

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EEF2 KİNAZ TARAFINDAN BRD4'ÜN DÜZENLENMESİ
VE BUNLARIN MEME KANSERİ TEDAVİSİ İLE
TÜMÖROGENEZDEKİ ROLLERİ

Sayra DİLMAÇ

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EEF2 KİNAZ TARAFINDAN BRD4'ÜN DÜZENLENMESİ
VE BUNLARIN MEME KANSERİ TEDAVİSİ İLE
TÜMÖROGENEZDEKİ ROLLERİ

Sayra DİLMAÇ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-2423 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteğini, sevgisini ve özverisini hep hissettiğim danışman hocam sevgili Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e;

Doktora tez projemi tamamlamak için beni laboratuvarına kabul eden, her aşamada bilgisi ve önerileriyle yanımda olan danışman hocam sevgili Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a

Houston'da hayatıma güzellikleriyle dokunan Oya ARACI ELMAS, Ekmel ELMAS, Nermin MAK KAHRAMAN, Şeyda BAYDOĞAN ve Pınar KANLIKILIÇER'e;

MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Anabilim Dalı çalışanlarına ve sadece laboratuvarında çalışma şansı vermekle kalmayıp hayatıma önemli değerler de katan Prof. Dr. Gabriel LOPEZ BERESTEIN'a;

Lisans üstü eğitim hayatım süresince bu yolda birlikte yürüdüğüm arkadaşlarım Nilay KUŞCU, Mustafa Gökhan ERTOSUN, Seren HAKSEVER ve Muhlis AKMAN'a;

Lisansüstü eğitim hayatıma adım atarak bu yolu başarıyla tamamlamama yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim süresinde desteklerine hep ihtiyaç duyduğum Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına;

Tüm hayatım boyunca kararlarıma saygı duyan, destekleyen, ben vazgeçtiğim zaman bile kalkıp devam etmem için ellerimden tutan annem Şehriban DİLMAÇ, kardeşlerim Arda ve İlksen DİLMAÇ, her zaman yanımda hissettiğim canım babam Halil DİLMAÇ, dedem Mustafa Kemal AĞIRDAŞ ve anneannem Mukaddes AĞIRDAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Meme kanseri dünyada kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür. eEF2K, meme kanserinde hücre döngüsü, migrasyon ve invazyonu düzenleyen bir alfa kinazdır. BRD4 ise, BET ailesinin bir üyesi olup; RNA polimeraz II'yi aktive etmektedir. eEF2K ve BRD4 arasında bir ilişkinin olduğu hipotezinden yola çıkarak planlanan çalışmamızda; BRD4'ün inhibisyonu ile meme kanseri hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonun nasıl etkileneceğini göstermeyi amaçladık.

Yöntem: MDA-MB-231 hücreleri üzerinde planlanan çalışmamızda; uygun siRNA'lar ve miR 122 ile BRD4 inhibisyonu sağlandı. İnhibisyon sonrası; hücre proliferasyonundaki değişim için MTS testi; koloni oluşumunu değerlendirmek için klonojenik analiz ile hücrelerin metastaz, invazyon ve migrasyon değerlendirmeleri yapıldı.

Bulgular: Sonuçlarımız eEF2K'nin BRD4'ü doğrudan etkilemediğini gösterdi. BRD4'ü inhibe etmek için, uygun siRNA'lar ve miR 122'nin kullanılmasına karar verildi. Bu şekilde planlanan inhibisyonla; siRNA'lar tümör hücrelerinde koloni oluşumunu, invazyonu ve migrasyonu azaltırken; miR 122'nin BRD4 siRNA'ları kadar etkili olmasa da inhibisyonu sağladığı görüldü.

Sonuç: miR 122 BRD4'ü inhibe etmekte ve bu inhibisyon üçlü negatif meme kanseri hücre hattında koloni oluşumunu, migrasyonu ve invazyonu yavaşlatmaktadır. Sonuçlarımız, miR 122 ile BRD4'ün inhibisyonunun agresif karakterli metastatik meme kanserlerinde yeni bir tedavi yaklaşımı oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: BRD4, miR 122, ÜNMK, migrasyon, invazyon

ABSTRACT

Objective: Breast cancer is the most common type of cancer in women in the world. eEF2K is an alpha kinase that regulates cell cycle, migration and invasion in breast cancer. BRD4 is a member of the BET family; RNA activates polymerase II. In our hypothesis whether there was any relationship between eEF2K and BRD4. We aimed to clarify how the inhibition of BRD4 is affected by proliferation, migration and invasion in breast cancer cells.

Method: In our study, we were used MDA-MB-231 cells. BRD4 inhibition was achieved with appropriate siRNAs and miR 122 in MDA-MB-231 cells. After the BRD4 inhibition; we performed MTS test for change in cell proliferation; clonogenic assay to evaluate colony formation. Invasion and migration analyzes were performed to explain the metastatic properties of the cells.

Results: Our results showed that eEF2K does not directly affect BRD4. For BRD4 inhibition, it was decided to use appropriate siRNAs and miR 122. After BRD4 inhibition, BRD4 siRNAs reduced colony formation, invasion and migration in tumor cells. Furthermore, miR 122 was shown to provide inhibition, although not as effective as BRD4 siRNAs.

Conclusion: miR 122 inhibits BRD4, and this inhibition slows colony formation, migration and invasion in the triple negative breast cancer cell line. Our results suggest that, inhibition of BRD4 with miR 122 could create a new treatment approach in aggressive metastatic breast cancers.

Key words: BRD4, miR 122, TNBC, migration, invasion

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1 Meme Kanseri	3
2.2. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 (eEF2)	9
2.2.1. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz (eEF2K)	10
2.3. Bromodomain ve Ekstraterminal Domain-İçeren (BET) Protein Ailesi	14
2.3.1. Bromodomain 4	15
2.4. MikroRNA	19
2.4.1. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Düzenlenmeleri	20
2.4.2. MikroRNA'lar ve Kanser	21
2.4.3. MikroRNA 122	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğaltılması	26
3.1.1. Hücrelerin siRNA ile Transfeksiyonu	26
3.1.2. Transfekte Edilen Hücrelerin Toplanması	28
3.1.3. Lentivirüs ile Konjuge Edilen Hücrelerinin Çoğaltılması	28
3.1.4. Hücrelerin MikroRNA ile Transfeksiyonu	28
3.1.5. Transfekte Edilen Hücrelerden Lizat Eldesi ve Protein Miktarı Tayini	29
3.2. Western Blot Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi	30
3.3. MTS Hücre Canlılık Testi	31

3.4. Klonojenik Canlılık Testi	32
3.5. Migrasyon Testi	32
3.6. İnvazyon Testi	33
3.7. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. siRNA'lar ile Transfeksiyonların Gösterilmesi	35
4.1.1. eEF2 Kinaz Ekspresyon Değişiminin BRD4 Proteinin Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi	37
4.2. mikroRNA'lar Yardımıyla BRD4 Protein Seviyesi Değişiminin Gösterilmesi	41
4.3. MDA-MB-231 Hücrelerinde BRD4 ve miR 122 ile Transfeksiyon Sonrası Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	43
4.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde BRD4 İnhibisyonunun Ardından Klonojenik Testi ile Koloni Oluşumlarının Gösterilmesi	45
4.5. MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon Testi Sonuçları	47
4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde İnvazyon Testi Sonuçları	50
4.7. MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon ve İnvazyon Test Sonuçlarının Doğrulanması	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 ÜNMK’de görülen alt tiplerin belirteçleri ve kemoterapi hassasiyetleri ve aktif olan hücre içi sinyal iletim mekanizmaları görülmektedir	7
Tablo 3.1. siRNA transfeksiyonu için kullanılan siRNA’lar görülmektedir	27
Tablo 3.2. Western Blot yöntemi için kullanılan solüsyonlar	30
Tablo 3.3. Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Translasyonel elongasyon aşaması. Başlatma aşamasından (initiasyon) sonra elongasyon süreci, birbirini takip eden bir dizi uzama adımı içerir. Her adım, mRNA'nın ribozom boyunca hareket etmesini sağlar, böylece uzayan polipeptidi taşıyan tRNA, P-bölgesi (peptit bölgesi) olarak adlandırılan 60S alt biriminin bir cebine tutunur. Uzama faktörü eEF1 ile, gelen her aminoasil-tRNA'yı doğru kodon-antikodon etkileşimlerine bağlı olarak A bölgesine (amino asit bölgesi) taşır. P bölgesindeki peptit, peptitiltransferaz olarak bilinen ribozim aktivitesinin etkisiyle A bölgesindeki amino aside aktarılır. Peptit transferini takiben uzama faktörü eEF2, boş tRNA'yı 60S ribozomunun P bölgesinden E bölgesine (ejeksiyon bölgesi) taşıyarak elongasyonun devamlılığını indükler. A bölgesini boş kaldığında mRNA'nın bir sonraki kodonu üzerinde yerleşmiştir ve yeni aminoasit tRNA'yı bağlamak için hazırdır. İşlem bir durdurma kodonu ile karşılaşılana kadar devam eder (Casabona M.R.C ark.'dan uyarlanmıştır.). 10

Şekil 2.2 eEF2'nin eEF2K tarafından fosforillenmesi ve inhibisyonu görülmektedir. (Hizli ve ark., 2013). eEF2, aktif haldeyken protein sentezinin uzama aşaması devam etmektedir (yeşil ok). Ancak, eEF2K tarafından Thr56'dan fosforillendiği zaman eEF2 inaktif hale geçmekte ve ribozoma bağlanamadığı için protein sentezinin uzama aşaması da yavaşlamaktadır (kırmızı ok) (Hizli A.A ve ark.'dan uyarlanmıştır.).

11

Şekil 2.3 eEF2K'nin domain yapısının ve regülasyonunun şematik gösterimidir. Kırmızı veya yeşil, kısımlar fosforilasyon ile eEF2K'yi inhibe eden veya aktive eden alanları belirtmektedir (Kenney ve ark., 2014). 11

Şekil 2.4 Bromodomain ve ekstraterminal (BET) protein ailesinin ve BET – NUT füzyon proteinlerinin temel yapısı görülmektedir. Her BET proteini iki bromodomain (BD1 ve BD2) ve bir ekstraterminal (ET) domain içerir. BRD4 ve BRDT'nin ilave bir karboksil terminal motifi (CTM)

bulunmaktadır. NUT orta hat karsinomu (NMC) hastalarında bulunan BRD3–NUT ve BRD4–NUT füzyon proteinleri, BRD3 veya BRD4’ün amino terminaline eklenen NUT proteiniyle BRD3 ve BRD4’ten ayrılır (Xu ve Vakoc, 2017). 14

Şekil 2.5 BRD4’ün hücre içi görevi ve inhibisyonunun gösterimi. A) Süper Enhanser’in (SE) organizasyonunda ve esas yapının oluşmasında BRD4 fonksiyonunun şematik gösterimi. Hiperasetile edilmiş kromatin bölgelerine bağlanan BRD4, SE ile promotor arasında bir köprü oluşturan, RNA-Pol II’nin bağlanmasını destekleyen ve stabilize eden geniş bir transkripsiyon düzenleyici protein platformunun kurulmasına aracılık eder. BRD4 ayrıca P-TEFb’nin RNA-Pol II’ye bağlanarak aktive olmasını sağlar. B) BETi’nin SE organizasyonu üzerindeki etkisi. BETi, BRD4’ü kromatine bağlanma bölgelerine tutunarak SE ile promotor arasındaki etkileşimi bozmaktadır. Bu durum da BRD4 aracılı genlerin transkripsiyonunu engellemiş olur. 16

Şekil 2.6 MikroRNA biyogenezi (Peng ve Croce, 2016). 21

Şekil 2.7 miR 122’nin biyogenezi (Gebert ve ark., 2014). pri-miR 122’nin ilk olarak Drosha ile poli A kuyruğu kesilerek pre-miR 122 oluşturulur. Ardında Dicer ile kesilerek exportin yardımıyla nukleusu dışına taşınır ve aktif miR 122 oluşturulmuş olur. 23

Şekil 4.1 eEF2 Kinaz siRNA’ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde eEF2K ekspresyonu görülmektedir . 35

Şekil 4.2 BRD4 siRNA’ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4, c-Myc, BRD2 ve eEF2K proteinlerinin ekspresyonu görülmektedir. BRD4 inhibisyonunun BRD2 ve eEF2K’nın ekspresyonlarını etkilemediği, ancak c-Myc ile doğrudan ilişkili olduğu dikkati çekmektedir. 37

Şekil 4.3 eEF2K siRNA’ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 proteininin ekspresyonu görülmektedir. 38

Şekil 4.4 A) eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 proteininin ekspresyon seviyesi görülmektedir. B) eEF2K

lentivirüsü ile konjuge edilen hücrelerde eEF2K protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir. C) eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilen hücrelerde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir.

39

- Şekil 4.5** A) eEF2K siRNA'sı ile inhibe edilen MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde eEF2K ve BRD4 proteinlerinin ekspresyonu görülmektedir. B) eEF2K siRNA'sı ile inhibisyon sonrası MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde eEF2K protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir. C) eEF2K siRNA'sı ile inhibisyonun ardından MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir.

40

- Şekil 4.6** Farklı mikroRNA'lar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 ve c-Myc proteinlerinin ekspresyonları görülmektedir. B) Farklı mikroRNA'lar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir (**** $p<0,0001$, *** $p=0,0001$).

42

- Şekil 4.7** BRD4 siRNA'ları ve miR 122 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 ekspresyonu görülmektedir.

43

- Şekil 4.8** MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonlarından 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir

44

- Şekil 4.9** MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyondan 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir ($*p<0,05$).

44

- Şekil 4.10** MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 ve miR 122 ile transfeksiyonlarından 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir.

45

- Şekil 4.11** A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra koloni oluşturan hücreler görülmektedir. B) Koloni oluşturan hücre sayılarının MDA-MB-231 (siRNA ile transfekte edilmeyen hücreler) grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir (** $p<0,005$, *** $p<0,0001$).

46

- Şekil 4.12** A) MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra koloni oluşturan hücreler görülmektedir. B) Koloni oluşturan hücre

sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir (* $p<0,05$). 47

Şekil 4.13 A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyonlarının azaldığı görülmektedir. B) Migrasyon sonrası kapanan alanın yüzde değerleri görülmektedir (* $p<0,05$). 49

Şekil 4.14 A) MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra 24 ve 48. saatlerde hücrelerin migrasyonlarının azaldığı görülmektedir. B) Migrasyon sonrası kapanan alanın yüzde değerleri görülmektedir (** $p<0,005$). 50

Şekil 4.15 A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra invaze olan hücreler görülmektedir. B) İnvaze olan hücre sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir. 52

Şekil 4.16 A) MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra invaze olan hücreler görülmektedir. B) İnvaze olan hücre sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir. 53

Şekil 4.17 BRD4 inhibisyonun ardından MDA-MB-231 hücrelerinde p-c-Src ve Src protein seviyeleri görülmektedir. 54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt (PKB)	: Protein Kinaz B
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
AR	: Androjen Reseptörü
ATR	: Ataksi-Talenjiektazi Mutasyonlu ve Rad3 İlişkili
BCA	: Bikinkoninik Asit
BET	: Bromodomain Ekstra Terminal Alan
BETi	: BET İnhibitörü
BL	: Bazal Benzeri
BRCA	: Meme Kanseri Geni (BREast CAncer)
BRD/BD	: Bromodomain
BSA	: Bovin Serum Albumin
Ca⁺²	: Kalsiyum
Cam	: Kalmodulin
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
Cap2	: Adenilil siklaz-ilişkili protein 2
CCL	: Kemokin (C-C) Ligand
Cox-2	: Siklooksijenaz 2
CXCL	: Kemokin (C-X-C) Ligand
c-Myc	: Hücresel Miyelositomatoz
c-Src	: c-Sarkoma
CTM	: Karboksil Terminal Motifi
DMEM	: Dulbelco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyum
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

E2F1	: E2 Transkripsiyon Faktörü 1
E-box	: Enhanser Box
E-Kaderin	: Epitelial Kaderin
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
eEF	: Ökaryotik Uzama Faktörü
eEF2	: Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2
eEF2K	: Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eIF4E	: Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
EPHA2	: Efrin Tip A Reseptör 2
ER	: Östrojen Reseptörü
ERK	: Hücre dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
FBS	: Fetal Sığır Serum
FGF2	: Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FOXA1	: Forkhead Box Protein A1
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HCV	: Hepatit C Virüsü
HDAC	: Histondeasetilaz
Her2/neu	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IGF1R	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
IL	: İnterlökin
IM	: İmmünomodülatör
IRF	: İnterferon Düzenleyici Faktör
JAK	: Janus Kinaz

KRT18	: Sitokeratin18
KSHP	: KH-Domain Splicing Düzenleyici Protein
LAR	: Lüminal Androjen Reseptörü
LNCRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
M	: Mezenkimal
MET	: Mezenkimal Epiteliyal Dönüşüm
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: Mikro RNA
MSL	: Mezenkimal Kök Hücre Benzeri
mTOR	: Memeli Rapamisin Hedefi
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-Karboksimethoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MYC	: Miyelositomatoz
N-Kaderin	: Nöronal Kaderin
NF- κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Öldürücü Hücre
NMC	: NUT orta hat karsinom
NRAS	: Nöroblastoma Rat Sarkoma
NUT	: Testisteki nükleer protein
p70S6K	: Ribozomal Protein S6 Kinaz Beta 1
PBS	: Fosfatlı Tuz Tamponu
p-c-Src	: Fosfo c-Sarkoma
PDGFR	: Platelet Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
PI3K	: Fosfoinositol 3-Kinaz
PIK2CA	: Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa

PMS	: Fenazin metosülfat
PR	: Progesteron Reseptörü
pre-miRNA	: Öncül mikroRNA
pri-miRNA	: Primer mikroRNA
PS	: Penisilin Streptomisin
P-TEFb	: Pozitif Transkripsiyon Uzama Faktörü b
PVDF	: Polivinilidin Florid
RIPA	: Radyoimmunopresipitasyon Deney Tamponu
RISC	: RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNA Pol II	: RNA Polimeraz II
RPPH1	: Ribonükleaz P RNA Komponent H1
SE	: Süper Enhanser
Ser	: Serin
siRNA	: Small İnterfering RNA
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
STK31	: Serin-Treonin Kinaz 31
T	: Tween-20
TBS	: Trisli Tuz Tamponu
TF	: Transkripsiyon Faktörü
Tfdp2	: Transkripsiyon Faktörü DP-2
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TP53	: Tümör Protein 53
ÜNMK	: Üçlü Negatif Meme Kanseri

VAT	: Viseral Adipoz Doku
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
Wnt	: Wingless (Kanatsız)
XBP1	: X-Box Bağlanma Protein 1



1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olmakla beraber, kansere bağlı görülen ölümlerin de ikinci sebebidir (Bray ve ark., 2018; Deshmukh ve ark., 2019). Meme kanseri tedavisi meme kanserinin alt tiplerine göre farklılık göstermektedir. Bugün bilinen tedavilere en zor yanıt veren meme kanseri tipi üçlü negatif meme kanseridir (ÜNMK). Bunun sebebi; ÜNMK, östrojen Reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Her2/neu) reseptörlerinin üçünü de hücre yüzeyinde barındırmamasından kaynaklanmaktadır. Hormon bağımlı hücre yüzey reseptörlerinin olmayışı, hormonal tedaviye yanıt vermemesini ve kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesini sağlamaktadır (Chavez ve ark., 2010). Bu sebeple günümüzde ÜNMK'nin tedavisinde yeni terapötik tedavi yöntemleri üzerinde önemle durulmakta ve hedef terapötikler belirlenmeye çalışılmaktadır.

Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 (eEF2), mesajcı RNA (mRNA) translasyonunun uzama aşamasında ribozom translokasyonuna aracılık etmektedir (Ryazanov ve Davydova, 1989). Aktif haldeki eEF2; eEF2 kinaz (eEF2K) tarafından Thr56 (Treonin 56)'dan fosforillenir ve bu fosforilasyonla eEF2 inaktif hale geçerek protein sentezini uzama aşamasında durdurur (Redpath ve Proud, 1989; Carlberg ve ark., 1990). eEF2 kinaz'ın inhibe edilmesi ile hücre siklusunun G1/S evresinde durdurulduğu bilinmektedir (Tekedereli ve ark., 2012). Bu bilgiye ek olarak eEF2 kinaz *in vitro* şartlarda aktive edildiğinde tümör hücrelerinin sağ kalımı, proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonunun arttığı bildirilmiştir (Ashour, Abdel-Aziz, ve ark., 2014).

Bromodomain protein ailesi; histonları lizin bölgesinden asetilleyen proteinlerdir. Bu aile üyeleri; histon asetiltransferazlar, kromatin ile ilişkili proteinler, transkripsiyonel ko-aktivatörler, histon metiltransferaz ve bromodomain ekstra-terminal alan (BET) proteinleridir (Haynes ve ark., 1992). Bu ailenin bir üyesi olan BRD4, histonlara Kac kısmından bağlanır ve pozitif transkripsiyon uzatma faktörü b (P-TEFb)'nin düzenlenmesini sağlayarak, hücre siklusunun ilerlemesini sağlar (Jang ve ark., 2005; Z. Yang ve ark., 2008).

Çalışmamızda; eEF2 kinaz ve BRD4'ün hücre siklusunun ilerlemesinde ve tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyon yetenekleri üzerindeki etkisi dikkate alındığında, bu iki proteinin tümör gelişimi ile ilişkilerinin olabileceği hipotezinden yola çıkarak; eEF2 kinaz ve BRD4'ün karşılıklı bir ilişki içerisinde olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca, eEF2 kinaz ve BRD4 ilişkisinin ÜNMK hücrelerinin gelişimini nasıl etkilediğinin de ortaya konması hedeflenmiştir. Literatürde eEF2 kinaz ve BRD4'ün ilişkili olabileceğine dair bir çalışma bulunmadığından; çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile, ÜNMK hücrelerinin gelişimini engelleyebilecek yeni hedefler ortaya konmuştur. Bu açıdan bu tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde henüz literatürde yer almayan yeni hedeflerin ortaya konduğu görülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Karsinogenez; organizmada bulunan hücre ya da hücre gruplarının vücut içi ya da dışarıdan gelen faktörlerin etkisi ile, organizmanın kontrol mekanizmalarından kaçarak kontrolsüz şekilde çoğalması ile başlayan karmaşık bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu kontrol dışında kalan hücreler organizmada hayatta kalmayı başararak, kitle halini almaya başladıklarında kanser adı verilen hastalık ortaya çıkmaktadır. Kanser tanımı oldukça genel bir isimlendirme olup, organizmadaki her doku ya da organda farklı şekilde seyreden, farklı histolojik ve fizyolojik özelliklere sahip farklılaşmış hücre topluluklarının oluşturduğu normal olmayan hücre grubudur (Smellie ve Sacks, 1994). Cinsiyet gözetmeksizin sıklıkla karşılaşılan kanser tipleri; kan, akciğer, lenf, meme, prostat, gastrointestinal sistem ve sinir sistemi kanserleridir (Mortality ve Causes of Death, 2016). Her yıl binlerce hastaya farklı kanser tanıları konmakta ve bu sayı günümüzde giderek artmaktadır. Her bir kanser türü için de günümüzde kabul gören farklı tedaviler bulunmaktadır. Ancak, bu tedavilerle birçok kanser türü için hastalığın tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmamaktadır. Literatüre kazandırılan her yeni bilgi kanser tedavisi için yeni bir yaklaşım ortaya koyacağından ciddi bir önem içermektedir (Zugazagoitia ve ark., 2016).

2.1.1. Meme Kanseri

Meme, farklı hormonların hedefi olan göğüs boşluğunun ön kısmında büyük pektoralis kasının üzerinde yer alan modifiye edilmiş bir bezdir. Yeni doğan bebeği beslemek için özel bir işleve sahiptir. Meme, hormonal kontrol altında süt üretimini sağlayan glandüler yapılardan oluşur. Bu yapılar, beslenme ve koruma sağlayan fibrovasküler ve yağ dokusu ile çevrilidir. Meme, işlevi sütü asinustan meme ucuna taşımak olan kanal ağından oluşur. Sayıları 15-20 olan büyük kanallar salgılarını, retroareolar ampullaya boşaltır. Bu kanallar daha küçük kanallara bölünür. Bu ağın tamamı duktal ağacı oluşturur. Kanal boyutu ne olursa olsun histolojik yapıları aynıdır: kanalın iç kısım, lümeni kaplayan tek bir epitel hücre tabakası içerir. Daha derinden, bazal membran çevresindeki miyoepitelyal hücrelerinin de bulunduğu bir tabaka bulunur. Kanallar, kasılıp gevşeme kabiliyetine

sahiptir; böylece lümeni daraltır ve sütün geçişini kolaylaştırır (Guinebretiere ve ark., 2005).

Meme lobülleri kanalların sonunda yer alır. Meme lobülleri, sütün sentezini sağlayan memenin fonksiyonel birimleridir. Her lobül, terminal kanala açılan asinus adı verilen yaklaşık yirmi adet küçük glandular yapıdan oluşur. Kanallar gibi her asinus, lümeni kaplayan ve sütün sentezini ve salgılanmasını sağlayan epitel tabakası ve bazal membranı kaplayan miyoepitel tabakasından oluşur. Kanallar ve meme lobülleri kan ve lenfatik damarlar, sinirlerden oluşan, beslenme ve destek sağlayan bağ dokusu ile çevrilidir (Guinebretiere ve ark., 2005). Meme kanallarında ve lobüllerinde oluşan anormal hücrel değişim meme kanserine sebep olabilmektedir.

Kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biri olan meme kanseri ve alt tipleri için de günümüzde birçok farklı tedavi yaklaşımı bulunmakla beraber, hala kanser sebepli ölümlerin kadınlardaki en yaygın nedenlerinden biridir (Zugazagoitia ve ark., 2016) (Coleman ve ark., 2008). Meme kanserleri farklı morfolojik ve biyolojik özelliklere sahip heterojen bir hücre topluluğudur. Dolayısıyla da farklı klinik davranışa sahip ve tedaviye farklı yanıt veren alt tiplerden oluşmaktadır (Tsang ve Tse, 2020).

Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi meme kanserleri de malign ve benign olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu iki kanser türünün de hücrelerin sahip oldukları özelliklere göre alt tipleri bulunmaktadır (Akram ve ark., 2017).

İnvaziv Olmayan Meme Kanseri

Bu kanser tipi yer aldığı lobül (süt kanalları) dışında yerleşmeyen bir kanserdir (West ve ark., 2017). En bilinen örneği *in situ* duktal karsinomdur. *In situ* duktal karsinom, süt kanallarında atipik hücrelerin gelişimiyle ortaya çıkar ve süt kanallarının dışına uzanmaz. Atipik hücreler lobüllerin veya kanalların dışındaki dokulara direk olarak invaze olmasa da ilerleyebilir ve invaziv meme kanserine dönüşebilirler (Akram ve ark., 2017). Tedavisinde koruyucu olarak meme dokusunun çıkarılmasına gerek yoktur (Posner ve Wolmark, 1992).

***In Situ* Duktal Karsinom**

İnvaziv olmayan meme kanserinin en genel türüdür. Yerleşimi sadece meme kanalı ile sınırlıdır (Harris ve ark., 2016).

***In Situ* Lobüler Karsinom**

Bu tip meme kanseri meme kanalı lobüllerinde görülür (Inoue ve ark., 2017). Lobüllerin dışında yani meme dokusunda yerleşim göstermez. *In situ* lobüler karsinom genellikle invaziv olmayan meme kanseri olarak tanımlanmaktadır (Clauser ve ark., 2016).

İnvaziv Meme Kanseri

İnvaziv meme kanserinde, lobüllerin içindeki kanserli hücreler meme dokusundan ayrılıp metastatik yetenek kazanırlar. Kanser hücreleri, kan damarları veya sistemik dolaşım yoluyla memeden vücudun farklı bölgelerine geçebilirler. İnvaziv meme kanseri kadınlarda en sık görülen meme karsinomudur (Harris ve ark., 2016). Bu hücreler yaygın olarak lenf nodları, beyin, kemikler, akciğerler ve karaciğere metastaz yaparlar. Bu hücreler meme dokusunda kontrolsüz olarak bölünerek uygun koşulları sağladıklarında bulundukları yerden ayrılır ve farklı organlara yerleşerek ve yeni odaklar oluşturma eğilimindedirler (Ryazanov ve Davydova, 1989). Yeni yerlerine ulaşan hücreler vücudun farklı bölgelerinde gelişiyor olsa da hala meme kanseri hücreleridirler (Page ve ark., 2017).

İnfiltrate Olan Lobüler Karsinom

İnfiltrate olan lobüler karsinom da invaziv lobüler karsinom olarak kabul edilir. Bunlar, memedeki süt bezlerinde gelişir, sıklıkla da vücudun diğer kısımlarına metastaz yapma yeteneğine sahiptirler (Arpino ve ark., 2004).

