinlerin son katlanmaları, parçalanmaları veya tamiri için gerekli organelle iletmek gibi görevleri vardır. (Mitra vd. 2009). Normal koşullar altında da ifade olan HSP'ler, hücre fonksiyonları olan hücre döngüsü düzenlenmesi, apoptoz, bağışıklık, yazılım aktivasyonu ve sinyal iletimiyle de alakalıdır (Jäättelä 1999) (Kuhn vd. 2006).



Şekil 1.3 Denatüre proteinlerin (DP) HSP aktivasyon ve onarım mekanizması (Khalil vd. 2011).

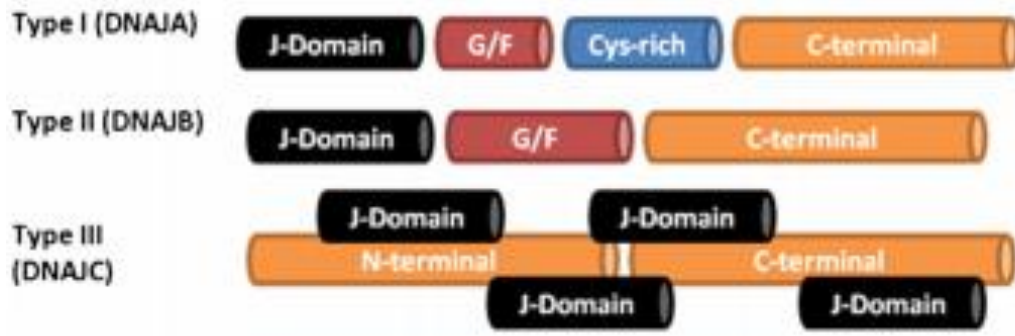
HSP'lerin kanserleşmede de fonksiyonları vardır ve bu sebeple son yıllarda yayımlanan çok sayıda çalışma HSP'leri diagnostik/prognostik biyobelirteç olarak veya anti-kanser ilaç hedefi olarak önermiştir. Örneğin erken teşhiste kullanılabilecek biyobelirteçler olarak; HSP27 hepatoselüler karsinomada (Lee vd. 2005) ve glioblastomada (Khalil ve James 2007); HSP90 hepatoselüler karsinoma (HK)'da (Sun vd. 2010); HSP60 meme kanserinde (Bini vd. 1997) öngörülmüştür. Bazı HSP şaperonları kanserlerde fazla ifade olur. Bu yüzden bunların, tümörleşmenin ilerlemesi, hücre çoğalması, farklılaşmanın azalması ve metastaz gibi süreçlerde rol alan baskılayıcı ilaçlarla baskılanması ya da diğer anti-tümör ilaçlarla beraber kullanılması üzerine de çalışılmaktadır (Taldone vd. 2008) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 İlerlemiş kanserli hastalarda şu anda klinik değerlendirmede bulunan birkaç HSP90 inhibitörünün kimyasal yapısı (Taldone vd. 2008).

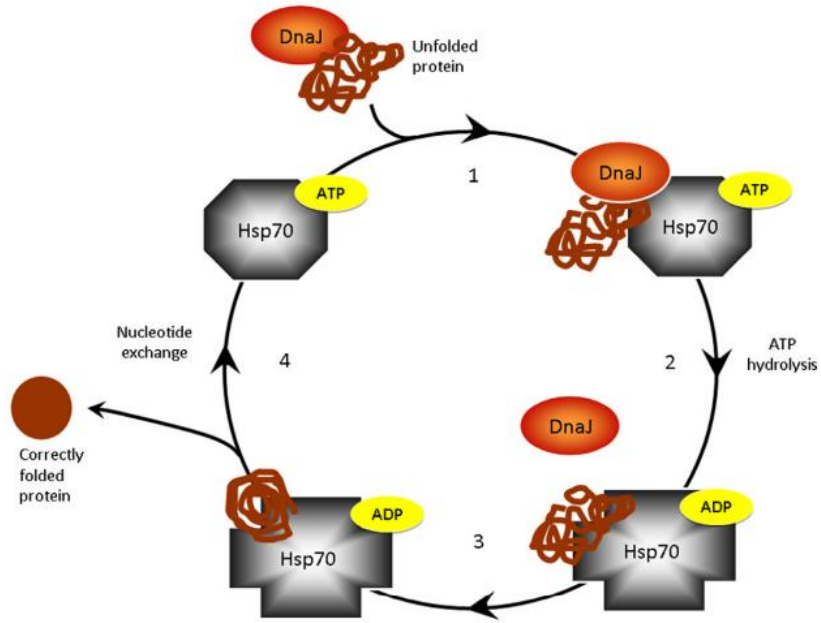
Ancak diğer şaperon ve ko-şaperonlarla (şaperon düzenleyen proteinlerle) birlikte fonksiyon gösteren birçok şaperon proteini bir yandan da multi-protein fonksiyonu gösterir (Freeman ve Morimoto 1996; Whitesell ve Lindquist 2005). HSP70 ve HSP90 gibi şaperonların fonksiyonlarını düzenleyen ve kilit bir role sahip olan ko-şaperonlar bu işi düzenlerken, ya onları uyararak (Felts ve Toft 2003; Wall vd. 1994) ya da diğer şaperonları aktif multi-şaperon kompleksine toplayarak yapar (van der Spuy vd. 2001).

49 üyeyle en geniş HSP alt ailesine sahip olan DNAJ (HSP40) ko-şaperon proteinleri ayrıca 3 alt-sınıfla en çeşitlilik gösteren HSP alt-ailesi olma özelliğine de sahiptir. HSP70 ve HSP90 şaperonları DNAJ ko-şaperon proteinleri tarafından sırasıyla doğrudan ya da dolaylı olarak düzenlenir (Sterrenberg vd. 2011) (Şekil 1.5). Üstelik, DNAJ proteinlerinin HSP70 şaperonlarından ayrı olarak “şaperon gibi” aktivite gösterdikleri de düşünülmektedir (Hageman vd. 2010).



Şekil 1.5 DNAJ'ların sınıflandırılması ve fonksiyonel bölgeleri (Sterrenberg vd. 2011).

DNAJ proteinlerinin “J” bölgesi türler arasında oldukça korunmuştur ve bu bölge HSP70 ile bağlantıda ve HSP70’in ATPaz kısmını uyarmada en büyük rolü üstlenir. HSP70’in ATPaz kısmı uyarılarak ATP ADP’ye hidrolize olur ve böylelikle HSP70’in ulaklarına bağlanma gücü ve yatkınlığı oldukça artar. Bu süreç sonunda da stabil bir HSP70-Ulak kompleksi oluşur (Sterrenberg vd. 2011) (Şekil 1.6). DNAJ proteinlerinin her biri bulundurduğu J bölgesine göre hem belirli HSP70 proteinlerine hem de bu proteinlerin belirli ulaklarına bağlanır. Dolayısıyla, DNAJ proteininin çeşidine göre HSP70 şaperonu ve HSP70 yolağına girecek olan ulak belirlenmektedir. 49 DNAJ ve 13 HSP70 vardır ve bu yüzden DNAJ’ların farklı HSP70 şaperonlarına ve bunların değişik ulaklarına bağlanması spesifik bir şekilde olur. Bu özgünlüğü artıran bir diğer etken ise DNAJ proteinlerinin hücre içindeki yerleşimleridir (Sterrenberg vd. 2011).



Şekil 1.6 HSP70-DNAJ kompleksinden önerilen şaperon destekli protein katlama modeli (Sterrenberg vd. 2011).

Bilimsel çalışmalar artan bir ilgiyle DNAJ ko-şaperon proteinlerinin kanserleşmedeki rollerine, biyobelirteç ve kanser ilacı hedefi olma potansiyellerine odaklanmaktadır (Sterrenberg vd. 2011). Kanserleşme ve metastazla alakalı olan DNAJ proteinleri etkileşimde olduğu proteinlerin işlevine göre ya kanser gelişimini tetikler ya da baskılar (Sterrenberg vd. 2011) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Kanseri gelişimi ve metastazında rol oynayan insan DNAJ izoformlarından bazıları (Sterrenberg vd. 2011).

DNAJ	Alternatif İsim	Kötü Huylu Doku	İşlev
DNAJA1	HDJ2	Glioblastom Prostat	Radyoterapiye dirençli ve maligniteyle ilişkili ifade
DNAJA3	TID-1 Melanoma Breast Kidney Haematopoietic	Osteosarkom	NF-Jb sinyal regülasyonu [apoptoz ve migrasyon / metastaz düzenleme], c-Met tirozin kinaz sinyalizasyonunun regülasyonu [Hücre migrasyonunun regülasyonu] ve onkojenik STAT5b'nin inhibisyonu [hücre büyüme regülasyonu]
DNAJB6	MRJ	Meme	Wnt sinyal yolağının inhibisyonu yoluyla göç, istila ve tümör oluşumunu engeller
DNAJB11	ERDJ3	KSHV-Yumurtalık ile ilişkili Tümörler	Paklitaksele dirençli yumurtalık kanserinde upregüle ifade
DNAJC9	JDD1, DJC9	Servikal	Metastatik ve metastatik olmayan tümörlerde upregüle ifade
DNAJC10	ERDJ5	Nöroblastom	Aşırı ifade, hücreleri ER stresine bağlı apoptoza duyarlı hale getirir.

1.2.1 DNAJA1

Kemoterapiler için biyobelirteç veya ilaç hedefi olarak düşünülen Isı Şoku Protein'lerinden (Khalil vd. 2011; Wu vd. 2007) biri olan HSP40'ın bir üyesi durumundaki *DNAJA1* (HDJ2)'in

kanserle olan ilişkisi farklı çalışmalarla belirtilmiştir. *DNAJA1*, Bcl-2 gen ailesine üye olan BAX'in sitozolden mitokondriye translokasyonunu inhibe ederek NO-aracılı apoptozu engeller (Gotoh 2001, 2004). MDA-MB-231 ve BT-474 birer insan meme kanseri hücre hattıdır. Anti-tümör ajanları olan AZD3409 ve R115777 bu hücre hatlarında *DNAJA1*'in farnesillenmesini engellediği belirtilmiştir. Ancak, bu ajanların anti-onkogenik etkileriyle *DNAJA1* farnesillemesi arasındaki bağıntı açık değildir (Izbicka vd. 2005). *DNAJA1* ifadesinin glioblastoma multiforme hücre hatlarında radyodirenç ile alakalı olduğu belirtilmiştir. *DNAJA1* ifadesi prostat kanserlerinde ilaç (17-AAG) direnci ile ilişkilidir (Nguyen vd. 2018). Ayrıca kanser hücre hatlarında *DNAJA1*'in, mevalonat yolunun aktivasyonu ile kanserin ilerlemesine neden olan CHIP aracılı mutant-p53 bozulmasını önlediği görüşü belirtildi. (Parrales vd. 2016, 2018).

Bu bilgilere zıt olarak normal sağlıklı hücelere kıyasla *DNAJA1*'in pankreas kanseri hücrelerinde downregüle edildiği belirtilmiştir (Crnogorac-Jurcevic vd. 2005). Ek olarak *DNAJA1*'in aşırı ifadesinin, pankreas kanseri hücrelerinin sağkalımını düşürdüğü gösterilmiştir (Stark vd. 2014). *DNAJA1* ifadesinin azalmasıyla, glioblastoma hücrelerinin büyümesinde, göç kabiliyetinde ve istilasında bir artış gözlemlenir (Meshalkina vd. 2016).

1.2.2 DNAJA2

DNAJA2 (*CPR3/DNJ3*) geninin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasının baskılanmasında östrojen ayarlı gen ürünü olarak işlev görebileceği belirtilmiştir (Ohlsson vd. 2001). 16q11.2 lokalizasyonunda bulunan *DNAJA2* geni meme kanserlerinde sıklıkla delesyona uğramaktadır (Ellsworth vd. 2008; Gruel vd. 2010). Ayrıca *DNAJA2* proteini, prostat kanserinde androjen reseptör sinyalleşmesinde görevli olan NWD1 proteinine bağlanan proteinlerinden biri olarak gösterilmiştir. NWD1 proteini prostat kanserlerinde ifadesi artan bir proteindir ve NWD1 aşırı ifadesi prostat kanseri hücrelerinde AR endojen seviyelerini arttırmıştır (Correa vd. 2014).

Birbirlerine yapısal olarak benzeyen *DNAJA1* ve *DNAJA2* proteinleri işlevsel olarak farklıdır. C terminalindeki yapısal değişiklikler, işlev için önemli olan N-terminal bölgelerini etkiler (Baaklini vd. 2012). *DNAJA2* geninin paralog genleri olan *DNAJA1*, *DNAJA3* ve *DNAJA4* genleriyle olan benzerlik oranları sırasıyla %57, %26 ve %51'dir (ENSEMBL v100, Zerbino vd. 2018).

Type	Ancestral taxonomy	Ensembl identifier & gene name	Compare	Location	Target %id	Query %id
Ancient paralogues	Animals and Fungi (Opisthokonta)	ENSG00000103423 DNAJA3 DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11808]	- Region Comparison - Alignment (protein) - Alignment (cDNA)	16:4,425,805-4,456,775:1	26.25 %	30.58 %
Ancient paralogues	Animals and Fungi (Opisthokonta)	ENSG00000086061 DNAJA1 DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5229]	- Region Comparison - Alignment (protein) - Alignment (cDNA)	9:33,025,273-33,039,907:1	57.18 %	55.10 %
Ancient paralogues	Animals and Fungi (Opisthokonta)	ENSG00000140403 DNAJA4 DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14885]	- Region Comparison - Alignment (protein) - Alignment (cDNA)	15:78,264,086-78,282,196:1	51.41 %	53.16 %

Şekil 1.7 DNAJA2 geninin paralogları (Zerbino vd. 2018).

DNAJA1 ve *DNAJA2*'nin kemo/radyo-direnç mekanizmalarını ve karsinogenezdeki olası rollerini gösteren kanıtlar olmasına rağmen, meme kanserindeki ifadeleri, biyobelirteç potansiyelleri, genetik/epigenetik alterasyonları henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada, *DNAJA1* ve *DNAJA2* genlerinin ifadesi, biyobelirteç potansiyeli ve genetik/epigenetik değişiklikleri meme kanseri hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerinde analiz edilmiştir.



BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Hücre Hatları ve Klinik Örnekler

- BT-20 Hücre Hattı
- MDA-MB-231 Hücre Hattı
- SK-BR-3 Hücre Hattı
- ZR-75-1 Hücre Hattı
- MCF 10A Hücre Hattı
- İnsan Meme Kanseri Doku Mikrodizileri (Biomax Inc. Rockville, MD, USA)
 - Katalog No: BR243z (klinik örnek sayısı: 3 Tümör, 3 Normal)
 - Katalog No: BC081116b (klinik örnek sayısı: 100 Tümör, 10 Normal)
 - Katalog No: BR486 (klinik örnek sayısı: 16 Tümör, 16 Normal)

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 DNA İzolasyonu

Moleküler alt tip bilgileri Çizelge 2.1’de belirtilmiş olan ve Doç. Dr. Işık Yuluğ (Bilkent Üniversitesi, Ankara) tarafından sağlanan BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 meme kanseri hücre hatları ve MCF 10A non-tümörijenik meme hücre hattı, ATCC (American Type Culture Collection) talimatlarına göre büyütülüp, hücrelere ait pelletlerden GeneAll® Exgene TM Blood SV Mini (Kat No: 105-101) kiti protokolü uygulanarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarının moleküler alt tip bilgileri (Kao vd. 2009) (ATCC; www.lgcstandards-atcc.org).

Hücre Hattı	Alt Tip	ER	PR	HER2	Tumorijenite	Hastalık
BT-20	Bazal A	-	-	-	Evet	Karsinoma
SK-BR-3	Luminal	-	-	+	Evet	Adenokarsinoma
MDA-MB-231	Bazal B	-	-	-	Evet	Adenokarsinoma
ZR-75-1	Luminal	+	-	-	Evet	Duktal Karsinoma
MCF 10A	Bazal B	-	-	-	Hayır	Fibrokistik Hastalık

İlk olarak 1.5 ml’lik 5 adet mikrosantrifüj tüplerinin içine 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi. Daha sonra her bir hücre hattına ait 200 µl’den daha az pellet 5 tüpe ayrı ayrı aktarıldıktan sonra 1x PBS ile 200 µl’ye tamamlandı. 200 µl BL buffer eklenip karışım elde edilmiş tüpler Nüve NM 110 cihazında vortekslendikten sonra 56°C’de 10 dakika inkübe edildi. Herhangi bir damla kalması durumuna karşı tüpler spin cihazında spinlendi. Ardından 200 µl saf etanol numunelere eklendikten sonra vortekslenip tekrar spin atıldı.

