

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE TRIM36'NİN ROLÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

AYCAN ÇELİK

OCAK 2025

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE TRIM36'NİN ROLÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Ayca ÇELİK

DANIŞMAN: Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

ZONGULDAK

Ocak 2025

KABUL:

Aycan ÇELİK tarafından hazırlanan “Meme Kanserinde TRIM36’nın Rolü” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 17/01/2025

Danışman: Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

Üye: Doç. Dr. Güneş ÇAKMAK GENÇ
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL AFATOĞLU
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Üye: Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü

Üye: Prof. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2025

Prof. Dr. Fikret GÖLGELEYEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



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

Aycan ÇELİK

ÖZET

Doktora Tezi

MEME KANSERİNDE TRIM36’NİN ROLÜ

Aycan ÇELİK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Ocak 2025, 87 sayfa

Meme kanseri en fazla tanı konulan kanser türü olup ölüme yol açan kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanserinin oluşum ve gelişim süreçlerinde rol oynayan sinyal yollarındaki protein komplekslerinin ortaya çıkarılması, tedavide kullanılabilecek yeni hedef moleküllerin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Son yapılan çalışmalarda, *TRIM36*’nın prostat, akciğer gibi bazı kanserlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte meme kanseri ile *TRIM36* ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki daha önce araştırılmamış olup bu çalışmada *TRIM36*’nın ekspresyon seviyesi ve meme kanseri patogenezi arasındaki ilişkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231’de *TRIM36* ekspresyonu susturulup ve/veya rapamisin uygulanıp yara iyileşme ve koloni oluşum deneyleriyle hücre göçü ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda 45 meme kanseri tanısı alan hastadan alınan normal ve tümör dokularından kantitatif real time PCR yöntemi ile *TRIM36* mRNA ekspresyon seviyesi rölatif olarak belirlenmiştir. Meme dokusunda *TRIM36* ekspresyonu gösterilmiş olup, normal ve tümör dokuları arasında *TRIM36* mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Meme kanseri hücre hatlarında

ÖZET (devam ediyor)

immünoblotlama ile TRIM36 ekspresyon seviyelerinin MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha az agresif olan MCF-7 hücrelerinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde TRIM36'nın siRNA transfeksiyonu ile susturulması sağlanmış ve immünoblot yöntemiyle gösterilmiştir. Transfeksiyon sonrasında hücrelere yara iyileşme ve koloni oluşum deneyi uygulanmış, MCF-7 hücrelerinde TRIM36 susturulmasının hücre göçünü artırdığı gösterilmiş olup TRIM36'nın tümör baskılayıcı role sahip olduğu düşünülmektedir. Transfeksiyon deneylerine ek olarak transfekte olan/olmayan hücrelere mTOR inhibitörü olan rapamisin her hücre tipi için belirlenen IC50 konsantrasyonunda uygulanmış, yara iyileşme ve koloni oluşum deneyleri gerçekleştirilmiştir. Rapamisinin tek başına uygulandığı gruplarda her iki hücre hattında da TRIM36 seviyesinin arttığı immünoblotlama ile tespit edilmiştir. Yara iyileşme deneylerinde MCF-7 hücrelerinde kombine uygulamanın, MDA-MB-231 hücrelerinde ise sadece rapamisin uygulamasının hücre göçü inhibisyonunda daha etkili olduğu gözlenmiştir. Koloni oluşum deneylerinde ise MCF-7 hücrelerinde kombine uygulamaya kıyasla TRIM36'nın susturulması, MDA-MB-231 hücrelerinde ise kombine uygulama koloni sayısında azalmayla sonuçlanmıştır. Bu çalışma, meme kanseri biyolojisinde TRIM36'nın rolünü tanımlayarak literatüre özgün bir katkı sunmakta ve TRIM36 susturulması ve/veya rapamisin uygulamasının bireye özgü terapötik bir strateji olarak değerlendirilebileceği yeni bir bakış açısı sağlamaktadır. Bu sonuçlar, moleküler kanser araştırmalarında TRIM36'yı gelecekteki çalışmalar için bir hedef molekül olarak konumlandırabilir.