İnfiltrate Olan Duktal Karsinom

İnfiltrate olan duktal karsinom da invaziv duktal karsinom olarak kabul edilir. Bu karsinom tipi memedeki süt kanallarında gelişir. Tüm meme dokusuna yayılabilir ve vücudun diğer kısımlarına metastaz yapma potansiyeline sahiptir (Somari ve ark., 2003).

Müsinöz Karsinom

Kolloid karsinom olarak da bilinen, müsinöz karsinom, mukus üreten kanser hücreleri tarafından oluşturulan nadir bir meme kanseri alt tipidir. Müsinöz karsinomlu kadınlar genellikle invaziv karsinomlu kadınlardan daha iyi bir tedavi profiline sahiptirler (Akram ve ark., 2017).

Tübüler Karsinom

Tübüler karsinomlar özel bir tür invaziv meme karsinomudur. Tübüler karsinomlu kadınlar genellikle diğer invaziv karsinomlu hastalardan daha iyi sağ kalım oranlarına sahiptirler (Akram ve ark., 2017).

İnflamatuvar Meme Kanseri

İnflamatuvar meme kanseri, lenf damarlarında veya kanallarda yerleşen tümör hücrelerinden kaynaklanmaktadır. İnflamatuvar meme kanseri, nadir görülmesine rağmen son derece hızlı büyüebilmektedir (Joglekar-Javadekar ve ark., 2017).

Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK)

ÜNMK, Östrojen (ÖR) ve progesteron (PR) hormonları ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) yüzey reseptörünün her üçünü de hücre yüzeyinde bulundurmayan meme kanseri olarak tanımlanmaktadır (Hammond ve ark., 2010; Pareja ve Reis-Filho, 2018; Wolff ve ark., 2018). ÜNMK, tüm meme kanserlerinin %12 ila 17'sini oluşturur, sıklıkla genç kadınları etkilemektedir ve kötü prognoza sahiptir (Foulkes ve ark., 2010). Bu fenotipte tipik olarak erken relaps görülür buna ek olarak karaciğer, akciğer ve merkezi sinir sistemi metastazlarıyla da oldukça sık karşılaşılır (Haffty ve ark., 2006). Bu durumda, patolojik olarak değerlendirildiğinde hastalığın evresi genellikle evre 3 olarak belirlenir. Klinik olarak ÜNMK, diğer meme kanseri türlerinden daha şiddetli bir seyir göstermektedir. Yüksek nüks riski, kısa süreli ilerlemesiz sağkalım ve kısa süreli genel sağkalım ile karakterizedir (Mustacchi ve De Laurentiis, 2015). Erken evre ÜNMK (aşama I-III) olan hastaların %50'sinde hastalık nüksü görülür ve hastaların %37'sinde ameliyattan sonraki 5 yıllık süreçte mortalite izlenir (Liedtke ve ark., 2008).

ÜNMK klinik olarak heterojendir, morfolojik, mutasyonel fenotip ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimin ilerlemesinde diğer meme kanserlerinden farklı bir profil

göstermektedir. Yeni nesil sekans dizileme çalışmalarıyla, ÜNMK'nin heterojenliği konusundaki bilgilere her gün yenileri eklenmektedir (Liedtke ve ark., 2008).

Üçlü Negatif Meme Kanseri Alt Tipleri

ÜNMK'nin moleküler heterojenliği fark edildikten sonra, yapılan araştırmalarda alt tipleri, hastalık prognozu veya sistemik tedaviye beklenen cevap temelinde sınıflandırılmaktadır. İlk çalışmalarla, 587 ÜNMK hastasından alınan primer tümörlerde, tümörlerin gen ekspresyon profilleri çıkarılmış ve 21 gen ifadesi veri setinde farklılık görülerek, 6 farklı ÜNMK gen ekspresyonuna sahip alt tip belirlenmiştir (Lehmann ve ark., 2011). Alt tipler ekspresyon modellerine göre adlandırılmıştır. Bunlar; bazal benzeri 1 ve 2 (BL1 / 2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve lüminal androjen reseptörü (LAR)'dür (Tablo 2.1). Bu sınıflandırmanın ardından, yaklaşık 30 farklı ÜNMK hücre hattı, farklı alt tiplerin modelleri olarak tanımlanmıştır (Sporikova ve ark., 2018).

Tablo 2.1. ÜNMK'de görülen alt tiplerin belirteçleri, kemoterapi hassasiyetleri ve aktif olan hücre içi sinyal iletim mekanizmaları görülmektedir.

ALT TİP	Farklılık Görülen Sinyal Yolağı	Önemli Belirteçler	Kemoterapi Hassasiyeti
Bazal Benzeri 1	Hücre Döngüsü, Proliferasyon, DNA Hasarı	ATR, BRCA, MYC, NRAS, Ki67	Çok iyi
Bazal Benzeri 2	Hücre Döngüsü, Proliferasyon, Büyüme Faktörleri, Glikoneogenez	EGFR, MET, EPHA2, TP53	Çok zayıf
İmmünomodülatör	İmmün Hücre Sinyalleri	JAK1/2, STAT1/4, IRF1/7/8, TNF	Orta
Mezenkimal	EMG, Hücre Motilitesi, Farklanma, Proliferasyon	Wnt, ALK, TGF-β	Orta
Mezenkimal Kök Hücre Benzeri	EMG, Hücre Motilitesi, Farklanma, Büyüme Faktörleri, Anjiyogenez	EGFR, PDGFR, ERK1/2, VEGFR2	Orta
Lüminal Androjen Reseptörü	Androjen/Östrojen Metabolizması, Steroid Sentezi, Porfirin Metabolizması	AR, FOXA1, KRT18, XBP1	Zayıf

Tabloda görüldüğü üzere; hem BL1 hem de BL2 alt tipleri DNA hasarı oluşturan ajanlara (cisplatin gibi) duyarlıdır ve hücre döngüsü ile DNA hasar-cevap genlerinin yüksek ekspresyonuna sahiptirler. BL1, hem hücre bölünmesinin hem de DNA hasar-yanıt genlerinin yüksek ekspresyonunun yanı sıra, artmış Ki67 ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. BL2, yüksek seviyelerde büyüme faktörü sinyalleri, glikoliz ve glukoneogenezin ve artmış miyoepitelyal belirteçlerle karakterizedir (Lehmann ve ark., 2011; Sporikova ve ark., 2018).

Hem M hem de MSL alt tipleri, uzak metastazsız sağkalımın azalması ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) / rapamisin (mTOR) inhibitörleri ve dasatinibin mekanik hedefine pozitif yanıt vermeleri ile karakterizedir. M ve MSL alt tiplerinin gen ekspresyon profilleri, kemoterapi dirençli metaplastik meme kanserinin gen ekspresyon profilleri ile örtüşür. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMG), hücre motilitesi, hücre dışı matriksin yeniden modellenmesi ve hücrel farklılaşmaya dahil olan genlerin yoğun ekspre oldukları görülmektedir. Proliferasyon genlerinin aşırı ekspresyonunu gösteren M alt tipinden farklı olarak, MSL alt tipinde mezenkimal kök hücre ile ilişkili genlerde de artış görülmektedir. Ayrıca; anjiyogenez, büyüme faktörleri ile kontrol edilen yollarda yer alan genler de yoğun ekspre olmaktadır (Lehmann ve ark., 2011; Masuda ve ark., 2013).

IM alt tipi, immün yanıt sinyal genlerinin (immün hücreler ve sitokin sinyalleri, antijen sunumu yolları gibi) artmış ekspresyonu ile karakterize edilir. IM ekspresyon profili ile medullar meme kanserinin moleküler mekanizmaları oldukça benzerdir ve her iki meme kanseri alt tipi de iyi bir prognoz göstermektedir (Bertucci ve ark., 2006; Lehmann ve ark., 2011).

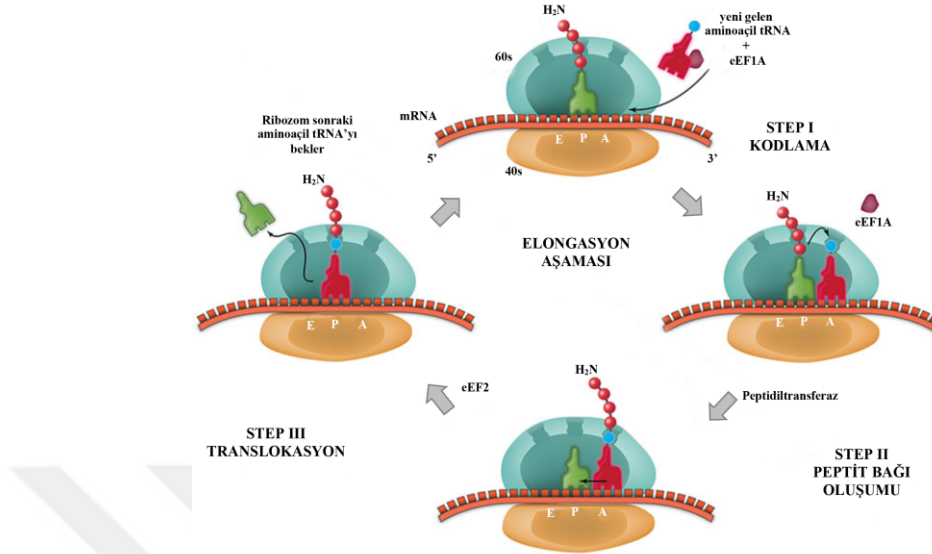
LAR; androjen reseptörünün (AR), AR'nin alt hedeflerinin ve koaktivatörlerinin aşırı ekspresyonuyla karakterizedir. LAR alt tipine sahip hastalar daha kısa nüksüz sağkalım profili gösterirler (Farmer ve ark., 2005). Bu alt tip için olası tedavi yöntemi androjen reseptörü antagonistlerinin (flutamid, enzalutamid, bikalutamid) kullanılmasıdır (Rampurwala ve ark., 2016). Ayrıca, LAR alt tip hücre hatları, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (PIK3CA) kinaz alanındaki bir mutasyonun sonucu olarak, PI3K inhibitörlerine de duyarlıdır (Lehmann ve ark., 2011).

2.2. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 (eEF2)

Ökaryotik hücrelerde translasyon, mRNA'nın (mesajcı RNA) kodununun çözülmesi ile ilerleyen protein sentezi işleminin başlangıç aşamalarından biridir. Translasyon, hücrelerin yeniden mRNA transkripsiyonuna ihtiyaç duymadan protein üretiminin hızla devam ettirilmesini sağlamaktadır (Dever, 2002). Protein translasyonu başlatma (initiasyon), uzama (elongasyon) ve sonlandırma olmak üzere üç adımdan oluşmaktadır. Her bir aşamada spesifik faktörler görevli olup; enerji bağımlı bir hücre içi üretim işlemi gerektirmektedir (Richter ve Klann, 2009). Başlatma adımı en sıkı kontrol edilen basamak olup; protein translasyonunda hız sınırlayıcı bir adım olarak kabul edilmektedir (Proud, 2001).

Protein translasyonunu başlatma, ökaryotik mRNA üzerinde bulunan özel bölgenin ökaryotik başlatma faktörü 4E'ye (eIF4E) bağlanmasıyla aktive olmaktadır (Gingras ve ark., 1999). 40S ribozomal protein Serin6 (S6)'da fosforilasyona uğrar ve S6'nın fosforilasyon seviyesindeki artış translasyonun hızlanmasını sağlamaktadır (Dufner ve Thomas, 1999).

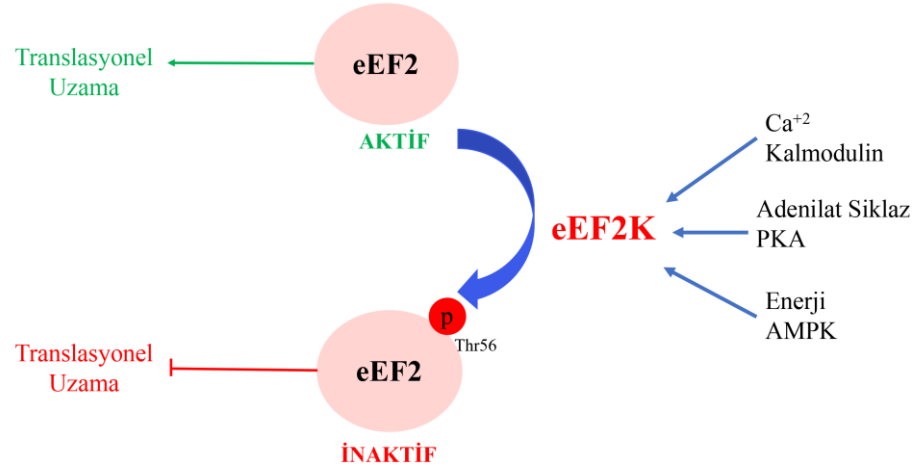
Uzama fazı, büyüyen peptide ilave amino asitlerin eklendiği protein translasyonunun ikinci aşamasıdır. Ökaryotik uzama faktörleri 1A ve 1B (eEF1A ve eEF1B), ribozomun A bölgesine tRNA'ların getirilmesinde görevlidirler (Browne ve Proud, 2002). Ökaryotik Elongasyon faktörü 2 (eEF2), tRNA'nın ribozomun A bölgesinden P bölgesine GTP hidrolizi yoluyla translokasyonuna aracılık eder (Montanaro ve ark., 1976). eEF2, Treonin 56 (Thr56) bölgesinden, bir Kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz olan ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (eEF2K) tarafından fosforile edilir. eEF2'yi fosforile eden bugün bilinen tek kinaz eEF2K'dır. Bu fosforilasyon sonucunda eEF2'nin inaktivasyonu ve uzama adımının inhibisyonu gerçekleşir. Bu inhibisyon genel protein translasyonunu azaltmaktadır (Nairn ve ark., 2001).



Şekil 2.1: Translasyonel elongasyon aşaması (Casabona, 1995). Başlatma aşamasından (initiasyon) sonra elongasyon süreci, birbirini takip eden bir dizi uzama adımını içerir. Her adım, mRNA'nın ribozom boyunca hareket etmesini sağlar, böylece uzayan polipeptidi taşıyan tRNA, P-bölgesi (peptit bölgesi) olarak adlandırılan 60S alt biriminin bir cebine tutunur. Uzama faktörü eEF1 ile, gelen her aminoasil-tRNA'yı doğru kodon-antikodon etkileşimlerine bağlı olarak A bölgesine (amino asit bölgesi) taşır. P bölgesindeki peptit, peptidiltransferaz olarak bilinen ribozim aktivitesinin etkisiyle A bölgesindeki amino aside aktarılır. Peptit transferini takiben uzama faktörü eEF2, boş tRNA'yı 60S ribozomunun P bölgesinden E bölgesine (ejeksiyon bölgesi) taşıyarak elongasyonun devamlılığını indükler. A bölgesini boş kaldığında mRNA'nın bir sonraki kodonu üzerinde yerleşmiştir ve yeni aminoasil tRNA'yı bağlamak için hazırdır. İşlem bir durdurma kodonu ile karşılaşılana kadar devam eder (Casabona M.R.C ark.'dan uyarlanmıştır.).

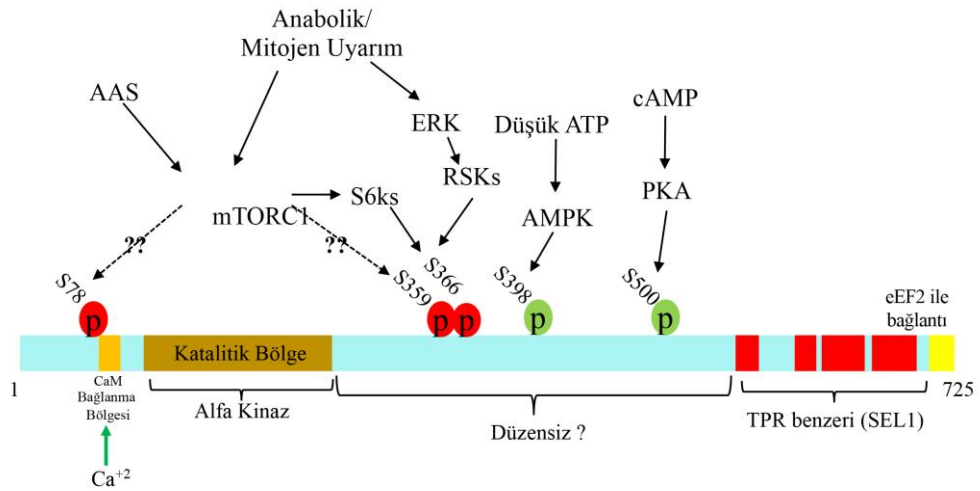
2.2.1. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz (eEF2K)

Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz, eEF2'yi fosforile eden ve etkisiz hale getiren bir kalsiyum/kalmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) bağımlı protein kinazdır. eEF2K bu nedenle protein sentezinin uzama aşamasının negatif bir düzenleyicisidir (Kenney ve ark., 2014). eEF2K, insan genomunda altı üyesi bulunan, "alfa-kinazlar" olarak adlandırılan küçük bir atipik protein kinaz ailesi üyesi olup; aktivitesi Ca^{2+} iyonlarına bağlıdır. eEF2K'in bugün bilinen tek substratı, uzama faktörü eEF2'dir. Diğer beş aile üyesinin veya substratlarının aktivitesinin düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir (Ryazanov, 2002). eEF2'nin Thr56'da fosforilasyonu ribozom ile bağlanmasını bozduğundan, eEF2K eEF2'yi inhibe eder ve böylece uzama aşamasını yavaşlatır (Şekil 2.2) (Carlberg ve ark., 1990; Price ve ark., 1991).



Şekil 2.2: eEF2'nin eEF2K tarafından fosforillenmesi ve inhibisyonu görülmektedir (Hızlı ve ark., 2013). eEF2, aktif haldeyken protein sentezinin uzama aşaması devam etmektedir (yeşil ok). Ancak, eEF2K tarafından Thr56'dan fosforillendiği zaman eEF2 inaktif hale geçmekte ve ribozoma bağlanamadığı için protein sentezinin uzama aşaması da yavaşlamaktadır (kırmızı ok) (Hızlı A.A ve ark.'dan uyarlanmıştır.)

eEF2K'nin Ca²⁺ iyonları tarafından aktivasyonu, dört Ca²⁺ iyonuna bağlanan ve eEF2K'in katalitik alanına yakın olan ve N-terminal tarafındaki bir bölge ile etkileşime giren kalmmodulin (CaM) tarafından sağlanır (Şekil 2.3) (Kenney ve ark., 2014).



Şekil 2.3: eEF2K'nin domain yapısının ve regülasyonunun şematik gösterimidir. Kırmızı veya yeşil, kısımlar fosforilasyon ile eEF2K'yi inhibe eden veya aktive eden alanları belirtmektedir (Kenney ve ark., 2014).

N-terminalindeki CaM bağlayıcı motifin çıkarılması, eEF2K aktivitesini arttırmaktadır. Bu aktivitenin düzenleyici bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Pigott ve ark., 2012).

Katalitik domain, insan eEF2K'sında yaklaşık 125-320 amino asite sahiptir. C- terminali ise aktivite için gerekli olan bir otofosforilasyon bölgesidir (Thr348) (Kenney ve ark., 2014). eEF2K, Serin445 (Ser445) ve Ser500 amino asitlerinden otofosforilasyona uğramaktadır (Tavares ve ark., 2012). Bu alanların eEF2K'in regülasyonundaki rolleri henüz tam olarak açıklanmamış olsa da; Ser500'ün fosforilasyonunun eEF2K'nin Ca^{2+} iyonlarına bağlanmasını azalttığı düşünülmektedir. Otofosforilasyon ise; molekül içi mekanizma ile gerçekleşmektedir (Redpath ve Proud, 1993).

eEF2K ve Protein Sentezi

Protein sentezi, ince ayarlanmış ve sıkı bir şekilde kontrol edilen bir işlemdir. Özellikle, eEF2 ve eEF2K tarafından kontrol edilen protein sentezinin uzama aşaması, kanser hücrelerinin kökenleri ve kalıcılığı hakkında ipuçları sunabilmektedir. Protein sentezinin uzama aşaması birçok kanser araştırmacısının dikkatini çeken önemli bir konu olup; tümör gelişiminde ve büyümesinde düzensizdir. Bu düzensizliğin sebep olduğu en belirgin tümör ilerletici mekanizma ise; hücrelerin apoptozdan kaçınmalarıdır. Kanser hücreleri, metabolik doyumsuzlukları nedeniyle yüksek düzeyde metabolik stres yaşadıkları için protein sentezi de düzensizdir. Bu da tümör hücrelerinin, eEF2'yi fosforile eden, protein sentezini engelleyen ve potansiyel olarak hücrede apoptozu indükleyecek pro-apoptotik ve apoptotik proteinlerin üretilmesini engelleyen bir mekanizmayla kontrol edildiklerini düşündürmektedir (White-Gilbertson ve ark., 2009; X. Y. Liu ve ark., 2012).

eEF2K ve Hücre Siklusu

Normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de hücre siklusunun düzgün şekilde ilerlemesi protein sentezinin ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. Yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinde eEF2 ve eEF2K arasındaki ilişkinin hücre döngüsünü düzenlemek için aktif halde çalıştığı gösterilmiştir (White-Gilbertson ve ark., 2009; Tekedereli ve ark., 2012). Protein sentezinin en yoğun devam ettiği hücre döngüsünün G1-fazında, eEF2 aktif rol oynamaktadır. eEF2 ve eEF2K'nin birbirleriyle olan zıt yönlü ilişkisi nedeniyle, bu fazda Ser366'dan fosforilasyon ile eEF2K inaktif halde tutulmaktadır. Herhangi bir şekilde, eEF2K'nin aktive olmasını sağlamak, G1 fazının durmasına neden olacaktır (White-Gilbertson ve ark., 2009; X. Y. Liu ve ark., 2012).

DNA sentezinin olduğu S fazına girişte eEF2K aktif hale gelir ve bu aşama eEF2K, cAMP (siklik adenosin monofosfat) ve Cap2 (Adenilil siklazil-işkili protein 2) seviyelerinde artış gözlenmektedir. Bu aşamada eEF2K'nin inhibisyonu, S fazına girmeyi de engellemektedir. Redaksiyon ve hücre bölünmesi olarak bilinen G2/M fazlarında, eEF2, eEF2K tarafından fosforilasyona uğrar ve protein sentezi hızla düşer (Celis ve ark., 1990). Bu aşamada eEF2, Thr56'da fosforilasyon ile etkisiz hale getirilir ve eEF2'nin bu aşamada aktif halde olması, G2/M geçişinin durmasına neden olur. Protein uzamasının mekanizması hücre döngüsünün ilerlemesiyle yakından ilişkilidir. Tümör hücrelerinde eEF2/eEF2K ilişkisinin bozulması ile hücre döngüsü düzgün şekilde ilerleyemez (X. Y. Liu ve ark., 2012).

eEF2K ve Tümör Gelişimi

Malign tümörler, tümör hücrelerinin birincil tümör bölgesinden diğerk dokulara yayılmasını sağlayan invazyon ve metastaz yoluyla yayılabilen tümörlerdir. Lokal invazyon, kanser hücreleri tarafından komşu dokulara doğrudan göç ve penetrasyon anlamına gelmektedir. Uzak metastaz, kanser hücrelerinin lenfatiklere ve kan damarlarına ulaşarak, kan dolaşımı veya lenf dolaşım ile vücudun başka yerlerindeki normal dokuları istila etme yeteneğini ifade eder (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Glioma hücreleri ile yapılan bir çalışmada eEF2K inhibisyonu ile tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneklerinin önemli ölçüde azaldığı ve migrasyonun da büyük ölçüde engellendiğı gösterilmiştir (L. Zhang ve ark., 2011). Bu çalışmanın sonuçları eEF2K'nin, glioma hücrelerinin invazyon ve migrasyonunun yüksek olmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

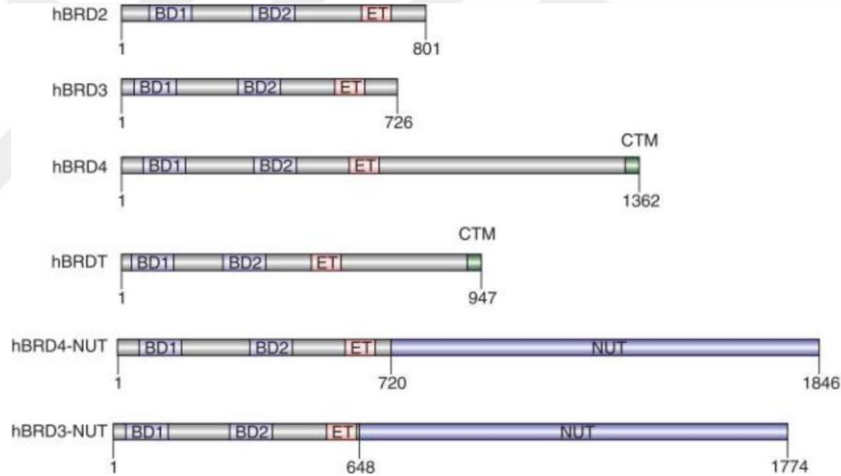
ÜNMK hücre hatları ile yapılan bir çalışmada; eEF2K'nin siRNA (small interfering RNA) yardımıyla susturulmasının ardından hücrelerin invazyon, migrasyon ve proliferasyonlarında ciddi bir azalma görölmüştür. Aynı çalışma *in vivo* fare meme kanseri modelinde denenmiş ve eEF2K'nin lipozomal siRNA aracılığıyla farelere verilmesi sonucunda tümör büyüklüğünün kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Tekedereli ve ark., 2012).

Literatürde yer alan çalışmalar; eEF2K, ÜNMK de dahil olmak üzere birçok kanser türünde tümör hücrelerinin invazyon, migrasyon ve metastatik yeteneklerini arttırarak

tümör gelişimini desteklediği yönündedir. Elimizdeki veriler ışığında eEF2K'nin hedeflenmesi ile ÜNMK'de tümör büyümesi ve metastazın geriletilmesi mümkün olabilecektir.

2.3. Bromodomain ve Ekstraterminal Domain-İçeren (Bet) Protein Ailesi

Memeli Bromodomain ve Ekstraterminal Domain içeren (BET) protein ailesi, tüm hücrelerde eksprese olabilen Bromodomain 2 (BRD2), Bromodomain 3 (BRD3), Bromodomain 4 (BRD4) ve sadece germ hücrelerinde bulunan Bromodomain Testis-Over Spesifik (BRDT) olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır (Şekil 2.4) (S. Y. Wu ve Chiang, 2007; Shi ve Vakoc, 2014). Dört BET proteini de çoklu asetillenmiş peptidlere bağlanan iki korunmuş bromodomaine (BD1 ve BD2) sahiptir (Filippakopoulos ve ark., 2012).



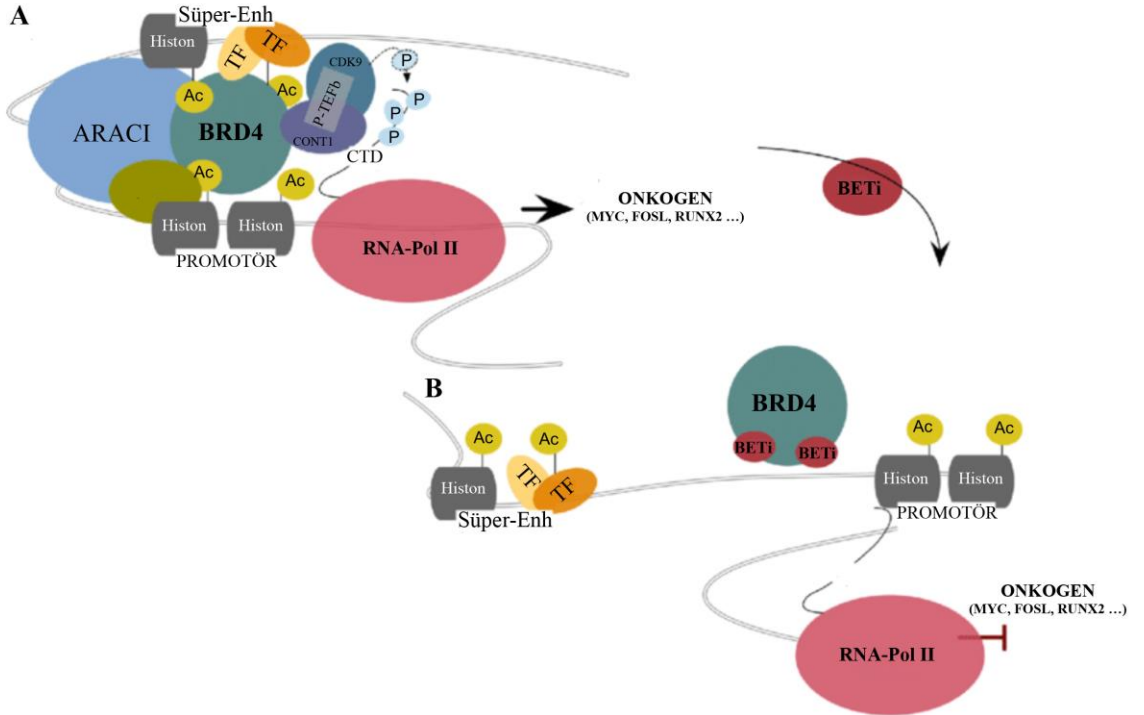
Şekil 2.4: Bromodomain ve ekstraterminal (BET) protein ailesinin ve BET – NUT füzyon proteinlerinin temel yapısı görülmektedir. Her BET proteini iki bromodomain (BD1 ve BD2) ve bir ekstraterminal (ET) domain içerir. BRD4 ve BRDT'nin ilave bir karboksil terminal motifi (CTM) bulunmaktadır. NUT orta hat karsinomu (NMC) hastalarında bulunan BRD3–NUT ve BRD4–NUT füzyon proteinleri, BRD3 veya BRD4'ün amino terminaline eklenen NUT proteiniyle BRD3 ve BRD4'ten ayrılır (Xu ve Vakoc, 2017).