Karışım dikkatlice SV kolonlarına transfer edildikten sonra 6,000 x g üzerinde (>8,000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüj edildi ve var olan tüpler yenisiyle değiştirildi. Bu yeni tüplere 600 µl buffer BW’yi eklenip 6,000 x g üzerinde (>8,000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra yine var olan tüplerin yenisiyle değiştirilmesinin hemen akabinde üzerine 700 µl TW buffer’ını uygulayıp 6,000 x g üzerinde (>8,000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüj edilip doğrudan geçenler diskard edildikten sonra SV kolonları var olan tüplerin içine tekrar sokuldu.

Ardından yıkama buffer'ının tamamen uzaklaşması için en yüksek hızda santrifüj yapıldı. Bu sırada SV kolonları 1.5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Yeni tüplere 200 µl AE buffer eklenip oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 1 dakika boyunca da en yüksek hızda santrifüjlendi. İzolasyon sonunda Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen) cihazı kullanılarak 5 hücre hattına ait konsantrasyon miktarları belirlendi.

Konsantrasyon belirleme aşamasında standartlar için 2 tüp ve her hücre hattı için 5 tüp alındı. Qubit reaktifi, 1:200 oranında dilüsyon yapılacak şekilde 7,5 µl Qubit reagent, 1492,5 µl Qubit working solution tüpünde hazırlandı. Kontrol amaçlı bulunan kitteki standartlardan 10'ar µl iki tüpe aktarıldıktan sonra 190 µl working solution eklenerek iki tüpün son hacmi 200 µl'ye tamamlandı. Her hücre hattındaki numuneler 10'ar µl 5 tüpe dağıtıldıktan sonra son hacim working solution ile 200 µl'ye tamamlandı. Tüpler 2-3 defa vortekslenip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra ölçüm yapıldı. Ek A.1'de belirtilen ve ölçümü yapılan tüpler buzdolabında -20°C'ye kaldırıldı.

2.2.2 RNA İzolasyonu

RNA'lar, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 meme dokusu tümörijenik hücre hatları ve MCF 10A meme hücre hatlarından RNeasy Mini Kit (Kat. No: 74104) (Qiagen, Almanya) protokolüne göre ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce RNaz'lardan korunmak için 1 ml Buffer RLT'ye 10 µl β-mercaptoethanol eklendi. Daha sonra working solution oluşması adına bunların üzerine oranı 4 hacim %96-100 olan ethanol eklendi. Hücre homojenizasyonunu sağlamak için her bir hücre hattına 600 µl Buffer RLT eklendi. Ardından bu tüplere 1 hacimlik %70'lik ethanol eklenerek pipetlenip, bu tüplerdeki örnekleri RNeasy Mini spin kolonlarına aktarılıp, 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Kolondan akanlar diskard edildi. Yine 8000 g'de sırasıyla 700 Buffer RW1 eklenerek 15 sn, 500 Buffer RPE eklenerek 15 sn ve 500 µl Buffer RPE eklenerek 2 dk santrifüj işlemi uygulandı. Uygulama ardından yeni tüplere geçildi ve membranların üzerine 50 µl RNase-free su eklenerek 8000 g'de 1 dk boyunca RNA ayrıştırılması yapıldı. RNA cleanup işleminde; tüpler sırasıyla 100 µl RNase-free su ve 500 Buffer RLT ile mixlendi. Ardından seyreltilmiş RNA'lara 250 µl %96-100 olan ethanol eklenerek pipetaj yapıp, örnekler yeni kolonlara aktarılıp 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Kolondan akanlar diskard edildi. Hemen ardından bu kolonlar 8000 g'de 15 sn 500 Buffer RPE ve 8000 g'de 2dk 500 Buffer RPE ile spinlenerek membrandan kalanlar yıkandı. Yeni tüplere geçildi ve membranların üzerine 50 µl RNase-free su eklenerek 8000 g'de 1 dk RNA

ayrıştırılması yapıldı. İzolasyon ardından RNA'ların ThermoFisher Multiskan cihazı ile ölçümü yapıldı (Ek A.1).

2.2.3 cDNA Sentezi

İzole edilmiş RNAlar, One Script Plus cDNA Sentez Kiti (Kat. No: G236) (Abm, Canada) kullanılarak cDNA'yı sentezlemek için kullanıldı. Her hücre hattından aynı miktarda (750 ng) total RNA kullanıldı (EK A.1) ve 5 tüpe ayrı ayrı sırasıyla RNA, oligodT, dNTP ve Rnase free sular eklendi. 65°C'de 5 dakika inkübe edilip, 1 dakika tüpleri beklettikten sonra sırasıyla tüplere 4 µl 5x RT Buffer, 0.5 µl RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor ve 1 µl OneScript Plus RTase eklendi. Hemen ardından tüplere 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika EN 500 Nüve inkübatör cihazında inkübasyon uygulandıktan sonra elde edilen komplementer DNA'lar buzdolabında -20°C'ye kaldırıldı.

2.2.4 Bisülfite Modifikasyonu

Genomik DNA'nın bisülfite ile modifikasyonunda metillenmemiş tüm sitozinler kimyasal reaksiyonla urasile dönüşür. Metillenmiş olan sitozinler ise reaksiyon süresince değişmeden kalır. Dönüşüm işlemi bittikten sonra DNA PCR ile amplifiye edilip COBRA yöntemi ile metilasyon statüsü belirlenir (Li ve Tollefsbol 2011; Acun vd. 2017). Bisülfite modifikasyonu, EpiJET Bisülfite Conversion Kit (Thermo Scientific, Kat No: K1461) kullanılarak yapıldı. Yöntem kısaca şu şekildedir:

Protokol aşamasında; bisülfite modifikasyonu için 600 ng DNA kullanıldı (Ek A.1), sonra hacimler 20 µl'ye tamamlandı. 20 µl hacimli tüplerin üzerine 120 µl önceden hazırlanan modification reagent eklenip hafif bir pipetaj yapıldı. Kapak sıcaklığı 75°C'ye ayarlanan BioRad T-100 cihazında tüpler, DNA'nın denatürasyonu ve bisülfite dönüşümü için 98°C'de 10 dakika ve 60°C'de 2,5 saat bekletildi. Bekleme süresinin ardından 5 hücre hattı için kitte bulunan kolonlara 400 µl binding buffer eklenildikten sonra pcr tüplerinde her bir hücre hattı için 140 µl'lik hacim bu beş kolona sırasıyla aktarılıp, pipetleme yapıldı. Kolonlar Nüve NF 048 santrifüj cihazında 12.000 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi, kolondan akanlar diskard edilip kolon tüpleri kolona tekrar yerleştirildi. Ardından kolonlara 200 µl wash buffer

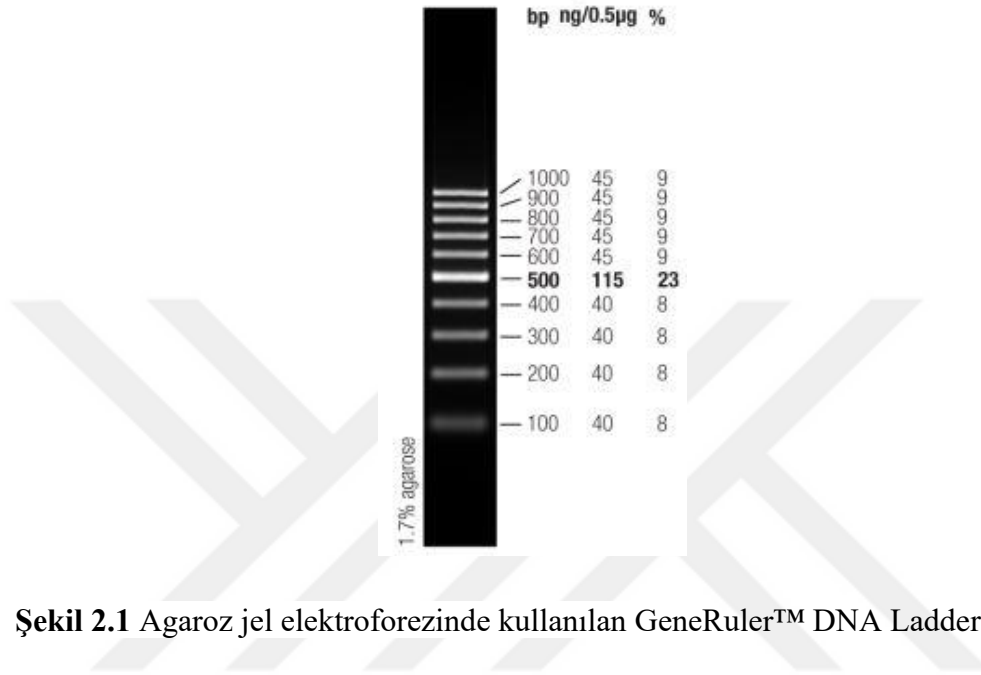
eklenildi ve aynı rpm ve saniye boyunca santrifüj işlemi uygulanıp, kolondan akanlar diskard edilip, kolon tüpleri kolona tekrar yerleştirildi. 200 µl desulfonation buffer eklendikten sonra oda sıcaklığında 20 dakika beklenilip, 12.000 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüj yapıldı ve kolondan akanlar diskard edilip kolon tüpleri kolona tekrar yerleştirildi. Sonraki iki aşama olan wash buffer aşamasında her iki adımda da santrifüj 12.000 rpm’de yapıp ilk aşamada 30 saniye beklenip kolondan akan sıvı diskart edilirken ikinci aşamada 60 saniye beklenilip içinde akmış solüsyon bulunan tüpler atıldı. Elution aşamasında kolonların altı için 1.5 ml’lik tüpler kullanılıp bu aşama 15+7 µl şeklinde 12.000 rpm’de 30 saniye boyunca iki defa tekrarlandı. Bisülfite çevrilmiş DNA’lar COBRA analizleri için hazır hale getirilmiş olup buzdolabında -20°C’de saklanıldı.

2.2.5 PCR

Metilasyon analizi için Bisülfite Nested PCR’a başlamadan önce liyofilize halde teslim alınan ve özellikleri Ek A.2’de belirtilen *DNAJA1* ve *DNAJA2* bisülfite primerlerini 100 µM derişimli stok haline getirebilmek için TE buffer ile pipetaj yardımı ile çözündürüldü. TE buffer ile çözülmüş primerler -20°C’ye kaldırılmadan önce alikotlanmak üzere molecular biology grade ile 100 µM’dan 10 µM’a seyreltilti. Ardından bu primerlerle Bisülfite Nested PCR uygulandı. Burada 2 set primer çifti kullanılmış olup, 1. PCR ürünü, 2. PCR’da kalıp olarak kullanıldı.

Promotor bölgesi mutasyon incelemesi için yapılan PCR’a başlamadan önce liyofilize halde teslim alınan ve Ek A.3’te belirtilen *DNAJA1* ve *DNAJA2* promotor bölgesi primerlerini 100 µM derişimli stok haline getirebilmek için primerler TE buffer ile pipetaj yardımı ile çözüldü. TE buffer ile çözülmüş primerler -20°C’ye kaldırılmadan önce alikotlanmak üzere DNaz ve RNaz içermeyen su ile 100 µM’dan 10 µM’a seyreltilti. Ardından, BioRad T-100 ve Techne (Prime) cihazı kullanılarak yapılan PCR’ların koşulları Ek A.3’te de belirtilen *DNAJA1* ve *DNAJA2* genleri için sırasıyla 59°C ve 60°C bağlanma sıcaklığında 35 cycle olarak ayarlanıp, amplifiye işlemi uygulandı. PCR amplifikasyonundan sonra ürünler jelle yüklenmeden önce yapılan hazırlıkta; % 1,5’luk olacak şekilde, hassas terazide (Dikomsan) tartılan toz halindeki agaroz ve 1x TAE tamponu karışımının mikrodalga fırında belli bir ısıda polarize haline getirilmesiyle oluşan jelle, soğumasına yakın 2 µl etidyum bromür eklenerek üzerine tarak yerleştirilmiş kasete döküldü ve bir süre katılaşmaya bırakıldı. Katılaşmış olan jel 1x TAE tamponuyla doldurulmuş agaroz jel yürütme tankına alındı ve jeldeki taraklar çıkarıldı. Şekil

2.1’de gösterilmiş olan markırı yüklemenden önce; 75 µl hacimli 5 hücre hattı ve 1 negatif kontrol reaksiyon tüplerinin 5 µl’si 1 µl 6X loading dye (Thermo Scientific, Kat no: R0611) ile beraber mikropipet yardımıyla agaroz jele yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra Thermo Scientific güç ünitesi çalıştırılarak 120 voltta 25 dakika boyunca yürütüldü. Sonuçlar jel dökümantasyon cihazında (Vilber Lourmat) analiz edildi.



Şekil 2.1 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

2.2.6 Q-RT-PCR, Semi Kantitatif RT-PCR

DNAJA1 transkriptinin nispi kantifikasyonu, üreticinin talimatlarına (CF-Rad Laboratories, Inc., CA / ABD) göre CFX96 Touch™ Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi üzerinde iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Kat. No: 1725120) ile yapıldı. TBP (TATA kutusu bağlayıcı protein) geni, bir iç kontrol olarak kullanıldı (Gur-Dedeoglu vd. 2009). Primer olarak Ek A.4’teki primerler kullanıldı. *DNAJA1* transkriptinin nispi seviyeleri, karşılaştırmalı CT metodu (2-ΔΔCT metodu) ile ölçülmüştür (Livak ve Schmittgenş 2001). İstatistiksel analizler Student’ın t testi ile yapıldı.

Semi kantitatif olarak RT-PCR’da Ek A.4’teki primerler kullanıldı ve TBP gen ifadesinin agaroz jeldeki bant yoğunluklarına bakılarak, 2. jelde hücre hatlarındaki TBP ifadeleri eşitlenecek hacimlerde PCR ürünü yüklendi. Bu şekilde meme hücre hatlarındaki *DNAJA2* mRNA ifadesi semi-kantitatif olarak belirlenmiş oldu.

2.2.7 İmmünohistokimya (IHC)

Doku mikrolaka teknolojisi, formalinle fikslenmiş parafine gömülmüş çok farklı tümör derecesine ve Tümör-Nod-Metastaz (TNM) değerine sahip doku örneklerinin tek bir lam düzlemi üzerine tespiti. Bu teknolojiyle aynı anda birçok örnekle immünohistokimya çalışması yapılabilmesinin yanı sıra bu teknoloji uzun zamandan beri gen ifade analizi ve biyobelirteç tayini gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Kononen vd. 1998; Thomson vd. 2009).

Protein ifadesi incelemesi için invaziv meme karsinomu örnekleri içeren ticari mikrodizilerinin (TMA) kullanılmıştır. TMA'ların bilgi formları Ek A.5 ve Ek A.6'da belirtilmiştir. IHC çalışması için, Novolink™ Min Polimer Tespit Sistemi Kiti kullanılmıştır (Kat. No: RE7290-K) (Novolink, Inc., CA, ABD). Uygulama kitin talimatlarına göre yapılmıştır. Kısaca bahsetmek gerekirse, boyama prosedürleri sırasında doku kaybını önlemek için TMA'lar gece boyunca 60°C'de heat block cihazında ısıtıldı. Slaytlar her bir aşama şalerlerde gerçeklemek üzere, 20 dakika boyunca ksilen içerisinde inkübe edildikten sonra deparafinize edildi, ardından kademeli bir absolute etanol (Merck) serisinde rehidrasyon (sırasıyla %100-5dk, %100-5dk, %96-5dk, %70-5dk, %50-5dk, dH₂O-10 dk) yapıldı. Kesitler, antijen görünürlüğü için sitrat tamponunda (Bio-Optica, 10mM, pH 6.0) ısıtıldı (Bu işleme "Antigen retrieval" denir). Endojen peroksidazlar kitle birlikte verilen çözeltilerle bloke edildi. TMA'lar 1,5 saat boyunca 4°C'de birincil antikorla (tavşan poliklonal Anti-DNAJA1; Kat. No: 11713-1-AP, tavşan poliklonal Anti-DNAJA2; Kat. No: 12236-1-AP) (Proteintech Group, Inc., IL, ABD) (DNAJA1-dilüsyon 1: 80, DNAJA2-dilüsyon 1: 62) ile inkübe edildi. 30 dakikalık sekonder antikor muamesesinden sonra slaytlar Novolink™ Polimer (Leica Biosystems, Katalog No: RE7290-K) ile 30 dakika inkübe edildi ve 5 dakika boyunca DAB çözeltilisi ile peroksidaz etkinliği artırıldı. Tüm slaytlar bazik bir boya olan hematoksilin ile karşıt boyandı. Dehidrasyon (sırasıyla %50-5dk, %70-5dk, %96-5dk, %100-5dk, %100-5dk, Xylene-10 dk, Xylene-10 dk) ve slaytların uzun süreli kullanımı için fiksasyon aşaması olan DPX muamesesinden sonra hücrelerin immünopozitivitesi (Acun vd. 2015, 2017), iki gözlemci (Furkan Çelebi İleri ve Tolga Acun) tarafından bağımsız olarak değerlendirildi; negatif (skor 0), zayıf pozitif (skor 1), orta pozitif (skor 2) ve kuvvetli pozitif (skor 3). İstatistiksel analizler Fisher Exact Test kullanılarak GraphPad yazılımı ile yapıldı.