Anahtar Kelimeler: TRIM36, meme kanseri, gen ekspresyonu, siRNA transfeksiyonu, hücre göçü, hücre proliferasyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE ROLE OF TRIM36 IN BREAST CANCER

Aycan ÇELİK

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

Thesis Advisor: Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

January 2025, 87 pages

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Elucidating the protein complexes within signaling pathways involved in the initiation and progression of breast cancer may facilitate the identification of novel therapeutic targets. Recent studies have highlighted the role of *TRIM36* in cancers such as prostate and lung; however, its association with breast cancer remains unexplored. In this study, we investigated the relationship between *TRIM36* expression levels and breast cancer pathogenesis. Additionally, *TRIM36* expression was silenced and/or rapamycin was administered in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 to evaluate its effects on cell migration and proliferation using wound healing and colony formation assays. To this end, the relative *TRIM36* mRNA expression levels were quantified by quantitative real time PCR in normal and tumor tissues collected from 45 breast cancer patients. *TRIM36* expression was confirmed in breast tissue, but no statistically significant difference was observed in *TRIM36* mRNA expression levels between normal and tumor tissues. Immunoblotting analysis in breast cancer cell lines revealed higher *TRIM36* expression levels in MCF-7 cells, which are less aggressive compared to MDA-MB-231 cells. *TRIM36* silencing was achieved in both cell lines

ABSTRACT (continued)

via siRNA transfection, as confirmed by immunoblotting. Following transfection, wound healing and colony formation assays were conducted. Results indicated that TRIM36 silencing in MCF-7 cells enhanced cell migration, supporting its potential tumor suppressor role. In addition to transfection experiments, rapamycin, an mTOR inhibitor, was administered to transfected and non-transfected cells at IC50 concentrations specific to each cell type. Subsequent wound healing and colony formation assays demonstrated that rapamycin treatment alone increased TRIM36 expression levels in both cell lines, as verified by immunoblotting. In wound healing assays, combined treatment with rapamycin and TRIM36 silencing showed greater inhibition of cell migration in MCF-7 cells, whereas rapamycin alone was more effective in MDA-MB-231 cells. Colony formation assays revealed that TRIM36 silencing in MCF-7 cells and combined treatment in MDA-MB-231 cells led to a significant reduction in colony numbers compared to other treatments. This study uniquely contributes to the understanding of TRIM36's role in breast cancer biology and provides a new perspective from which TRIM36 silencing and/or rapamycin administration can be considered as an individualized therapeutic strategy. These findings position TRIM36 as a promising target molecule for future molecular cancer research and therapeutic development.

Keywords: *TRIM36*, breast cancer, gene expression, siRNA transfection, cell migration, cell proliferation

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her fikrimi hoşgörü ile karşılayıp isteklerimi geri çevirmeyen, bu tezin hazırlanmasında büyük emeği olan, bana çözüm odaklı düşünebilmeyi öğreten, sadece akademik değil kişisel hayatımda da kendime örnek aldığım, fikirlerine değer verdiğim ve her zaman sevgisini hissettiğim hocam Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK'e,

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarını bizimle büyük bir yardımseverlikle paylaşan Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na,

Bu çalışmayı destekleyen Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi BAP Birimi'ne (Proje No: 2021-50737594-03) ve TÜBİTAK'a (1002 – B Acil Destek Modülü, Proje No:124Z199),

Akademik hayatımın başlangıcından itibaren bana yol gösteren, içtenlikle her zaman yanımda olan, derdimi paylaşıp her konuda fikir alabildiğim değerli hocalarım ve arkadaşlarım Doç. Dr. İbrahim ARMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL AFATOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Seval ÇAPANLAR'a, Arş. Gör. Dr. Utku Can ATILGAN'a ve Arş. Gör. Kardelen DALGAN'a,