BD1 ve BD2, histonlar ve/veya transkripsiyon faktörleri üzerinde bulunan asetillenmiş lizin rezidülerine bağlanan hidrofobik bir cep içermektedir. Bromodomain proteinleri Pozitif Transkripsiyon Uzama Faktörü-b'ye bağlanabilmekte ve bağlandıktan sonra BET bromodomainleri, P-TEFb'yi aktive etmektedir. Aktivasyon üzerine, P-TEFb, transkripsiyonun uzaması için gerekli olan RNA Polimeraz II'yi (RNA Pol II) karboksil terminal alanındaki Serin 2'den (S2) fosforiller (Barrero, 2017). BET protein ailesinin en kapsamlı incelenen üyesi, P-TEFb'ye doğrudan bağlanabilen tek BET ailesi üyesi olan

BRD4'tür (Perez-Salvia ve Esteller, 2017). BRD4 proteini, kromatin stabilitesinin korunması için gereklidir ve hücre döngüsü sırasında kısmen P-TEFb alımı yoluyla hücrelerin M fazından G1 fazına geçişini kontrol etmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalar, heterozigot Brd4^{+/-} farelerde, BRD4 yokluğunun hücre farklılaşması ve organogenezinde ciddi hasarlara neden olduğunu ve normal hücre döngüsünün ilerlemesiyle hücre gelişim için BRD4'ün gerekli olduğunu göstermiştir (Schweiger ve ark., 2007).

2.3.1. Bromodomain 4

BRD4, embriyogenez ve kanser gelişimi sırasında önemli bir rol oynayan transkripsiyonel ve epigenetik bir düzenleyicidir. BRD4, P-TEFb'ye doğrudan bağlanabilen tek BET ailesi üyesidir ve P-TEFb'ye bağlandıktan sonra RNA Pol II'nin de aktive edilmesi ile önemli genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Şekil 2.5) (Dhalluin ve ark., 1999). Çoklu asetile lizin residüleri, BRD4 ve diğer BET ailesi üyeleri olan proteinler için afiniteleri daha yüksek olan, kromatin boyunca hiper asetillenmiş histon bölgeleri ile etkileşime girer, transkripsiyonel olarak aktif düzenleyici elementler üzerinde birikir ve protein sentezinin hem başlatma hem de uzama adımı gen transkripsiyonuna aracılık eder (Filippakopoulos ve ark., 2012).



Şekil 2.5: BRD4'ün hücre içi görevi ve inhibisyonunun gösterimi (Donati ve ark., 2018). A) Süper Enhanser'in (SE) organizasyonunda ve esas yapının oluşmasında BRD4 fonksiyonunun şematik gösterimi. Hiperasetile edilmiş kromatin bölgelerine bağlanan BRD4, SE ile promotor arasında bir köprü oluşturan, RNA-Pol II'nin bağlanmasını destekleyen ve stabilize eden geniş bir transkripsiyon düzenleyici protein platformunun kurulmasına aracılık eder. BRD4 ayrıca P-TEFb'nin RNA-Pol II'ye bağlanarak aktive olmasını sağlar. B) BETi'nin SE organizasyonu üzerindeki etkisi. BETi, BRD4'ü kromatine bağlanma bölgelerine tutunarak SE ile promotor arasındaki etkileşimi bozmaktadır. Bu durum da BRD4 aracılı genlerin transkripsiyonunu engellemiş olur

Genom temelli çalışmalar, BRD4'ün genom boyunca yaygın olarak dağıldığını göstermektedir. Bu nedenle, yakın zamanda geliştirilen BET-inhibitörlerinin (BETi) kullanılmasıyla BRD4'ün inhibisyonu, hem hematolojik hem de solid maligniteleri hedeflemek için en umut verici stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir (Filippakopoulos ve ark., 2010; Dawson ve ark., 2011). Son kanıtlar, BRD4'ün kanserdeki rolü DNA hasarı onarımı ve kontrol noktası aktivasyonu veya telomer homeostazı gibi süreçleri etkileyen transkripsiyonel olmayan fonksiyonlarının olduğunu da göstermektedir. Bu BRD4'ün kanonikal olmayan aktivitelerinin BETi aracılı inhibisyonunun, kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalmasını önemli ölçüde etkileyebileceğini düşündürmektedir (Donati ve ark., 2018).

Bromodomain 4 ve Transkripsiyonel Regülasyon

BRD4 ilk olarak hücre döngüsünün ilerlemesini sağlamak için mitoz sırasında kromozomlarla ilişkilendirilen bir hücre döngüsü kontrol proteini olarak tanımlanmıştır. BRD4'ün transkripsiyonel aktivitesi, embriyogenez sırasında ve hücre kimliğinin belirlenmesinde gerekli olduğu bildirilmiştir (Di Micco ve ark., 2014; T. Wu ve ark., 2015). Bu durum, BRD4'ün transkripsiyonun regülasyonunda önemli role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Embriyogenezin erken evrelerinde, BRD4'ün, Nanog ve OCT4 gibi Embriyonik Kök Hücre (EKH) transkripsiyon faktörlerini (TF) kontrol ederek; onlarla iş birliği içerisinde EKH'lerin kendi kendini yenilemesinde ve pluripotensilerinin korunmasında role sahip olduğu bilinmektedir (W. Liu ve ark., 2014; T. Wu ve ark., 2015). Farelerde BRD4 olmayan embriyoların, iç hücre kütesini koruyamadıkları için implantasyondan kısa bir süre sonra apoptoza gittiği gösterilmiştir (Houzelstein ve ark., 2002). Gelişimin daha ileri evrelerinde BRD4, köken spesifik genlerin seçici olarak düzenlenmesi yoluyla hücre kimliğinin belirlenmesi için gereklidir. Lee J.E. ve arkadaşları tarafından yapılan

çalışmada ikili koşullu nakavt fare modelinde adipogenez ve miyogenez için BRD4 ekspresyonunun gerekli olduğu da gösterilmiştir (J. E. Lee ve ark., 2017).

Bromodomain 4 ve Kanser

Kanser, normal hücrelerin malign transformasyona uğramasıyla başlayan bir süreçtir. Metabolik veya enfeksiyon hastalıklarının neden olduğu kronik inflamasyon ile malign hücresel dönüşüm arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır (Grivennikov ve Karin, 2010; Andrieu ve ark., 2018). İnflamasyonla mücadele süresince; DNA hasar/onarım mekanizmaları da bozulabilir ve bu durum neoplastik hücre popülasyonunun transformasyonu ve yayılmasını daha da tetikleyebilir. Nicholas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma, tip 2 diyabeti olan kişilerin meme kanseri insidansının arttığı da gösterilmiştir (Nicholas ve ark., 2017).

MYC onkogeni; hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz, pluripotensinin kurulması ve sürdürülmesi üzerinde önemli etkileri olan bir transkripsiyon faktörüdür. MYC ekspresyonu ve fonksiyonundaki değişiklikler hem inflamatuvar hem de neoplastik koşullarda görülmektedir, bu da MYC'nin kronik inflamasyonu tümörgeneze bağlayan kritik moleküler ve hücresel yolları düzenlediğini göstermektedir (Leal ve ark., 2017). Şişmanlıkta yağ dokusunda görülen değişikliklerin çoğu deri altı yağ dokusundan ziyade visceral adipoz doku varlığının artışı ile karakterizedir. Visceral yağ dokusu artışının kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve tip II diyabet ile ilişkili olmasının yanı sıra yağ doku artışı ile kanser arasında da bir ilişki olduğu bilinmektedir (Chakraborty ve ark., 2017). *In vivo* fare modeli ile yapılan çalışmalarda, artmış visceral adipoz doku varlığının MYC'in nükleer aktivasyonuna sebep olduğu, bu durumun da dolaşım fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) seviyesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Chakraborty ve ark., 2017; Chakraborty ve ark., 2018). İnhibitörler aracılı BRD4'ün inhibisyonunda, visceral adipoz doku hacmindeki azalmanın, FGF2 salınımını azalttığı ve MYC'ye bağlı transkripsiyonu inhibe ederek epitel hücrelerinin neoplastik dönüşümünü engellediği de gösterilmiştir (Chakraborty ve ark., 2018).

BRD4'ün inhibisyonunu durumunda, BRD4'ün c-Myc'in promotoruna bağlanması inhibe olmaktadır. Bu inhibisyon sonrasında hem tümör hücrelerinde hem de tümör mikroçevresinde bulunan inflamatuvar hücre popülasyonlarında MYC'ye bağlı hedef

genlerin ekspresyonunun bloklandığı gösterilmiştir (Ott ve ark., 2012; Posternak ve Cole, 2016; Andrews ve ark., 2017).

NF- κ B, Cox-2, MYC, siklin D1 ve CD47 gibi çeşitli moleküller, tümör ilerlemesini etkileyen, tümör mikroçevresinde inflamasyonun desteklenmesi ve proinflamatuvar sinyal yollarının etkinleştirilmesinde rol oynamaktadırlar. Bunlardan NF- κ B, kanserde çift taraflı role sahip olup; interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi pro-tümörojenik ve pro-inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır (De Simone ve ark., 2015).

BET protein ailesi üyelerinin, kanserin gelişimini ve ilerlemesini desteklemede rol oynayan inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Zou Z. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, BRD4'ün RelA üzerindeki asetillenmiş lizin-310 rezidüsüne bağlandığını ve bunun sonucunda insan akciğer karsinomu hücre hatlarında NF- κ B'nin aktivasyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Zou ve ark., 2014). Ayrıca, BRD2'nin de melanom hücre hatlarındaki NF- κ B aktivitesinin düzenlenmesinde rolü olduğu da vurgulanmıştır. BRD2'nin inhibisyonu, NF- κ B'ye bağlı sinyalleri bloke ederek melanom hücrelerinin proliferasyonunu azaltmakta ve IL-6, interlökin-8 (IL-8), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kemokin (C-C) ligand 5 (CCL5) ve kemokin (C-X-C) ligand 10 (CXCL10) da dahil olmak üzere NF- κ B hedef gen ekspresyonunu inhibe etmektedir (Gallagher ve ark., 2014). NF- κ B yolağının pan-BET inhibitörleri kullanılarak inhibe edilmesi ile, NF- κ B ile ilişkili protein, p50 ve p50 öncüsü p105'in inhibe edilerek NF- κ B aktivasyonunu azalttığı da gösterilmiştir.

KRAS ile yönlendirilen kanserlerde, MYC'nin yüksek ekspresyonu, kemokin (C-C) ligand 9 (CCL9) ve interlökin-23 (IL-23) ekspresyonunu arttırmaktadır. CCL9, CD206⁺ makrofajlarının tümör mikroçevresine alınmasında rol oynayan kemotaktik bir faktör olup, anjiyogenezi ve anormal kan damarı oluşumunu teşvik eden sitokinlerin üretimini ve salımını artırır. IL-23 ise, tümöre infiltre efektör T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin işlevlerini baskılayan ve böylece tümör immünoevazyonunu destekleyen bir sitokindir (Kortlever ve ark., 2017).

Bu alışmalar göz önüne alındığında BRD4'n hem tümör hücrelerinde hem de tümör mikroçevresindeki sinyallerin düzenlenmesinde potansiyel rolü olduğu açıktır. Buna ek olarak, BET proteinlerinin terapötik hedeflemesinin, tümör hücrelerinde BRD4 aracılı sinyalleri ve kanser ilerlemesini destekleyen tümörle ilişkili stromayı inhibe etmek için yeni bir strateji ortaya çıkarabileceği de dşnlmektedir.

2.4. Mikro RNA

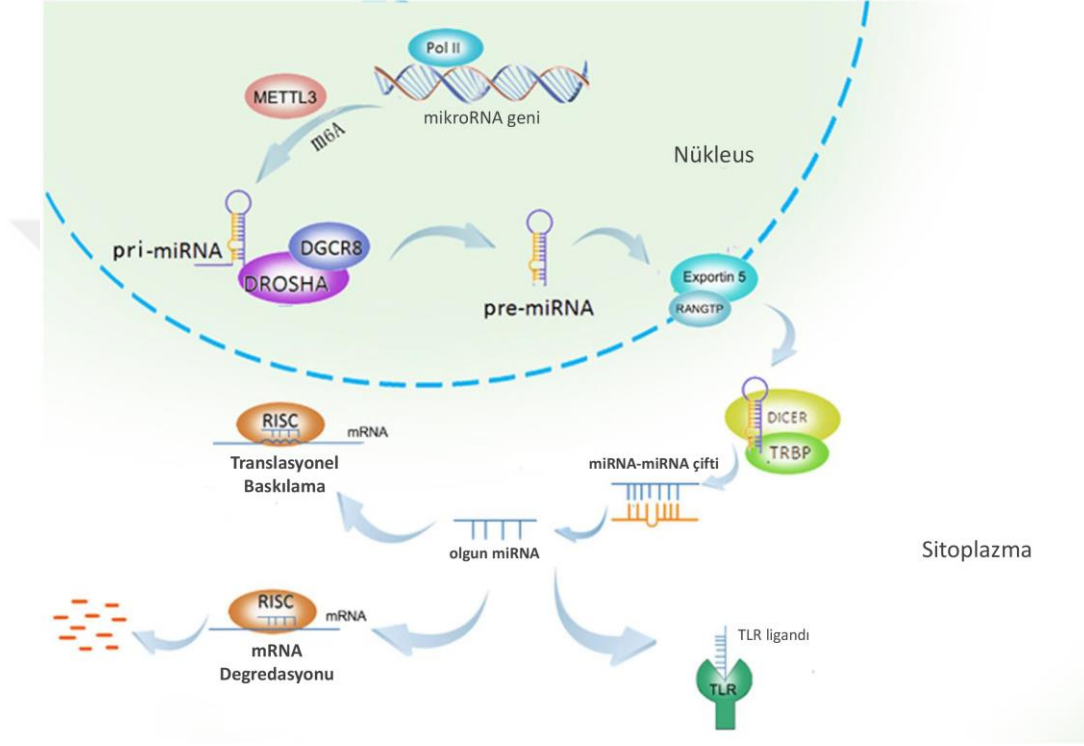
mikroRNA'lar (miRNA'lar), post-transkripsiyonel düzenlenmeleri yönlendirmek için proteinleri kodlayan genlerin mRNA'ları ile eşleştirilerek hayvanlarda ve bitkilerde önemli gen düzenleyici rolleri olan endojen, yaklaşık 23 nükleotitten oluşan RNA parçalarıdır (Bartel, 2009). Tek bir miRNA birkaç yüz geni hedefleyebilmekte ve tek bir hedef gen genellikle birden fazla miRNA bağlanma bölgesi içerebilmektedir. Bu sebeple tüm insan genlerinin %60'ından fazlasının miRNA regülasyonu için doğrudan bir hedef olduğuna inanılmaktadır (Friedman ve ark., 2009).

İlk miRNA, (lin-4), Lee R.C. ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir. Protein lin-14'n ekspresyonunu düzenleyerek gelişimi etkileyen, protein kodlamayan küçük bir RNA olarak tanımlanmıştır (R. C. Lee ve ark., 1993). 2001 yılında, miRNA'ların üç bağımsız grup tarafından hem omurgasızlarda hem de omurgalılarda olduğu ve bazılarının da yüksek oranda korunduğu bildirilmiştir. Bu da miRNA aracılı post-transkripsiyon sonrası regülasyonun türler arasında genel bir düzenleyici işlev olduğunu göstermektedir (Lagos-Quintana ve ark., 2001; Lau ve ark., 2001; R. C. Lee ve Ambros, 2001).

2.4.1. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Düzenlenmeleri

miRNA biyogenezi, büyük birincil transkriptin (pri-miRNA) kopyalanmasıyla başlar. Transkripsiyona RNA polimeraz II aracılık eder, ancak bazı pre-miRNA'lar RNA polimeraz III tarafından üretilmektedir. Pri-miRNA'lar daha sonra RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNaz Drosha'dan oluşan bir kompleks tarafından nc miRNA (pre-miRNA) adı verilen 85-nükleotitlik bir yapıya dönüştürülür. ekirdekten sitoplazmaya Ran/GTP/Exportin5 kompleksi ile taşındıktan sonra, miRNA'lar başka bir RNase III Dicer (Kesici) enzim tarafından 20–22 nükleotitlik miRNA/miRNA çifti oluştururlar. Dubleks zldkten sonra olgun miRNA, RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi (RISC)

olarak adlandırılan bir protein kompleksine bağlanır (Şekil 2.6). miRNA yüklü bir RISC, miRNA ile hedeflenen mRNA transkripti arasındaki bağlantıyı sağlayarak, mRNA bölünmesi ve bozulması ya da translasyonel baskı yoluyla gen susturulmasına aracılık eder (Peng ve Croce, 2016).



Şekil 2.6: MikroRNA biyogenezi (Peng ve Croce, 2016).

miRNA'ların biyogenezi, miRNA transkripsiyon seviyeleri, Drosha ve Dicer tarafından işleme, taşınma, RISC bağlanması ve miRNA bozunması dahil olmak üzere birçok aşamada kontrol altında tutulur. Örneğin, DEAD-kutusu RNA helikazlarının ve SMAD proteininin, Drosha aracılı miRNA olgunlaşmasında rol aldığı bilinmektedir (Fukuda ve ark., 2007). KH-domain Splicing düzenleyici protein (KSHP), memeli hücrelerinde miRNA alt kümesinin biyogenezi düzenlemek için hem Drosha hem de Dicer komplekslerinin bir bileşeni olarak görev alır (Trabucchi ve ark., 2009).

2.4.2. MikroRNA'lar ve Kanser

Son yıllarda miRNA ekspresyonunun insan malignitelerinde değişken olduğu anlaşılmıştır. Bu düzensizliğin ana sebeplerinin, kromozomal anormallikler,

transkripsiyonel, epigenetik değişiklikler ve miRNA biyogenezi sırasındaki hatalar olduğu düşünölmektedir. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında, malign hücrelerdeki anormal miRNA ekspresyonu genellikle, genomik miRNA kopya sayılarındaki ve gen lokuslarındaki değişikliklere (amplifikasyon, delesyon veya translokasyon) bağlanır. miRNA geni lokus değişikliği ise ilk kez, B hücresi kronik lenfositik lösemi hastalarında 13q14 kromozomundaki miR 15a/16-1 geninin kaybı ile görölmüşür (Calin ve ark., 2002).

miRNA ekspresyonu farklı transkripsiyon faktörleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu nedenle kanserde miRNA'ların anormal ekspresyonu, c-Myc ve p53 gibi bazı önemli transkripsiyon faktörlerinin düzensizliğine bağli olabilir. O'Donnell K.A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenlemek için birçok malignitede sıklıkla yüksek düzeyde ekspre edilen c-Myc'in, miR 17-92 promotorundaki E-box kısımlarına bağlanarak onkojenik miR 17-92'nin transkripsiyonunu aktive ettiğini keşfetmişlerdir (O'Donnell ve ark., 2005). Onkojenik rolü ile tutarlı olarak, c-Myc ayrıca mir 15a, miR 26, miR 29, miR 30 ve let 7 aileleri gibi tümör baskılayıcı miRNA'ların transkripsiyonel aktivitesini de baskılamaktadır.

Wang B. ve arkadaşları, c-Myc ile miR 122'nin karşılıklı birbirlerinin ekspresyonlarını düzenledikleri yönünde bulgulara ulaşmışlardır. Bu çalışmada; hepatosellöler karsinomda c-Myc'in miR 122 ekspresyonunu baskıladığını göstermişlerdir. miR 122 ise; Tfdp2 (Transkripsiyon Faktörü Dp-2) ve E2F1 (E2 Transkripsiyon Faktörü F1)'i hedefleyerek c-Myc transkripsiyonunu dolaylı olarak inhibe eder (B. Wang ve ark., 2014). Ayrıca c-Myc; miR 148a-5p ve miR 363-3p'nin de promotorlerine doğrudan bağlanarak bu mikroRNA'ların da ekspresyonlarını baskılamaktadır. Bu durum; G1'den S fazına ilerlemeyi teşvik ederek hepatosellöler karsinom oluşumunu tetikler. Buna ek olarak yapılan çalışmada, miR 148a-5p'nin doğrudan c-Myc ekspresyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir (H. Han ve ark., 2013).

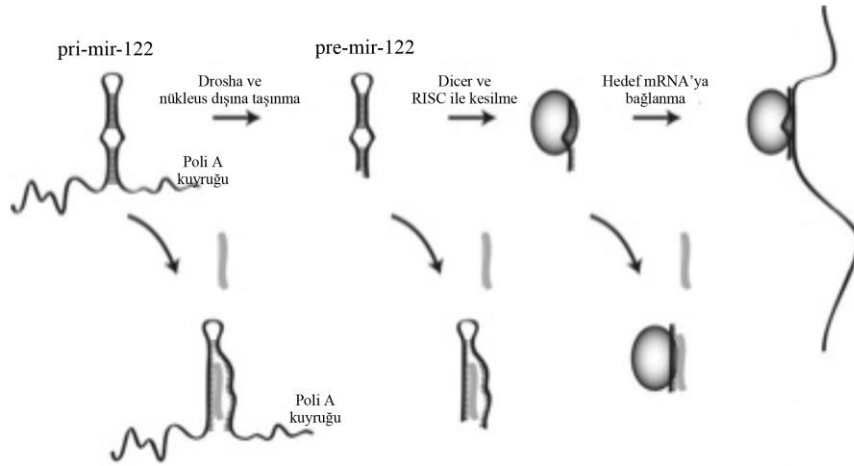
En çok çalışılan iki transkripsiyonel faktör olan c-Myc ve p53'e ek olarak, miRNA ekspresyonunu düzenleyen başka transkripsiyonel faktörler de bulunmuştur. Örneğin miR 223, miyeloid soy gelişiminde önemli fonksiyonları olan hematopoietik sistemde ekspre

edilir ve ekspresyonu, hepatoselüler karsinom ve akut miyeloid lösemi (AML)'de baskılanmıştır (Johnnidis ve ark., 2008; Stamatopoulos ve ark., 2009).

Bu çalışmalar göz önüne alındığında mikro RNA'ların solid ve solid olmayan tümörlerde onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak kanser gelişiminde rol oynayan önemli basamaklarda görevlerinin olduğu açıktır.

2.4.3. MikroRNA 122

mikroRNA 122 (miR 122), karaciğerden izole edilmiştir, stres yanıtı ve lipid metabolizması başta olmak üzere karaciğer fizyolojisinin birçok yönünde önemli roller oynamaktadır (Bhattacharyya ve ark., 2006; Esau ve ark., 2006). c-Myc'in geninin düzenlenmesinde görevli 'hcr' adlı sıra dışı bir transkript tanımlanmış ve bu transkript karaciğere özgü, kodlanmayan genomik partikül benzeri, özellikle nükleer olarak görülen ve endonükleazlar tarafından oluşturulan bir genomik materyal olarak adlandırılmıştır (Moroy ve ark., 1989). Ardından, hcr'nin miR 122 için bir öncül olduğu ve "pri-miRNA" olarak adlandırılan kısmının 66 nükleotit uzunluğunda bir "pre-miRNA" oluşturduğu görülmüştür. Sonuç olarak da endonükleaz Dicer tarafından olgun miR 122'yi oluşturmak için parçalanmaktadır. Bu yolla oluşan miR 122 hcr transkriptinin küçük bir parçası sayılmaktadır (Şekil 2.7) (Chang ve ark., 2003).



Şekil 2.7: miR 122'nin biyogenezi (Gebert ve ark., 2014). pri-miR 122'nin ilk olarak Drosha ile poli A kuyruğu kesilerek pre-miR 122 oluşturulur. Ardında Dicer ile kesilerek exportin yardımıyla nükleusu dışına taşınır ve aktif miR 122 oluşturulmuş olur.

2002 yılında, farklı fare dokularından hazırlanan küçük RNA'ların sistematik klonlanması ve dizilenmesinden sonra, miR 122 karaciğerde ekspre edilen bir miRNA olarak tanımlanmıştır (Lagos-Quintana ve ark., 2002; Chang ve ark., 2004). miR 122'nin Hepatit-C virüs (HCV) replikasyonunu düzenlediği ve HCV enfeksiyonu için potansiyel bir terapötik hedef olduğu bilinmektedir (Jopling, 2008).

Meme kanseri hastalarında, miR 122'nin yüksek düzeydeki ekspresyonu; kanserin metastaz basamaklarında bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Meme kanseri hastalarında, dolaşımdaki yüksek miR 122 düzeyleri evre II ve evre III'te metastaz oluşumunu arttırmaktadır (X. Wu ve ark., 2012). Meme kanserinde miR 122 seviyesinin az olması tümör baskılayıcı bir aktiviteye sahip olması ile ilişkilendirilmiştir. Başka bir yayında; yüksek düzeyde ekspre edilen miR 122'nin meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* şartlarda proliferasyonu azalttığı, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan *in vivo* fare meme kanseri modeli çalışmalarında tümör gelişimini geriletmediği de gösterilmiştir (B. Wang ve ark., 2012). Yapılan bu iki çalışma ile iki farklı sonuca ulaşıldığı görülmektedir. Bu durum da dolaşımda bulunan miR 122'nin metastazı tetikleyen bir rolü olduğu görülürken, miR 122'nin vektör yardımıyla direk hücre içinde yüksek düzeydeki ekspresyonu da tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve büyümesini geriletmediğini göstermektedir. Bu durum, dolaşımdaki miR 122 ile hücre içindeki miR 122'nin farklı görevlere sahip olduğunu net olarak ortaya koymaktadır.

miR 122 ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında; miR 122'nin özellikle hepatoselüler karsinom ve meme kanserinde tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkili olduğu açıktır. Ancak ÜNMK'nde miR 122 ile BRD4 arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma henüz literatürde yer almamaktadır. Ayrıca mikroRNA'ların biyolojik süreçlerde hastalık ve doku bazında farklı etkiler gösterdiği de açıktır. Bu sebeple ÜNMK'de miR 122'nin BRD4 ile olabilecek ilişkisinin henüz tanımlanmayan rollerinin ortaya konması hastalığın seyrinin anlaşılmasında önemli bir rol oynayacağını düşündürmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında; hücre siklusu, protein sentezi ve tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon potansiyellerinde rolü olduğu bilinen eEF2K ile c-Myc gibi genlerin transkripsiyonunda rol alan BRD4'ün ve miR 122'nin ÜNMK'de etken bir role sahip olabileceği görülmektedir.

Bu bağlamda hipotezimiz; eEF2K ile BRD4 arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak ve BRD4 inhibisyonu ile tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon gibi metastazı tetikleyen özelliklerinin nasıl değişeceğini göstermektir. Bu hipotezden yola çıkarak, amacımız ÜNMK’nde BRD4 inhibisyonunun tümör hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerindeki etkilerini açığa çıkartmaktır. Bu doğrultuda çalışmamızda, ÜNMK hücre hattı olan ve agresif karakteriyle bilinen MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. eEF2K siRNA’lar kullanılarak BRD4 ekspresyon değişimleri anlaşılmaya çalışılmış ve ilerleyen deneylerle bu ilişki tam olarak ortaya konulmuştur. Ardından BRD4 siRNA’ları ve BRD4’ü hedefleyebileceği düşünülen mikroRNA’lar kullanılarak BRD4 inhibisyonu sağlanmış; tümör hücrelerinin proliferasyon, koloni oluşturma, migrasyon ve invazyon yetenekleri değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğaltılması

MDA-MB-231 hücreleri %10'luk FBS (Fötal Sığır Serumı) (Corning, #CG-35-011-CV) ve %1'lik Penisilin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher, #15140122) ile desteklenmiş DMEM F-12 (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumı) (Corning, #10-090-CV) hücre medyumunda, 37⁰C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler %80 konfluensiye ulaştıktan sonra medyumları uzaklaştırıldı ve ardından hücrelerin kültür kabından ayrılmasını sağlamak için üzerlerine Tripsin-EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) (Sigma, #T-4047) eklendi. İnkübatörde 5 dakika Tripsin-EDTA solüsyonunda bekletildi ve sonrasında kültür kabına eklenen Tripsin-EDTA'nın 2 katı kadar olacak şekilde DMEM F-12 medyumı eklendi. Kültür kabında yüzer hale gelen hücreler ve medyum toplanarak falkona alındı. Hücreler, +4⁰C'ye soğutulmuş santrifüjde 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve hücrelerin falkonun dibine çökmesi sağlandı. Hücrelerin üzerlerindeki Tripsin-DMEM karışımı medyum uzaklaştırıldı ve 10 ml yeni medyum eklendi. Hücrelerin medyum içerisine dağılması sağlandıktan sonra bu süspansiyondan 1 ml alınarak yeni bir kültür kabına aktarıldı. Üzerine kültür kabının tabanını kaplayacak şekilde medyum eklendi ve hücrelerin bu medyumda büyümeleri takip edildi. Hücrelerin pasajlanması işlemine hücre hattının proliferasyon hızına bağlı olarak 3-4 günde bir olacak şekilde devam edildi. Hücrelerin karakterlerini koruduklarına emin olmak adına her pasaj sonrası hücrelerin morfolojileri ve canlılıkları kontrol edildi. 3. kez pasajlanması yapılan hücreler *in vitro* deneylerde kullanılmak üzere hazırlandı.