2.2.8 Yararlanılan İn-Siliko Araçlar

İn-siliko analizi için *DNAJA1* ve *DNAJA2* genleri EPD (Eukaryotic Promoter Database)'de araştırıldı (Dreos vd. 2014). Promotor bölgeleri ile CpG adalarının örtüştüğü UCSC genom tarayıcısında görüldü (Kent vd. 2002). MethPrimer ve Primer3 programları yardımıyla bisülfıt PCR primerleri dizayn edildi (Li ve Dahiya 2002). BLAST programında bu primer çiftlerinin kontrolü yapıldı.

DNAJA1 ve *DNAJA2*'nin nokta mutasyon ve kopya sayısı varyasyonları Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu (COSMIC) (v91) veri tabanında (Forbes vd. 2017) incelendi.

Meme kanseri hastalarında *DNAJA1* ve *DNAJA2* mRNA ifadesinin prognostik değerini değerlendirmek için Kaplan-Meier plot çizici (KM çizici, www.kmplot.com) kullanıldı. KM plotter, seçilen genin ifade seviyesinin prognostik değerini farklı kanser tiplerinde değerlendirebilen çevrimiçi bir hayatta kalma analiz aracıdır. İlgili veritabanlarından toplanan kanser hastalarının gen ifade verilerini ve sağkalım bilgilerini kullanır (Gen Expression Omnibus, ArrayExpress, vb.) (Gyorffy vd. 2010). *DNAJA1* ve *DNAJA2* hayatta kalma analizi için kullanılan prob seti (sırasıyla Affy ID: 200881_at ve Affy ID: 226994_at) yazılım tarafından spesifikliğı, kapsamı ve bozulmaya karşı direnci bakımından seçildi. Numuneler, “Auto select best cutoff” seçeneğı kullanılarak, *DNAJA1* ve *DNAJA2* ifadesine göre yüksek ve düşük olarak ayrılmıştır. Hazard Ratio (Tehlike oranı) (HR), %95 güven aralığı ve log sıralaması p değeri ile yazılım tarafından hesaplandı ve grafikte gösterildi.

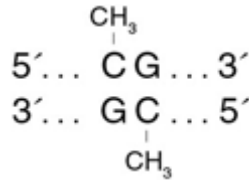
2.2.9 Mutasyon Analizi

EPD veri tabanı ile gösterilen ve deneysel olarak doğrulanmış promotör bölgeleri Ek A.3'te belirtilen primerlerle, doğrudan sekanslama yoluyla mutasyon taraması için kontrol edildi. Mutasyon taraması, Mutation Surveyor V5.1.2 (Demo) yazılım paketi (SoftGenetics, LLC., www.softgenetics.com, USA) kullanılarak yapıldı.

2.2.10 Metilasyon Analizi

2.2.10.1 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Tümör baskılayıcı gen ifadesinin DNA metilasyonu ile susturulmasına ilişkin son raporlar, spesifik gen lokuslarındaki DNA metilasyon seviyelerini ölçmek için doğru, hassas, güvenilir ve kantitatif yöntemlere duyulan ihtiyacı vurgulamıştır. Teknik: bisülfitle muamele edilip, PCR'la amplifikasyon sürecinden geçen genomik DNA'daki DNA metilasyonuna bağlı sekans farklılıklarını ortaya çıkarmak için restriksiyon sindiriminin kullanılabileceğini gösteren bir tekniktir. Spesifik bölgelerdeki DNA metilasyon seviyelerini belirlemek için (Acun vd., 2011, 2015, 2017) kullanılan bu yönteme COBRA (Kombine Bisülfid Restriksiyon Analizi) denir (Xiong ve Laird 1997). COBRA deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere New England Biolabs firmasından temin edilen ve bir *E. coli* suşu *Spiroplasma* sp. MQ1 suşundan izole edilen CpG Metiltransferaz (M. SssI) ile MCF 10A hücre hattına ait genomik DNA metillendi. CpG Metiltransferaz, M.SssI, Şekil 2.2'de belirtildiği gibi çift sarmallı dinükleotid tanıma dizisi 5'... CG ... 3' içindeki tüm sitozin rezidülerini (C⁵) metillemektedir (Renbaum vd. 1990) .



Şekil 2.2 CpG Metiltransferazla (M.SssI) metillenme (URL-1).

- 32 mM stok çözeltisi halinde bulunan SAM (S-Adenozilmetiyonin) 1 µl SAM + 19 µl distile su karışımıyla 1600 µM'a 20 kat seyreltildikten sonra 160 µM'a kadar 10 kat daha dilüye edildi.
- Sırasıyla 10 µl dH₂O, 2 µl 10x buffer, 2 µl SAM, 5 µl DNA ve 1 µl SssI (Metiltransferaz) bir tüpe alındıktan sonra BioRad T-100 cihazında 2 saat boyunca 37°C'de ve 20 dakika 65°C'de inkübe edildi.

DNAJA1 enzim kesiminde, GCG[^]C bölgelerini tanıyan HhaI (Kat No: ER1851) restriksiyon enzimi kullanıldı. *DNAJA2* enzim kesiminde ise T[^]CGA bölgelerini tanıyan TaqI (Kat No: ER0672) restriksiyon enzimi kullanıldı.

2.2.10.2 Metilasyon Analizi İçin İn-Siliko Araçlar

TCGA kohortunda *DNAJA1* ve *DNAJA2* promotor metilasyon verilerini analiz etmek için UALCAN aracı kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017).

DNAJA1 ve *DNAJA2* genlerinin meme hücre hatları ve klinik örneklerinde metilasyon seviyelerini göstermek için Morpheus online aracı kullanılmıştır (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).



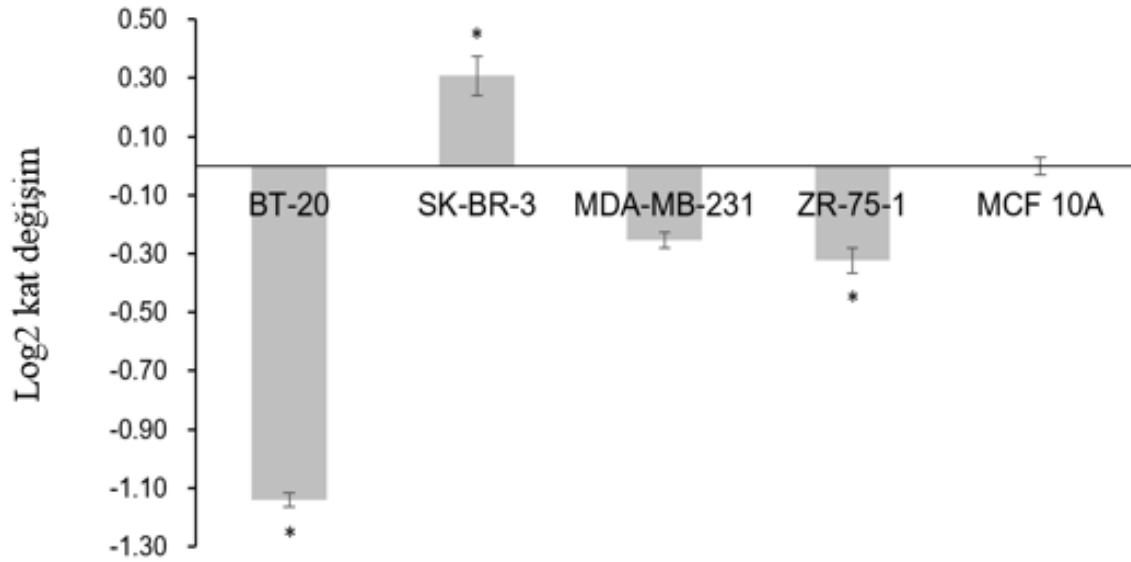
BÖLÜM 3

BULGULAR

3.1 *DNAJA1* GENİ İLE İLGİLİ BULGULAR

3.1.1 Meme Hücre Hatlarında mRNA İfade Analizi

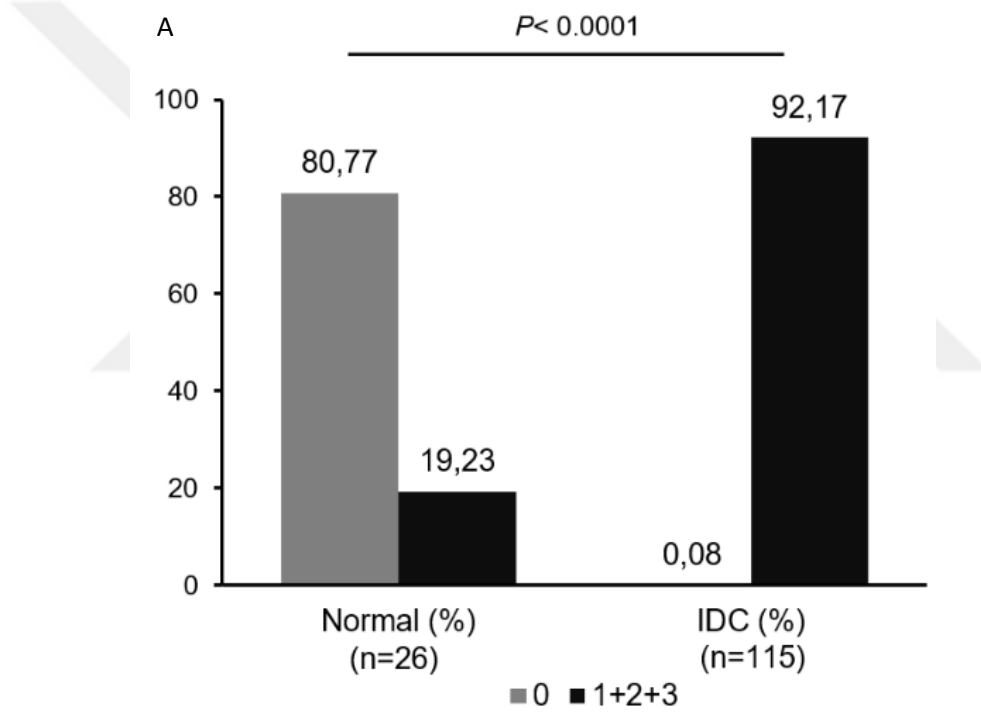
Real-time qRT-PCR sonuçlarına göre, *DNAJA1* mRNA ifadesi, BT-20 hücre hattında tümörijenik olmayan meme hücre hattına (MCF 10A) kıyasla önemli oranda (>2-kat) düşük bulundu. SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarındaki *DNAJA1* transkript seviyeleri, MCF 10A'ya kıyasla 1 kat'dan fazla değişim gösterirken, MDA-MB-231 hücre hattında önemli bir değişim göstermemiştir (Şekil 3.1).



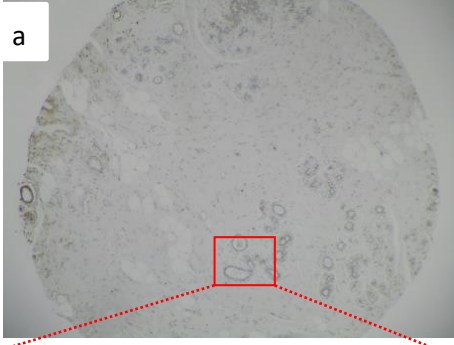
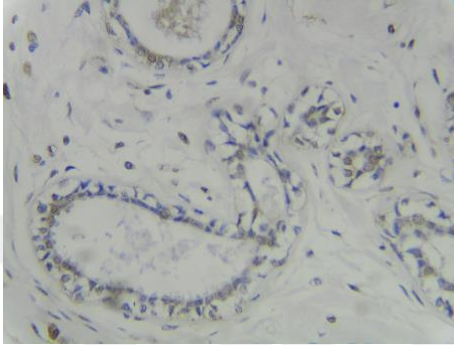
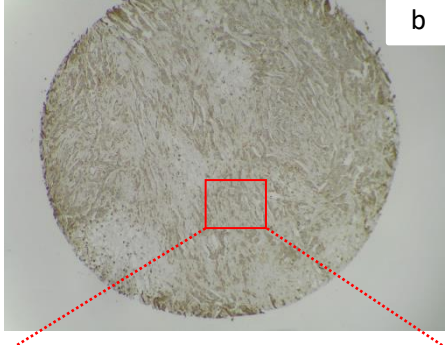
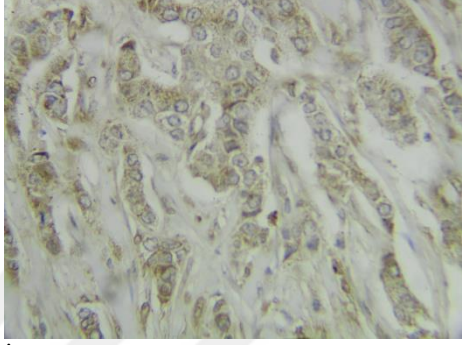
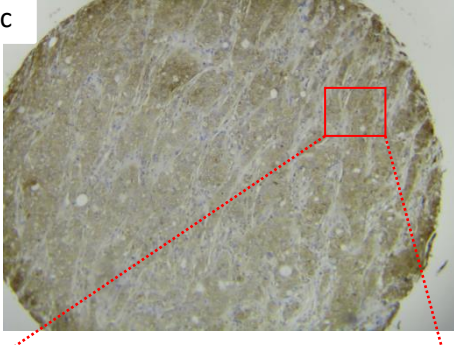
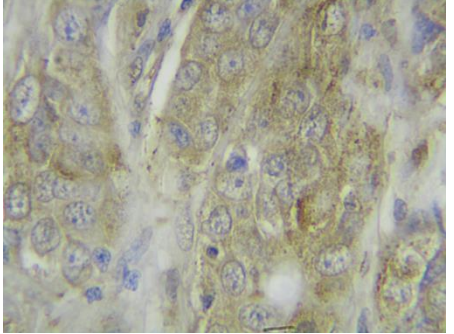
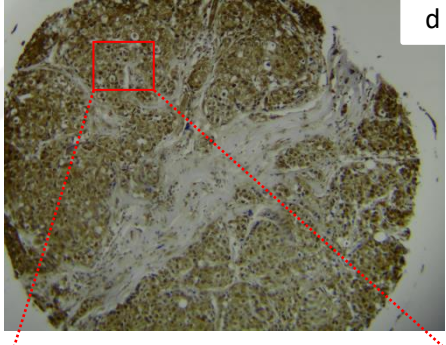
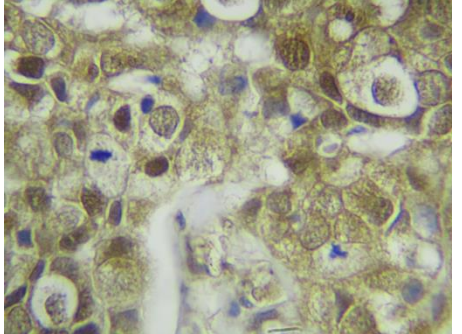
Şekil 3.1 *DNAJA1*'in meme kanseri hücre hatlarında tümörijenik olmayan epitel meme hücre hattına (MCF 10A) göre mRNA ifadesi.

3.1.2 Meme Kanseri Hastalarında Protein İfade Analizi

Meme kanseri klinik örneklerindeki *DNAJA1* protein ifadesi immünohistokimya yöntemi ile incelendi. Örneklerle ait histo-patolojik klinik bilgiler Ek A.5 ve Ek A.6 'da görülebilir. *DNAJA1* protein ifadesi, invaziv duktal karsinoma örneklerinde (n = 115), eş normal meme dokularına (n = 26) kıyasla daha sık görülmektedir ($P < 0.0001$) (Şekil 3.2.A). İmmünboyamaya dair temsili fotoğraflar Şekil 3.2.B'de sunulmuştur. *DNAJA1* protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki ise Çizelge 3.1'de görülebilir. İstatistiksel analiz, *Fisher's exact test yöntemi* ile yapılmış, anlamlılık eşik değeri $P < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



B

a   Komşu normal meme dokusu TMA No: BR486 / Örnek No: C8 Negatif (skor: 0)	b   İnvaziv duktal karsinoma TMA No: BR486 / Örnek No: D3 Zayıf pozitif (skor: 1)
c   İnvaziv duktal karsinoma TMA No: BC081116b / Örnek No: D7 Orta pozitif (skor: 2)	d   İnvaziv duktal karsinoma TMA No: BC081116b / Örnek No: H6 Kuvvetli pozitif (skor: 3)

Şekil 3.2 Meme kanseri klinik örneklerinde *DNAJA1* protein ifadesi A) Invasiv duktal karsinoma (IDC) ve eş normal meme dokusu örneklerinde *DNAJA1* protein ifadesi. İmmünboyama sonuçları *negatif* (skor 0), *zayıf pozitif* (skor 1), *orta pozitif* (skor 2) ve *kuvvetli pozitif* (skor 3) olarak değerlendirilmiş ve örneklerin boyama skorları “0” vs “1 + 2+3” şeklinde gruplanmıştır. B) Ticari doku mikrodizileri ile gerçekleştirilen *DNAJA1* immünohistokimya çalışmasının temsili fotoğrafları. Doku örneklerinde seçilen bölgelerin (kırmızı dikdörtgenler) 400X büyütülmüş fotoları da gösterilmiştir. Normal meme dokusunda ifade yok (a). IDC dokuları doku boyunca zayıf ila güçlü sitoplazmik boyama (kahverengi) gösterir (b, c, d).