Her zaman tavsiyeleri, bilgisi ve sevgisiyle yanımda olan, birlikte ağlayıp birlikte güldüğümüz, “en”lerimi paylaştığım, hayatımın her anında desteklerini hissettiğim dostlarım Melek Ekin DURAN ve Zehra ŞİPŞAK'a,

Hayatım boyunca aldığım her kararda desteklerini hissettiren, her sıkıntıma yardımlarıyla göğüs gerdiğim, üzerimde en büyük emeğe sahip olan canım ailem Saadet ÇELİK, Recep ÇELİK ve Abdullah ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aycan ÇELİK



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL:	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 MEME KANSERİ.....	1
1.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	1
1.1.2 Meme Kanseri Etiyolojisi	1
1.1.3 Meme Kanseri Sınıflandırması	3
1.1.4 Meme Kanserinde Tanı ve Tedavi	4
1.1.5 Rapamisin ve Meme Kanseri	7
1.1.6 Androjen Sinyali ve Meme Kanseri	8
1.2 UBİKUİTİNASYON.....	10
1.3 E3 UBİKUİTİN LİGAZLAR	12
1.3.1 TRIM Protein Ailesi.....	13

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.3.2 TRIM Proteinlerinin Fonksiyonları.....	17
1.3.3 TRIM36 / HAPRIN (Androjen Duyarlı Gen)	20
BÖLÜM 2 GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
2.1 GEREÇ	23
2.1.1 Ekipmanlar	23
2.1.2 Kimyasallar ve Kitler	24
2.1.3 Besiyeri ve Solüsyonlar.....	26
2.1.4 Doku Örnekleri.....	29
2.1.5 Hücre Hatları.....	29
2.2 YÖNTEM.....	29
2.2.1 Dokulardan RNA İzolasyonu	29
2.2.2 RNA Konsantrasyon ve Saflıklarının Belirlenmesi	30
2.2.3 cDNA Sentezi.....	30
2.2.4 Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)	31
2.2.5 Hücre Kültürü.....	31
2.2.6 Sitotoksite Testi (MTT Testi)	33
2.2.7 siRNA Transfeksiyonu.....	34.
2.2.8 Rapamisin uygulaması	34

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.2.9 siRNA ve Rapamisin Kombine Uygulaması.....	35
2.2.10 Protein İzolasyonu.....	35
2.2.11 Total Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	35
2.2.12 SDS Page Elektroforezi ve İmmünoiblotlama	36
2.2.13 Koloni-Oluşum Deneyi	37
2.2.14 Yara İyileşmesi Deneyi	37
2.2.15 İstatistiksel Analiz	38
BÖLÜM 3 BULGULAR.....	39
3.1 DOKU DENEYLERİ BULGULARI	39
3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ BULGULARI	43
3.2.1 Rapamisinin Hücre Canlılığına Etkisi ve IC50 Değerinin Belirlenmesi	44
3.2.2 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	46
3.2.3 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde siTRIM36 Transfeksiyonu ile TRIM36'nın Susturulması	46
3.2.4 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde siTRIM36 Transfeksiyonu ve/veya Rapamisin Uygulamasının TRIM36 Seviyesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	48
3.2.5 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Azalmış TRIM36 Seviyesinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	50
3.2.6 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde TRIM36 Susturulmasının ve/veya Rapamisin Uygulamasının Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	53