3.1.1. Hücrelere siRNA Transfeksiyonu

Hücrelere projede kullanılacak siRNA'ların transfeksiyonu için, 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Proliferasyon hızları ve morfolojileri uygun durumda olan hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırıldı. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra hücrelerin üzerlerindeki medyum uzaklaştırıldı ve 10 ml yeni medyum eklendi. Hücrelerin medyum içinde homojen dağılması sağlandıktan sonra bu karışım içerisinden ependorfa 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi (Thermo Fisher, #T10282) ile karıştırıldı. Bu karışım içerinden de 10 µl alınarak hücre sayımı için özel olarak hazırlanmış lamin kuyucuğuna

(Thermo Fisher, #C10312) bırakıldı. Daha sonra bu lam hücre sayım cihazına konularak 1ml hücre süspansiyonunda bulunan total hücre sayısı, canlı hücre sayısı ve ölü hücre sayıları ile oranları tespit edildi.

Hücre canlılıkları saptanan hücreler siRNA transfeksiyonu için hazır hale geldikten sonra, 6 kuyucuklu kültür tabaklarında her bir kuyucukta 125.000 hücre olacak şekilde hücrelerin hangi oranda eklenecekleri hesaplandı. Tüm deney prosedürü iki tekrar olacak şekilde çalışıldı ve kullanılacak her bir protein için 2 farklı siRNA denemesi yapıldı. Buna ek olarak 2 kuyucuğa da kontrol siRNA transfeksiyonu yapıldı. Kullanılan siRNA'lar tablo 3.1'de görülmektedir. Hücreler kültür kaplarına alındıktan sonra üzerlerine 2ml'ye tamamlanacak şekilde medyum eklendi. Hücrelerin 6 kuyucuklu kültür tabaklarına tutunmaları için 24 saat beklendi.

Tablo 3.1: siRNA transfeksiyonu için kullanılan siRNA'lar görülmektedir.

Kullanılan siRNA	Katalog No	Üretici Firma
eEF2K siRNA I	SASI_Hs01_00060066	Sigma-Aldrich
eEF2K siRNA II	SASI_Hs01_00060067	Sigma-Aldrich
BRD4 siRNA I	SASI_Hs01_00037409	Sigma-Aldrich
BRD4 siRNA II	SASI_Hs01_00037410	Sigma-Aldrich
Negatif Kontrol siRNA	SIC001-10NMOL	Sigma-Aldrich

Literatürde daha önce yapılan çalışmalar baz alınarak siRNA konsantrasyonunun 50 nm olmasına karar verildi (Ashour, Gurbuz, ve ark., 2014). Kontrol ve kullanılacak proteinlerin siRNA'ları için her kuyucukta 50 nm siRNA olacak şekilde eklenmesi için; kontrol ve diğer siRNA miktarları hesaplandı. Bu hesaplamaların ardından her bir siRNA transfeksiyonu için ayrı ayrı olmak üzere 3 ayrı set olacak şekilde bir ependorfta 2 µl siRNA ve 250 ml DMEM (FBS-, PS-) bir diğer ependorfta ise 18 ml Hiperfect (Qiagen; #301707) ve 250 ml DMEM (FBS-, PS-) karışımları hazırlandı. Bu iki ayrı karışım tek bir ependorfta birleştirildi ve oda ısısında 20 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımında her bir kuyucuğa 250 µl eklendi. Üzerine ise 1750 ml FBS ve PS eklenmemiş DMEM F-12 eklendi. Hücreler bu şekilde 6 saat inkübatör

içerisinde 37⁰C ve %5 CO₂ koşullarında transfeksiyon için bırakıldı. 6 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki medyum çekildi ve yerine 2 ml FBS ve PS eklenmiş medyum koyuldu ve inkübatör içerisinde 37⁰C ve %5 CO₂ koşullarında 72 saat süreyle hücreler bu medyunda bekletildi.

3.1.2. Transfekte Edilen Hücrelerin Toplanması

72 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki medyum falkona alındı. Hücreler tripsinle kaldırılarak santrifüj edildi ve üstünden çekilen medyumlarla birlikte aynı falkona alındı. Tekrar 2000 rpm’de santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Hücrelerin üzerindeki medyum çekildi ve yerine 1 ml PBS (Fosfatlı Tuz Tamponu) (Corning, #21-040-CM) eklenerek hücreler PBS içerisinde karıştırıldı ve ependorfa alındı. Daha sonra 13.500 rpm’de, +4⁰C’ye soğutulmuş santrifüjle 3 dakika santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Süpernatant atıldı ve pellet daha sonra kullanılmak üzere -80⁰C’ye kaldırıldı. Bu şekilde siRNA ile transfekte edilmiş olan hücreler toplandı.

3.1.3. Lentivirüs ile Konjuge Edilen Hücrelerinin Çoğaltılması

eEF2K için özel dizayn edilen GST (Glutasyon S-Transferaz) ile konjuge edilmiş eEF2K lentivirüsü (NM_013302.3) kullanılmıştır (Tekedereli ve ark., 2012; Bayraktar ve ark., 2017). eEF2K lentivirüsü ve kontrol lentivirüsü ile konjuge edilen MDA-MB-231 hücreleri %10’luk FBS ve %1’lik Penisilin-Streptomycin ile desteklenmiş DMEM F-12 hücre medyumunda, 37⁰C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin 2-3 defa pasajlanmasının ardından hücrelerin karakterlerini koruduğu da görüldükten sonra bu hücreler tripsinle kaldırılarak santrifüj edildi. Hücrelerin tripsinden arındırılması için PBS eklenerek karıştırıldı ve tekrar santrifüj edildi. Ardından hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletler ependorfa alınarak -80⁰C’ye kaldırıldı.

3.1.4. Hücrelerin MikroRNA ile Transfeksiyonu

Hücrelerin mikroRNA’lar ile transfeksiyonu için siRNA ile yapılan transfeksiyona benzer şekilde 6 kuyucuklu kültür tabaklarına 125.000 hücre sayılarak ekildi. Ekilen hücrelerin 6 kuyucuklu kültür tabaklarına tutunmaları için 24 saat beklendi. Kullanılacak olan her bir mikroRNA için iki tekrarlı olacak şekilde deney dizayn edildi.

Kontrol mikroRNA ve kullanılan her bir mikroRNA için her kuyucukta 100 nm mikroRNA olacak şekilde eklenerek; siRNA transfeksiyonuyla aynı şekilde DMEM (FBS-, PS-) ve Hiperfect ile karıştırılarak oda ısısında 20 dakika bekledikten sonra mikroRNA'lar hücrelerin üzerine eklendi.

mikroRNA transfeksiyonunun gerçekleşmesi için 48 saat beklendi ve bu sürenin sonunda, hücrelerden pelletler toplanarak -80°C'lik soğutucuya kaldırıldı.

3.1.5. Transfekte Edilen Hücrelerden Lizat Eldesi ve Protein Miktarı Tayini

Transfekte edilen hücrelerden toplanan pelletlerden lizat elde etmek için pelletlerin üzerine 1ml RIPA buffer (Thermo Fisher, #89900), 10 µl fosfataz inhibitörü (Thermo Fisher, #A32957) ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Fisher, #A32953) karıştırıldı ve buz üzerine alındı. Daha sonra pellet büyüklüklerine göre hücrelerin üzerine 50-70 µl olacak şekilde bu karışım eklendi. Her 10 dakikada bir vortekslenerek 30 dakika boyunca hücrelerden proteinlerin açığa çıkarılması sağlandı. Daha sonra 13.500 rpm'de, +4°C'lik santrifüjle 10 dakika santrifüjlenerek pelletin çökmesi sağlandı. Supernatantın tamamı yeni bir ependorfa çekilerek western blot protokolünde kullanılmak üzere saklandı.

Hücrelerden elde edilen protein miktarlarını tayin edebilmek için BCA (Thermo Fisher, #23227) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için 96 kuyucuklu kültür kaplarının her kuyucuğuna 3 tekrar olacak şekilde 0-80-160-320-640-1280 µg BSA içerecek şekilde önce standartlar sonra da 2 tekrar olacak şekilde örnekler eklendi. Daha sonra standartların ve örneklerin üzerine her kuyucuğa toplam 200 µl olacak şekilde 196 µl Reagent A ve 4 µl Reagent B'den oluşan karışım eklenerek, protein miktarının belirlenmesi için 30 dakika karanlıkta, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda okuyucuda 570 nm'de ölçüm yapıldı.

Elde edilen sonuçlar standartlara göre oranlanarak her bir örnekte 40 µg protein olacak şekilde western blot için kullanılacak örnek miktarları hesaplandı.

3.2. Western Blot Yöntemi İle Protein Miktarının Belirlenmesi

Bu işlem için ilk olarak kullanılacak solüsyonlar hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Western Blot yöntemi için kullanılan solüsyonlar

10X Yürütme/Transfer Tamponu	1X Yürütme Tamponu	1X Transfer Tamponu	10X TBS	1X TBS-T
30 g Tris-Base	100 ml 10X Y/T Tamponu	100 ml 10X Y/T Tamponu	31,5 g Tris-HCl	100 ml 10X TBS
14,4g Glisin	900 ml dH ₂ O	700 ml dH ₂ O	80 g NaCl	900 ml dH ₂ O
1000 ml dH ₂ O	10 ml SDS	200 ml Metanol	1000 ml dH ₂ O	1 ml Tween-20

Protein miktarlarına göre hesaplanıp kullanım miktarları belirlenen örnekler 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı. Daha sonra ısıtma cihazında 100⁰C’de 5 dakika kaynatıldı ve karışımın ependorfun dip kısmına çökmesi için kısa süreli santrifüjlendi. Bu deney için %4-%15’lik poliakrilamid jel (Bio-Rad; #4568083) kullanıldı. Poliakrilamid jele, ilk olarak proteinlerin yerlerini tayin etmede kullanılacak belirteç (Thermo Fisher, #26619), takiben de örnekler yüklendi. Örnekler oda sıcaklığında 60 V’da yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel ve polivinilidin florid (PVDF) membran sandviç yöntemi ile kasetlere yerleştirildi ve proteinlerin jelden membrana transfer olması gece boyu +4⁰C’de 23 V’da transfer edilmesi sağlandı. Jelden membrana transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra membran kasetten çıkarıldı ve spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için TBS-T (Trisli Tuz Tamponu-Tween 20)’de hazırlanmış %5’lik süt tozunda (Bio-Rad; #1706404) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklama işleminin sonunda üretici firmanın önerisi doğrultusunda bloklama solüsyonunda uygun dilüsyon oranında çözölmüş olan primer antikorlar membranın üzerine eklendi ve gece boyu +4⁰C’de inkübe olması sağlandı (Tablo 3.3). Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran TBS-T ile 2 kere 7’şer dakika yıkandı. Yıkama sonrasında bloklama solüsyonunda çözölmüş olan primer antikorlara uygun şekilde hazırlanmış olan sekonder antikorlar 1/2000 dilüsyon oranında hazırlanıp membranların üzerinde eklenerek oda ısısında 1 saat inkübe edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.

Antikor	Üretildiği Hayvan	Dilüsyon	kDa
Anti-eEF2K Cell Signal; #3692S	Tavşan	1/1000	105
Anti-BRD4 Cell Signal; #134490S	Tavşan	1/1000	200
Anti-BRD4 Santa Cruz; #48772	Tavşan	1/1000	132
Anti-cMyc Cell Signal; #5605S	Tavşan	1/1000	57-65
Anti-BRD2 Cell Signal; #5848S	Tavşan	1/1000	100
Anti-p-c-Src Santa Cruz; #16860	Fare	1/500	60
Anti-c-Src Cell Signal; #2108S	Tavşan	1/1000	60
Anti-GAPDH Cell Signal; #5184S	Tavşan	1/1000	37
Peroksidaz işaretli Anti-Tavşan Cell Signal; #7074S	Keçi	1/2000	-
Peroksidaz işaretli Anti-Tavşan Cell Signal; #7076S	At	1/2000	-

3.3. MTS Hücre Canlılık Testi

MDA-MB-231 hücreleri 96-kuyucuklu kültür tabaklarına her kuyucukta 1500 hücre olacak şekilde hesaplanarak ekildi. 24 saatlik inkübasyonla hücrelerin kuyucuklara tutunmaları beklendi. 24 saatin ardından hücreler siRNA için 50nM ve mikro RNA için 100nM dozlarda olacak şekilde hesaplanan siRNA ve mikro RNA'lar ile muamele edildi. Deney düzeneği her bir gruptan 6 kuyucuk ve 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülmek üzere 3 farklı set olarak hazırlandı.

siRNA ve mikroRNA'lar ile transfeksiyonun 48., 72. ve 96. saatlerinin sonunda kültür tabaklarına %2 oranında MTS (Promega; #G1112) ile dilüe edilen PMS (Sigma; #P-9625) karışımından her bir kuyucuğun üzerine 200µL olacak şekilde eklenerek 30-60 dakika oda ısısında inkübe edildi. Sürenin sonunda kitin belirttiği değer olan 490 nm absorbans değerinde ELISA okuyucu ile ölçüm yapılarak sonuçlar alındı.

3.4. Klonojenik Canlılık Testi

MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyucukta 500 hücre olacak şekilde sayılarak 6 kuyucuklu kültür tabaklarına ekildi. Her bir transfeksiyon için hücreler 3 ayrı set şeklinde çalışıldı. Hücrelerin 24 saat süreyle tutunmaları ve belli bir konfluensiye ulaşmaları beklendikten sonra deneye başlandı. Kontroller ve BRD4 siRNA'ları ve miR 122 için 50 nm konsantrasyonlar belirlenerek FBS eklenmemiş medyumlarda hazırlandı. Bu medyumlar hücrelerin üzerine eklendi. 6 saat sonra hücrelerin üzerindeki medyum uzaklaştırılarak yerine her bir kuyucukta 2 ml olacak şekilde FBS'li medyum eklendi. Hücreler her 3 günde bir kontrol edildi ve hiçbir ajanla muamele edilmemiş hücrelerin olduğu kuyucukta (MDA-MB-231) yeterli koloni sayısı gözlemlendikten sonra deney sonlandırıldı.

Hücrelerin muamele edileceği stok kristal violet boyası (Sigma; #C0775) 0,2 gr kristal violet'in 45mL metanolde (Merck; #1-06008.2500) çözülmesiyle hazırlandı. Hücrelerin üzerindeki medyum atıldıktan sonra, stok kristal violet'ten 5mL alınarak 45mL distile su ile karıştırıldı ve hazırlanan kristal violet boyası ile 5 dk süreyle inkübe edildi. Boyanma tamamlandıktan sonra kurutularak kolonilerin fotoğrafları çekildi. Image J analiz yöntemiyle kristal violet ile mavi-mor boyanmış olan koloniler tek tek işaretlenerek sayıldı. Koloni sayımının ardından sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5. Migrasyon Testi

Migrasyon testinin amacı; hücrelerin aradaki boşluğu kapatma potansiyellerinin değerlendirilmesi olduğundan; hücrelerin maruz kaldıkları ajanlara göre migrasyon hızlarının nasıl değiştiğini göstermek için planlandı. MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyucukta 125.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Her bir örnek için 2 kuyucuk üzerinde çalışma yapıldı. 24 saat hücrelerin tutunması beklendikten sonra literatürdeki dozlarla da uyumlu olarak siRNA'lar için 50 nm (Ashour, Gurbuz, ve ark., 2014), mikro RNA'lar için 50 nm (Bayraktar ve ark., 2018) konsantrasyonda olacak şekilde transfekte edilerek 48 saat beklendi. 48. saatin sonunda 200µL'lik steril filtreli pipet uçları kullanılarak kuyucukların içindeki hücreler üzerinde düz bir çizgi çekildi ve kuyucuğun ortasında hücrelerin kuyucuklardan kaldırılması sağlandı. Hemen ardından

hücrelerin üzerine taze medyum eklenerek 0. saat fotoğrafları çekildi. Deney 24 ve 48. saatler sonrasında da kuyucukların fotoğraflarının çekilmesiyle devam etti.

Her bir kuyucukta bulunan boşluğun ölçüsü Image J programı yardımı ile hesaplandı ve ortalamaları alınarak bu alanların yüzde cinsinden değerleri belirlendi. Ardından MDA-MB-231 grubunun kapanma yüzdesi ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6. İnvazyon Testi

İnvazyon testinde amaç, hücrelerin çeşitli proteazlar salgılayarak ortamda bulunan matrijeli degrade ederek matrijelin bir tarafından diğer tarafına geçip geçemediklerini ortaya çıkarmaktır. Bu amaç için hücreler serumsuz (FBS'siz) (besin ortamını daha az olduğu) medyum içerisine eklenir. Matrijelin diğer tarafında bulunan serumlu (FBS'li) (besin maddesinin daha fazla olduğu) medyum ise hücreler için aktive edici bir ortam olarak kullanılmaktadır. MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyucukta 150.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Her bir örnek için 3 kuyucuk üzerinde çalışma yapıldı. 24 saat hücrelerin tutunması beklendikten sonra literatürle uyumlu olarak siRNA'lar için 100 nm (Tilli ve ark., 2016), mikro RNA'lar için 50 nm (Bayraktar ve ark., 2018) konsantrasyonda olacak şekilde transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra siRNA'lar için 72, mikroRNA için 48. saatin sonunda her bir kuyucuktaki hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak ayrı ayrı falkonlara alındı.

Aynı zamanda matrijel invazyon testi için invazyona özel filtreli kuyucuklar (BD Falcon; #353097) 3ml soğuk FBS'siz medyum içinde 200µL matrijel (Corning; #354234) çözülerek elde edilen solüsyon ile kaplandı. Hazırlanan matrijel kaplı kuyucuklar 24-kuyucuklu kültür tabağı içine yerleştirildi ve steril kabin içinde 3-4 saat boyunca donması beklendi.

Transfekte edilmiş olan hücreler ayrı ayrı sayıldı ve her bir hücre grubundan 80.000 hücre olacak şekilde sayılarak matrijel kaplı kuyucuklara eklendi. Hücrelerin üzerine 200µL'ye tamamlanacak şekilde FBS'siz medyum eklendi. Matrijel kaplı kuyucukların dışına da 500µL FBS'li medyum eklendi. Hücreler inkübatöre kaldırılarak 24 saat süreyle beklendi.

24 saat sonra matrijel kaplı membranın diğ er yüzüne geçen hücreler boyanarak görünür hale getirildi. Hema-3 (Fisher Scientific; #22-122911) solüsyonu yardımıyla önce fiks  edilen hücreler; nükleus ve sitoplazmalarının boyanması için kit içinde bulunan histolojik boyalarla işaretlendi. Matrijelin diğ er yüzüne geçen hücreler ışık mikroskopuyla görünür hale getirilmiş oldu. Filtreler kesilerek lam üzerine sabitlendikten sonra her grup için rastgele seçilen 10 alandan fotoğ raf çekildi Image J programı yardımı ile invaze olan hücrelerin sayısı hesaplandı.

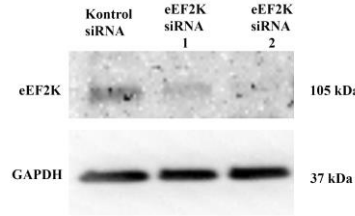
3.7. İstatistiksel Analiz

Tüm deney sonuçlarının istatistiksel analiz ve hesaplamalar GraphPad Prism versiyon 5 ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde, ortalama $\pm$ standart hata (SEM) hesaplandı. Çoklu kar ıla tırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı. GraphPad Prism uygulaması ile *p* değ erleri hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. siRNA'lar İle Transfeksiyonların Gösterilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinin eEF2K siRNA'sı kullanılarak susturulmasıyla hücrelerde eEF2K geninin transkripsiyonunu durdurulması sağlanacaktır. Bunun ardından da gen transkripsiyonunun durmasına bağlı olarak hücrede eEF2K proteinin azalması beklenmektedir. MDA-MB-231 hücreleri uygun hücre koşullarında büyütülmelerinin ardından ilk olarak eEF2K siRNA'ları transfekte edildi. Hedef olmayan inhibisyonları önleyebilmek adına (off-target etkisi) iki ayrı siRNA klonu kullanılarak transfeksiyon yapıldı. siRNA ile transfeksiyonu takip eden 72. saatin sonunda hücreler toplanarak western blot yöntemi için hücre lizatları elde edildi. Elde edilen lizatlardan eEF2 Kinaz proteini için western blot yapılarak inhibisyonun olup olmadığı gösterildi (Şekil 4.1). Ayrıca internal kontrol olarak kullanılan GAPDH ile hücre lizatlarındaki protein miktarı gösterildi.



Şekil 4.1: eEF2 Kinaz siRNA'ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde eEF2K ekspresyonu görülmektedir.

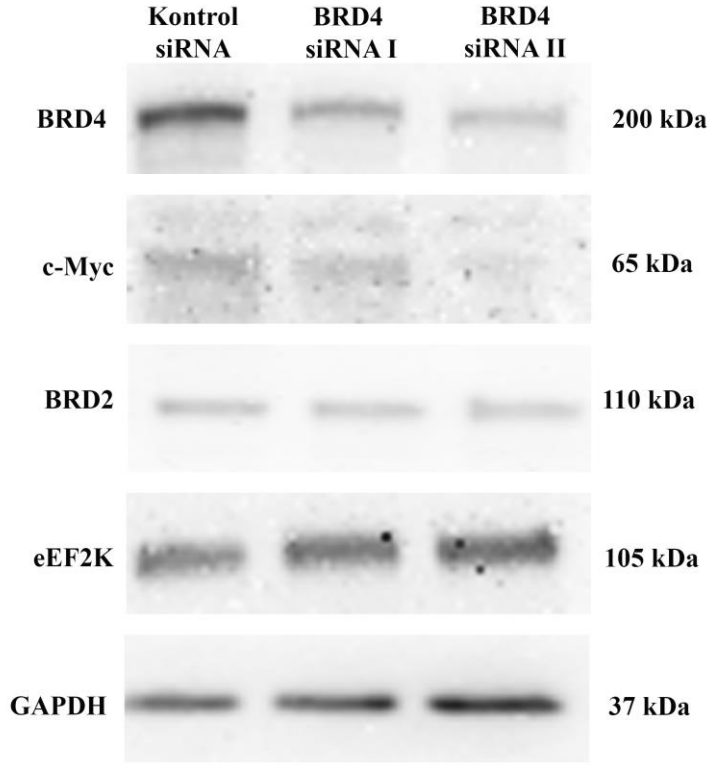
eEF2 Kinaz'ı inhibe etmek için kullanılan iki ayrı siRNA'nın da eEF2K'nin protein miktarını azalttığı net bir şekilde görülmektedir. Aynı membranda yapılan internal kontrol GAPDH işaretlemesi ile de üç hücre lizatlarındaki protein miktarlarının birbirine yakın olduğu ve buna rağmen azalmanın etkinliği dikkati çekmektedir. Bu deneyle; siRNA ile gen sessizleştirilmesinin başarıyla yapılmasının ardından; eEF2K protein miktarındaki ciddi azalma net bir şekilde görülmektedir.

Benzer bir deney de; BRD4 siRNA'ları ile yapılan transfeksiyon sonunda, elde edilen lizatlardaki BRD4 protein miktarlarının western blot analizi ile değerlendirilmesiyle yapılmıştır. Kontrol siRNA'sı ile iki siRNA'nın birlikte denenmesi sonucunda, BRD4 protein miktarının her iki siRNA ile de ciddi oranda azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.2).

Bunu takiben aynı membranlarda; BRD4'ün hedef proteini olan ve transkripsiyon promotoruna bağlandığı bilinen c-Myc için de işaretleme yapıldı. c-Myc proteinin de BRD4 inhibisyonu ile azaldığı görüldü. Dolayısıyla, BRD4 inhibisyonu doğru bir şekilde gerçekleştirilirse; BRD4'ün hedef proteini olan c-Myc'in de azaldığını ve bu ikisinin birbiriyle doğrudan ilişkili olduğunu gösterdi (Şekil 4.2).

BRD2 proteini, BRD4 ile aynı ailenin üyesi olup, BRD4'e moleküler olarak çok benzemektedir. Bu yüzden kullanılan siRNA'ların sadece BRD4'ü inhibe ettiğini gösterebilmek, BRD2'nin bundan etkilenip etkilenmediğini anlamak adına; BRD2 için de protein seviyesi aynı membranlarda değerlendirildi. Ancak; BRD2'nin protein miktarı, kontrol siRNA'sı ve hedef siRNA'lar kullanıldığında da hücrelerde aynı seviyede olduğu görüldü (Şekil 4.2). Bu sonuç, BRD4 siRNA'sının sadece BRD4'e özgül olduğunu, BRD2 üzerinde bir etkisinin olmadığını net olarak göstermektedir.

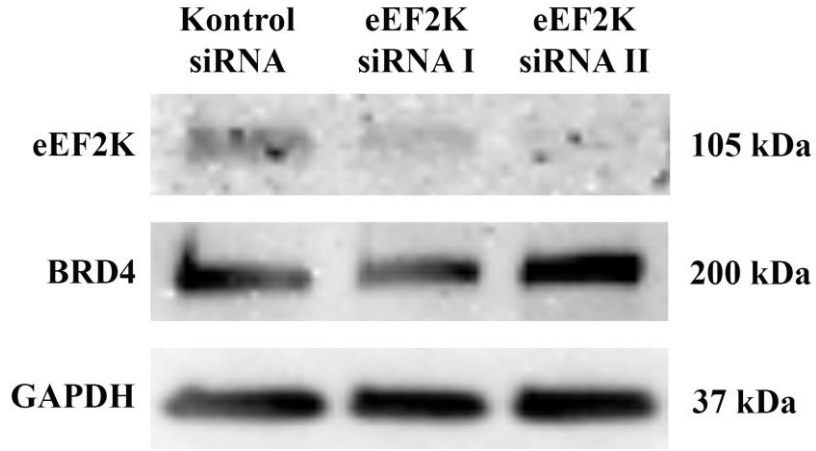
Elde ettiğimiz bulgularda eEF2K siRNA'sı ile eEF2K ekspresyonunun azaltıldığı durumda BRD4 protein miktarında herhangi bir değişim görülmedi. BRD4 siRNA'sı kullanılmasının ise eEF2K ekspresyonunu nasıl etkileyeceği bilinmemekteydi. Bu sebeple siRNA ile BRD4 inhibisyonundan sonra eEF2K protein miktarına da western blot yöntemi ile bakıldı. BRD4 inhibisyonunun ardından, eEF2K'nın protein miktarının da kontrol siRNA ve transfekte edilen hücrelere göre değerlendirilmesi sağlandı. Ancak, bunun da BRD2 gibi; farklı siRNA'lar ile değişmediği görüldü (Şekil 4.2). İnternal kontrol olarak kullanılan GAPDH proteinin ise kontrol ve BRD4 siRNA'ları ile transkripsiyonun ardından değişmediği görüldü.



Şekil 4.2: BRD4 siRNA'ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4, c-Myc, BRD2 ve eEF2K proteinlerinin ekspresyonu görülmektedir. BRD4 inhibisyonunun BRD2 ve eEF2K'nın ekspresyonlarını etkilemediği, ancak c-Myc ile doğrudan ilişkili olduğu dikkati çekmektedir.