Çizelge 3.1 *DNAJA1* protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki.

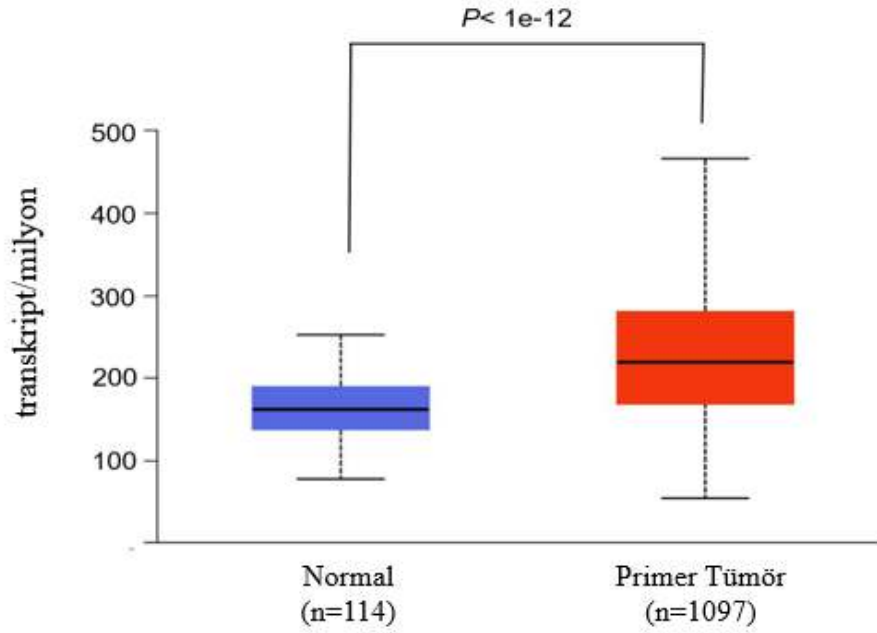
		IHC Skor (0) n (%)		IHC Skor (1+2+3) n (%)
Tümör Evresi	TI	2 (22.22)	<i>P</i> = 0.147	7 (77.78)
	II-IV	7 (6.60)		99 (93.40)
	TI-II	5 (5.43)		87 (94.57)
	III-IV	4 (17.39)		19 (82.61)
			<i>P</i> = 0.0773	
Lenf Nodülü Evresi	N0	7 (7.53)	<i>P</i> = 0.6814	86 (92.47)
	NI-III	2 (9.09)		20 (90.91)
Sınıf	GI	0 (0)	<i>P</i> = 0.6018	16 (100)
	GII-III	8 (8.70)		84 (91.30)
Evre	SI	2 (25)	<i>P</i> = 0.1193	6 (75)
	SII-SIII	7 (6.54)		100 (93.46)
HER2	Negatif	4 (7.40)	<i>P</i> = 0.7262	50 (92.60)
	Pozitif	4 (9.52)		38 (90.48)
PR	Negatif	5 (10.20)	<i>P</i> = 0.4361	44 (89.80)
	Pozitif	2 (4.26)		45 (95.74)
ER	Negatif	3 (9.37)	<i>P</i> = 0.6827	29 (90.63)
	Pozitif	4 (6.25)		60 (93.75)

3.1.3 *DNAJ1* Geninin Meme Kanseri Örneklerinde İfade ve Sağ-Kalım Analizi

Sonuçları

3.1.3.1 UALCAN Aracı İle Yapılan İfade Analizi Sonuçları

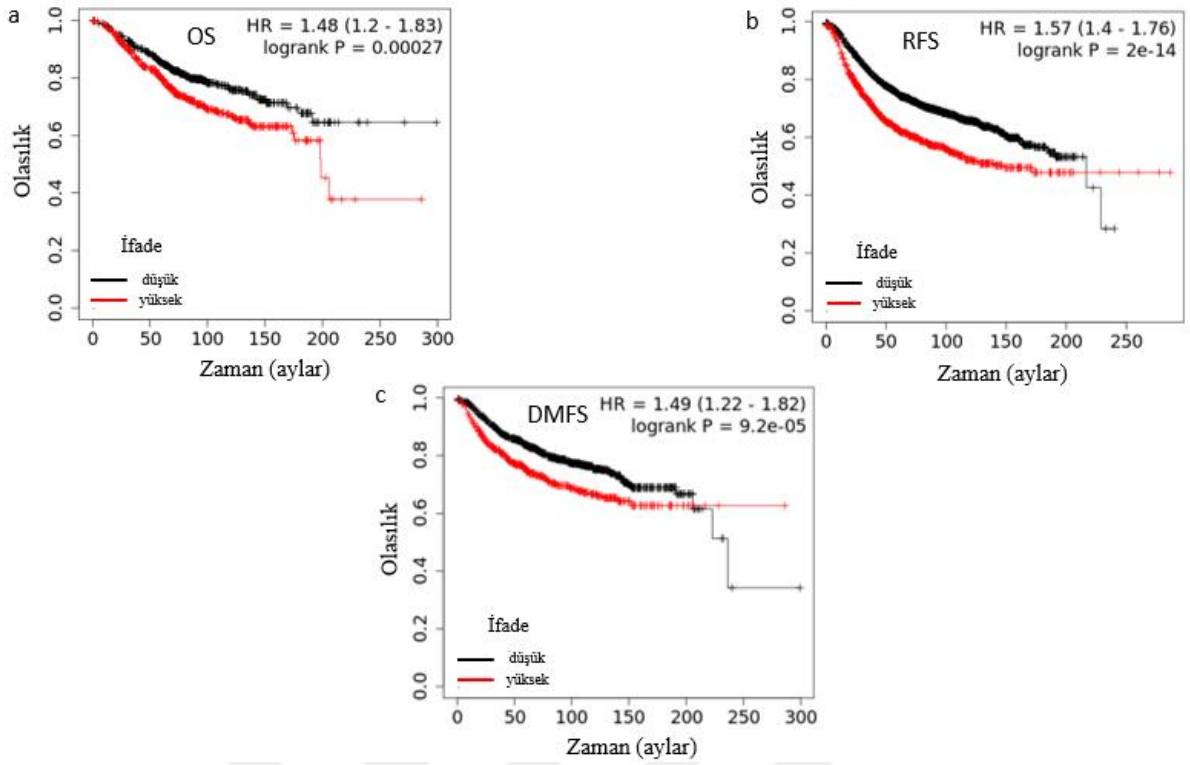
UALCAN web aracına göre *DNAJ1* mRNA ifadesi, meme kanseri örneklerinde normal örneklere göre anlamlı derecede yüksektir ($P < 1e-12$) (Şekil 3.3) (Chandrashekar vd. 2017).



Şekil 3.3 *DNAJ1*'in klinik meme kanseri örneklerinde ve normal örneklerdeki ifadesi. UALCAN web aracı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017).

3.1.3.2 KM-Plotter Aracı İle Yapılan Sağ-Kalım Analizi Sonuçları

Meme kanserinde *DNAJ1* mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerlerine bakıldığında; *DNAJ1* ifadesi yüksek olan meme kanseri hastalarının Overall Survival (Tam sağ kalım, n=1402), Relapse Free Survival (Nüksetmeden Sağ kalım, n=3955), Distant Metastasis Free Survival (Uzak Metastaz Olmadan Sağ kalım, n=1747) oranları, ifadesi düşük olan hasta grubuna göre anlamlı oranlarda düşüktür (Şekil 3.4) (Affy ID: 200881_at) (Gyorffy vd. 2010).



Şekil 3.4 Meme kanseri hastalarında *DNAJA1* mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerleri.
a) OS b) RFS c) DMFS

3.1.4 *DNAJA1* Geninin Genetik Alterasyonları

3.1.4.1 Meme Kanseri Hastalarındaki Nokta Mutasyon ve Kopya Sayısı Değişimleri

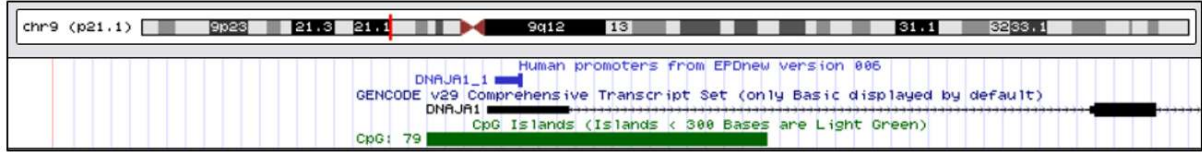
DNAJA1'in genetik değişiklikleri Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu (COSMIC) veri tabanında (v91) arandı ve meme kanseri örneklerindeki genetik alterasyonların çok nadir olduğu (<%1) gözlemlendi (Forbes vd. 2017) (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 *DNAJA1* geninin Sanger-COSMIC veritabanında genetik alterasyonu (Forbes vd. 2017).

Mutasyonlu Örnekler/Test Edilen Örnekler (Mutasyonlu Örneklerin Yüzdesi)	
Nokta Mutasyonları	20/2580 (% 0.78)
Kopya Sayısı Varyantları	1/1492 (% 0.07)

3.1.4.2 Meme Hücre Hatlarında Promotor Mutasyon Analizi Sonuçları

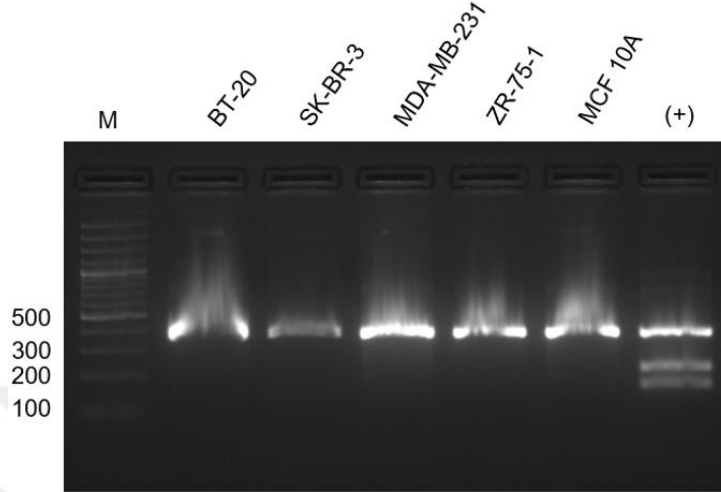
UCSC genom tarayıcı (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>) ve EPD veri tabanı (<https://epd.epfl.ch//index.php>) kullanılarak, *DNAJA1* geninin promotor bölgesinin (*DNAJA1_1*, açık mavi) ve CpG adasının (yeşil) çakıştığı görüldü. Fotoğrafta, *DNAJA1* geninin ilk eksonu (siyah) gösterilmektedir (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 EPD veri tabanı ve UCSC genom tarayıcısına göre *DNAJA1* geninin promotor bölgesi CpG adası ile çakışmaktadır. UCSC genom tarayıcısı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002).

DNAJA1 geninin promotör bölgesi (Şekil 3.5) doğrudan sekanslama yoluyla mutasyonlar için analiz edildi. Mutasyon taraması, Mutation Surveyor V5.1.2 (Demo) yazılım paketi (SoftGenetics, LLC., www.softgenetics.com, USA) kullanılarak yapıldı. Şekil 3.6 ‘da görüldüğü gibi SK-BR-3 hücre hattında *DNAJA1*’in promotor bölgesinde heterozigot bir SNP (rs2297218) gözlemlendi. Bulunan SNP, transkripsiyonel represör protein olan MIZF (HINFP) bağlanma bölgesindedir (Sekimata ve Homma 2004; Zerbino vd. 2018). Bu SNP’nin, *DNAJA1* gen ifadesinin görece olarak yüksek olduğu SK-BR-3 hücre hattında görülmüş olması anlamlıdır.

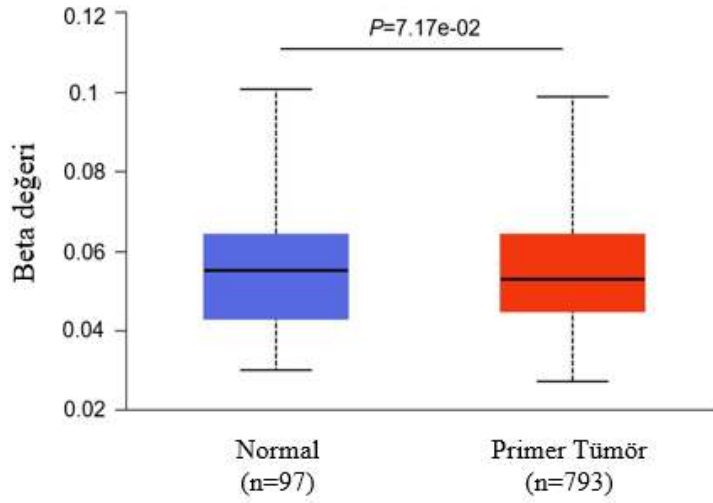
olarak *in-vitro* olarak metile edilmiş MCF 10A DNA'sının PCR ürünü ile beklenen *HhaI* enziminin kesim ürünleri 215 bp ve 158 bp olacaktır.



Şekil 3.7 *DNAJA1* COBRA sonucu. COBRA sonucuna göre meme hücre hatlarında *DNAJA1* promotor metilasyonu yoktur. M: Marker; (+): Pozitif Kontrol; *in-vitro* olarak metile edilmiş MCF 10A DNA'sının PCR ürünü. Beklenen PCR boyu 373 bp, *HhaI* enziminin kesim ürünleri de 215 bp ve 158 bp olacaktır.

3.1.5.2 UALCAN Verileri

UALCAN çevrimiçi aracı ile yapılan analizler sonucunda Şekil 3.8'de *DNAJA1* geninin promotor bölgesi, hem normal hem de meme kanseri örneklerinde hipometiledir (beta değeri < 0.25). Metilasyon düzeyleri bakımından normal (n=97) ve primer tümör örnekleri (n=793) arasında anlamlı bir fark yoktur ($P=7.17e-02$) (Chandrashekar vd. 2017).



Şekil 3.8 *DNAJA1* promotör bölgesi meme kanseri klinik örneklerinde hipometiledir. UALCAN çevrimiçi aracı ekran görüntüsünü kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017).

3.1.5.3 Morpheus Verileri

Morpheus aracına göre, *DNAJA1* geni, normal (n = 97) ve meme invaziv karsinoma klinik örneklerinde (n = 788) sıklıkla hipometiledir (Şekil 3.9) (URL-2). *DNAJA1*'in metilasyon seviyeleri, minimum (mavi) ile maksimum (kırmızı) arasında artan düzende gösterilmiştir.

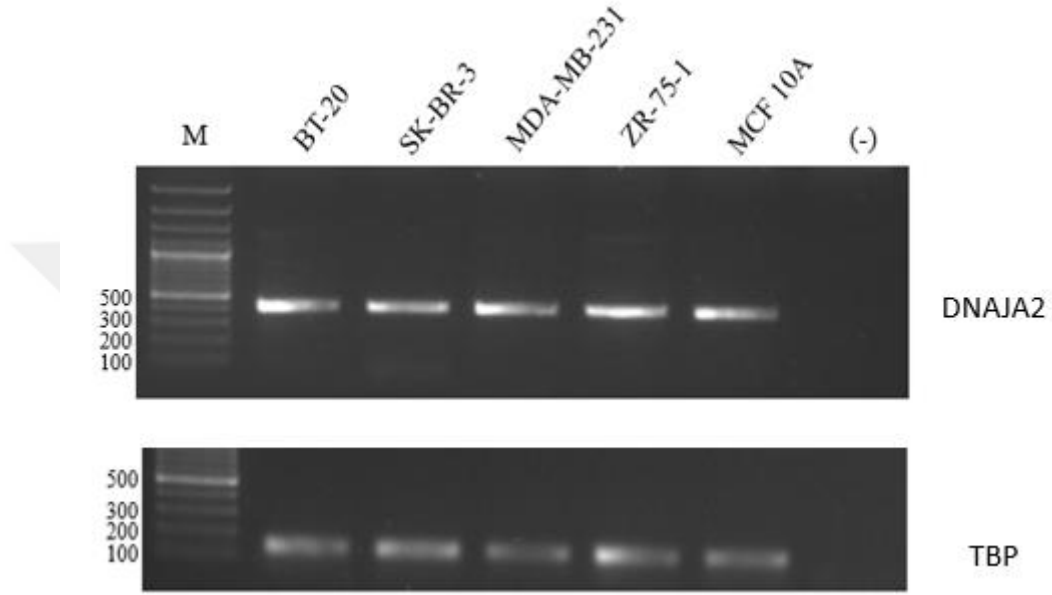


Şekil 3.9 *DNAJA1* geninin meme kanseri ve normal meme klinik örneklerindeki metilasyon durumu. Morpheus çevirim içi aracından alınan ekran görüntüsü kullanılmıştır (URL-2). Siyah bar tümör örneklerini (n=788), yeşil bar normal örnekleri (n=97) göstermektedir. Metilasyon seviyeleri, minimum için “mavi”, maksimum için “kırmızı” renk arasında artan düzende gösterilmiştir.