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

3.2.7 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Azalmış TRIM36 Seviyesinin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	57
3.2.8 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde TRIM36 Susturulmasının ve/veya Rapamisin Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	59
BÖLÜM 4 TARTIŞMA	63
BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	71
EK AÇIKLAMALAR.....	85
EK A: Etik Kurul Onay Belgesi	85
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Sayfa
Şekil 1.1 AR sinyali (sol), AR'nin kinazlar ve fosfatazlar üzerindeki kontrolü ve etkileşimleri yoluyla bazı hücrel işlemin düzenlenmesi (sağ) (BioRender.com ile oluşturuldu) (Venkadakrishnan et al., 2020).	10
Şekil 1.2 Ubikuitin-Proteazom Sistemi (Hatakeyama (2017)'dan uyarlanmıştır).	11
Şekil 1.3 TRIM Ailesi Proteinlerinin Domainleri (Napolitano et al., 2011'den uyarlanmıştır).	14
Şekil 1.4 TRIM Proteinlerinin Sınıflandırılması (Hatakeyama, 2017'den uyarlanmıştır).	16
Şekil 1.5 TRIM36'nın kromozomal lokalizasyonu, gen ve proteinini şematize edilmiş görüntüsü (URL-1).	20
Şekil 3.1 GAPDH geni standart eğrisi	40
Şekil 3.2 TRIM36 geni standart eğrisi	40
Şekil 3.3 GAPDH geni qRT-PCR erime piki grafiği	41
Şekil 3.4 TRIM36 geni qRT-PCR erime piki grafiği	41
Şekil 3.5 Normal ve tümör dokularında TRIM36 mRNA ekspresyonu kat değişimleri.	43
Şekil 3.6 MCF-7 hücreleri (a: %60 konfluent, b: %80 konfluent)	43
Şekil 3.7 MDA-MB-231 hücreleri (a: %50 konfluent, b: %80 konfluent)	44
Şekil 3.8 MCF-7 hücrelerinde farklı dozlarda rapamisin uygulamasının canlılık oranına etkisi	45
Şekil 3.9 MDA-MB-231 hücrelerinde farklı dozlarda rapamisin uygulamasının canlılık oranına etkisi	45
Şekil 3.10 BSA standart serisi ile çizilen standart grafiği	46
Şekil 3.11 MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoblotlarda sırasıyla kontrol (C), transfeksiyon ajanı kontrol (TRC), scrambled siRNA negatif kontrol (siNC) ve siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36). *p<0.01	47
Şekil 3.12 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoblotlarda sırasıyla kontrol (C), transfeksiyon ajanı kontrol (TRC), scrambled siRNA negatif kontrol (siNC) ve siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36). *p<0.01	48
Şekil 3.13 MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoblotlarda sırasıyla kontrol (C), siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36), rapamisin uygulanmış deney grubu (Rapa) ve hem siTR36 hem rapamisin uygulanmış deney grubu (siTR36+Rapa). *p<0.01	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.14 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoblotlarda sırasıyla kontrol (C), siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36), rapamisin uygulanmış deney grubu (Rapa) ve hem siTR36 hem rapamisin uygulanmış deney grubu (siTR36+Rapa). *p<0.01	50
Şekil 3.15 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.....	51
Şekil 3.16 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.	51
Şekil 3.17 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.....	52
Şekil 3.18 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.	53
Şekil 3.19 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.....	54
Şekil 3.20 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.	55
Şekil 3.21 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.....	56
Şekil 3.22 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.	56
Şekil 3.23 MCF-7 hücre grupları koloni oluşum deneyi.....	57
Şekil 3.24 MCF-7 hücre grupları koloni sayıları.	58
Şekil 3.25 MDA-MB-231 hücre grupları koloni deneyi.	58
Şekil 3.26 MDA-MB-231 hücre grupları koloni sayıları.	59
Şekil 3.27 MCF-7 hücre grupları koloni oluşum deneyi.....	60
Şekil 3.28 MCF-7 hücre grupları koloni sayıları	60
Şekil 3.29 MDA-MB-231 hücre grupları koloni oluşum deneyi.	60
Şekil 3.30 MDA-MB-231 hücre grupları koloni sayıları.	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