4.1.1. eEF2 Kinaz Ekspresyon Değişiminin BRD4 Proteinini Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

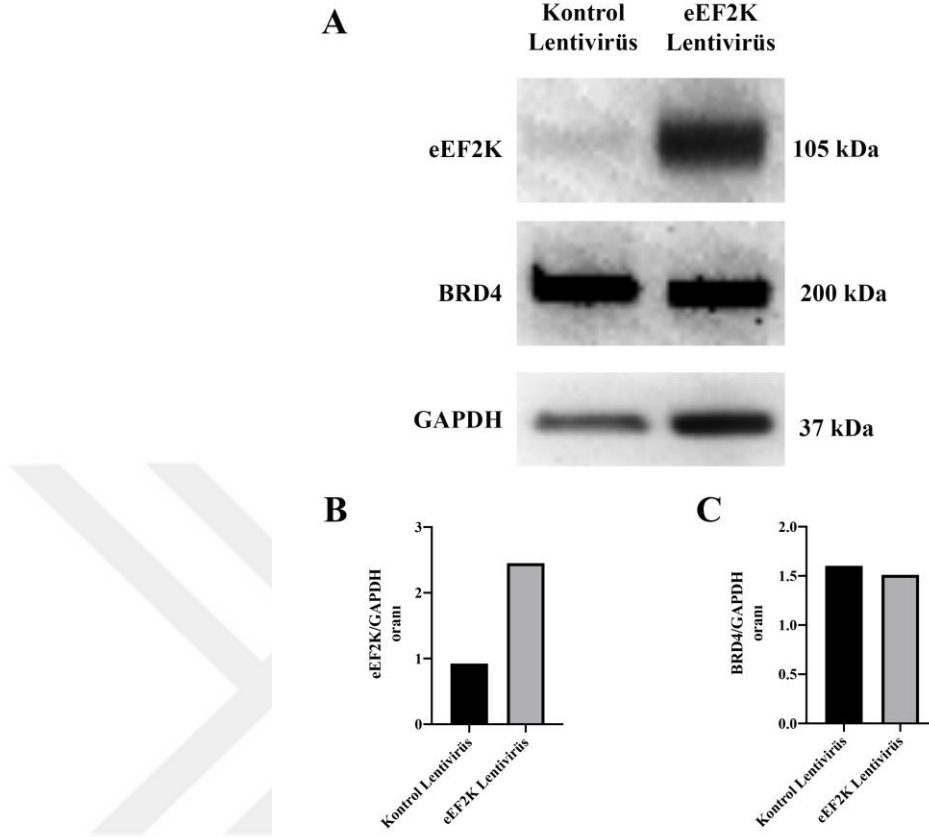
eEF2K'nın BRD4 üzerindeki etkisini gösterebilmek için; eEF2K siRNA'sı ile genin sessizleştirilmesi sağlandı ve BRD4 ekspresyonu değerlendirildi. Bu işaretleme sonrasında eEF2K gen sessizleştirilmesinin BRD4 proteinin seviyesini değiştirmediği görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: eEF2K siRNA'ları ile inhibe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 proteininin ekspresyonu görülmektedir.

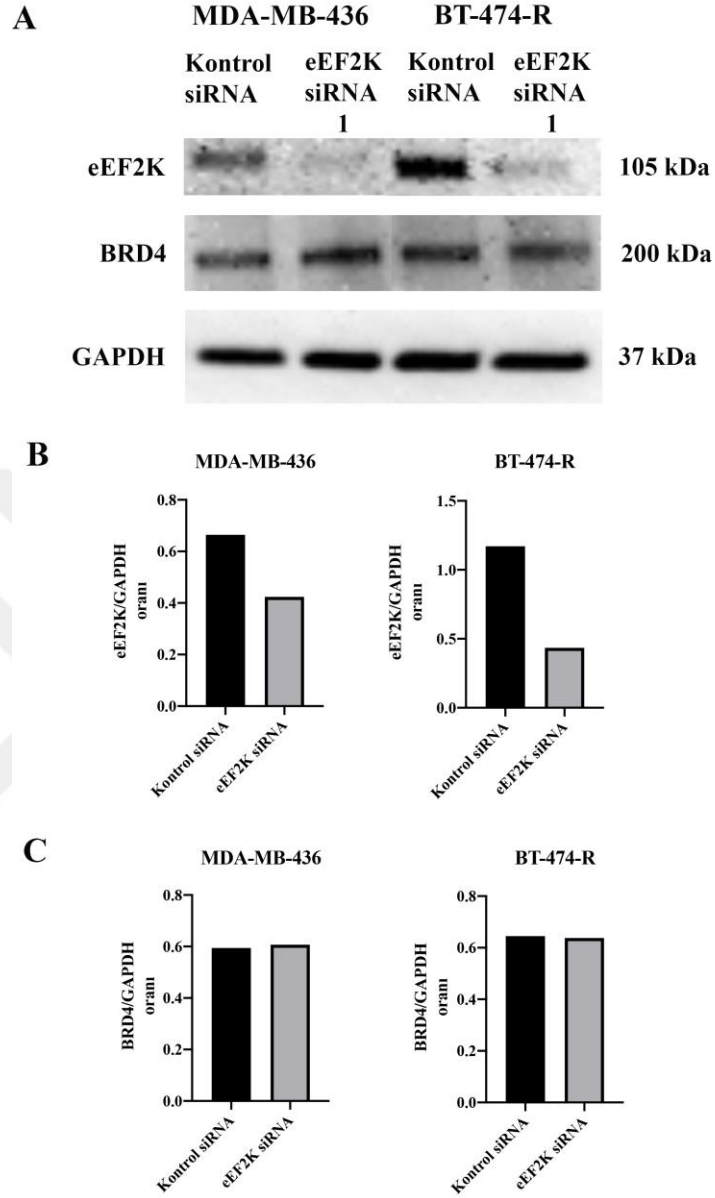
Bu sonuçlar, hipotezimizde sorguladığımız eEF2K'in BRD4 ekspresyonu üzerinde etkisinin olabileceği ihtimalini ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle çalışmamız eEF2K'nin lentivirüsü konjuge edilmesi şartıyla ekspresyonunun arttırılmasına (inhibisyonun tam tersi bir durum oluşturmak) yönlendirmiştir. Bu durumda BRD4'ün etkilenip etkilenmediğini görmeyi hedefledik.

eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde öncelikle eEF2K protein miktarı değerlendirilmiştir. Lentivirüsler, konjuge edilen hedef genin hücre içerisinde normalden fazla şekilde transkribe olup protein miktarının artmasına sebep olmaktadır. eEF2K inhibisyonunun BRD4 protein miktarını değiştirmedeği görüldüğünden, BRD4 proteinin eEF2K ekspresyonunun artışından nasıl etkileneceğini de araştırılmıştır. Lentivirüs ile konjugasyon sonrasında eEF2K protein seviyesinde kontrol lentivirüsü ile konjuge edilen hücrelere göre ciddi bir artış olduğu görüldü (Şekil 4.4A). eEF2K miktarındaki bu artışa rağmen BRD4 protein miktarının aynı kaldığı dikkati çekmekteydi (Şekil 4.4). Bantların analizleri sonucunda eEF2K lentivirüsü ile protein miktarının 2 kattan fazla arttığı görüldü (Şekil 4.4B). Buna karşın, BRD4 protein miktarı açısından değerlendirildiğinde, eEF2K lentivirüsü ile kontrol lentivirüsü arasında bir fark görülmedi (Şekil 4.4C).



Şekil 4.4: **A)** eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 proteininin ekspresyon seviyesi görülmektedir. **B)** eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilen hücrelerde eEF2K protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir. **C)** eEF2K lentivirüsü ile konjuge edilen hücrelerde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir.

Bu sonuçların doğrulanması için, eEF2K ile gen sessizleştirilmesi farklı hücre hatlarında da gerçekleştirilerek BRD4 protein seviyeleri değerlendirildi. Bu hücre hatlarından biri MDA-MB-231'e benzer şekilde üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-436 olarak seçildi. Diğeri ise östrojen, progesteron ve HER-2 reseptörleri açısından pozitif olan, ancak HER-2 reseptörü için en sık kullanılan tedavi yaklaşımı olan Trastuzumab'a (HER-2 reseptörü blokeri) dirençli hücrelerin oluşturduğu BT-474-R hücre hattı olarak seçildi. Her iki hücre hattına da eEF2K siRNA'sı transfekte edildi ve daha önceki western blot deneyleriyle aynı şekilde eEF2K, BRD4 ve GAPDH antikolları ile işaretlendi. Kullandığımız 2 hücre hattında da MDA-MB-231'e benzer şekilde, eEF2K geninin inhibisyonu sonrasında eEF2K protein miktarı azalırken (Şekil 4.5A ve B) BRD4 protein miktarında bir değişim görülmedi (Şekil 4.5A ve C).



Şekil 4.5: A) eEF2K siRNA'sı ile inhibe edilen MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde eEF2K ve BRD4 proteinlerinin ekspresyonu görülmektedir. **B)** eEF2K siRNA'sı ile inhibisyon sonrası MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde eEF2K protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir. **C)** eEF2K siRNA'sı ile inhibisyonun ardından MDA-MB-436 ve BT-474-R hücrelerinde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir.

Bu yeni sonuç bize eEF2K ile BRD4 arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermiştir. Çünkü, eEF2K gen seviyesinin değişimi (arttırılması ve/veya azaltılması) BRD4 protein miktarı üzerinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Farklı hücre hatlarında da benzer sonuçların alınması bu sonuçlarımızı doğrulamaktadır. Bu sebeple projede BRD4 inhibisyonunu sağlayabilmek için siRNA'ya ek olarak yeni bir gen düzenleyici

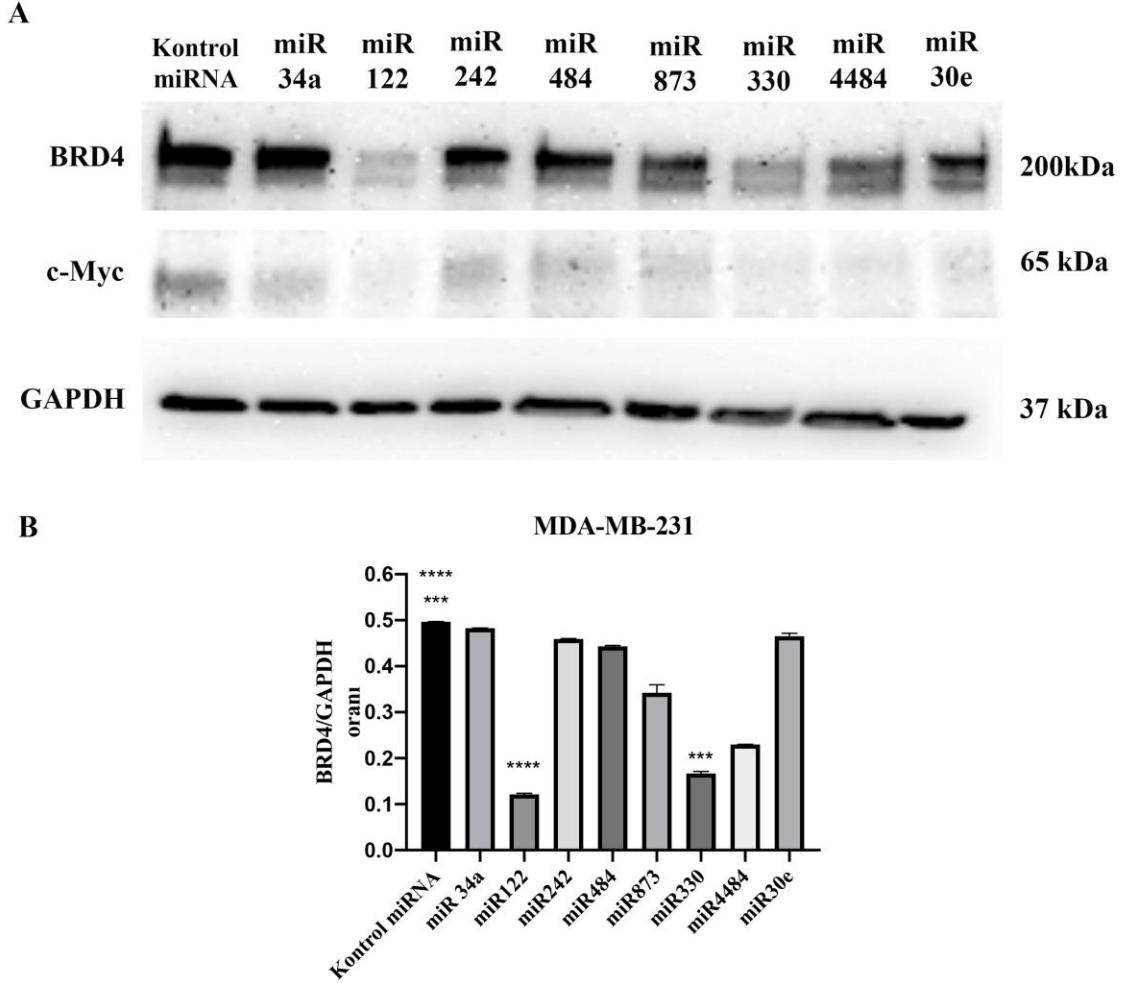
kullanılması için mikroRNA ile gen seviyesi değiştirme yönteminin kullanılmasına karar verildi.

4.2. MikroRNA’lar Yardımıyla Brd4 Protein Seviyesi Değişiminin Gösterilmesi

eEF2K ve BRD4 arasında doğrudan bir ilişki olduğu sonucu doğrulanamadığı için BRD4’ hedefleyen başka bir gen düzenleyici ile çalışılmasına karar verilmiştir. Bu sebeple farklı miRNA’lar MDA-MB-231 hücrelerine transfekte edildi ve BRD4 ekspresyonunun değişimi değerlendirildi.

mikroRNA veri tabanlarında yapılan analiz çalışmaları ile BRD4 ile ilişkisi olabilecek ancak literatürde henüz aralarında bir ilişki olduğu gösterilmemiş mikroRNA’lar seçilerek her biri ile ayrı ayrı transfeksiyon yapıldı ve elde edilen lizatlar BRD4 proteini açısından western blot yöntemiyle değerlendirildi.

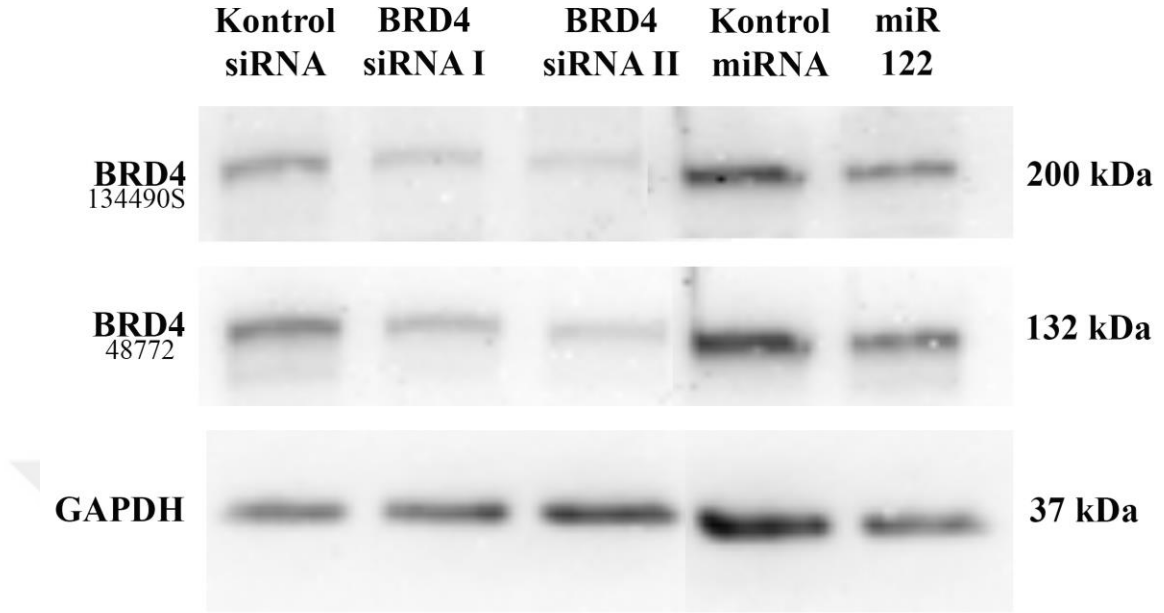
Yapılan analizler doğrultusunda miR 122 ve miR330’un BRD4’ inhibe ettiği görüldü (şekil 4.6). BRD4 inhibisyonunun ardından BRD4’n hedef proteini olan c-Myc ekspresyonu da değerlendirildi ve BRD4’e benzer şekilde c-Myc’in de bu iki mikroRNA ile inhibe olduğu görüldü (şekil 4.6).



Şekil 4.6: A) Farklı mikroRNA'lar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 ve c-Myc proteinlerini ekspresyonları görülmektedir. **B)** Farklı mikroRNA'lar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 protein miktarının GAPDH'e oranı görülmektedir (****p<0,0001, ***p=0,0001).

Bu iki mikro RNA arasından miR 122'nin BRD4'ü daha fazla inhibe ettiği görüldüğü için deneylere miR 122 ile devam edilmesine karar verildi.

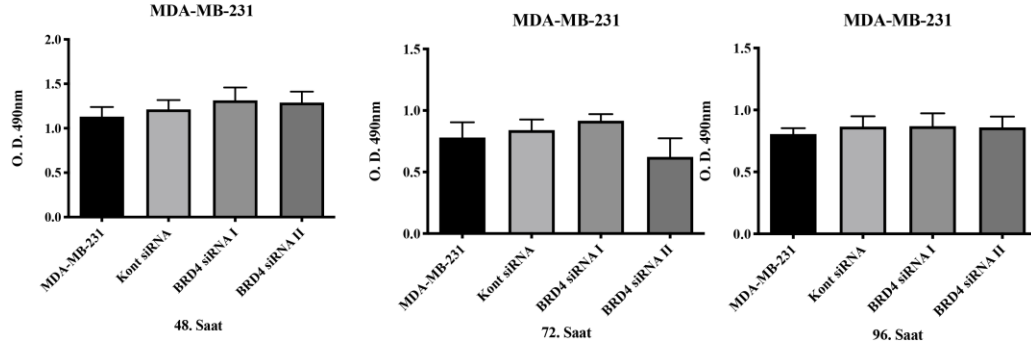
BRD4 siRNA'ları ve miR 122 ile transfeksiyonu teyit etmek için aynı anda bir transfeksiyon daha yapıldı. Yine bu membranlarda BRD4 protein seviyeleri değerlendirildi. Bu defa iki farklı firmadan temin edilen iki ayrı BRD4 antikoru (BRD4 I için, Cell signal; #134490S ve BRD4 II için, Santa Cruz; #48772) ile işaretleme yapıldı. Bu işaretleme sonucunda da hem siRNA ile hem miR 122 transfeksiyonu ile BRD4 seviyesinin azaldığı görüldü (Şekil 4.7). Ayrıca iki ayrı BRD4 antikoru da kullanılarak sonuçların doğruluğu teyit edilmiş oldu.



Şekil 4.7: BRD4 siRNA'ları ve miR 122 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 ekspresyonu görülmektedir.

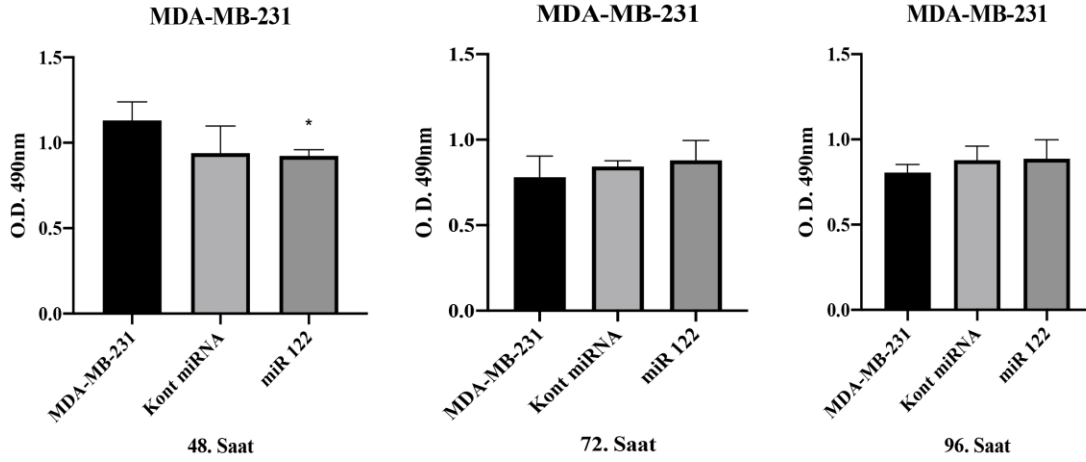
4.3. MDA-MB-231 Hücrelerinde Brd4 Ve Mir-122 İle Transfeksiyon Sonrası Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ve miR 122 ile transfeksiyonundan sonra hücre proliferasyonunun nasıl değiştiğini görmek amacıyla MTS testi yapıldı. Hücreler bu test için 96-kuyucuklu kaplara 3 set halinde ekildi. Transfeksiyondan sonraki 48., 72. ve 96. saatlerin sonunda 490 nm'de absorbans değerleri okutuldu. 48., 72. ve 96. saatlerin sonunda BRD4 siRNA'ları ile transfekte edilen hücre proliferasyonlarında anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 4.8).



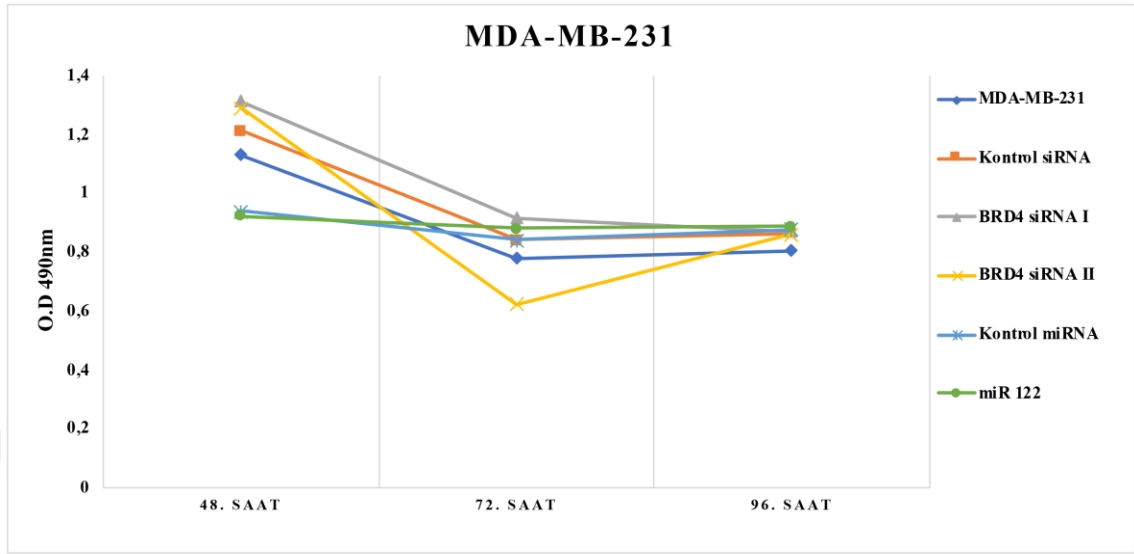
Şekil 4.8: MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonlarından 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir.

Aynı şekilde miR 122 ile transfeksiyondan sonra yapılan deneyde ise; 48. saatin sonunda hücrelerin proliferasyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (Şekil 4.9). Ancak 72. ve 96. saatlerin sonunda ise anlamlı bir değişim gözlenmedi.



Şekil 4.9: MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyondan 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir (* $p < 0,05$).

Hücrelerin proliferasyon hızlarını saatlere göre değişimi çizgi grafiği ile de gösterildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 ve miR 122 ile transfeksiyonlarında 48, 72 ve 96 saat sonraki proliferasyon hızları görülmektedir.

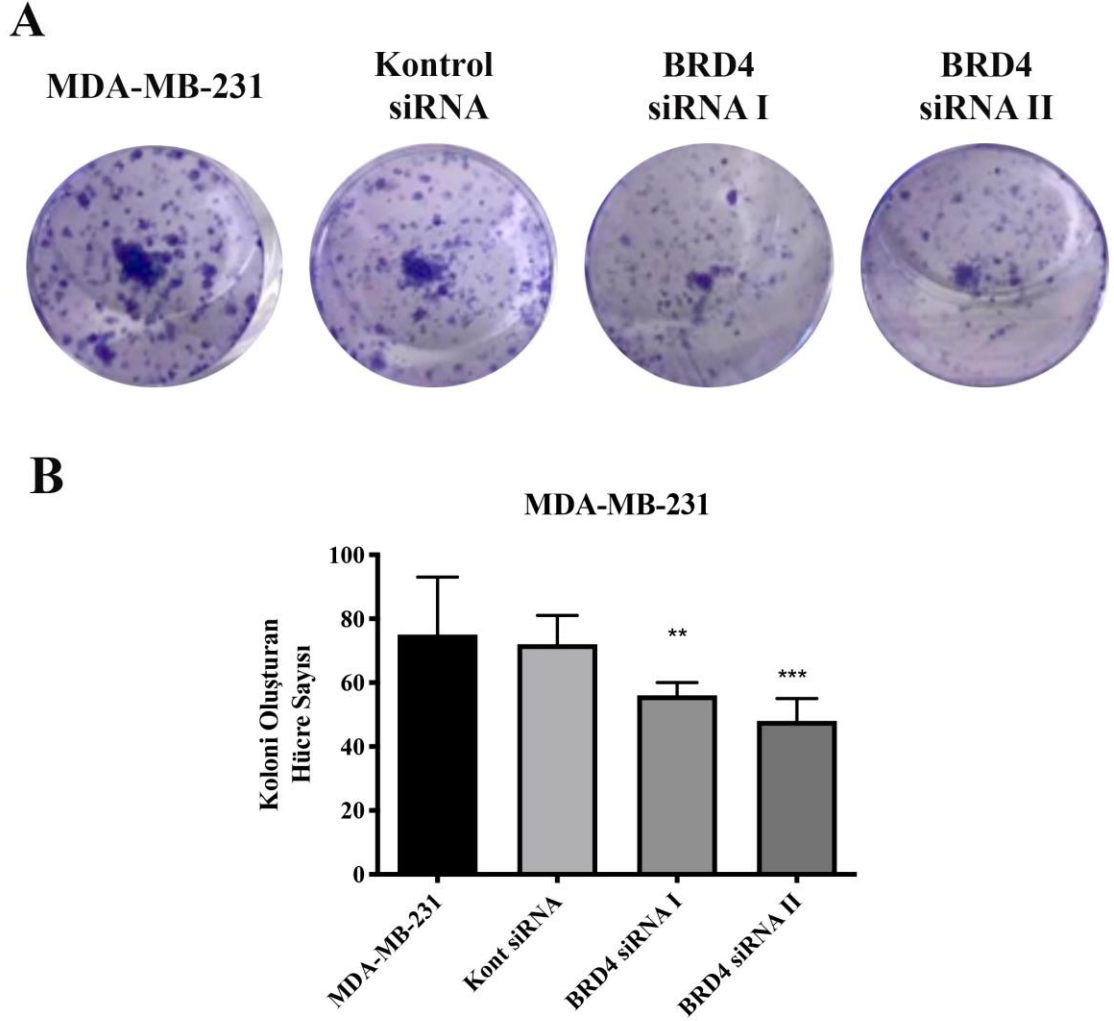
Grafiklerde de görüldüğü gibi; MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde BRD4 inhibisyonu yapılırken (48, 72 ve 98 saat) hücre proliferasyonlarında bir değişime rastlanmamıştır. Ancak miR 122’de 48. saatte gözlenen düşüş anlamlılık içermektedir.

4.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde Brd4 İnhibisyonunun Ardından Klonojenik Testi İle Koloni Oluşumlarının Gösterilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA’ları ve miR 122 ile transfeksiyonundan sonra koloni oluşum değişimlerini görmek amacıyla klonojenik testi yapıldı. Bu testte hücreler transfekte edildikten sonra 10-15 gün arası bir zaman diliminde 3 günde bir kontrol edilerek transfekte edilmeyen hücrelerin bulunduğu kuyucukta (MDA-MB-231) yeterli hücre sayısına ulaşılması beklendi. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra tüm hücrelerin üzerindeki medyum alınarak hücreler kristal violet ile boyandıktan sonra koloni oluşturan hücreler Image J programı ile sayıldı.