3.2 DNAJA2 GENİ İLE İLGİLİ BULGULAR

3.2.1 Meme Hücre Hatlarında mRNA İfade Analizi

Semi-kantitatif-RT-PCR sonuçlarına göre *DNAJA2* mRNA ifadesi meme hücre hatları arasında dikkate değer bir farklılık göstermemektedir (Şekil 3.10).

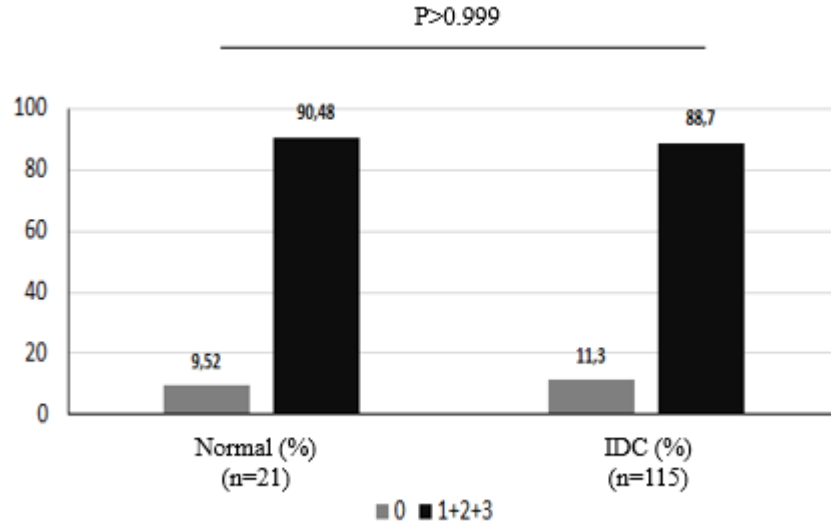


Şekil 3.10 Semi-kantitatif RT-PCR sonucuna göre *DNAJA2*'nin meme hücre hatlarındaki mRNA ifadesi. *TBP* geni normalizasyon amacıyla kullanılmıştır. (-): Kalıp olmayan PCR kontrolü. M: DNA markır

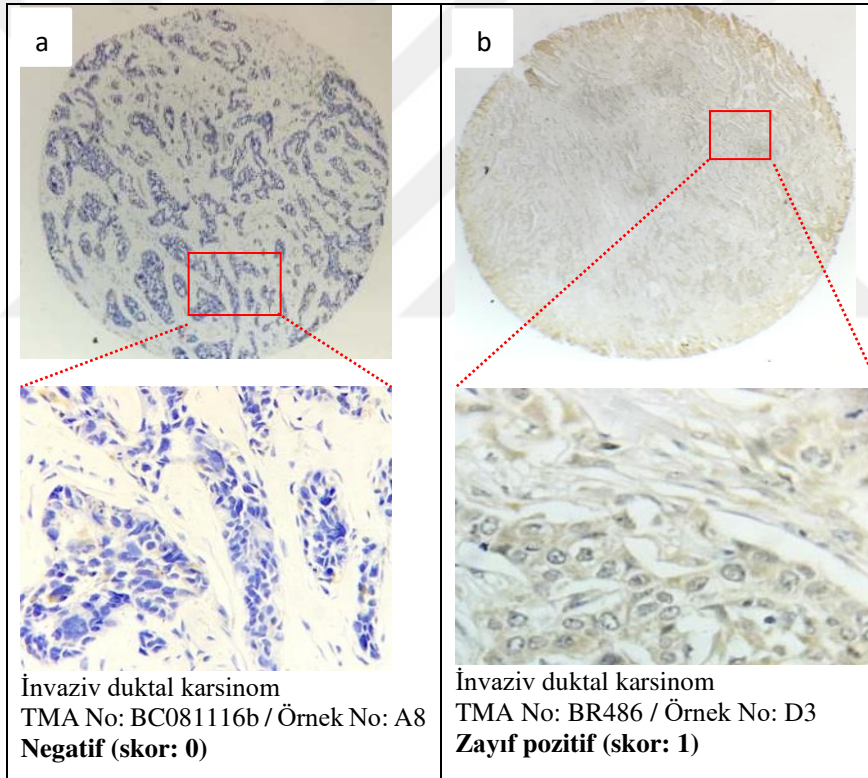
3.2.2 Meme Kanseri Hastalarında Protein İfade Analizi

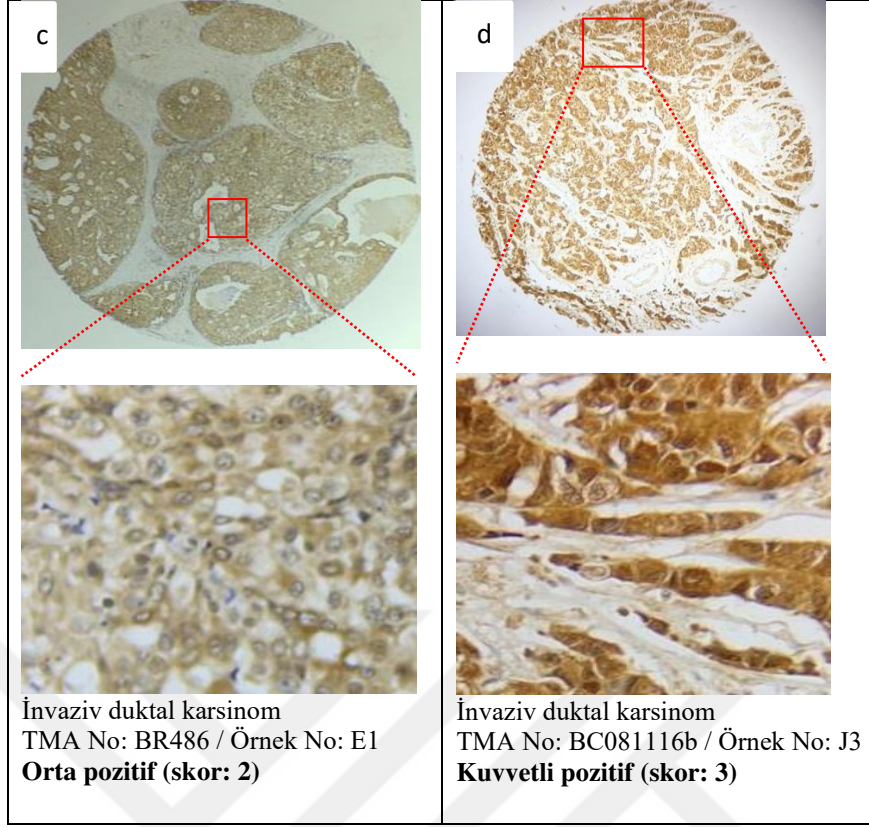
Meme kanseri klinik örneklerindeki *DNAJA2* protein ifadesi immünohistokimya yöntemi ile incelendi. Örneklerle ait histo-patolojik klinik bilgiler Ek A.5 ve Ek A.6'da görülebilir. *DNAJA2* protein ifadesi, invaziv duktal karsinoma örneklerinde (n = 115), eş normal meme dokularına (n = 21) göre anlamlı bir fark göstermemektedir ($P > 0.99$) (Şekil 3.11.A). İmmünboyamaya dair temsili fotoğraflar Şekil 3.11.B'de sunulmuştur. *DNAJA2* protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki ise Çizelge 3.3'de görülebilir. İstatistiksel analiz, *Fisher's exact test yöntemi* ile yapılmış, anlamlılık eşik değeri $P < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

A



B





Şekil 3.11 Meme kanseri klinik örneklerinde *DNAJA2* protein ifadesi A) Invasiv duktal karsinoma (IDC) ve eş normal meme dokusu örneklerinde *DNAJA2* protein ifadesi. İmmünboyama sonuçları *negatif (skor 0)*, *zayıf pozitif (skor 1)*, *orta pozitif (skor 2)* ve *kuvvetli pozitif (skor 3)* olarak değerlendirilmiş ve örneklerin boyama skorları “0” vs “1 + 2+3” şeklinde gruplanmıştır. B) Ticari doku mikrodizileri ile gerçekleştirilen *DNAJA2* immünohistokimya çalışmasının temsili fotoğrafları. Doku örneklerinde seçilen bölgelerin (kırmızı dikdörtgenler) 400X büyütülmüş fotoları da gösterilmiştir. IDC örneklerinde negatif (a) (skor: 0) ve pozitif (b, c, d) (skor: 1, 2, 3) sitoplazmik boyama (kahverengi) gözlenmiştir.

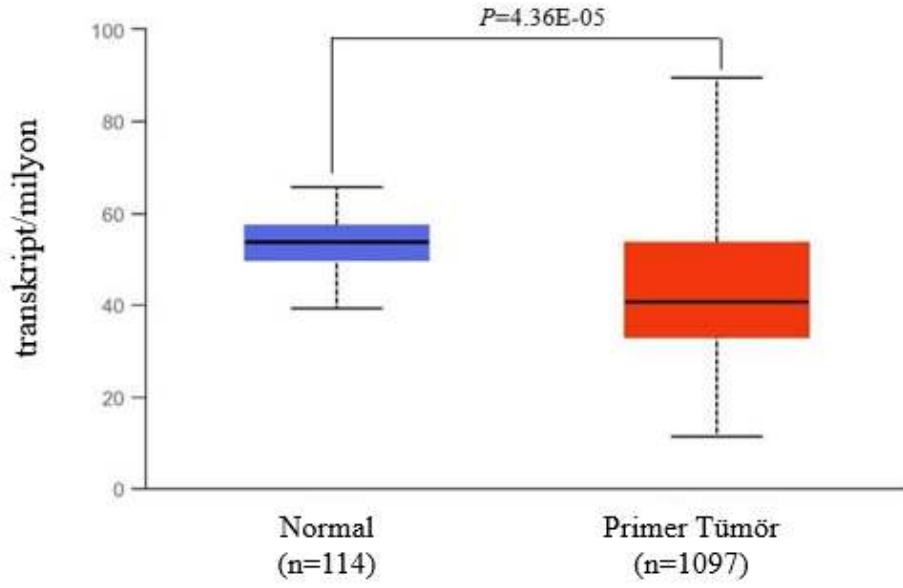
Çizelge 3.3 *DNAJA2* protein ifadesi ve meme kanseri örneklerinin klinik özellikleri arasındaki ilişki.

		IHC Skor (0) n (%)		IHC Skor (1+2+3) n (%)
Tümör Evresi				
	TI	3 (37.50)		5 (62.50)
	TII-TIV	7 (6.54)		100(93.46)
			$P= 0.0214$	
	TI-TII	4 (4.54)		84 (95.46)
	TIII-TIV	3 (11.53)		23 (88.47)
			$P=0.1938$	
Lenf Nodülü Evresi				
	N0	10(10.10)		89 (89.90)
	NI-NII	4 (14.81)		23 (85.19)
			$P=0.497$	
Sınıf				
	GI	0 (0)		20 (100)
	GII-GIII	14 (13.72)		88 (86.28)
			$P=0.1229$	
Evre				
	SI	3 (33.33)		6 (66.67)
	SII-SIII	11 (9.01)		111 (90.99)
			$P=0.0559$	
HER2				
	Negatif	6 (11.11)		48 (88.89)
	Pozitif	6 (14.63)		35 (85.37)
			$P=0.7572$	
PR				
	Negatif	8 (10.20)		40 (89.80)
	Pozitif	4 (16,66)		43 (83.34)
			$P=0.3553$	
ER				
	Negatif	6 (18.75)		26 (81,25)
	Pozitif	6 (9.52)		57 (90.48)
			$P=0.2106$	

3.2.3 *DNAJA2* Geninin İn-Siliko Araçlar İle Meme Kanseri Örneklerinde İfade ve Sağ-Kalım Analizi Sonuçları

3.2.3.1 UALCAN Aracı İle Yapılan İfade Analizi Sonuçları

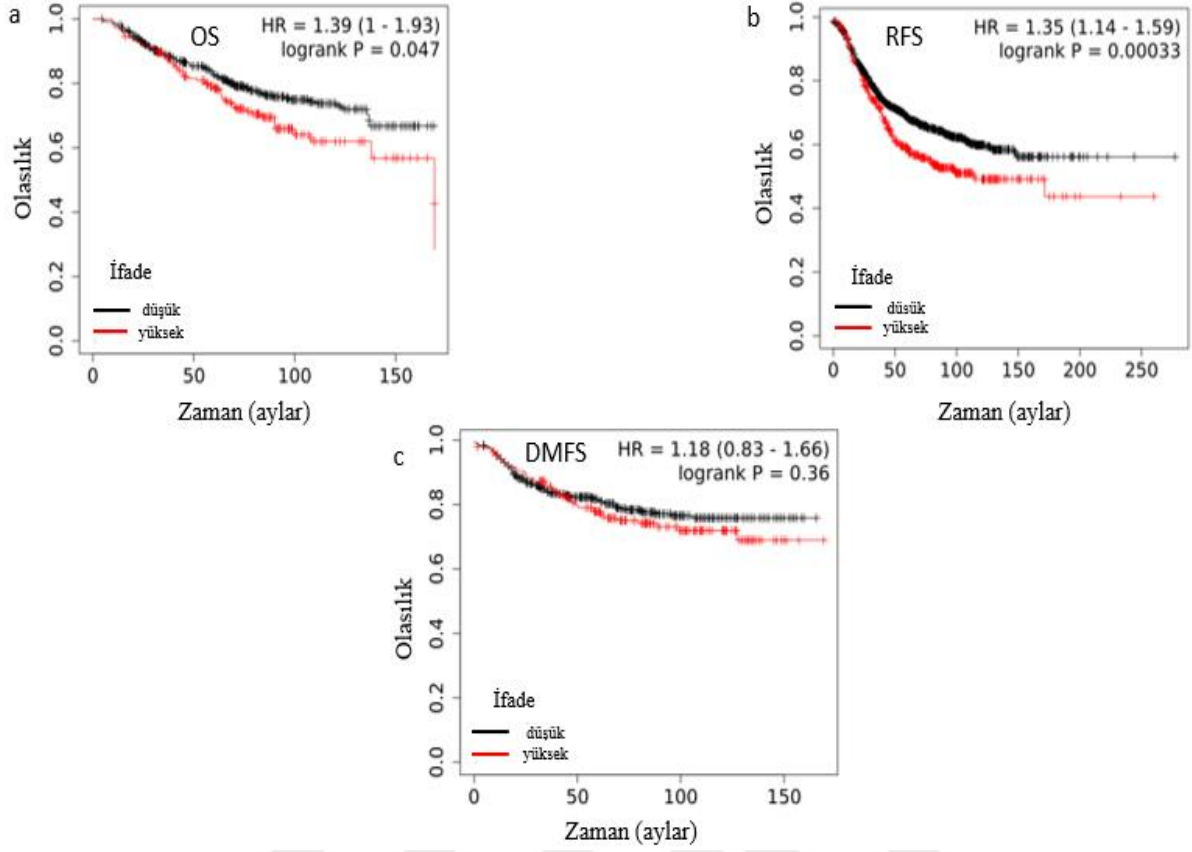
UALCAN web aracına göre *DNAJA2* mRNA ifadesi, normal örneklerde meme kanseri örneklerine oranla daha yüksektir ($P=4.36E-05$) (Chandrashekar vd. 2017) (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 *DNAJA2*'nin klinik meme kanseri örneklerinde ve normal örneklerdeki ifadesi. UALCAN web aracı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017).

3.2.3.2 KM-Plotter Aracı İle Yapılan Sağ-Kalım Analizi Sonuçları

Meme kanserinde *DNAJA2* mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerlerine (Affy ID: 226994_at) bakıldığında; *DNAJA2* ifadesi yüksek olan meme kanseri hastalarının Tam sağ kalım (Overall Survival) (n=626), Nüksetmeden Sağ kalım (Relapse Free Survival) (n=1764), oranları, ifadesi düşük olan hasta grubuna göre anlamlı oranlarda düşüktür. Uzak Metastaz Olmadan Sağ kalım (Distant Metastasis Free Survival) (n=664) oranlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 3.13) (Gyorffy vd. 2010).