No

Sayfa

Çizelge 1.1 TRIM ailesine ait bazı genler ve bu genlerin farklı kanser türlerinde uğradıkları değişimler (Hatakeyama 2011).	18
Çizelge 3.1 TRIM36 mRNA ekspresyonu kat değişiminin normal ve tümör dokularındaki tanımlayıcı istatistikleri.	42





EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

Sayfa

EK A: Etik Kurul Onay Belgesi.....	85
------------------------------------	----





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta
dk	: Dakika
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
T_m	: Erime sıcaklığı
%	: Yüzde
g	: Merkezkaç kuvveti
L	: Litre
M	: Molar
U	: ünite
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
μg	: mikrogram
μl	: mikrolitre
nm	: nanometre
cm	: santimetre
pmol	: pikomol
μM	: mikromolar
nM	: nanomolar

KISALTMALAR

ACID	: asit bakımından zengin bölge
APL	: Akut promiyelositik lösemi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

AR	: Androjen reseptörü
ARF	: ADP-ribosilasyon faktörü aile alanı
ATP	: Adenin tri fosfat
B-NHL	: B hücreli Hodgkin olmayan lenfoma
BRCA1-2	: Meme kanseri 1-2 genleri
BROMO	: bromodomain
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CBC	: Tam kan sayımı
CC	: Sarmal bobin – coiled coil
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbondioksit
COS	: alanı,
Cys	: Sistein
DCIS	: Duktal karsinom in situ
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: çift sarmallı RNA
DUB	: deubikuitinasyon enzimi
EBV	: Epstein Barr virüsü
ER	: Östrojen resptörü
ERE	: Östrojen yanıt elemanı
FIL	: filamin tipi IG alanı
FNIII	: fibronektin tip III tekrarı
Gly	: Glisin
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (Reseptör tirozin-protein kinaz
erbB-2)	
HPV	: insan papilloma virüsü
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IFN	: İnterferon
LCIS	: Lobüler karsinom in situ
Lys, K	: Lizin
M1	: İlk metiyonin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

MATH	: Meprin ve TRAF-homoloji alanı
miRNA	: mikro RNA
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
mTOR	: “mammalian target of rapamycin”
MTT	: (3-(4,5 Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromid)
NHL	: “NCL-1, HT2A, Lin41”
PET	: Poztron emisyon tomografisi
PHD	: plant homeodomain
PR	: Progesteron reseptörü
qRT-PCR	: kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
RBCC	: RING, B-Box, Coiled coil
RING	: “really inteersting new gene”
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
RT	: oda sıcaklığı
shRNA	: küçük saç tokası RNA
siRNA	: küçük interferans Ribonükleik asit
siRNA	: small interferring RNA – küçük susturucu RNA
TM	: transmembran bölgesi
TRIM	: “Tripartite motif family”
X	: herhangi bir aminoasit
Zn⁺²	: Çinko iyonu



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 MEME KANSERİ

1.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri 2022 GLOBOCAN verilerine göre en fazla tanı konulan insan kanseridir ve ölüme yol açan kanserler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında insidansı en yüksek kanser türüdür (Bray et al., 2024).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC – International Agency for Research on Cancer) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2022 verilerine göre kadınlarda meme kanseri, küresel kanser insidansında ikinci sırada yer almış ve yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka ile tüm kanser vakalarının %11,6'sını oluşturmuştur. Hastalık, dünya genelinde 666.000 ölüme yol açarak (tüm kanser ölümlerinin %6,9'u) kanser kaynaklı ölümlerin dördüncü en yaygın nedeni olmuştur. Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser olarak gözlenmiştir. Kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının dörtte biri ve kanser ölümlerinin altıda biri meme kanserine bağlıdır (Bray et al., 2024).

Meme kanserinin birçok türü bulunmakta fakat tümör başlangıcı ve sürecinin hala kesin olmaması ve buna bağlı olarak çoğu türünde net bir tedavinin bulunmaması yüksek insidans ve ölüme yol açmasının sebepleridir. Son zamanlarda bu nedenle güçlü tanısal değere sahip biyobelirteçlerin tanımlanması teşhis ve tedavi olanaklarının iyileştirilmesi bakımından ilgi çekmektedir (Zhou et al., 2018).