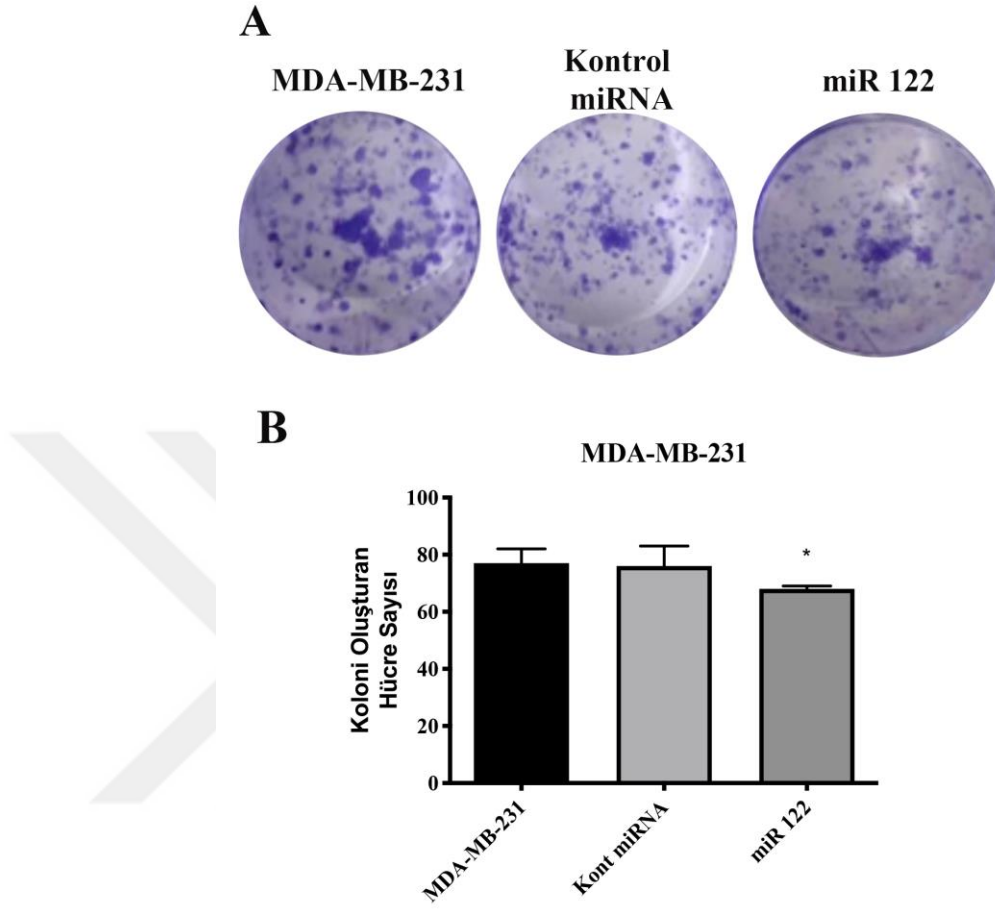
Klonojenik testinde; MDA-MB-231 hücrelerindeki BRD4 inhibisyonu, hücrelerin proliferasyonunu, transfekte edilmeyen (MDA-MB-231) ve kontrol siRNA grubuna göre azaltmıştır (Şekil 4.11A). Image J programı ile sayılan hücreler arasında istatistiksel analiz

yapıldığında da; kullanılan iki farklı BRD4 siRNA'sının transfekte edildiği hücrelerin; transfeksiyon yapılmayan ve kontrol siRNA'nın transfekte edildiği hücelere kıyasla hücre sayısında anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü (Şekil 4.11B).



Şekil 4.11: A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra koloni oluşturan hücreler görülmektedir. **B)** Koloni oluşturan hücre sayılarının MDA-MB-231 (siRNA transfekte edilmeyen hücreler) grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir (** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

Aynı şekilde miR 122 transfekte edilen hücrelerde de klonojenik canlılık testi yapıldı. miR 122 ile transfekte edilen hücrelerde, MDA-MB-231 hücrelerine göre bir azalma görüldü (Şekil 4.12A). Yapılan istatistiksel analiz ile de bu azalmanın anlamlı olduğu gösterildi (Şekil 4.12B).



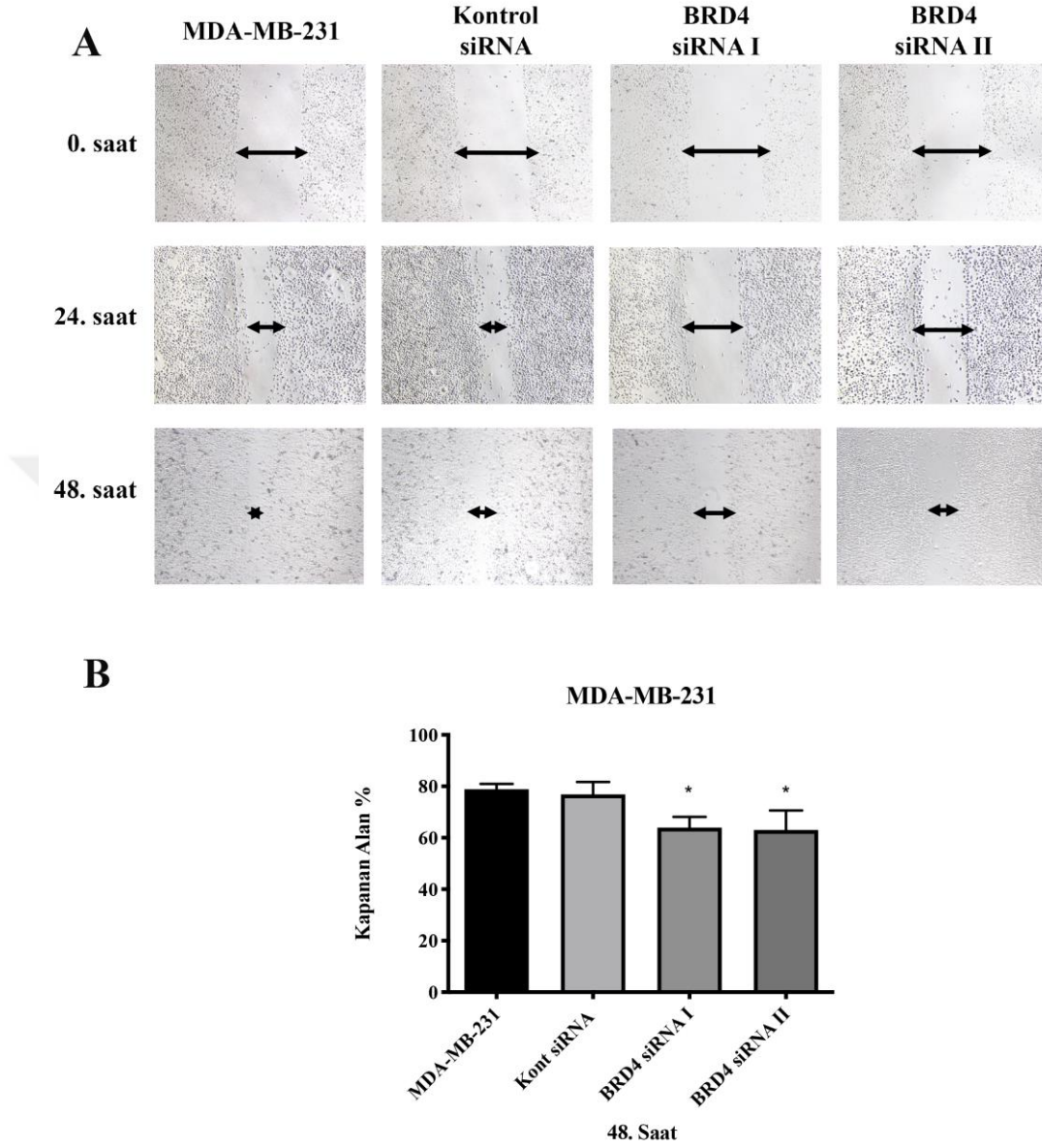
Şekil 4.12: **A)** MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra koloni oluşturan hücreler görülmektedir. **B)** Koloni oluşturan hücre sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir (* $p<0,05$).

4.5. MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon Testi Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 inhibisyonundan sonra göç etme yeteneğini görmek için yapılmıştır. Bu deneyde, BRD4 inhibisyonun tümör hücrelerinin metastatik özelliklerini etkileyip etkilemediklerinin değerlendirilmesi planlandı. MDA-MB-231 hücreleri 6-kuyucuklu tabaklara ekildikten sonra BRD4 siRNA'ları transfekte edildi. 48 saat sonra kuyucuklara yukarıdan aşağıya doğru olacak şekilde steril pipet ucu ile bir çizik çekildi ve hemen ardından 0. saat fotoğrafları çekildi. Kuyucukların çizilmesini takip eden 24. ve 48. saatlerde de hücrelerin fotoğrafları çekildi. Tüm fotoğraflar Image J programı ile aradaki açıklığın ölçülerek sayısal veriler haline getirildi. Her bir grup için ölçülen değerlerin ortalaması hesaplandı. Ardından 48. saat için hesaplanan değer 100 ile çarpıldı ve 0. saatte hesaplanan değerlerin ortalamasına bölünerek alanın yüzde değeri hesaplandı.

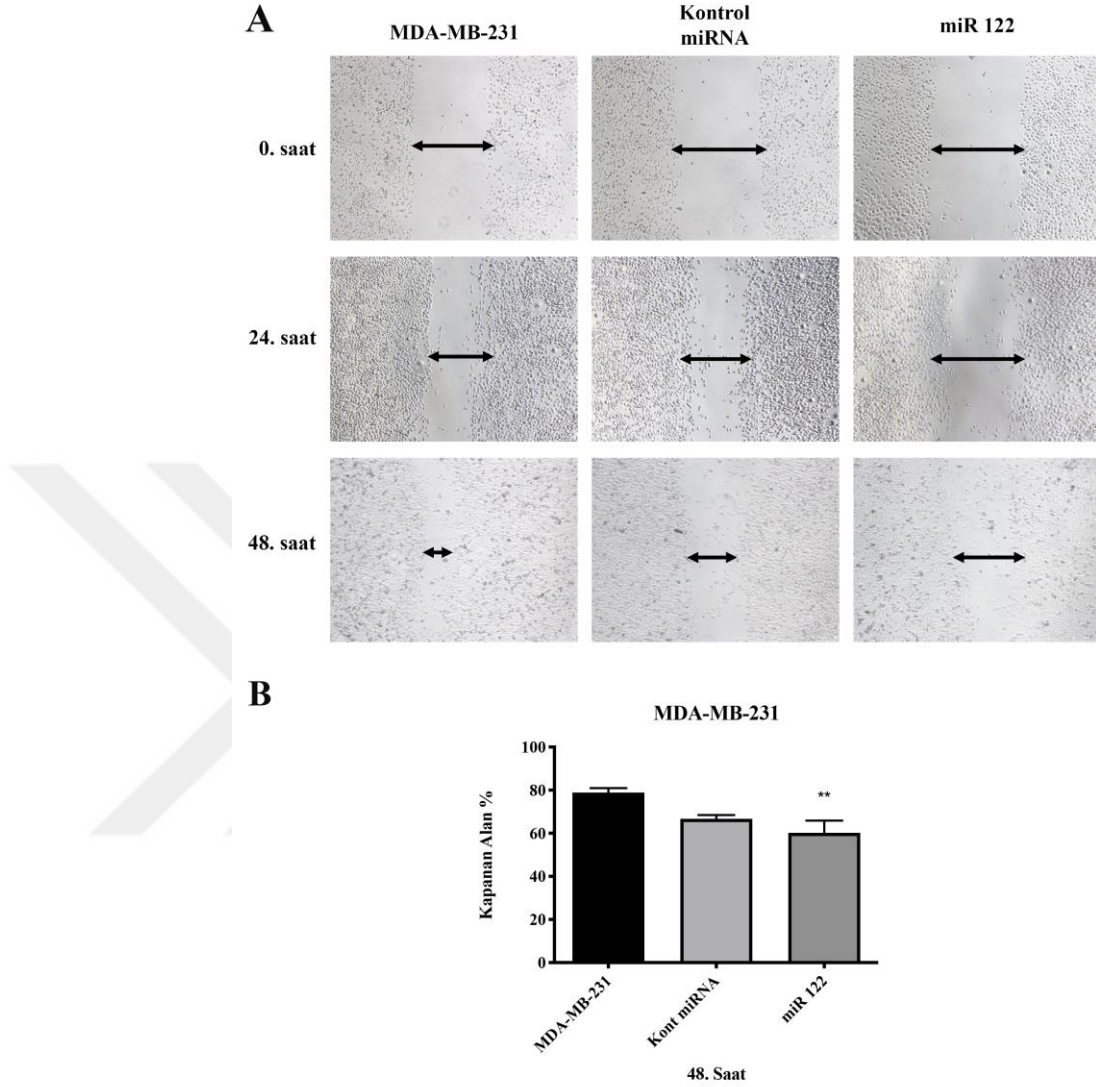
Sonuçlar değerlendirildiğinde; transfeksiyonun ardından 24 ve 48. saatlerde BRD4 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonlarının hem transfekte edilmeyen hem de kontrol siRNA grubuna göre azaldığı görüldü (Şekil 4.13A). Image J ile 48. saat sonuçlarının sayısal değerlere çevrilmesinden sonra yapılan istatistiksel analiz ile de bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü. Ayrıca, MDA-MB-231 grubu ile kontrol siRNA transfekte edilen grup arasında anlamlı bir azalma görülmedi (Şekil 4.13B).





Şekil 4.13: A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyonlarının azaldığı görülmektedir. **B)** Migrasyon sonrası kapanan alanın yüzde değerleri görülmektedir (* $p < 0,05$).

Benzer şekilde miR 122 transfekte edilen hücrelerde, 24 ve 48. saatlerin sonunda hücrelerin migrasyon kapasitelerinin düşük olduğu ancak azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi (Şekil 4.14A). Kontrol miRNA ve transfekte edilmeyen hücreler arasında ise anlamlı bir azalma tespit edilmedi (Şekil 4.14B).



Şekil 4.14: A) MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra 24 ve 48. saatlerde hücrelerin migrasyonlarının azaldığı görülmektedir. B) Migrasyon sonrası kapanan alanın yüzde değerleri görülmektedir (** $p<0,005$).

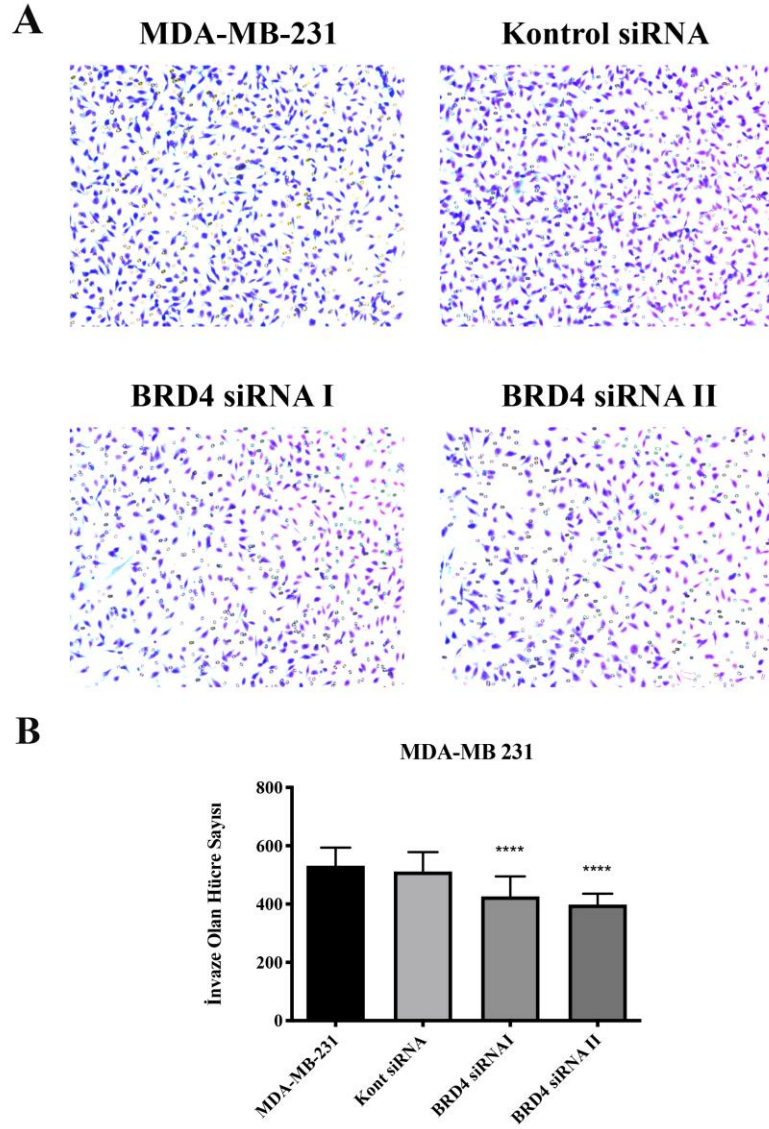
4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde İnvazyon Testi Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonun azaldığının görülmesinin ardından, BRD4 inhibisyonunun ÜNMK hücrelerinin invazyon kapasitesilerini değerlendirmek için *in vitro* invazyon analizi yaparak göstermeyi amaçladık. Matrijelin üzerine ekilen hücrelerin çeşitli proteazlar salgılayarak matrijelin diğer tarafına geçmesi prensibine dayanarak yapılan bu deneyde, hücrelerin *in vivo* ortamda metastaz sırasındaki koşulları taklit edilmektedir. Süre sonunda matrijelin arka tarafına geçen hücreler histolojik boyalar ile

boyanarak görünür hale getirildi ve invaze olan hücreler Image J programı yardımıyla sayılarak gruplar arası fark olup olmadığı değerlendirildi.

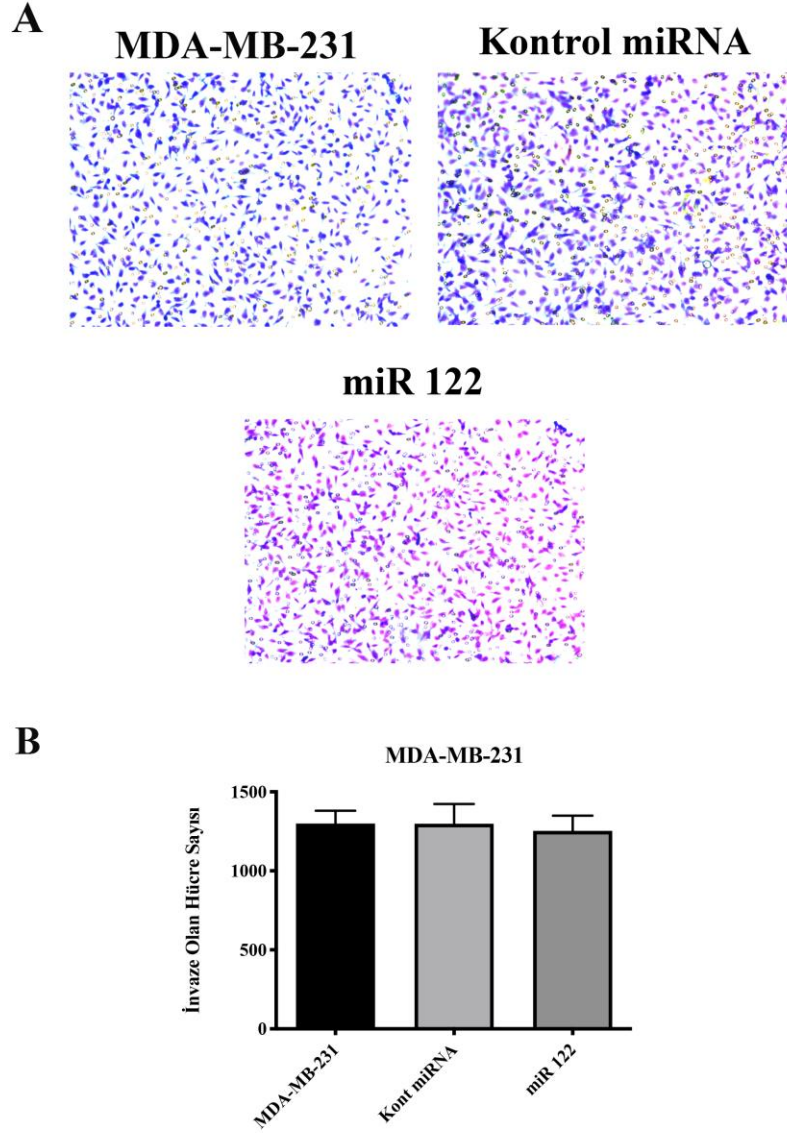
siRNA ile BRD4 inhibisyonunun ardından, MDA-MB-231 hücrelerinin matrijel içerisinde daha az invaze olduğu görüldü. Transfekte edilmeyen hücreler ile kontrol siRNA transfekte edilen hücreler arasında bir azalma görülmedi (Şekil 4.15A). İstatistiksel analizler sonunda, MDA-MB-231 hücreleri ile BRD4 siRNA'larının transfekte edildiği hücreler arasındaki azalmanın anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.15B).





Şekil 4.15: A) MDA-MB-231 hücrelerinin BRD4 siRNA'ları ile transfeksiyonundan sonra invaze olan hücreler görülmektedir. **B)** İnvaze olan hücre sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonuyla oluşan BRD4 inhibisyonundan sonra, invazyon kapasitelerinin mikroRNA transfekte edilmeyen gruba göre azalmanın olmadığı görüldü (Şekil 4.16A). Hücre sayımından sonra yapılan istatistiksel analizler sonucunda hücreler arasında bir anlamlılığa rastlanmadı (Şekil 4.16B).



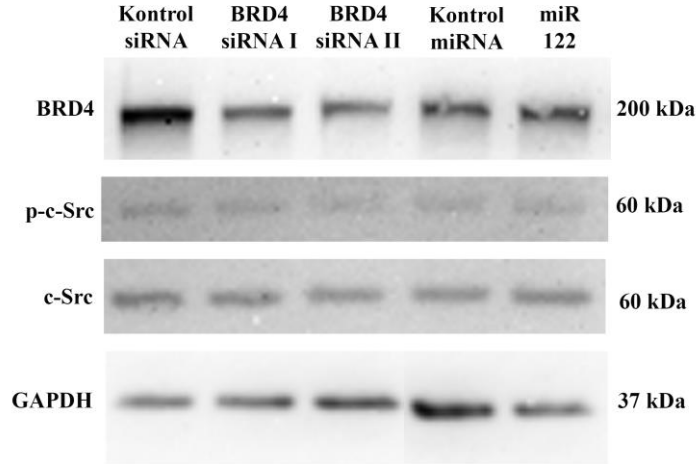
Şekil 4.16: **A)** MDA-MB-231 hücrelerinin miR 122 ile transfeksiyonundan sonra invaze olan hücreler görülmektedir. **B)** İnvaze olan hücre sayılarının MDA-MB-231 grubuna göre istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir.

Migrasyon ve invazyon sonuçlarına göre, BRD4'ün inhibisyonunun, MDA-MB-231 hücrelerinin göç potansiyellerini ve ÜNMK hücrelerinin invazyon hızlarını olumsuz etkilediğini düşündürmektedir.

4.7. MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon Ve İnvazyon Test Sonuçlarının Doğrulanması

Hem siRNA ile hem de mikroRNA ile BRD4 inhibisyonunun ardından hücrelerin migrasyon hızlarının düştüğü görülmüştür. Ardından yapılan *in vitro* invazyon testi ile de BRD4'ün siRNA ile direk inhibisyonu sonrası invazyonun azaldığı, ancak miR 122 tarafından yapılan BRD4 inhibisyonu ile görülen azalmanın ise anlamlı olmadığı görüldü. Hücrelerin metastatik potansiyellerini görmek için yapılan bu iki deney sonucunun protein düzeyinde de konfirme edilmesiyle; invazyonun ana moleküllerinden biri olan Src protein miktarının değerlendirilmesi planlandı. Src proteinin fosforilasyonunun artması hücrelerin invazif potansiyellerini arttırmaktadır. Bu sebeple BRD4 inhibisyonundan sonra p-c-Src ve c-Src antikorları kullanılarak western blot deneyleri planlandı.

Deney sonucunda p-c-Src protein miktarının BRD4 siRNA'ları ile inhibe edilen hücrelerde azaldığı görüldü. miR 122 ile transfeksiyonun ardından ise p-c-Src miktarında azalma tespit edilmedi. Src protein miktarının da transfeksiyonla değişmediği görüldü (Şekil 4.17). Bu durum; Src protein miktarının aynı kaldığını ancak, p-c-Src proteinindeki azalmanın BRD4 inhibisyonu sebebiyle olabileceğini gösterdi.



Şekil 4.17: BRD4 inhibisyonunun ardından MDA-MB-231 hücrelerinde p-c-Src ve Src protein seviyeleri görülmektedir.

p-c-Src protein miktarının BRD4 inhibisyonu ile azalması migrasyon ve invazyon testlerinin sonuçları ile benzer şekilde olup bize BRD4 inhibisyonunun tümör hücrelerinin metastatik yeteneklerini azaltabileceğini düşündürmektedir.



5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık karşılaşılan kanser tipi olarak bilinmektedir. Bununla beraber kanserden kaynaklı ölüm nedenlerinin de en sık görülen ikinci sebebidir (Bray ve ark., 2018). Meme kanseri alt tiplerindeki farklar; tedavi tiplerinin de çeşitliliğini ortaya koymaktadır. İnvaziv olmayan meme kanserlerinde tedaviye cevap verme ve tedavi sonrası sağ kalım oranı yüksekken; (Tsang ve Tse, 2020) ÜNМК'lerinde durum diğer kanser türlerine kıyasla daha farklı seyretmektedir.

ÜNМК, kötü sağ kalım ve yüksek metastaz insidansı ile karakterize edilen meme kanserinin en agresif alt tipidir. Sınırlı tedavi seçenekleri ÜNМК'nin agresif karakterine katkıda bulunan önemli bir faktördür. Standart kemoterapi, ÜNМК'nin sistemik tedavisinin bel kemiği olmaya devam etmektedir; bununla birlikte, bu tümörler genellikle sitotoksik ilaçlara dirençlidirler (Nedeljkovic ve Damjanovic, 2019). Kemoterapi, uzun yıllardır metastatik ÜNМК hastalarının tedavisinde ilk başvurulanan tedavi yöntemi olmaya devam ederken; günümüzde hastalarının tedavisini optimize etmek amacıyla yeni terapötik tedavi ajanlarının, immünoterapinin ve öngörücü biyobelirteçlerin geliştirilmesine devam edilmektedir (Caparica ve ark., 2019).

Alfa kinaz ailesinin atipik bir üyesi olan ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 kinaz, protein sentezinin peptit uzama fazının kontrolünde rol oynamaktadır. eEF2K, ÜNМК hastalarının tümör hücrelerinde aşırı derecede ekspre edilmektedir ve hücre proliferasyonunu, motilitesini/invazyonunu ve tümör oluşumunu desteklemektedir (Tekedereli ve ark., 2012; Bayraktar ve ark., 2018). Hücrelerdeki bu ekspresyona ek olarak yapılan ÜNМК *in vivo* modellerinde eEF2K'nin genetik inhibisyonu, tümör büyümesini önemli ölçüde baskılamış ve kemoterapinin etkinliğini de arttırmıştır. Bu çalışmalar; eEF2K'nin ÜNМК'de potansiyel bir moleküler terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (Bayraktar ve ark., 2018).

Bromodomain 4, BET protein ailesinin en iyi çalışılan ve ciddi fonksiyonel görevleri olan üyesidir. Transkripsiyonel regülasyonda görevli önemli bir transkripsiyonel düzenleyicidir. BRD4, pozitif transkripsiyon uzama faktörü b (P-TEFb) dahil olmak üzere

aktif promotor ve enhanser bölgelerdeki çoklu protein kompleksleri ile etkileşime girer ve transkripsiyonel regülasyonda rol oynar (Jiang ve ark., 2020). BRD4'ün, hücre siklusu düzenleyicisi olan c-Myc'in gen promoturunda direk bağlanma bölgesinin bulunmasından tümör hücrelerinin proliferasyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. BRD4'ün inhibisyonu c-Myc'le ilişkili olan genlerin transkripsiyonlarının azaldığı bilinmektedir (Ott ve ark., 2012).

Çalışmamızda, hücre siklusunun düzenlenmesinde sorumlu olan eEF2K ve BRD4 arasındaki ilişkisinin ortaya çıkarılması için öncelikle eEF2K'nin siRNA'lar yardımıyla inhibisyonu sağlanmış ve BRD4 seviyesinin bu inhibisyonundan etkilenmediği görülmüştür. Ardından bu etkiye ters açıdan bakılarak; BRD4'ün inhibisyonu sağlanmış ve bu defa eEF2K'nin ekspresyonunda herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde eEF2K'nin lentivirüsler yardımı ile normalden yüksek düzeyde ekspre edildiği durumda da BRD4 protein seviyesinde bir değişim görülmemiştir. Bu deneylerin farklı meme kanseri hücre hatlarında denenmesi BRD4 ile eEF2K arasında doğrudan bir ilişki olmadığını doğrulamıştır. Literatürde de eEF2K ile BRD4'ün ilişkisini gösteren bir yayına rastlanmadığından çalışmamız bu aşamada literatüre katkı sağlayacaktır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde BRD4'ün eEF2K tarafından düzenlenmediği görüldü. Bu durumun ardından BRD4'ü hedef alan diğer regülatör faktörler araştırılmaya başlandı ve BRD4'ü hedefleyebileceği düşünülen mikroRNA'lar kullanılarak BRD4'ün hedeflenmesi sağlandı. Yapılan western blot analizleri sonucunda miR 122'nin BRD4'ü inhibe ettiği görüldü. c-Myc'in promotorunda BRD4'ün direk olarak bağlanabileceği bir bölge bulunmaktadır. BRD4'ün inhibe edilmesi ile BRD4 c-Myc'in promotoruna bağlanamamakta ve c-Myc'in translasyonu durmaktadır (Ott ve ark., 2012) (Andrews ve ark., 2017). Çalışmamızda da BRD4'ün siRNA'lar ile inhibisyonunun ardından, hedef geni olan c-Myc'in de inhibe olduğu görüldü. Literatürle örtüşen bu bilgi, miR 122'nin BRD4 ve BRD4'ün hedef proteinlerini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuç üzerine gidilerek BRD4 ile miR 122 arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışıldı.

MikroRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda olan, kodlanmamış bölgedeki hedef haberci RNA transkriptlerine bağlanan ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu etkileyebilen kısa kodlayıcı olmayan RNA'lardır (Shayestehpour ve ark., 2017).

miRNA'lar ayrıca gen ekspresyonunu susturmak suretiyle protein translasyonunu bastırabilir ve protein translasyonundaki düzensizliklere sebep olarak biyolojik hücresel işlevleri etkileyebilir (Khan ve ark., 2019). Birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de mikroRNA'ların görevli olduğu, tümör ilerlemesi ve metastaz gelişimi ile ilişkili olarak hücre proliferasyonunu düzenlediği, apoptozu inhibe ettiği ve/veya metastatik kapasiteyi artırarak tümör büyümesinin desteklenmesine sebep olabildiği söylenmektedir (J. G. Han ve ark., 2017; Luo ve ark., 2017). Meme kanserinde de mikroRNA'ların gerek onkogen gerekse tümör süpresör etkileri olduğu bilinmektedir (Khan ve ark., 2019).

miR 122 geni, kromozom 18 üzerinde yerleşiktir ve uzun kodlanmayan RNA (LNCRNA)'dan RNA polimeraz II tarafından kopyalanarak sentezlenir (Thakral ve Ghoshal, 2015). miR 122 özellikle karaciğerde yüksek oranda ekspre olmaktadır ve lipid metabolizması gibi birçok biyolojik süreçte de hayati bir rol oynamaktadır (J. Yang ve ark., 2017).

Fong Y. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, miR 122'nin meme kanseri hücreleri tarafından salgılandığı ve pre-metastatik niş içinde metabolik ortamı adapte ederek metastazı destekleyebildiği gösterilmiştir (Fong ve ark., 2015). Başka bir çalışmada ise, miR 122'nin tümör baskılayıcı olarak görev aldığı ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R)'nü hedefleyerek ve meme kanserinde PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolağını düzenleyerek tümör oluşumunu engelleyebildiği gösterilmiştir (B. Wang ve ark., 2012).

Literatür miR 122'nin meme kanserinde hem tümör baskılayıcı hem de metastazı destekleyerek çift taraflı etki gösterdiği yönünde iki açıdan da değerlendirme yapmaktadır. miR 122 ile BRD4'ün etkileşimin, kanser gelişiminin hangi safhasında yer aldığı henüz açıklığa kavuşmadığından; çalışmamızda miR 122 meme kanserindeki rolünün BRD4 ile ilişkisi üzerinden ortaya çıkarılması planlanmıştır. İlk olarak BRD4 ile miR 122 arasındaki ilişkinin tümör hücrelerinde hücre canlılığını nasıl etkilediğini görebilmek amacıyla hücre canlılık testi yapıldı ve BRD4 siRNA'ları kullanılarak yapılan inhibisyonun ardından 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülen hücre canlılık testi, BRD4 inhibisyonunun MDA-MB-231 hücrelerinin sağ kalımlarını etkilemediği gösterildi.

Borbely G. ve arkadaşlarının MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4'ün inhibitörü olan JQ1'i kullanarak; hücre proliferasyonunu değerlendirdikleri çalışmada, 72. saatte proliferasyonun azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı belirtilmiştir. JQ1'e ek olarak histondeasetilaz (HDAC) inhibitörünün (mokenitostat) kullanıldığı durumda ise, bu etkinin artarak hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, JQ1 aracılığı ile BRD4 inhibisyonun tek başına hücre proliferasyonu üzerinde doğrudan etkisinin olmadığını, hücre proliferasyonunun histondeasetilaz inhibitörü ve JQ1'in birlikte kullanıldığı durumda anlamlı düzeyde azaldığını ortaya koymuşlardır (Borbely ve ark., 2015). Çalışmamızda da benzer şekilde 72. saatin sonunda BRD4 siRNA'ları ile hücre canlılığının azaldığını gördük, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuç bize BRD4 inhibitörü olan JQ1'in etkisi gibi siRNA ile BRD4 inhibisyonunun da hücre proliferasyonu üzerinde tek başına etkisinin yeterli olmadığını gösterdi.

BRD4'ün her ne kadar c-Myc'in doğrudan düzenleyicisi olarak hücre siklusu üzerinde etkili olduğu düşünülse de, c-Myc'in sadece BRD4 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmediği belirgindir. Xiong J. ve arkadaşları, Serin-treonin kinaz 31 (STK31)'in, c-Myc'in gen ekspresyonunu indükleyerek c-Myc'i aktive ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca östrojen reseptörü alfa, c-Myc, siklin E ve siklin D gibi hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunu da düzenlemektedir (Strom ve ark., 2004). Kim S. ve arkadaşları tarafından miR 155 ile yapılan bir çalışmada, miR 155 inhibisyonunun c-Myc protein ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (Kim ve ark., 2018). Yapılan bu çalışmalar, c-Myc'in BRD4 inhibisyonu ile azalmasına rağmen, hücre proliferasyonunun düşmemesi c-Myc'in ekspresyonunun diğer düzenleyici faktörler tarafından korunduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızda miR 122 ile yapılan hücre canlılık testinde ise 48. saatte hücre proliferasyonunun azaldığı; ancak bu azalmanın 72 ve 96. saatlerde geriye döndüğü gözlemlendi. miR 122'nin renal hücre karsinomunda proliferasyonu arttırdığı Wang Z. ve arkadaşları tarafından gösterilmesine rağmen; bizim bulgularımız bunu doğrulamamaktadır (Z. Wang ve Wang, 2020). Oysa ki; mesane kanserinde miR 122'nin kanser hücrelerinin proliferasyonu CREB1'i hedef alarak azalttığı söylenmektedir (Guo ve ark., 2018). Meme kanserinde ise miR 122'nin, uzun kodlanmayan RNA ailesinin bir üyesi olan RPPH1'in inhibe ederek MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin

proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Y. Zhang ve Tang, 2017). Sonuçlarımız, miR 122'nin transfeksiyon ekspresyonunun arttırıldığı durumda, proliferasyonun azalmadığını göstermektedir. Bu durum, miR 122'nin BRD4' inhibe ederek tümör proliferasyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığına işaret etmektedir. Ancak bu etkinin dolaylı yollardan olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Hücre koloni oluşturma testinde ise uzun süreli hücre canlılığı ve koloni oluşum kapasitelerinin değişimi değerlendirilmiştir. Wang J. ve arkadaşlarının BRD4 inhibitörü JQ1 ile yaptıkları deneylerde koloni oluşumlarının kontrole göre azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı gösterilmiştir (J. Wang ve ark., 2018). Ancak bizim bulgularımız; BRD4 siRNA'larının transfekte edildiği hücrelerde koloni oluşumlarının anlamlı olarak azaldığını göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan siRNA ile gen düzeyinde inhibisyon sağlandığı için bu inhibisyonun proteine direk olarak yansıdığı bilinmektedir. Kimyasal inhibitörler de ise, var olan proteinin sadece işlevi üzerinde bir bloklama sağlandığı düşünüldüğünde Wang J. ve arkadaşlarının JQ1 kullanarak yaptıkları çalışmada koloni inhibisyonu görülmemesine rağmen, bizim deneyimizde siRNA ile gen sessizleştirilmesinin çok daha etkili bir koloni inhibisyonu yapması olası bir sonuçtur.

miR 122 ile tekrarlanan koloni oluşum deneyinde de siRNA ile BRD4 inhibisyonuna benzer şekilde koloni sayısında azalma gözlenmiştir. miR 122'nin hücrelere verildiği durumda BRD4 inhibisyonun sağlandığı ve bu inhibisyonun BRD4 inhibisyonuyla benzer şekilde koloni oluşumunu da azalttığı görüldü. Bu durum, bize miR 122'nin BRD4 inhibisyonu sağlayarak koloni oluşumu üzerinde etkisi olduğunu teyit etmektedir.

BRD4 hücre dışı maktriksi yeniden programlayarak, tümör hücrelerinde metastazı arttırmaktadır (Alsarraj ve Hunter, 2012). Meme kanserinde görülen ektopik BRD4 gen ekspresyonun Fibulin1, Serping1 gibi hücre dışı matriks düzenleyici genlerin ekspresyon seviyesini değiştirerek metastaza yol açtığı da bilinmektedir (Crawford ve ark., 2008). Sonuçlarımız değerlendirildiğinde; BRD4'n tümör hücrelerinin agresif potansiyellerini arttırarak, metastazı tetikleyebileceği görülmektedir.

Hücrelerin motilite yeteneklerinin BRD4 inhibisyonu ile nasıl değiştiğini göstermek adına yaptığımız migrasyon testi sonuçlarına göre; BRD4'n siRNA ve miR 122 ile inhibisyonu

hücrelerinin motilitelerini etkileyerek kontrole göre daha az agresif olduklarını göstermiştir. Bu bulgular, BRD4 gen ekspresyonunun artışıyla, tümör hücrelerinin metastatik potansiyellerinin de artacağını; aksine inhibisyonun da tümör hücrelerinin metastaz kapasitelerini sınırlandıracağını göstermiştir.

Wang Z. ve arkadaşlarının literatüre kazandırdıkları çalışmada; miR 122'nin ÜNМК hücre hatlarında ekspresyonunun arttırıldığı durumda, invazyonun arttığını ve inhibe edildiği durumda ise invazyonun azaldığını göstermektedir. Buna ek olarak; miR 122 ekspresyonu artışının EMG'yi tetikleyerek, EMG belirteçlerinden olan E-Kaderin (Epitelyal Kaderin) ekspresyonunu azaltıp; N-Kaderin (Nöronal Kaderin) ve Vimentin ekspresyonlarını ise arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada; miR 122'nin CHMP3 (charged multivesicular body protein 3)'ü baskılayarak EMG belirteçlerinin ekspresyonlarını değiştirdiği ve EMG üzerinde metastazı tetikleyici bir rolü olduğu belirtilmiştir (Z. Wang ve Wang, 2020).

miR 122'nin tek hedefinin BRD4 olmadığı aynı zamanda CHMP3'ün hedef olarak yer aldığı literatürde tanımlanmıştır (Z. Wang ve Wang, 2020). Ancak, başka bir çalışmada, lentivirüs ile RPPH1 (Ribonukleaz P RNA komponent H1)'in yüksek düzeyde ekspres ettirildiği durumda, miR 122'nin RPPH1'e bağlanarak RPPH1'i inhibe ettiği belirtilmiş ve bu inhibisyonun da MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde invazyonu azalttığı da gösterilmiştir (Y. Zhang ve Tang, 2017). Literatürde yer alan bu iki çalışma göz önüne alındığında, miR 122'nin inhibe ettiği farklı genler farklı etkiler göstermektedir. Çalışmamızda ise miR 122, her ne kadar BRD4 inhibisyonunu sağlasa da bu inhibisyonun her zaman tümör hücrelerinin invazyonlarını değiştirecek kadar etkili olmadığı düşünülmektedir.

Lu L. ve arkadaşlarının MDA-MB-231 hücrelerinde yaptıkları çalışmada JQ1 inhibitörü aracılı BRD4 inhibisyonunda, SNAIL'in ekspresyonunun azaldığı ve tümör hücrelerinin invazyon kapasitelerinin sınırlandığı gösterilmiştir (Lu ve ark., 2020). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, Lu L. ve arkadaşlarının çalışmalarının sonuçlarıyla örtüşmekte ve BRD4 inhibisyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde invazyonu azalttığını göstermektedir.

Meme kanserinde Src'in proteininin fosforilasyonunun yüksek olduğu durumda metastazla korele bir ilişkileri olduğu Wilson G.R ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (Wilson ve ark., 2006). Ocana A. ve arkadaşlarının meme kanseri hastalarında kullanılan kemoterapötiklerin (trastuzumab ve paklitaxel) p-Src seviyesini azalttığı ve bu azalmanın da tümör hücrelerinin metastaz kapasitelerini sınırladığı gösterilmiştir (Ocana ve ark., 2019). p-Src ekspresyonunun az olması literatürde tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonlarını azalması ile ilişkili bulunmuştur (Finn, 2008). Çalışmamızda migrasyon ve invazyon testlerinde gösterilmeye çalışılan BRD4 inhibisyonu ile tümör hücrelerinin metastatik potansiyellerinin azalmasının teyit edilmesi için p-c-Src ve c-Src protein miktarlarının değişimi de vurgulandı. Elde edilen sonuçlara göre BRD4 inhibisyonunun ardından p-c-Src protein seviyesi azalırken, c-Src seviyesinin aynı kaldığı görüldü. Literatürdeki veriler de p-Src ekspresyonunun azalmasının invazyon ve migrasyonu azalttığını belirtmektedir. Bu durum da bize BRD4'ün tümör hücrelerinin metastatik özelliklerini arttırdığını, inhibisyonu ile de tümör hücrelerinin metastaz yeteneklerinin azaldığını bir kez daha göstermiş oldu.

Çalışmamızda miR 122'nin BRD4'ü inhibe ederek MDA-MB-231 hücrelerinde BRD4 protein miktarını azalttığı gösterildi. Ayrıca; BRD4 inhibisyonunun tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerinde doğrudan bir etkisinin olmadığı da gösterilmiş oldu. Ancak, tümör hücrelerinin metastatik durumları değerlendirildiğinde BRD4 inhibisyonu ile hücre motilitesi ve invazyonunun azaldığı ve bu azalmanın tümör hücrelerinin metastatik potansiyellerini düşürdüğü ortaya çıkarıldı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında kadınlarda tedaviye en az cevap veren meme kanseri tipi olan ÜNМК hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve metastazında görevli olan eEF2K'nin, tümör hücrelerinin metastatik özelliklerini arttıran BRD4 üzerindeki olası etkisinin araştırılması planlandı.

ÜNМК hücrelerinde ilk olarak eEF2K ve BRD4 arasındaki bir ilişki olup olmadığı açıklanmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; eEF2K'in inhibisyonu ve ekspresyonunun arttırılmasının BRD4 protein miktarı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca, BRD4 inhibisyonun da eEF2K üzerinde bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Ardından mikroRNA'lar ile yapılan testler sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde miR 122 seviyesinin artışının BRD4 protein miktarını azalttığı görüldü. Bu veriyle BRD4 inhibisyonu hem siRNA'lar ile hem de miR 122 ile çalışılmaya devam edildi.

BRD4'ün siRNA ve miR 122 kullanılarak yapılan inhibisyonunun tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı görüldü. BRD4 inhibisyonunun ardından yapılan koloni oluşturma deneyleri sonucunda siRNA'lar ve miR 122'nin MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumlarını azalttığı gösterildi.

MDA-MB-231 hücrelerinin metastatik yeteneklerinin BRD4 ekspresyon değişiminden nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılan migrasyon ve invazyon testlerinin sonucunda, BRD4 inhibisyonu ile tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonlarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı görüldü. Bu sonuç da; BRD4 ekspresyonunun azalmasının tümör hücrelerinin metastatik potansiyellerini azalttığını göstermektedir. Ayrıca, p-c-Src seviyesindeki BRD4 inhibisyonuna bağlı azalma da bize BRD4'ün tümör hücrelerinin metastatik karakterlerinin arttırılabileceğini, inhibisyonu ile de metastatik karakterin gerilediği göstermiştir.

Çalışmamızda miR 122'nin BRD4 üzerindeki inhibe edici etkisi, literatürde ilk defa yer alacak bir bilgidir. Ayrıca BRD4 inhibisyonunu MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki metastatik potansiyelin azalması üzerindeki rolü de çalışmamızla ilk defa tanımlanmıştır.

Bu çalışma ile BRD4'ü hedefleyerek ÜNМК hücrelerinin metastatik yeteneklerinin azaltılabileceğı gösterildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde ÜNМК hastalığının tedavisinde BRD4 hedefli tedavilerin kullanılması ile tümör hücrelerinin agresif karakterlerinin azaltılabileceğı öngörülmektedir. Çalışmamızın sonuçları bize BRD4'ün metastatik ÜNМК hastalarının tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017; 50 (1): 33.

Alsarraj, J., & Hunter, K. W. Bromodomain-containing protein 4: A dynamic regulator of breast cancer metastasis through modulation of the extracellular matrix. *Int J Breast Cancer.* 2012; 2012: 670632.

Andrews, F. H., Singh, A. R., Joshi, S., Smith, C. A., Morales, G. A., Garlich, J. R., . . . Kutateladze, T. G. Dual-activity pi3k-brd4 inhibitor for the orthogonal inhibition of myc to block tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114 (7): E1072-E1080.

Andrieu, G. P., Shafran, J. S., Deeney, J. T., Bharadwaj, K. R., Rangarajan, A., & Denis, G. V. Bet proteins in abnormal metabolism, inflammation, and the breast cancer microenvironment. *J Leukoc Biol.* 2018; 104 (2): 265-274.

Arpino, G., Bardou, V. J., Clark, G. M., & Elledge, R. M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: Tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (3): R149-156.

Ashour, A. A., Abdel-Aziz, A. A., Mansour, A. M., Alpay, S. N., Huo, L., & Ozpolat, B. Targeting elongation factor-2 kinase (eef-2k) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Apoptosis.* 2014; 19 (1): 241-258.

Ashour, A. A., Gurbuz, N., Alpay, S. N., Abdel-Aziz, A. A., Mansour, A. M., Huo, L., & Ozpolat, B. Elongation factor-2 kinase regulates tg2/beta1 integrin/src/upar pathway and epithelial-mesenchymal transition mediating pancreatic cancer cells invasion. *J Cell Mol Med.* 2014; 18 (11): 2235-2251.

Barrero, M. J. Epigenetic strategies to boost cancer immunotherapies. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (6).

Bartel, D. P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136 (2): 215-233.

Bayraktar, R., Ivan, C., Bayraktar, E., Kanlikilicer, P., Kabil, N. N., Kahraman, N., . . . Ozpolat, B. Dual suppressive effect of mir-34a on the foxm1/eef2-kinase axis regulates triple-negative breast cancer growth and invasion. *Clin Cancer Res.* 2018; 24 (17): 4225-4241.

Bayraktar, R., Pichler, M., Kanlikilicer, P., Ivan, C., Bayraktar, E., Kahraman, N., . . . Ozpolat, B. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast

cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget*. 2017; 8 (7): 11641-11658.

Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Charafe-Jauffret, E., Mamessier, E., Adelaide, J., . . . Birnbaum, D. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res*. 2006; 66 (9): 4636-4644.

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. 2006; 125 (6): 1111-1124.

Borbely, G., Haldosen, L. A., Dahlman-Wright, K., & Zhao, C. Induction of usp17 by combining bet and hdac inhibitors in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6 (32): 33623-33635.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68 (6): 394-424.

Browne, G. J., & Proud, C. G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem*. 2002; 269 (22): 5360-5368.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. Frequent deletions and down-regulation of micro- rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (24): 15524-15529.

Caparica, R., Lambertini, M., & de Azambuja, E. How i treat metastatic triple-negative breast cancer. *ESMO Open*. 2019; 4 (Suppl 2): e000504.

Carlberg, U., Nilsson, A., & Nygard, O. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur J Biochem*. 1990; 191 (3): 639-645.

Casabona, C. M. R. *Genetica humana: Catedra De Derecho y Genoma Humano*; 1995, p:

Celis, J. E., Madsen, P., & Ryazanov, A. G. Increased phosphorylation of elongation factor 2 during mitosis in transformed human amnion cells correlates with a decreased rate of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87 (11): 4231-4235.

Chakraborty, D., Benham, V., Bullard, B., Kearney, T., Hsia, H. C., Gibbon, D., . . . Bernard, J. J. Fibroblast growth factor receptor is a mechanistic link between visceral adiposity and cancer. *Oncogene*. 2017; 36 (48): 6668-6679.

Chakraborty, D., Benham, V., Jdanov, V., Bullard, B., Leal, A. S., Liby, K. T., & Bernard, J. J. A bet bromodomain inhibitor suppresses adiposity-associated malignant transformation. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018; 11 (3): 129-142.

Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., . . . Taylor, J. M. Mir-122, a mammalian liver-specific microrna, is processed from hcr mrna and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter cat-1. *RNA Biol.* 2004; 1 (2): 106-113.

Chang, J., Provost, P., & Taylor, J. M. Resistance of human hepatitis delta virus rnas to dicer activity. *J Virol.* 2003; 77 (22): 11910-11917.

Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010; 32 (1-2): 35-48.

Clauser, P., Marino, M. A., Baltzer, P. A., Bazzocchi, M., & Zuiani, C. Management of atypical lobular hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, and lobular carcinoma in situ. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016; 16 (3): 335-346.

Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., . . . Group, C. W. Cancer survival in five continents: A worldwide population-based study (concord). *Lancet Oncol.* 2008; 9 (8): 730-756.

Crawford, N. P., Alsarraj, J., Lukes, L., Walker, R. C., Officewala, J. S., Yang, H. H., . . . Hunter, K. W. Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105 (17): 6380-6385.

Dawson, M. A., Prinjha, R. K., Dittmann, A., Giotopoulos, G., Bantscheff, M., Chan, W. I., . . . Kouzarides, T. Inhibition of bet recruitment to chromatin as an effective treatment for mll-fusion leukaemia. *Nature.* 2011; 478 (7370): 529-533.

De Simone, V., Franze, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M. C., Di Fusco, D., . . . Stolfi, C. Th17-type cytokines, il-6 and tnf-alpha synergistically activate stat3 and nf-kb to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene.* 2015; 34 (27): 3493-3503.

Deshmukh, S. K., Srivastava, S. K., Poosarla, T., Dyess, D. L., Holliday, N. P., Singh, A. P., & Singh, S. Inflammation, immunosuppressive microenvironment and breast cancer: Opportunities for cancer prevention and therapy. *Ann Transl Med.* 2019; 7 (20): 593.

Dever, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* 2002; 108 (4): 545-556.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., & Zhou, M. M. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature.* 1999; 399 (6735): 491-496.

Di Micco, R., Fontanals-Cirera, B., Low, V., Ntziachristos, P., Yuen, S. K., Lovell, C. D., . . . Hernando, E. Control of embryonic stem cell identity by brd4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Rep.* 2014; 9 (1): 234-247.

Donati, B., Lorenzini, E., & Ciarrocchi, A. Brd4 and cancer: Going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer*. 2018; 17 (1): 164.

Dufner, A., & Thomas, G. Ribosomal s6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res*. 1999; 253 (1): 100-109.

Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., . . . Monia, B. P. Mir-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006; 3 (2): 87-98.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., . . . Iggo, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005; 24 (29): 4660-4671.

Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J. P., Barsyte-Lovejoy, D., . . . Knapp, S. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*. 2012; 149 (1): 214-231.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., . . . Bradner, J. E. Selective inhibition of bet bromodomains. *Nature*. 2010; 468 (7327): 1067-1073.

Finn, R. S. Targeting src in breast cancer. *Ann Oncol*. 2008; 19 (8): 1379-1386.

Fong, M. Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A. Y., Chandra, M., Ashby, J., . . . Wang, S. E. Breast-cancer-secreted mir-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2015; 17 (2): 183-194.

Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363 (20): 1938-1948.

Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19 (1): 92-105.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., . . . Kato, S. Dead-box rna helicase subunits of the drosha complex are required for processing of rna and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2007; 9 (5): 604-611.

Gallagher, S. J., Mijatov, B., Gunatilake, D., Gowrishankar, K., Tiffen, J., James, W., . . . Hersey, P. Control of nf-kb activity in human melanoma by bromodomain and extra-terminal protein inhibitor i-bet151. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27 (6): 1126-1137.

Gebert, L. F., Rebhan, M. A., Crivelli, S. E., Denzler, R., Stoffel, M., & Hall, J. Miravirsin (spc3649) can inhibit the biogenesis of mir-122. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (1): 609-621.

Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. Eif4 initiation factors: Effectors of mrna recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 913-963.

Grivennikov, S. I., & Karin, M. Inflammation and oncogenesis: A vicious connection. *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20 (1): 65-71.

Guinebretiere, J. M., Menet, E., Tardivon, A., Cherel, P., & Vanel, D. Normal and pathological breast, the histological basis. *Eur J Radiol.* 2005; 54 (1): 6-14.

Guo, L., Yin, M., & Wang, Y. Creb1, a direct target of mir-122, promotes cell proliferation and invasion in bladder cancer. *Oncol Lett.* 2018; 16 (3): 3842-3848.

Haffty, B. G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S. A., Weidhaas, J., . . . Toppmeyer, D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (36): 5652-5657.

Hammond, M. E., Hayes, D. F., Wolff, A. C., Mangu, P. B., & Temin, S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract.* 2010; 6 (4): 195-197.

Han, H., Sun, D., Li, W., Shen, H., Zhu, Y., Li, C., . . . Li, Y. A c-myc-microrna functional feedback loop affects hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2013; 57 (6): 2378-2389.

Han, J. G., Jiang, Y. D., Zhang, C. H., Yang, Y. M., Pang, D., Song, Y. N., & Zhang, G. Q. A novel panel of serum mir-21/mir-155/mir-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2017; 92 (2): 55-66.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646-674.

Harris, L. N., Ismaila, N., McShane, L. M., & Hayes, D. F. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline summary. *J Oncol Pract.* 2016; 12 (4): 384-389.

Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., & Dawid, I. B. The bromodomain: A conserved sequence found in human, drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20 (10): 2603.

Hizli, A. A., Chi, Y., Swanger, J., Carter, J. H., Liao, Y., Welcker, M., . . . Clurman, B. E. Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eef2) by cyclin a-cyclin-dependent kinase 2 regulates its inhibition by eef2 kinase. *Mol Cell Biol.* 2013; 33 (3): 596-604.

Houzelstein, D., Bullock, S. L., Lynch, D. E., Grigorieva, E. F., Wilson, V. A., & Beddington, R. S. Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein brd4. *Mol Cell Biol.* 2002; 22 (11): 3794-3802.

Inoue, M., Nakagomi, H., Nakada, H., Furuya, K., Ikegame, K., Watanabe, H., . . . Oyama, T. Specific sites of metastases in invasive lobular carcinoma: A retrospective cohort study of metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2017; 24 (5): 667-672.

Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N., & Ozato, K. The bromodomain protein brd4 is a positive regulatory component of p-tefb and stimulates rna polymerase ii-dependent transcription. *Mol Cell.* 2005; 19 (4): 523-534.

Jiang, G., Deng, W., Liu, Y., & Wang, C. General mechanism of jq1 in inhibiting various types of cancer. *Mol Med Rep.* 2020; 21 (3): 1021-1034.

Joglekar-Javadekar, M., Van Laere, S., Bourne, M., Moalwi, M., Finetti, P., Vermeulen, P. B., . . . van Golen, K. L. Characterization and targeting of platelet-derived growth factor receptor alpha (pdgfra) in inflammatory breast cancer (ibc). *Neoplasia.* 2017; 19 (7): 564-573.

Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, O., . . . Camargo, F. D. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microrna-223. *Nature.* 2008; 451 (7182): 1125-1129.

Jopling, C. L. Regulation of hepatitis c virus by microrna-122. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36 (Pt 6): 1220-1223.

Kenney, J. W., Moore, C. E., Wang, X., & Proud, C. G. Eukaryotic elongation factor 2 kinase, an unusual enzyme with multiple roles. *Adv Biol Regul.* 2014; 55: 15-27.

Khan, S., Ayub, H., Khan, T., & Wahid, F. Microrna biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie.* 2019; 167: 12-24.

Kim, S., Lee, E., Jung, J., Lee, J. W., Kim, H. J., Kim, J., . . . Chang, S. Microrna-155 positively regulates glucose metabolism via pik3r1-foxo3a-cmyc axis in breast cancer. *Oncogene.* 2018; 37 (22): 2982-2991.

Kortlever, R. M., Sodir, N. M., Wilson, C. H., Burkhart, D. L., Pellegrinet, L., Brown Swigart, L., . . . Evan, G. I. Myc cooperates with ras by programming inflammation and immune suppression. *Cell.* 2017; 171 (6): 1301-1315 e1314.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science.* 2001; 294 (5543): 853-858.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. Identification of tissue-specific micrnas from mouse. *Curr Biol.* 2002; 12 (9): 735-739.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. An abundant class of tiny rnas with probable regulatory roles in *caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 294 (5543): 858-862.

Leal, A. S., Williams, C. R., Royce, D. B., Pioli, P. A., Sporn, M. B., & Liby, K. T. Bromodomain inhibitors, jq1 and i-bet 762, as potential therapies for pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2017; 394: 76-87.

Lee, J. E., Park, Y. K., Park, S., Jang, Y., Waring, N., Dey, A., . . . Ge, K. Brd4 binds to active enhancers to control cell identity gene induction in adipogenesis and myogenesis. *Nat Commun*. 2017; 8 (1): 2217.

Lee, R. C., & Ambros, V. An extensive class of small rnas in *caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 294 (5543): 862-864.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. The *c. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843-854.

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011; 121 (7): 2750-2767.

Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., Andre, F., Tordai, A., Mejia, J. A., . . . Pusztai, L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26 (8): 1275-1281.