Şekil 3.13 Meme kanseri hastalarında *DNAJA2* mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerleri. a) OS b) RFS c) DMFS

3.2.4 *DNAJA2* Geninin Genetik Alterasyonları

3.2.4.1 Meme Kanseri Hastalarındaki Nokta Mutasyon ve Kopya Sayısı Değişimleri

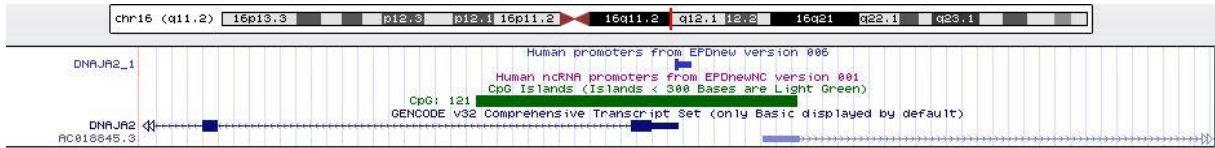
DNAJA2'nin genetik değişiklikleri Sanger-COSMIC veri tabanında (v91) arandı ve meme kanseri örneklerindeki genetik alterasyonlarının çok nadir olduğu (<%1) gözlemlendi (Forbes vd. 2017) (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 *DNAJA2* geninin Sanger-COSMIC veritabanında genetik alterasyonu (Forbes vd. 2017).

	Mutasyonlu Örnekler/Test Edilen Örnekler (Mutasyonlu Örneklerin Yüzdesi)
Nokta Mutasyonları	15/2580 (% 0.58)
Kopya Sayısı Varyantları	5/1492 (% 0.34)

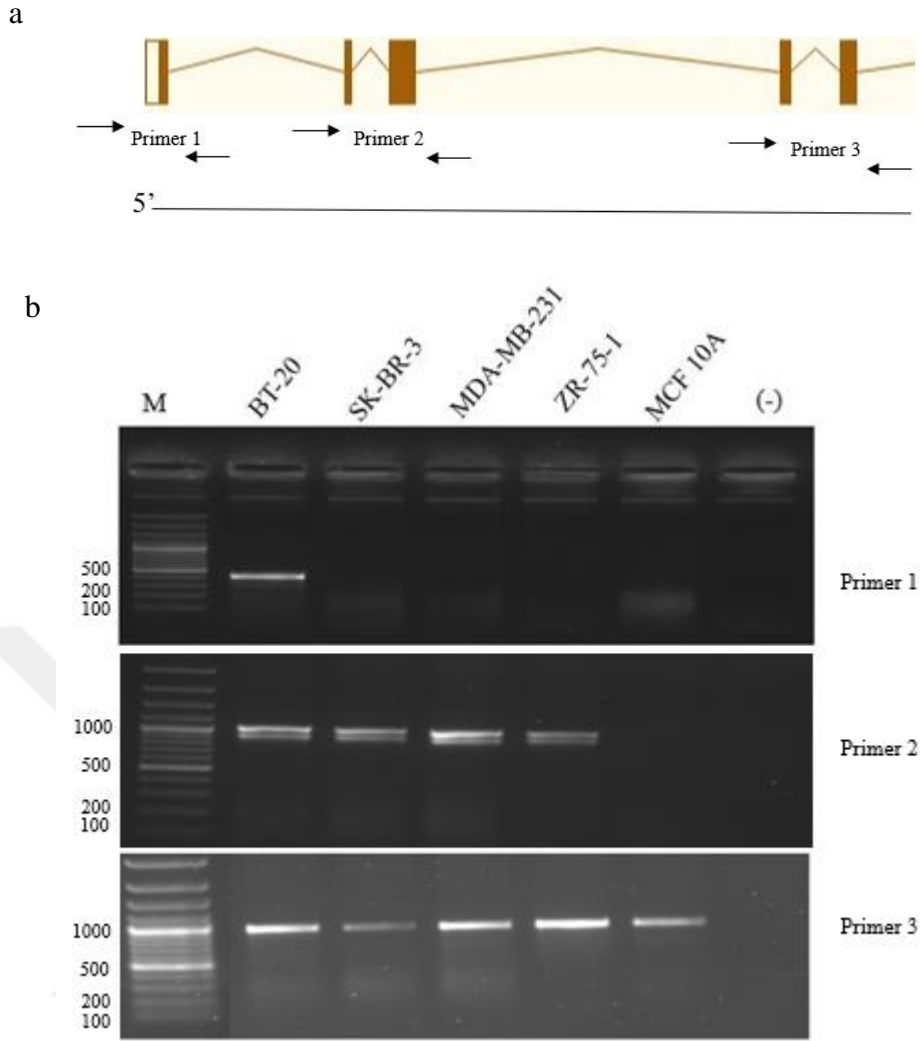
3.2.4.2 Meme Hücre Hatlarında Promotor Mutasyon Analizi Sonuçları

UCSC genom tarayıcısı (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>) ve EPD veri tabanı (<https://epd.epfl.ch//index.php>) kullanılarak *DNAJA2* geninin deneysel olarak onaylanmış promotor bölgesinin (*DNAJA2_1*, açık mavi) CpG adası (yeşil) ile çakıştığı görüldü. Koyu mavi çizgi *DNAJA2* genini, dar ve geniş dikdörtgenler ise sırasıyla UTR ve ekzonları gösterir (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002) (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 EPD veri tabanı ve UCSC genom tarayıcısına göre *DNAJA2* geninin promotor bölgesi CpG adası ile çakışmaktadır. UCSC genom tarayıcısı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002).

DNAJA2'nin protein kodlayan (*DNAJA2*-201 ENST00000317089.10) (ENSEMBL v99) transkriptinin 5'-upstream bölgesinden başlayan ve sonrasındaki beş ekzona spesifik tasarlanan primer çiftleriyle (Şekil 3.15 a) yapılan PCR'larda, 1 no.lu PCR sonucunda sadece BT-20 ürün verdi. 2 no.lu PCR'da MCF 10A hücre hattı hariç hepsinde ürün görüldü. 3 no.lu PCR'da tüm hücre hatlarında ürün gözlemlendi. Bu deneyler sonucunda 5'-upstream bölgesinde genomik delesyon olduğu düşünülebilir ancak bölgenin ayrıntılı olarak analiz edilmesi gerekmektedir (Şekil 3.15 b).



Şekil 3.15 Meme hücre hatlarında genomik delesyon. a) *DNAJA2* 5' upstream bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin yaklaşık yerleri. b) 1, 2, 3 no ile gösterilen primer çiftlerinin PCR sonuçları. Beklenen ürün büyüklükleri sırayla 407, 1012 ve 1000 bp.

3.2.5 Meme Kanserinde *DNAJA2* Metilasyon Analizi Sonuçları

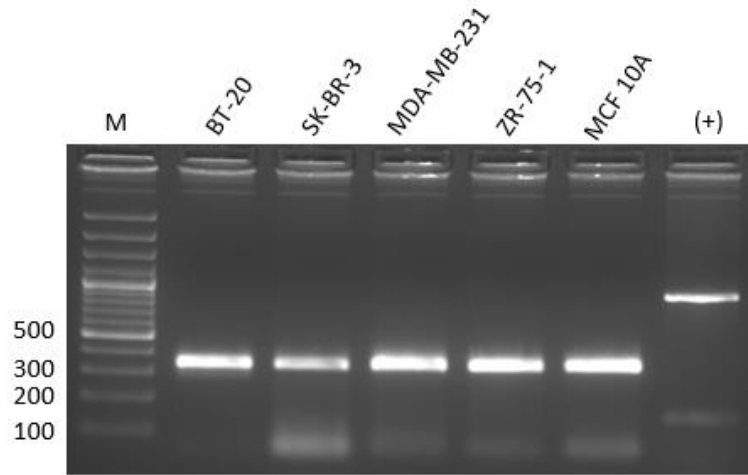
3.2.5.1 COBRA Sonucu

DNAJA2 geninin promotor metilasyonu yolu ile regüle edilip edilmediği araştırıldı. Şekil 3.14'te görüldüğü gibi *DNAJA2* geninin promotor bölgesi CpG adası ile çakışmaktadır. Bu CpG adasının meme hücre hatlarındaki metilasyon durumu COBRA yöntemiyle incelendi.

COBRA deneyi için bisülfite ile muamele edilmiş meme hücre hatlarına ait DNA'lar kullanıldı. Nested PCR yöntemi ile hedef bölge çoğaltıldı. PCR'lar Ek B.2'de verilen koşullara göre

Techne (Model: Prime) cihazında yapıldı. Örnekler, %1,5 agaroz jel içeren elektroforezde yürütüldü.

Bisülfid modifikasyonu DNA'daki metillenmemiş tüm sitozinler kimyasal reaksiyonla urasile dönüşüp, metillenmiş olan sitozinler ise reaksiyon süresince değişmeden kalır. Dönüşüm işlemi bittikten sonra DNA PCR'da amplifiye edilip, T^hCGA bölgelerini tanıyan *TaqI* (Kat No: ER0672) kesim enzimi kullanılarak COBRA ile metilasyon statüsü belirlendi. Şekil 3.16'daki COBRA analizi, CpG adasının meme hücre hatlarında hipometile olduğunu göstermiştir. Meme hücre hatlarında beklenen PCR boyu 343 bp (primerler; F: tggatttgaggaaaatagagaat, R: ctcccaaatacCTTCTTCAACTC), metilasyon varsa *TaqI* için kesim ürünleri ise 134, 112, 45, 34, 18 bp. olacaktır. Pozitif kontrol olarak, *TaqI* enziminin kesim bölgesini içeren bir PCR ürünü kullanılmıştır (primerler; F: tgcaagtcacagctttatca, R: ccaatatctgcattcccaatcca). Bu PCR ürünü MDA-MB-231 DNA'sından çoğaltılmıştır. Amacımız *TaqI* enziminin deney sırasında çalışıyor olduğunu göstermektir. Pozitif kontrolde PCR ürün boyu 1000 bp'dır. *TaqI* kesim ürünlerinin boyları ise 849, 145 ve 6 bp'dır.

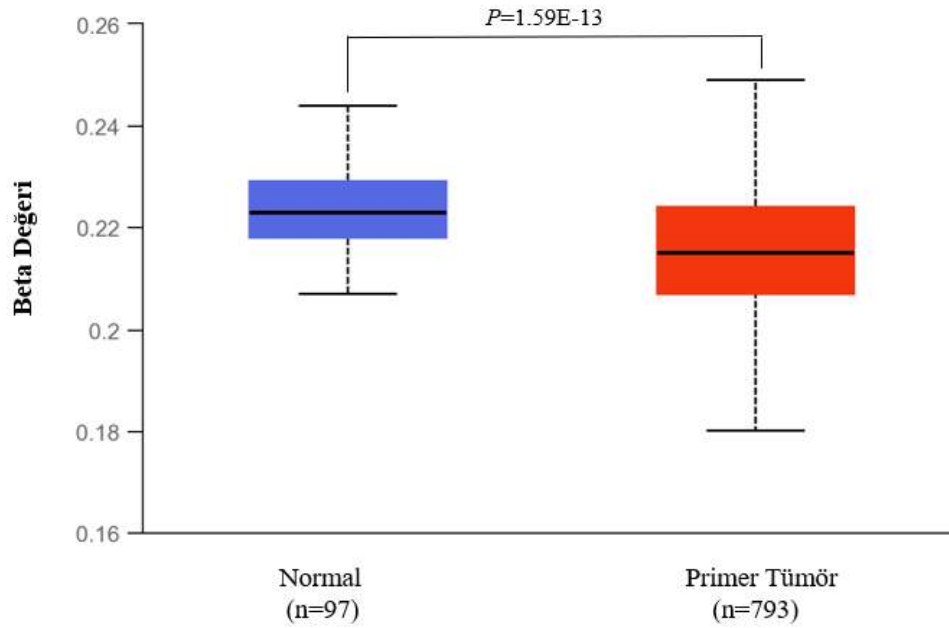


Şekil 3.16 *DNAJA2* COBRA sonucu. COBRA sonucuna göre meme hücre hatlarında *DNAJA2* promotor metilasyonu yoktur. M: Marker; (+): Pozitif Kontrol; *TaqI* kesim bölgesi içeren PCR ürünü. Meme hücre hatlarında beklenen PCR boyu 343 bp, *TaqI* enziminin kesim ürünleri de 134, 112, 45, 34, 18 bp olacaktır. Pozitif kontrolde PCR ürün boyu 1000 bp. *TaqI* enziminin kesim ürünleri de 849, 145 ve 6 bp.

3.2.5.2 UALCAN Verileri

UALCAN çevrimiçi aracı ile yapılan analizler sonucunda Şekil 3.16'daki *DNAJA2* geninin promotor bölgesi, normal ve meme kanseri örneklerinde hipometiledir. Kanser örneklerinin

metilasyon seviyesi normallere kıyasla anlamlı oranda daha düşüktür (beta değeri < 0.25) ($P=1.59E-13$).



Şekil 3.17 *DNAJA2* promotör bölgesi meme kanseri örneklerinde hipometiledir (Beta değeri <0.25). UALCAN çevrimiçi aracı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017).

3.2.5.3 Morpheus Verileri

Morpheus çevrimiçi aracından alınan ekran görüntüsünden de anlaşılabacağı üzere *DNAJA2* geni normal (n = 97) ve meme invaziv karsinoma örneklerinde (n = 788) metiledir (Şekil 3.18) (URL-2). *DNAJA2*'nin metilasyon seviyeleri, minimum (mavi) ile maksimum (kırmızı) arasında artan düzende gösterilmiştir.



Şekil 3.18 *DNAJA2* geninin meme kanseri ve normal meme klinik örneklerindeki metilasyon durumu. Morpheus çevrim içi aracından alınan ekran görüntüsü kullanılmıştır (URL-2). Açık mavi bar tümör örneklerini (n=788), yeşil bar normal örnekleri (n=97) göstermektedir. Metilasyon seviyeleri, minimum için “koyu mavi”, maksimum için “kırmızı” renk arasında artan düzende gösterilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE TARTIŞMA

DNAJA1 (*HDJ2*)’nin kanser ile ve kemo-/radyo-terapi direnç mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Crnogorac-Jurcevic vd. 2005; Wang vd. 2006; Wu vd. 2007; Khalil vd. 2011; Stark vd. 2014; Meshalkina vd. 2016; Parrales vd. 2016, 2018; Nguyen vd. 2018) ama bildiğimiz kadarıyla meme kanserlerindeki protein ifadeleri ve genetik/epigenetik alterasyonları henüz çalışılmamıştır.

Çalıştığımız genlerin genetik alterasyonlarının ve/veya DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların gen ifadelerine etkilerini yorumlayabilmek için farklı alt tiplerini temsil eden meme hücre hatlarını kullandık. Önemli bir not olarak belirtmeliyiz ki; bahsettiğimiz bu analizleri yapabilmek için, IHC çalışmasında kullandığımız veya in-siliko araçlarda incelediğimiz klinik örneklerin DNA veya RNA’larına sahip değiliz. Bu sebeple gen ifade değişimlerini aynı klinik örnek üzerinde inceleme ve genetik/epigenetik değişimlerle yorumlama şansımız olmadı.

DNAJA1 gen ifadesi, MCF 10A hücre hattı ile kıyaslandığında, HER2+ luminal hücre hattında (SK-BR-3) fazla ifade olmakta, triple-negatif bazal hücre hattında (BT-20) ve ER+ luminal hücre hattında (ZR-75-1) ise az ifade olmaktadır. Triple-negatif bazal hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattında ise önemli bir değişim göstermemiştir. Dolayısıyla, hücre hatlarında alt-tipe özgün bir ifade değişimi gözlenmemiştir. Ancak, bu hücre hatlarının proliferatif ve invaziv gen ifade profillerinin incelenmesi, bu iki kanserleşme sürecine özgün *DNAJA1* gen ifade biçimi ortaya koyabilir (Chavez vd. 2010; Dai vd. 2015; Hoek vd. 2008) ve hasta prognoza yönelik bilgiler verebilir.

DNAJA1 mRNA ifadesini ve sağ kalıma etkisini, sırasıyla UALCAN (Chandrashekar vd. 2017) ve Kaplan-Meier (Gyorffy vd. 2010) gibi çevrimiçi araçlarla da incelediğimizde; *DNAJA1* mRNA ifadesinin kanser örneklerinde normal örneklere göre yüksek olduğunu ve sağkalımı olumsuz etkilediğini gördük (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

DNAJA1 protein ifadesinin, invaziv duktal karsinoma örneklerinde, eş normal meme dokularına kıyasla daha sık olduğunu bulduk ($P < 0,0001$) (Şekil 3.2). Ancak, *DNAJA1* protein ifadesi ile

invaziv meme kansinomu örneklerinin klinik özellikleri arasında anlamlı bir ilişki g zlemlenemedik ( izelge 3.1). *DNAJA1* protein ifadesinin hasta sağ kalıma etkisini IHC  alıŐması hasta grubunda inceleyemedik      , bu hasta grubunun sağ kalım bilgilerine sahip değildik.

DNAJA1 geninin meme kanserindeki mutasyon oranları oldukça düşük (<%1) görünmektedir (Forbes vd. 2017) ve “sık görülür” (hot-spot) denebilecek belirli mutasyonlar yoktur. *DNAJA1* geninin promotor bölgesindeki olası mutasyonlar dizileme yöntemi ile meme hücre hatlarında incelendi. SK-BR-3 hücre hattında *DNAJA1*’in promotor bölgesinde heterozigot bir SNP (rs2297218) gözlendi (Şekil 3.6). HER2+ imm nprofiline sahip luminal alt tipli (Kao vd. 2009) SK-BR-3 hücre hattında bulunan SNP, transkripsiyonel represör protein olan MIZF (HINFP) bağlanma bölgesindedir ve bu anlamlıdır.       *DNAJA1* gen ifadesi SK-BR-3 hücre hattında görece olarak yüksektir (Sekimata ve Homma 2004; Zerbino vd. 2018). Dolayısıyla, bu SNP’nin meme kanseri örneklerinde incelenmesi gerekmektedir.

Genetik etmenler dışında, DNA metilasyonu gibi epigenetik etmenler de gen ifadelerini etkileyen mekanizmalardır (Esteller 2007). UCSC genom tarayıcısı (Dreos vd. 2014) ve EPD veri tabanı (Kent vd. 2002) yardımıyla *DNAJA1* geninin promotor bölgesinin CpG adasının çakıştığı görüldü (Şekil 3.5). Bu CpG adasının meme hücre hatlarındaki metilasyon durumu COBRA yöntemiyle incelenerek promotor bölgesinin meme hücre hatlarında hipometile olduğunu gözlemledik (Şekil 3.7). Bu sonuç, Morpheus ve UALCAN (Chandrashekar vd. 2017)  evrimi i araçları ile meme kanseri klinik örneklerinde de desteklendi (Şekil 3.8 ve şekil 3.9). Bu nedenle, *DNAJA1* gen ifadesinin, promotor metilasyonundan başka epigenetik mekanizmalar tarafından, örneğin, lncRNA’lar (Rinn JL ve Chang HY 2012) veya miRNA’lar (Davalos vd. 2012) tarafından düzenlenebileceğini düşünüyoruz.

DNAJA2 (*DJ3*) proteininin, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskılayıcı etkisi olabileceği belirtilmiştir (Ohlsson vd. 2001). 16q11.2 lokusunda bulunan *DNAJA2* geni meme kanserlerinde sıklıkla delesyona uğramaktadır (Ellsworth vd. 2008; Gruel vd. 2010). Ayrıca bu gen kanserleşme ile ilişkili bulunmuŐ ama bildiğimiz kadarıyla meme kanserlerindeki protein ifadeleri ve genetik/epigenetik alterasyonları henüz çalışılmamıştır.

DNAJA2 geninin meme hücre hatlarındaki mRNA ifadesi semi-kantitatif RT-PCR yöntemi ile incelendiğinde mRNA ifadesi meme hücre hatları arasında dikkate değer bir farklılık göstermemektedir (Şekil 3.10). *DNAJA2* mRNA ifadesi, meme kanseri örneklerinde normal örneklerle göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuŐ, ancak beklenmedik şekilde, düşük

DNAJA2 mRNA ifadesi meme kanseri hastalarının tam sağkalım (OS) ve nüksüz sağkalım (RFS) oranlarını arttırmıştır (Şekil 3.13).

Ayrıca, mRNA ifadesinin aksine, *DNAJA2* protein ifadesine meme kanseri örneklerinde ve eş normal meme dokularında oldukça sık rastlanmıştır. (Şekil 3.11). *DNAJA2* protein ifadesi ile invaziv meme karsinomu örneklerinin klinik özellikleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenemedi (Çizelge 3.3). *DNAJA2* protein ifadesinin hasta sağ kalıma etkisini IHC çalışması hasta grubunda inceleyemedik, çünkü bu hasta grubunun sağ kalım bilgilerine sahip değildik.

DNAJA2 geninin meme kanserindeki mutasyon oranları oldukça düşük (<%1) görünmektedir (Forbes vd. 2017). *DNAJA2* geninin promotor bölgesi mutasyonları meme hücre hatlarında araştırıldı. *DNAJA2*'nin protein kodlayan (*DNAJA2*-201 ENST00000317089.10) (ENSEMBL v99, Zerbino vd. 2018) transkriptinin 5'-upstream bölgesinden başlayan ve devamındaki beş ekzona spesifik tasarlanan primer çiftleriyle yapılan PCR'ların sonuçları, promotor bölgesi civarında genomik delesyon olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 3.15).

UCSC genom tarayıcısı (Dreos vd. 2014) ve EPD veri tabanı (Kent vd. 2002) yardımıyla, *DNAJA2* geninin promotor bölgesinin CpG adası ile çakıştığı görüldü (Şekil 3.14). Bu bölge meme hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerinde hipometilelidir (Şekil 3.16 ve Şekil 3.17). Ancak, Morpheus çevrimiçi aracında metilasyon düzeyi normal ve tümör örneklerinde orta-yüksek olarak görünmektedir (Şekil 3.18). Gerek metilasyon düzeyinde, gerek mRNA ve protein ifadelerindeki farklı bulguların sebebinin *DNAJA2* geninin farklı izoformları ile ilgili olabileceğini düşünüyoruz. Nitekim bunun örnekleri literatürde de mevcuttur; *DNAJA3* (*TID1*) geninin kısa formu apoptozu baskımlarken, uzun formu apoptozu teşvik etmektedir (Syken vd. 1999).

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, *DNAJA1*'in meme kanserinde potansiyel bir biyobelirteç olduğunu ve *DNAJA1* ifadesinin meme kanserinde hasta sağ kalımını olumsuz etkilediğini göstermektedir. *DNAJA2* mRNA ifadesi meme kanserinde prognostik öneme sahiptir ve sağ kalımı olumsuz etkilemektedir. Genetik alterasyonları nadir olan *DNAJA2* geni promotor hipometilasyonu yolu ile regüle ediliyor olabilir. Daha çok meme hücre hattı ve klinik örnek kullanarak yapılacak fonksiyonel ve klinik çalışmalar, *DNAJA1* ve *DNAJA2* genlerinin meme karsinogenezindeki rolünü ve regülasyonunu daha iyi anlamak için gereklidir.



KAYNAKLAR

- Acun T, Oztas E, Yagci T, Yakicier M C** (2011) SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation. *BMC Cancer*, 6;11:223.
- Acun T, Demir K, Oztas E, Arango D, Yakicier M C** (2015) PTPRD is homozygously deleted and epigenetically downregulated in human hepatocellular carcinomas. *OMICS*, 19(4):220-9.
- Acun T, Doberstein N, Habermann J K, Gemoll T, Thorns C, Oztas E, Ried T** (2017) HLJ1 (DNAJB4) Gene Is a Novel Biomarker Candidate in Breast Cancer. *OMICS*, 21(5):257-265
- Baaklini I, Wong M J, Hantouche C, Patel Y, Shrier A, Young JC** (2012) The DNAJA2 substrate release mechanism is essential for chaperone-mediated folding. *J Biol Chem*, 287(50):41939-54
- Bini L, Mag B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez J C, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser D F, Tosi P** (1997) Protein Expression Profiles In Human Breast Ductal Carcinoma and Histologically Normal Tissue. *Electrophoresis*, 18(15), 2832–41.
- Bomford C K, Kunkler IH S S** (1993) Radiation Physics, Therapy and Oncology, *Walter and Miller's Textbook of RT* (Symods P, Mills JA, Duxbury A.), 2nd Edition, Churchill Livingstone Inc.,143
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram S, Siegel R L, Torre L A, Jemal A** (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 68:394-424.
- Brenton J D, Carey L A, Ahmed A A, Caldas C** (2005) Molecular classification and molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready For Clinical Application? *J. Clin. Oncol.*, 23:7350-7360.
- Chandrashekar D S, Bashel B, Balasubramanya S A H, Creighton C J, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi B V S K, Varambally S** (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, 19(8):649-658.
- Chavez K J, Garimella S V, Lipkowitz S** (2010) Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 32(1-2):35-48.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- 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. *J. Natl. Cancer Inst.*, 101:736–50
- Cho W C S** (2007) Contribution of Oncoproteomics to Cancer Biomarker Discovery. *Molecular Cancer*, 6:25
- Correa R G, Krajewska M, Ware C F, Gerlic M, Reed J C** (2014) The NLR-related protein NWD1 is associated with prostate cancer and modulates androgen receptor signaling. *Oncotarget* 30;5(6):1666-82.
- Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, Capurso G, Lattimore S, Akada M, Sunamura M, Prime W, Campbell F, Brentnall T A, Costello E, Neoptolemos J, Lemoine N R** (2005) Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 129(5):1454–63.
- Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B** (2015) Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical Use and Future Trends. *Am J Cancer Res*, 5(10): 2929–2943.
- Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M** (2012). Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, 31(16), 2062–2074.
- Dreos R, Ambrosini G, Perier R, Bucher P** (2014) The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue): D92-6.
- Ellsworth R E, Hooke J A, Love B, Ellsworth D L, Shriver C D** (2009) Molecular changes in primary breast tumors and the Nottingham Histologic Score. *Pathol Oncol Res.*, 15(4):541-7.
- Esteller M** (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, 8(4):286–298.
- Felts S J, Toft D O** (2003) p23, A Simple Protein With Complex Activities. *Cell Stress & Chaperones*, 8(2):108-13.
- Forbes S A, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole C G, Ward S, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok C Y, Jia M, Jubb M, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell P J** (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Research*, 4;45(D1): D777-D783.
- Freeman B C, Morimoto R I** (1996) The Human Cytosolic Molecular Chaperones Hsp90, Hsp70 (hsc70) and Hdj-1 Have Distinct Roles In Recognition Of A Non-Native Protein and Protein Refolding. *The EMBO Journal*, 15(12), 2969–79.
- Gotoh T, Terada K, Mori M** (2001) Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide-mediated apoptosis in RAW 264.7. *Cell Death Differ*, 8(4):357-66.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M** (2004) Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, 11(4):390-402.
- Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues M J, Pierron G, Goudefroye R, Cottu P, Reyal F, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, Vincent-Salomon A** (2010) Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer*, 46(13):2399-407.
- Gur-Dedeoglu B, Konu O, Bozkurt B, Ergul G, Seckin S, Yulug IG** (2009) Identification of Endogenous Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Normal Matched Breast Tumor Tissues. *Oncol Res*, 17(8):353-65.
- Gül G** (2017) Curcumin ve Hidroksiürea'nın Gen Düzenleyici ve Antianjiyogenik Etkilerinin Meme Kanseri Hücre Hattında Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, 187s
- Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z** (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 123(3):725-31.
- Hageman J, Rujano M A, van Waarde M A, Kakkar V, Dirks R P, Govorukhina N, Oosterveld-Hut H M, Lubsen N H, Kampinga H H** (2010) A DNAJB Chaperone Subfamily with HDAC-Dependent Activities Suppresses Toxic Protein Aggregation. *Molecular Cell*, 37(3), 355–369.
- Hoek K S, Eichhoff O M, Schlegel N C, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R** (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*, 68(3):650-6.
- Ho-Yen C, Bowen R L, Jones J** (2012) Characterization of Basal-Like Breast Cancer: An Update. *Diagnostic Histopathology*, 18:104-111.
- Izbicka E, Campos D, Carrizales G, Patnaik A** (2005) Biomarkers of anticancer activity of R115777(Tipifarnib, Zarnestra) in human breast cancer models in vitro. *Anticancer Res.*, 25(5):3215-23.
- Jäättelä M** (1999) Heat Shock Proteins As Cellular Lifeguards. *Annals of Medicine*, 31(4): 261–71.
- Kayar N** (2019) Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi eğitiminin meme kanseri korkusu ve sağlık inançlarına etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ordu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı, İzmir, 109s

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y L, Girard L, Gandhi J, Kwei K A, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar A F, Minna J D, Pollack J R** (2009) Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, 4(7):e6146.
- Kent W J, Sugnet C W, Furey T S, Roskin K M, Pringle T H, Zahler A M, Haussler D** (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12(6):996-1006.
- Khalil A A and James P** (2007) Biomarker Discovery: A Proteomic Approach For Brain Cancer Profiling. *Cancer Science*, 98(2): 201–13.
- Khalil A A, Kabapy N F, Deraz S F, Smith C** (2011) Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816(2):89-104.
- Khuwaja G, Abu-Rezq A** (2004) Bimodal breast cancer classification system. *Pattern Analysis and Applications* 7., 235-242
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch M J, Sauter G, Kallioniemi O P** (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.*, 4(7):844-7.
- Kuhn D J, Zeger E L, Orlowski R Z** (2006) Proteasome Inhibitors and Modulators of Heat Shock Protein Function. *Cancer Therapeutics*, 1816(2):91-116.
- Lee I N, Chen C H, Sheu J C, Lee H S, Huang G T, Yu C Y, Lu F J, Chow L P** (2005) Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Related Biomarkers by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 4(6):2062–9.
- Li L C, Dahiya R** (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs *Bioinformatics*, 18(11):1427-31
- Li Y, Tollefsbol T O** (2011) DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol.*, 791: 11–21.
- 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*, 25(4):402-8.
- Meshalkina D A, Shevtsov M A, Dobrodumov A V, Komarova E Y, Voronkina I V, Lazarev V F, Margulis B A, Guzhova I V** (2016) Knock-down of Hdj2/DNAJA1 co-chaperone results in an unexpected burst of tumorigenicity of C6 glioblastoma cells. *Oncotarget* 7(16):22050-63
- Mitra A, Shevde L A, Samant R S** (2009) Multi-Faceted Role of HSP40 In Cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, 26(6):559–567.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Nguyen E V, Centenera M M, Moldovan M, Das R, Irani S, Vincent A D, Chan H, Horvath L G, Lynn D J, Daly R J, Butler L M** (2018) Identification of Novel Response and Predictive Biomarkers to Hsp90 Inhibitors Through Proteomic Profiling of Patient-derived Prostate Tumor Explants. *Mol Cell Proteomics*, 17(8):1470-1486.
- Ohlsson H, Br  nner N, Engelholm L H, Lundholt B K, Weidle U, Briand P, Lykkesfeldt A E** (2001) Identification of two estrogen regulated genes associated with growth regulation of human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 182(1):1-11.
- Sekitima M, Homma Y** (2004) Sequence-specific transcriptional repression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF. *Nucleic Acids Res.*, 32:590–597.
- Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts A M, Yu J, Klijn J G, Foekens J A, Martens J W** (2008) Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research*, 68:3108–3114.
- S  rlie T, Perou C M, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen M B, van de Rijn M, Jeffrey S S, Thorsen T, Quist H, Matese J C, Brown P O, Botstein D, Lonning P E, Borresen-Dale A L** (2001) Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses With Clinical Implications. *Proc. Natl Acad Sci.* 98: 10869-10874
- S  rlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J S, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou C M, L  nning P E, Brown P O, B  rresen-Dale A, Botstein D** (2003) Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets. *PNAS*, 2100:8418–8423
- Sotiropoulos C, Neo S Y, McShane L M, Korn E L, Long P M, Jazaeri A, Martiat P, Fox S B, Harris A L, Liu E T** (2003) Breast Cancer Classification and Prognosis Based On Gene Expression Profiles From A Population-Based Study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:10393-10398
- Stark J L, Mehla K, Chaika N, Acton T B, Xiao R, Singh P K, Montelione G T, Powers R** (2014) Structure and function of human DnaJ homologue subfamily A member 1 (DNAJA1) and its relationship to pancreatic cancer, *Biochemistry*, 53(8):1360–1372
- Sterrenberg J N, Blatch G L, Edkins A L** (2011) Human DNAJ In Cancer And Stem Cells. *Cancer Letters*, 312(2):129–142.
- Sun Y, Zang Z, Xu X, Zhang Z, Zhong L, Zan W, Zhao Y , Sun L** (2010) Differential Proteomics Identification of HSP90 As Potential Serum Biomarker In Hepatocellular Carcinoma by Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4):1423–33.
- Syken J, De-Medina T, M  nger K** (1999) TID1, a human homolog of the Drosophila tumor suppressor l(2)tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(15):8499-8504.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Parrales A, Ranjan A, Iyer S V** (2016) DNAJA1 controls the fate of misfolded mutant p53 through the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol.*, 8(11): 1233-1243
- Parrales A, Thoenen E, Iwakuma T**, (2018) The Interplay Between Mutant p53 and Mevalonate Pathway. *Cell Death Differ.*, 25(3): 460-470
- Perou C M, Sorlie T, Eisen M B, van de Rijn M, Jeffrey S S, Rees C A, Pollack J R, Ross D T, Johnsen H, Akslen L A, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu S X, Lonning P E, Borresen-Dale A L, Brown P O, Botstein D** (2000) Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature*, 406:747-752
- Renbaum P, Abrahamove D, Fainsod A, Wilson G G, Rottem S, Razin A** (1990) Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of the gene coding for the CpG DNA methylase from Spiroplasma sp. strain MQ1(M.SssI). *Nucleic Acids Res* 18(5): 1145–1152
- Rinn J L, Chang H Y** (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem.*, 81:145-166.
- Vallejos C S, Gómez H L, Cruz W R, Pinto J A, Dyer R R, Velarde R, Suazo J F, Neciosup S P, León M, de la Cruz M A, Vigil C E** (2010) Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association With Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database. *Clin. Breast Cancer*, 10:294–300.
- Van der Spuy J, Cheetham M E, Dirr H W, Blatch G L** (2001) The Cochaperone Murine Stress-Inducible Protein 1: Overexpression, Purification And Characterization. *Protein Expression and Purification*, 21(3):462–9.
- Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G** (2008) Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(4):370-4
- Thomson T A, Zhou C, Chu C, Knight B** (2009) Tissue microarray for routine analysis of breast biomarkers in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol.* 132(6):899-905.
- Wall D, Zylicz M, Georgopoulos C** (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(7):5446–51.
- Wang C C, Liao Y P, Mischel P S, Iwamoto K S, Cacalano N A, McBride W H** (2006) HDJ-2 as a Target for Radiosensitization of Glioblastoma Multiforme Cells by the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 and the Role of the p53/p21 Pathway. *Cancer Research*, 66(13):6756-62