Liu, W., Stein, P., Cheng, X., Yang, W., Shao, N. Y., Morrissey, E. E., . . . You, J. Brd4 regulates *nanog* expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death Differ*. 2014; 21 (12): 1950-1960.

Liu, X. Y., Zhang, L., Zhang, Y., & Yang, J. M. Roles of *eef-2* kinase in cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125 (16): 2908-2913.

Lu, L., Chen, Z., Lin, X., Tian, L., Su, Q., An, P., . . . Wang, H. Inhibition of *brd4* suppresses the malignancy of breast cancer cells via regulation of *snail*. *Cell Death Differ*. 2020; 27 (1): 255-268.

Luo, Y., Wang, X., Niu, W., Wang, H., Wen, Q., Fan, S., . . . Zhou, M. Elevated *microrna-125b* levels predict a worse prognosis in *her2*-positive breast cancer patients. *Oncol Lett*. 2017; 13 (2): 867-874.

Masuda, H., Baggerly, K. A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Meric-Bernstam, F., . . . Ueno, N. T. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013; 19 (19): 5533-5540.

Montanaro, L., Sperti, S., Testoni, G., & Mattioli, A. Effect of elongation factor 2 and of adenosine diphosphate-ribosylated elongation factor 2 on translocation. *Biochem J.* 1976; 156 (1): 15-23.

Moroy, T., Etienne, J., Bougueleret, L., Hadchouel, M., Tiollais, P., & Buendia, M. A. Structure and expression of hcr, a locus rearranged with c-myc in a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 1989; 4 (1): 59-65.

Mortality, G. B. D., & Causes of Death, C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: A systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet.* 2016; 388 (10053): 1459-1544.

Mustacchi, G., & De Laurentiis, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: Literature review. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 4303-4318.

Nairn, A. C., Matsushita, M., Nastiuk, K., Horiuchi, A., Mitsui, K., Shimizu, Y., & Palfrey, H. C. Elongation factor-2 phosphorylation and the regulation of protein synthesis by calcium. *Prog Mol Subcell Biol.* 2001; 27: 91-129.

Nedeljkovic, M., & Damjanovic, A. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer-how we can rise to the challenge. *Cells.* 2019; 8 (9).

Nicholas, D. A., Andrieu, G., Strissel, K. J., Nikolajczyk, B. S., & Denis, G. V. Bet bromodomain proteins and epigenetic regulation of inflammation: Implications for type 2 diabetes and breast cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74 (2): 231-243.

O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. C-myc-regulated micrnas modulate e2f1 expression. *Nature.* 2005; 435 (7043): 839-843.

Ocana, A., Gil-Martin, M., Antolin, S., Atienza, M., Montano, A., Ribelles, N., . . . Ruiz-Borrego, M. Efficacy and safety of dasatinib with trastuzumab and paclitaxel in first line her2-positive metastatic breast cancer: Results from the phase ii geicam/2010-04 study. *Breast Cancer Res Treat.* 2019; 174 (3): 693-701.

Ott, C. J., Kopp, N., Bird, L., Paranal, R. M., Qi, J., Bowman, T., . . . Weinstock, D. M. Bet bromodomain inhibition targets both c-myc and il7r in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012; 120 (14): 2843-2852.

Page, K., Guttery, D. S., Fernandez-Garcia, D., Hills, A., Hastings, R. K., Luo, J., . . . Shaw, J. A. Next generation sequencing of circulating cell-free DNA for evaluating mutations and gene amplification in metastatic breast cancer. *Clin Chem.* 2017; 63 (2): 532-541.

Pareja, F., & Reis-Filho, J. S. Triple-negative breast cancers - a panoply of cancer types. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15 (6): 347-348.

Peng, Y., & Croce, C. M. The role of micrnas in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016; 1: 15004.

Perez-Salvia, M., & Esteller, M. Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics.* 2017; 12 (5): 323-339.

Pigott, C. R., Mikolajek, H., Moore, C. E., Finn, S. J., Phippen, C. W., Werner, J. M., & Proud, C. G. Insights into the regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and the interplay between its domains. *Biochem J.* 2012; 442 (1): 105-118.

Posner, M. C., & Wolmark, N. Non-invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 1992; 21 (3): 155-164.

Posternak, V., & Cole, M. D. Strategically targeting myc in cancer. *F1000Res.* 2016; 5.

Price, N. T., Redpath, N. T., Severinov, K. V., Campbell, D. G., Russell, J. M., & Proud, C. G. Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* 1991; 282 (2): 253-258.

Proud, C. G. Regulation of mrna translation. *Essays Biochem.* 2001; 37: 97-108.

Rampurwala, M., Wisinski, K. B., & O'Regan, R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2016; 14 (3): 186-193.

Redpath, N. T., & Proud, C. G. The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem J.* 1989; 262 (1): 69-75.

Redpath, N. T., & Proud, C. G. Cyclic amp-dependent protein kinase phosphorylates rabbit reticulocyte elongation factor-2 kinase and induces calcium-independent activity. *Biochem J.* 1993; 293 (Pt 1): 31-34.

Richter, J. D., & Klann, E. Making synaptic plasticity and memory last: Mechanisms of translational regulation. *Genes Dev.* 2009; 23 (1): 1-11.

Ryazanov, A. G. Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS Lett.* 2002; 514 (1): 26-29.

Ryazanov, A. G., & Davydova, E. K. Mechanism of elongation factor 2 (ef-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated ef-2 is unable to catalyze translocation. *FEBS Lett.* 1989; 251 (1-2): 187-190.

Schweiger, M. R., Ottinger, M., You, J., & Howley, P. M. Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. *J Virol.* 2007; 81 (18): 9612-9622.

Shayestehpour, M., Moghim, S., Salimi, V., Jalilvand, S., Yavarian, J., Romani, B., & Mokhtari-Azad, T. Targeting human breast cancer cells by an oncolytic adenovirus using microrna-targeting strategy. *Virus Res.* 2017; 240: 207-214.

Shi, J., & Vakoc, C. R. The mechanisms behind the therapeutic activity of bet bromodomain inhibition. *Mol Cell.* 2014; 54 (5): 728-736.

Smellie, W. J., & Sacks, N. P. Recent advances in the treatment of breast cancer. *Postgrad Med J.* 1994; 70 (822): 243-246.

Somiari, R. I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., . . . Shriver, C. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics.* 2003; 3 (10): 1863-1873.

Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. Genetic markers in triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2018; 18 (5): e841-e850.

Stamatopoulos, B., Meuleman, N., Haibe-Kains, B., Saussoy, P., Van Den Neste, E., Michaux, L., . . . Lagneaux, L. Microrna-29c and microrna-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood.* 2009; 113 (21): 5237-5245.

Strom, A., Hartman, J., Foster, J. S., Kietz, S., Wimalasena, J., & Gustafsson, J. A. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line t47d. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (6): 1566-1571.

Tavares, C. D., O'Brien, J. P., Abramczyk, O., Devkota, A. K., Shores, K. S., Ferguson, S. B., . . . Dalby, K. N. Calcium/calmodulin stimulates the autophosphorylation of elongation factor 2 kinase on thr-348 and ser-500 to regulate its activity and calcium dependence. *Biochemistry.* 2012; 51 (11): 2232-2245.

Tekedereli, I., Alpay, S. N., Tavares, C. D., Cobanoglu, Z. E., Kaoud, T. S., Sahin, I., . . . Ozpolat, B. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e41171.

Thakral, S., & Ghoshal, K. Mir-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as mirna mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015; 15 (2): 142-150.

Tilli, T. M., Carels, N., Tuszynski, J. A., & Pasdar, M. Validation of a network-based strategy for the optimization of combinatorial target selection in breast cancer therapy: Sirna knockdown of network targets in mda-mb-231 cells as an in vitro model for inhibition of tumor development. *Oncotarget.* 2016; 7 (39): 63189-63203.

Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A., . . . Rosenfeld, M. G. The rna-binding protein ksrp promotes the biogenesis of a subset of micrnas. *Nature*. 2009; 459 (7249): 1010-1014.

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020; 27 (1): 27-35.

Wang, B., Hsu, S. H., Wang, X., Kutay, H., Bid, H. K., Yu, J., . . . Ghoshal, K. Reciprocal regulation of microrna-122 and c-myc in hepatocellular cancer: Role of e2f1 and transcription factor dimerization partner 2. *Hepatology*. 2014; 59 (2): 555-566.

Wang, B., Wang, H., & Yang, Z. Mir-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting igf1r. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e47053.

Wang, J., Zhou, F., Li, Z., Mei, H., Wang, Y., Ma, H., . . . Wu, G. Pharmacological targeting of bet proteins attenuates radiation-induced lung fibrosis. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 998.

Wang, Z., & Wang, X. Mir-122-5p promotes aggression and epithelial-mesenchymal transition in triple negative breast cancer by suppressing charged multivesicular body protein 3 through mitogen-activated protein kinase signaling. *J Cell Physiol*. 2020; 235 (3): 2825-2835.

West, A. V., Wullkopf, L., Christensen, A., Leijnse, N., Tarp, J. M., Mathiesen, J., . . . Oddershede, L. B. Dynamics of cancerous tissue correlates with invasiveness. *Sci Rep*. 2017; 7: 43800.

White-Gilbertson, S., Kurtz, D. T., & Voelkel-Johnson, C. The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Mol Oncol*. 2009; 3 (5-6): 402-408.

Wilson, G. R., Cramer, A., Welman, A., Knox, F., Swindell, R., Kawakatsu, H., . . . Bundred, N. J. Activated c-src in ductal carcinoma in situ correlates with high tumour grade, high proliferation and her2 positivity. *Br J Cancer*. 2006; 95 (10): 1410-1414.

Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., . . . Dowsett, M. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2018; 36 (20): 2105-2122.

Wu, S. Y., & Chiang, C. M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2007; 282 (18): 13141-13145.

Wu, T., Pinto, H. B., Kamikawa, Y. F., & Donohoe, M. E. The bet family member brd4 interacts with oct4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (3): 390-403.

Wu, X., Somlo, G., Yu, Y., Palomares, M. R., Li, A. X., Zhou, W., . . . Wang, S. E. De novo sequencing of circulating mirnas identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med.* 2012; 10: 42.

Xu, Y., & Vakoc, C. R. Targeting cancer cells with bet bromodomain inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7 (7).

Yang, J., Yuan, Y., Yang, X., Hong, Z., & Yang, L. Decreased expression of microrna-122 is associated with an unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia and function analysis indicates a therapeutic potential. *Pathol Res Pract.* 2017; 213 (9): 1166-1172.

Yang, Z., He, N., & Zhou, Q. Brd4 recruits p-tefb to chromosomes at late mitosis to promote g1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2008; 28 (3): 967-976.

Zhang, L., Zhang, Y., Liu, X. Y., Qin, Z. H., & Yang, J. M. Expression of elongation factor-2 kinase contributes to anoikis resistance and invasion of human glioma cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32 (3): 361-367.

Zhang, Y., & Tang, L. Inhibition of breast cancer cell proliferation and tumorigenesis by long non-coding rna rppl1 down-regulation of mir-122 expression. *Cancer Cell Int.* 2017; 17: 109.

Zou, Z., Huang, B., Wu, X., Zhang, H., Qi, J., Bradner, J., . . . Chen, L. F. Brd4 maintains constitutively active nf-kappab in cancer cells by binding to acetylated rela. *Oncogene.* 2014; 33 (18): 2395-2404.

Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., & Paz-Ares, L. Current challenges in cancer treatment. *Clin Ther.* 2016; 38 (7): 1551-1566.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sayra	Uyruğu	TC
Soyadı	Dılmaç	Tel no	05542737488
Doğum tarihi	01.10.1985	e-posta	sayradilmac@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Adem Tolunay Anadolu Lisesi	2003
Lisans	Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2014
Doktora	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Kamu Personeli Dil Sınavı	64

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Meme Kanseri Hücreleri ile Dış Pulpası Kök Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Mikroçevredeki Sitokin Sinyalleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2020 -
Fare Meme Kanseri Modelinde Rottlerinin Eef2 Kinaz Üzerine	TÜBİTAK	2019 -

Etkisinin İmmün ve Metastatik Yanıtlar Açısından Değerlendirilmesi		
Metastatik Karakterli Meme Kanseri Hücrelerinde Toll-Like Receptor-4 (Tlr4)'ün Kemokin Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi.	TÜBİTAK	2019 -
Fare Meme Kanseri Modelinde Karsinogenik Yanıtlara Karşı Ortaya Çıkacak Anksiyete ve Depresyonun Düzenlenmesinde Melatoninin Etkisi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2018 -
Eef2 Kinaz Tarafından BRD4'ün Düzenlenmesi ve Bunların Meme Kanseri Tedavisi ile Tümöröenezdeki Roller	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017 -
Fare Meme Kanseri Modeli Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde ve Hücre Hatlarında SIRT1 ile FoxO Proteinlerinin Ekspresyonlarının <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017 - 2019
Meme Kanseri Modelinde Melatoninin Koruyucu Etkisinin Primer Tümör ve Metastaz Açısından Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017 - 2019
Rotenonla İndüklenen Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde Metforminin Olası Etkileri ve Etki Mekanizmaları	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2017- 2019
Meme Kanseri Modelinde Primer Tümör ve Metastaz Oluşumunda Melatonin ve Doksorubisinin <i>İn Vivo</i>	TÜBİTAK	2016- 2018

ve <i>İn Vitro</i> Etkilerinin Değerlendirilmesi.		
Meme Kanserine Verilen İmmün Yanıtta Neprilysin ve ADAM10'nun Rolü.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2015-2017
Deneyisel Parkinson Hastalığında Melatonin Etkisinin Mekanizması.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2015 - 2017
Sıçan İnguinal Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerden Damarlı Kikirdak Dokusu Üretilmesi: Hücre Terapinin Mikrocerrahi İle Birleştirilmesi	TÜBİTAK	2015 - 2016
Meme Kanseri ve İlişkili Organ Metastazlarında C-Fos'un Tumorogenez Açısından Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2014- 2016
DHA ile Oluşturulan DeneySEL Parkinson Modelinde Hem Oksijenaz'ın Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2014 -2015
DeneySEL Parkinson Modelinde DHA'nın nNos Yolağı Üzerine Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2014 -2015
Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde Nefronektin Ekspresyonu	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2012 - 2014
DeneySEL Parkinsonda Artan İNOS Aktivitesi ve Cox- 2 Aktivitesi Üzerine Melatonin Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2011 - 2012

Burslar-Ödüller:

22. Ege Onkoloji Günleri, E-Poster Bildiri 3.'lük Ödülü, 2020

TÜBİTAK, 2214A-Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu, 2017

XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Poster Sunum Ödülü, 2016

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

1. Erin N., **Dilmac S.**, Curry A, Duymuş Ö, Tanrioer G, Prodeus A, Gariepy J, Gorczynski RM. "CD200 mimetic aptamer PEG-M49 markedly increases the therapeutic effects of pegylated liposomal doxorubicin in a mouse model of metastatic breast carcinoma: an effect independent of CD200 receptor 1." *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. Jan;69 pp.103-114, 2020, doi: 10.1007/s00262-019-02444-3.
2. Tanrioer G., Eyinc M.B., Aliyev E., **Dilmac S.**, Erin N. "Presence of S100A8/Gr1-Positive Myeloid-Derived Suppressor Cells in Primary Tumors and Visceral Organs Invaded by Breast Carcinoma Cells" *Clinical Breast Cancer*, vol.18, pp.1067-1076, 2018, doi: 10.1016/j.clbc.2018.03.013.
3. Parlak H., Ozkan A., **Dilmac S.**, Tanrioer G., Ozsoy O., Agar A. "Neuronal nitric oxide synthase phosphorylation induced by docosahexaenoic acid protects dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinson's disease" *Folia Histochem Cytobiol.*, vol.56, pp.27-37, 2018, doi: 10.5603/FHC.a2018.0005.
4. **Dilmac S.**, Erin N., Demir N., Tanrioer G. "Nephronectin Is Decreased In Metastatic Breast Carcinoma And Related To Metastatic Organs." *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH*, vol.23, pp.1-10, 2017, doi: 10.1007/s12253-017-0289-0.
5. Goksu E., Dogan O., Ulker P., Tanrioer G., Konuk E., **Dilmac S.**, et al., "Pentoxifylline Alleviates Early Brain Injury in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage.", *ACTA NEUROCHIRURGICA*, vol.158, pp.1721-30, 2016, doi: 10.1007/s00701-016-2866-5.
6. Ozkan A., Parlak H., Tanrioer G., **Dilmac S.**, Ulker S.N., Birsen I., et al., "The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of heme oxygenase", *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL*, vol.101, pp.110-119, 2016, doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.012.
7. Yildirim FB., Ozsoy O., Tanrioer G., Kaya Y., Ogut E., Gemici B., **Dilmac S.**,

Ozkan A., Agar A., Aslan M., Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental Parkinson's disease. *NEUROCHEM INT.*, 79: 1-11. 2014, doi: 10.1016/j.neuint.2014.09.005.

8. Dalaklioglu S., Taşatargil A., Kale S., Tanrioer G., **Dilmac S.**, Erin N. Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- α and NADPH oxidase. *VASCUL PHARMACOL.*, 59(3-4):103- 11. 2013, doi: 10.1016/j.vph.2013.07.008.

Bildiriler:

1. **Dilmaç S.**, Tanrıöver G., Özpölat B. miR 122 ile BRD4'ün inhibisyonu üçlü negatif meme kanserine yeni bir tedavi yaklaşımı olabilir mi? 26-28 Şubat 2020 İzmir. 22. Ege Onkoloji Günleri. Poster Sunumu.
2. **Dilmac S.**, Ertosun M.G., Ozes O.N., Tanrioer G. Effects of phosphorylation changes of E2F1 from S235 on proliferation and migration. 18-22 2019 Diyarbakır. 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress. Poster Presentation.
3. Tanrioer G., **Dilmac S.**, Ertosun M.G., Oktem G., Yavasoglu S. Cross-talk between tumor and stem cells: determination of conditioned media cytokine levels. September 18-22 2019 Diyarbakır. 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress. Poster Presentation.
4. Tanrioer G., **Dilmac S.**, Goksu A.K., Falay B., Memioğlu M. The role of endoplasmic reticulum stress proteins in the mouse breast cancer model. April 24-26 2019 Edirne. 24th National Electron Microscopy Congress. Poster Presentation.
5. Goksu A.K., **Dilmac S.**, Tanrioer G., Erin N. Can melatonin affect the metastasis process by prohibiting epithelial-mesenchymal transition in breast cancer? April 24-26 2019 Edirne. 24th National Electron Microscopy Congress. Poster Presentation.
6. **Dilmac S.**, Ertosun M.G., Erin N., Ozes O.N., Tanrioer G. E2F1 might be an effective role on cell fate in primary tumor by using mice breast cancer model. May 18-21 2017 Antalya. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Poster Sunumu.
7. Tanrioer G., **Dilmac S.**, Aliyev E., Gorczynski R., Erin N. CD200-induced treatment decreases GR1+ cells in spleen. May 18-21 2017 Antalya. 15th International

Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Poster Sunumu.

8. Tanrıöver G., **Dilmaç S.**, Aytaç G., Erin N. The neuroprotective effect of melatonin in the mouse breast cancer model reduces NF-KB immunoreactivity from the central nervous system. May 07-10 2017 Sakarya. 15th National Congress of Neurosciences. Poster Sunumu.
9. Aytac G., Erin N., **Dilmac S.**, Sindel M., Tanrioever G. NF-KB expression changes due to doxorubicin in the hippocampus in mouse metastatic breast cancer model. May 07-10 2017 Sakarya. 15th National Congress of Neurosciences. Poster Sunumu.
10. Tanrioever G., **Dilmac S.**, Aytac G., Erin N. Melatonin increases IFN- γ secretion and suppresses metastasis of breast carcinoma. April 24-27 2017 Prague, 5th International Conference Immunotherapy & Immunomonitoring (CITIM). Poster Sunumu.
11. Nuray Erin, Gamze Tanrioever, Anna Podnos, **Sayra Dilmac**, Aaron Prodeus, Jean Gariépy, Reg Gorczynski. CD200 mimetic PEG-M49 increases therapeutic effects of pegylated liposomal doxorubicin on poorly differentiated breast carcinoma: Possible role on in vivo increased anti-tumoral immune response. April 24-27 2017 Prague, 5th International Conference Immunotherapy & Immunomonitoring (CITIM). Poster Sunumu.
12. Tanrioever G., **Dilmac S.**, Erin N. TRPV1 expression decreases in Spleen of Mice Bearing Metastatic Breast Carcinoma. November 27-30 2016 Konya. 6th Multidisciplinary Cancer Research Congress. Poster Sunumu.
13. G. Tanrioever, E. Goksu, M. Aslan, **S. Dilmac**, P. Ulker, E. Konuk. Pentoxifylline administration alleviated tissue injury in a rat model of subarachnoid hemorrhage. May 26-29 2016 Ankara. 14th National Congress of Neurosciences. Poster Sunumu.
14. Nuray Erin, **Sayra Dilmac**, Gamze Tanrioever. Effects of Phosphoramidon on TNF- α and IFN- γ release from Mixed Leukocyte Culture obtained from tumor-bearing mice. May 10-12 2016 Mainz, Germany. 14th CIMT Annual Meeting. Poster Sunumu.
15. Gamze Tanrioever, **Sayra Dilmac**, Nuray Erin. The expression of Gr1+ and S100A8/A9+ cells in primary tumors and visceral organs invaded by breast carcinoma cells. May 10-12 2016 Mainz, Germany. 14th CIMT Annual Meeting. Poster Sunumu.

16. **Sayra Dilmac**, Gamze Tanrıöver, Nuray Erin. Activation Of Endoplasmic Reticulum Stress Miht Not Be Sufficient To Induce Apoptosis In Metastatic Breast Cancer: Possible Role Cytoplasmic Expression Of Chop. May 04-07 Izmir. 1st International Cell Death Research Congress. Poster Sunumu.
17. Nilay Kuşcu, **Sayra Dılmaç**, Gamze Tanrıöver, Nuray Erin, Çiler Çelik-Özenci. Fare Meme Kanseri Modeli Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde ve Hücre Hatlarında FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 Ekspresyonlarının *in vivo* ve *in vitro* Değerlendirilmesi. 30 Nisan-03 Mayıs 2016 Çeşme, XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
18. Berna SÖZEN, **Sayra DİLMAÇ**, A. Kübra GÖKSU, Necdet DEMİR, Gamze TANRIÖVER. Koroid Pleksusta Aquaporin-1 (AQP1), Aquaporin-2 (AQP2) ve Aquaporin-4(AQP4) Ekspresyonları: Cinsiyet ve Siklus Bağımlı Farklılıklar. 30 Nisan-03 Mayıs 2016 Çeşme, XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
19. Mansur Cici, **Sayra Dılmaç**, Nuray Erin, Gamze Tanrıöver. Metastatik ve Non metastatik Fare Meme Kanseri Modelinde Serebral Kavernoz Malformasyon Proteinlerinin (CCM1, CCM2 ve CCM3) Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. 30 Nisan-03 Mayıs 2016 Çeşme, XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
20. **Sayra Dılmaç**, Mansur Cici, Nuray Erin, Gamze Tanrıöver. Meme Kanseri Bağı Oluşan İnflamatuvar Yanıtta c-fos Aktivasyonunun Değerlendirilmesi. 30 Nisan-03 Mayıs 2016 Çeşme, XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
21. **Sayra Dılmaç**, Nuray Erin, Necdet Demir, Gamze Tanrıöver. *In vivo* metastatik fare meme kanseri modelinde primer tümör ve organ metastazlarında nefronektin ekspresyonu azalmaktadır. 30 Nisan-03 Mayıs 2016 Çeşme, XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
22. Ertosun Mustafa Gökhan, Pehlivanoğlu Süray, **Dılmaç Sayra**, Tanrıöver Gamze, Erin Nuray, Özeş Osman Sadi. TWIST1 Transkripsiyon Faktörünün AKT Tarafından Fosforilasyonu *İn Vivo* Metastaz Gelişimine Neden Olmaktadır. 27-30 Ekim 2015 Fethiye. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Poster Sunumu.

23. Hande Parlak, Ayşe Özkan, **Sayra Dilmaç**, Aysel Ağar. Deneysel Parkinson Modelinde Dokosaheksaenoik Asitin (DHA) nNOS Yolağına Etkisi. 09-13 Eylül 2015 Çanakkale. 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi. Sözlü Sunum
24. G. Tanrıöver, **S. Dilmaç**, N. Erin. Meme Kanseri Fare Modeli Primer Tümör ve Metastazlarında s100A8 e s100A9 Proteinlerinin Ekspresyonu. 02-04 Eylül 2015 İstanbul. 22. Elektron Mikroskopi Kongresi. Poster Sunumu.
25. M. Cici, **S. Dilmac**, Nuray Erin, G. Tanrıöver. Fare Meme Kanseri Modeli Organ Metastazlarında CCM3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. 02-04 Eylül 2015 İstanbul. 22. Elektron Mikroskopi Kongresi. Poster Sunumu.
26. Tanrıöver G, Özsoy Ö, **Dilmaç S**, Kaya Y, Aslan M, Yıldırım FB, Ağar A. Melatonin Is A Protective Effect Neurons In A Model Of Parkinson's Disease. 30 April-3 May 2015 Konya. 13th Turkish Neuroscience Congress. Poster Presentation.
27. Gamze Tanrioever, **Sayra Dilmac**, Nuray Erin. c-fos Might Be A Role In Neuroimmune Activity In Brain: A Model Of Murine Metastatic Breast Carcinoma. 23-27 April 2014 Bodrum. 2nd Anticancer Agents Congress & 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. Poster Presentation.
28. Selvinaz Dalaklıoğlu Taşatargil, Arda Taşatargil, Şule Kale, Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmac**, Nuray Erin. Balb-C Farelerde Metastatik Meme Karsinomunun Neden Olduğu Endotel Disfonksiyonunda Tümör Nekrozis Faktör-Alfa e NADPH Oksidazın Rolü. 4-7 Kasım 2013 Antalya. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi. Poster Sunumu.
29. S. Dalaklioglu, A. Taşatargil, S. Kale, G. Tanrioever, **S. Dilmac**, N. Erin. Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- α and NADPH oxidase. 28-31 August 2013 Geneva. 11th Conference of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) Poster Presentation
30. Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmaç**, Nuray Erin, Şule Kale, Özlem Duymuş, Necdet Demir. Metastatik Meme Kanseri Nefronektin ve Ki67 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. 28-31 Mayıs 2013 Mersin. 12. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Poster Sunumu.

31. Nilay Kuşcu, **Sayra Dilmaç**, Gamze Tanrıöver, Nuray Erin, Çiler Çelik Özenci. Meme Kanserinden Elde Edilen Metastatik Hücreler İle Non-Metastatik Hücrelerin SIRT, p53, p21 Ekspresyonları Açısından *in vivo* Ve *in vitro* Değerlendirilmesi. 28-31 Mayıs 2013 Mersin. 12. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Poster Sunumu.
32. Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmaç**, Şule Kale, Özlem Duymuş, Nuray Erin. Fare Meme Kanseri Modelinde; Kalp, Karaciğer ve Beyine Metastaz Yapan Hücreler Farklı Metastatik Karakteristik Özellikler Sergiler. 28-31 Mayıs 2013 Mersin. 12. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Sözlü Sunum.
33. Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmaç**, Ceren Kencebay, Yavuz Arıca, Narin Derin, Necdet Demir, İsmail Çakıcı, Haluk Özcanlı. Eritropoietin ve Asetil-L-Karnitin Sıçanlarda Periferik Sinir İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. 28-31 Mayıs 2013 Mersin. 12. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Poster Sunumu.
34. Reşit Köken, Gamze Tanrıöver, Ali Ünal, **Sayra Dilmaç**, L. Bikem Süzen, Özgür Duman. Ratlarda Serebral İskemi Sonrası BDNF, TNF-Alfa ve Neuro-D1 Proteinlerinin Serebrumdaki Ekspresyonları. 28 Nisan-1 Mayıs 2013 İzmir 11. Ulusal Sinir Bilim Kongresi. Poster Sunumu.
35. Göksun Başaranlar, Gamze Tanrıöver, Narin Derin, **Sayra Dilmaç**, Necdet Demir. Sıçanlar Global Serebral İskemi Reperüzyon İndüklü Hipokampal Doku Hasarına Ghrelinin Etkisi. 25-28 Eylül 2012 İstanbul 24. Ulusal Biyofizik Kongresi. Poster Sunumu.
36. Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmaç**, Şule Kale, Nuray Erin. Karaciğer Metastatik Hücreleri, Kalp ve Beyin Metastatik Hücrelerine Göre Daha Hızlı Hareket Eder ve Daha Agresiftir. 16-19 Mayıs 2012 Denizli 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.
37. Gamze Tanrıöver, **Sayra Dilmaç**, Şule Kale, Necdet Demir, Nuray Erin. C-Fos Protein Ekspresyonunun Metastatik Mikroçevreyle İlişkisi Var Mıdır? 16-19 Mayıs 2012 Denizli 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Poster Sunumu.