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 And The Chaperoning Of Cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 5(10):761-72

Wu X, Yao D, Su X, Tai B, Huang H, Qiu L, Wu W, Shao Y (2007) Dynamic expression of rat heat shock protein gp96 and its gene during development of hepatocellular carcinoma *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*6(6):616-21

Zerbino D R, Achuthan P, Akanni W, Amode R M, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall S, Girón C G, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu O G, Janacek S H, Juettemann T, To J K, Laird M R, Lavidas I, Liu Z, Loveland J E, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy D N, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong C K, Parker A, Patricio M, Riat H S, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt S E, Kostadima M, Langridge N, Martin F J, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines D M, Trevanion S J, Aken B L, Cunningham F, Yates A, Flicek P (2018) Ensembl 2018 *Nucleic Acid Res.*, 46(1):D754-D761

URL-1<<https://international.neb.com/products/m0226-cpg-methyltransferase-msssi#Product%20Information>> Ziyaret Tarihi: 20.05.2019

URL-2< <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>>Ziyaret Tarihi: 20.10.2019



EK AÇIKLAMALAR

EK A: Konsantrasyonlar, Primer Çiftleri ve IHC Mikrodizi Listesi

Ek A.1 Genomik DNA ve RNA Konsantrasyonları

DNA'lar	Ölçüm Sonucu	600 nM'a Göre Hesaplama
BT-20	134 ng/µl	4,47 ng/µl
SK-BR-3	158 ng/µl	3,79 ng/µl
MDA-MB-231	120 ng/µl	5 ng/µl
ZR-75-1	122 ng/µl	4,91 ng/µl
MCF 10A	122 ng/µl	4,91 ng/µl

RNA'lar	Ölçüm Sonucu	750 ng'a Göre Hesaplama (c DNA sentezi için)
BT-20	362 ng/µl	2,75 ng/µl
SK-BR-3	365 ng/µl	2,75 ng/µl
MDA-MB-231	881 ng/µl	1,05 ng/µl
ZR-75-1	554 ng/µl	1,92 ng/µl
MCF 10A	198 ng/µl	5,18 ng/µl

Ek A.2 DNAJA1 ve DNAJA2 Bisülfite Nested Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
DNAJA1-Bi	gttgagtggagaaaagggttttag	ccaacacaaaaactaaaaacaac	494	56°C
DNAJA2-Bi	tggatttggaggaaaatagagaat	ctaactaaaaaaacatccctaacc	404	56°C
DNAJA1-Bi-Ne	Gttgagtggagaaaagggttttag	ccaaaacaccacaccaacc	373	56°C
DNAJA2-Bi-Ne	tggatttggaggaaaatagagaat	ctcccaaatcCTTCTTCAACTC	343	55,57°C *

* Optimizasyonlarla bağlanma sıcaklığı MDA-MB-231 ve ZR75-1'de 57 °C olurken geri kalan örneklerde 55°C oldu.

Ek A.3 *DNAJA1* ve *DNAJA2* Dizileme Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
DNAJA1-pro	gctccagaagattccacgag	aggaactgacagcggctcta	434	59°C
DNAJA2-pro (1. Primer Çifti)	ctggacctggaggaaaacag	gcctggctgaagaagacatc	407	60°C
DNAJA2_Pro (2. Primer Çifti)*	tgcgaagtcacagctttatca	ccaatatctgcattcccaatcca	1000	60°C
DNAJA2_Pro (3. Primer Çifti)*	gcgagaaagtgccgaagaat	acaagcagcctcagaacctat	1012	60°C

* BT-20 dışındaki hücre hatlarında primerler çalışmadı. ENSEMBL'dan "intron variantı" ve "upstream gene variants" 'lara bakarak başka bir forward primer tasarlandı.

Ek A.4 *DNAJA1* ve *DNAJA2* Q-RT-PCR Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
DNAJA1	gttgagtggagaaaagggttttag	ccaacacacacacacacacacac	494	56°C
DNAJA2	GATGCCGCAGTATCGTAATCC	TCCGGTCTAGATGGCAGAAGA	404	60°C

Ek A.5 Çalışmada kullanılan ticari doku mikrodizisinin (TMA) örnek bilgi formu (BC081116b).

Pozisyon	No.	Yaş	Cinsiyet	Organ/Anatomik Bölge	Patoloji Teşhisi	TNM	Sınıf	Evre	Tip	Doku ID.	ER	PR	HER2
A1	1	60	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg050265	+++	+++	0
A2	2	49	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N1M0	1	IIIA	malign	Fmg050281	-	-	1+
A3	3	67	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg050259	-	-	3+
A4	4	58	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg050233	+++	-	0
A5	5	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg020189	-	-	0
A6	6	52	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg020147	-	-	3+
A7	7	64	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg010825	*	*	*
A8	8	59	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	I	malign	Fmg010906	-	-	0
A9	9	52	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T1cN0M0	2	I	malign	Fmg010838	+++	+	0
A10	10	70	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg020312	+	-	0
B1	11	43	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010868	+++	+++	0
B2	12	51	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg050278	+++	+	0
B3	13	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N2M0	2	IIIA	malign	Fmg020093	+++	+	1+
B4	14	43	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T1cN0M0	-	I	malign	Fmg010839	+++	+++	0
B5	15	41	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020204	+++	++	3+
B6	16	74	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020170	+++	++	0
B7	17	71	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg050754	-	-	0
B8	18	42	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N0M0	2	IIB	malign	Fmg050739	-	-	1+
B9	19	32	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N1M0	2	IIIB	malign	Fmg050755	++	-	3+
B10	20	87	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg050794	-	-	1+
C1	21	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg020182	+	+	1+
C2	22	46	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	-	IIA	malign	Fmg020168	-	-	3+
C3	23	46	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020012	-	-	3+
C4	24	42	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020183	-	-	0
C5	25	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020151	+++	+++	0
C6	26	46	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010769	-	-	3+
C7	27	45	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	malign	Fmg010767	+++	+++	0
C8	28	95	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T1N0M0	2	I	malign	Fmg020192	+++	+	2+
C9	29	52	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020141	-	-	2+
C10	30	53	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N0M0	2	IIB	malign	Fmg020327	-	-	0
D1	31	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010932	+++	++	0
D2	32	64	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010834	+++	-	1+
D3	33	42	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010917	++	+++	0
D4	34	45	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg020179	+++	+	3+
D5	35	36	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020140	++	+++	0
D6	36	34	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	malign	Fmg020190	+++	-	0
D7	37	58	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg050244	+++	-	3+
D8	38	58	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg010766	+++	+++	0
D9	39	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010824	+++	+	3+
D10	40	55	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	malign	Fmg010908	+	-	3+
E1	41	76	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	malign	Fmg010789	+++	+++	0
E2	42	51	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg010905	++	+	3+
E3	43	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020188	++	-	0
E4	44	50	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	malign	Fmg020304	+++	+++	0
E5	45	61	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020013	+++	-	0
E6	46	41	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	-	IIA	malign	Fmg050277	-	-	0
E7	47	44	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N0M0	2	IIB	malign	Fmg010823	-	-	3+
E8	48	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4bN0M0	2	IIIB	malign	Fmg010950	-	-	3+
E9	49	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T1N1M0	-	IIA	malign	Fmg020137	+++	+++	0
E10	50	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T3N0M0	2	IIB	malign	Fmg050237	+++	+++	0
F1	51	37	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010802	+	-	3+
F2	52	72	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010764	*	*	*
F3	53	45	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010944	-	-	0
F4	54	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010946	-	-	0
F5	55	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	malign	Fmg020136	-	-	0
F6	56	45	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010811	-	-	0
F7	57	40	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T1N0M0	2	I	malign	Fmg020194	-	-	0
F8	58	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020175	+	+	*
F9	59	71	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T4N2M0	2	IIIB	malign	Fmg020095	+++	+++	0
F10	60	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom	T2N1M0	-	IIB	malign	Fmg061126	+	-	3+

Ek A.5 (devam ediyor)

G1	61	66	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010931+++	+++	0
G2	62	35	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T1N0M0	2	I	malign	Fmg020094++	++	3+
G3	63	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T4bN0M0	2	IIIB	malign	Fmg010858++	+++	3+
G4	64	44	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010859++	++	0
G5	65	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	1	IIA	malign	Fmg020173-	-	3+
G6	66	55	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	-	IIA	malign	Fmg010943*	*	3+
G7	67	46	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010920+++	+	0
G8	68	56	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010851++	+	3+
G9	69	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010778-	-	3+
G10	70	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010826-	-	0
H1	71	66	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg050249+++	-	3+
H2	72	46	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020090+++	++	0
H3	73	59	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T4bN0M0	2	IIIB	malign	Fmg010937+++	+	0
H4	74	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010860+++	+++	0
H5	75	62	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010774+++	+++	0
H6	76	52	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020199-	-	0
H7	77	54	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T1N0M0	2	I	malign	Fmg020088+++	++	3+
H8	78	52	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010934++	++	3+
H9	79	49	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010914+++	+++	3+
H10	80	43	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010835+++	+++	0
I1	81	33	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg050229+++	+++	0
I2	82	47	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020185+	+++	1+
I3	83	32	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	-	IIA	malign	Fmg020087*	*	*
I4	84	38	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010910+	+++	0
I5	85	70	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020146+++	+++	0
I6	86	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg020205+++	++	3+
I7	87	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T3N1M0	2	IIIA	malign	Fmg050234+++	-	1+
I8	88	44	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T4aN0M0	2	IIIB	malign	Fmg050282-	-	2+
I9	89	69	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T3N0M0	2	IIIB	malign	Fmg020184+++	-	0
I10	90	49	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010924+	-	0
J1	91	48	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010840+++	+	0
J2	92	42	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N1M0	2	IIIB	malign	Fmg050720++	-	0
J3	93	42	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N2M0	2	IIIA	malign	Fmg010821+++	+++	0
J4	94	49	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010929-	-	0
J5	95	68	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T4bN0M0	2	IIIB	malign	Fmg010927-	-	3+
J6	96	53	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010922+++	+++	0
J7	97	49	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	3	IIA	malign	Fmg020181-	-	3+
J8	98	69	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	3	IIA	malign	Fmg020178+	-	3+
J9	99	36	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010933-	-	0
J10	100	29	F	Meme	İnvaziv duktal karsinom T2N0M0	2	IIA	malign	Fmg010803-	-	3+
K1	101	51	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg020326++	++	0
K2	102	37	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg020550++	++	0
K3	103	35	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg060379++	+	0
K4	104	45	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg010231-	-	0
K5	105	35	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg010800+	++	0
K6	106	46	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg032110+	+	0
K7	107	49	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg010251+	+	0
K8	108	44	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg020543+	+	0
K9	109	38	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg040763+	+	0
K10	110	37	F	Meme	Kansere bitişik normal-	-	-	NAT	Fmg010802++	+	0

Ek A.6 Çalışmada kullanılan ticari doku mikrodizisinin (TMA) örnek bilgi formu (BR486).

Pozisyon	No.	Yaş	Cinsiyet	Organ/Anatomik Bölge	Patoloji Teşhisi	TNM	Sınıf	Evre	Tip	Doku ID.
A1	1	60	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg020311
A2	2	53	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg020207
A3	3	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T1N0M0	1	I	Malign	Fmg030942
A4	4	51	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	177936
A5	5	39	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	Malign	179516
A6	6	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	179596
A7	7	48	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	Malign	Fmg010703
A8	8	34	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	Fmg020190
B1	9	60	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg020311
B2	10	53	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg020207
B3	11	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T1N0M0	1	I	Malign	Fmg030942
B4	12	51	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	177936
B5	13	39	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	2	IIB	Malign	179516
B6	14	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	179596
B7	15	48	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	1	IIA	Malign	Fmg010703
B8	16	34	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	Fmg020190
C1	17	60	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020311
C2	18	53	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020207
C3	19	46	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg030942
C4	20	51	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	177936
C5	21	39	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	179516
C6	22	50	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	179596
C7	23	48	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg010703
C8	24	34	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020190
D1	25	31	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg010849
D2	26	53	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	180239
D3	27	52	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	Fmg050572
D4	28	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	Fmg020446
D5	29	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	Fmg020396
D6	30	37	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N2M0	2	IIIB	Malign	Fmg020323
D7	31	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	3	IIA	Malign	Fmg010907
D8	32	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N2M0	3	IIIA	Malign	Fmg020458
E1	33	31	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	2	IIA	Malign	Fmg010849
E2	34	53	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	180239
E3	35	52	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	Fmg050572
E4	36	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N1M0	1	IIB	Malign	Fmg020446
E5	37	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N0M0	2	IIIB	Malign	Fmg020396
E6	38	37	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T4N2M0	2	IIIB	Malign	Fmg020323
E7	39	46	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N0M0	3	IIA	Malign	Fmg010907
E8	40	50	F	Meme	İnvazif duktal karsinom	T2N2M0	3	IIIA	Malign	Fmg020458
F1	41	31	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	*	-	AT	Fmg010849
F2	42	53	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	180239
F3	43	52	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	*	-	AT	Fmg050572
F4	44	50	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020446
F5	45	46	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020396
F6	46	37	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020323
F7	47	46	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg010907
F8	48	50	F	Meme	Kansere bitişik normal c-	-	-	-	AT	Fmg020458

EK B: PCR Koşulları

Ek B.1 DNAJA1 Nested PCR Koşulları

<u>PCR Aşamaları</u>	<u>Bisülfite Nested PCR Koşulları*</u>
Başlangıç Denatürasyonu	95°C-2 Dk
Denatürasyon	95°C-30 Sn
Bağlanma	56°C-30 Sn
Uzama	72°C-30 Sn
Son Uzama	72°C-5 Dk

*: 1 ve 2. PCR'ın koşulları aynıdır. Bununla beraber 1. PCR ürünleri 75 µl dH₂O ile seyreltilerek 2. PCR'da bu ürünlerden 2 µl kullanıldı.

Ek B.2 DNAJA2 Nested PCR Koşulları

<u>PCR Aşamaları</u>	<u>Bisülfite Nested PCR Koşulları*</u>
Başlangıç Denatürasyonu	95°C-2 Dk
Denatürasyon	95°C-30 Sn
Bağlanma	56°C-30 Sn
Uzama	72°C-30 Sn
Son Uzama	72°C-5 Dk

*: 1 ve 2. PCR'ın koşulları aynıdır. Bununla beraber 1. PCR ürünleri 50 µl dH₂O ile seyreltilerek 2. PCR'da bu ürünlerden 4 µl kullanıldı.

ÖZGEÇMİŞ

Furkan Çelebi İLERİ 1995 yılında Ankara'nın Çubuk ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Çubuk ilçesinde tamamladı. 2013 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kazandı. Bir yıl ZBEÜ İncirharmanı Kampüsü'nde isteğe bağlı hazırlık ve dört yıllık lisans eğitiminden sonra 2018 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi'nden mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği ZBEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programını sürdürmektedir.

İLETİŞİM BİLGİLERİ:

Adres : Yıldırım Beyazıt Mahallesi 101. Sokak A/1 No:6 Çubuk/ANKARA

Tel : (+90) 530 275 53 67

E-posta : furkanileri.beun@gmail.com