1.1.2 Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, çevresel etmenler, alkol ve sigara kullanımı, radyasyon, genetik faktörler gibi birçok faktör yer almaktadır. Genetik olmayan faktörler

arasında cinsiyet en önemli risk faktörü olarak kabul edilir. Hastalığın prognozu incelendiğinde ise genç hastaların, yaşlılara kıyasla daha kötü bir klinik profil sergilediği görülmektedir. Gençyaşta meme kanseri teşhisi konulan kadınların, yaşlı kadınlara göre daha kısa bir hayatta kalma süresine sahip olduğu ve bu durumun daha agresif tümör biyolojisi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Klauber-DeMore, 2006, Üreyen et al., 2016).

İlk doğum yaşı ve gebelik sayısı, meme kanseri için bilinen önemli risk faktörlerindendir. İlk doğumun ardından yaşanan her gebelik, sekizinci gebeliğe kadar uzun vadeli ek bir risk azalmasına yol açmaktadır (Katuwal et al., 2019). Ayrıca, çalışmalar göstermektedir ki gebelik sonrası en az iki yıl emzirme, menstrüel döngü sıklığını azaltarak meme kanseri riskini düşürmektedir (Feng et al., 2018).

Yaşam tarzı, aşırı alkol tüketimi, yüksek yağlı gıdalarla beslenme ve sık yapılan diyet gibi sağlıksız alışkanlıklar, meme kanseri riskini artırabilir. Alkol tüketimi, kandaki östrojenle ilişkili hormon seviyelerini yükselterek östrojen reseptörü yollarını aktive edebilir (van den Brandt et al., 2002; Jung et al., 2016). Hem sigara hem de alkol kullanan kadınlarda ise meme kanseri riski daha da artmaktadır (Knight et al., 2017). Bugüne kadar yapılan araştırmalar, özellikle erken yaşta sigara kullanımının meme kanseri gelişme riskini artırdığını ortaya koymuştur (Catsburg et al., 2015; Kispert and McHowat, 2017).

Aile öyküsü, meme kanseri risk faktörlerinden biridir; hastaların dörtte birinde aile geçmişinde meme kanseri bulunmaktadır. Annesi, kız kardeşi veya diğer aile bireylerinde meme kanseri öyküsü olan kadınlar, bu hastalığa daha yatkındır (Brewer et al., 2017). BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınların, normal bireylere kıyasla meme kanserine yakalanma olasılığı %60-80 oranında daha yüksektir (Ford et al., 1998).

Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u, bir ebeveyninden kalıtılan genetik mutasyonlara bağlıdır. Kalıtsal meme kanserinin en yaygın nedeni BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar olsa da, diğer birçok genetik mutasyonun da meme kanseri gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Tümör hücrelerinde sıkça mutasyona uğramış veya amplifiye olmuş genler arasında TP53 (tümörlerin %41'i), PIK3CA (%30), MYC (%20), PTEN (%16), CCND1 (%16), ERBB2 (%13), FGFR1 (%11) ve GATA3 (%10) yer alır. Bu genler, erken meme kanseri vakalarına ilişkin bir dizi raporda bildirilmiştir. Bu genlerin ürünleri, ya baskılanmış (ör. TP53) ya da aktif hale gelmiş (ör. CCND1) durumda olup, hücresel proliferasyonu destekleyen veya apoptozu

engelleyen onkogenik yolların düzenlenmesinde rol oynar (ör. MYC). Meme kanserine neden olan mutasyonların çoğu oldukça nadir görüldüğü için, genellikle bu kanserlerin nedeni, düşük penetransa sahip birçok mutasyonun kümülatif etkisidir (Nik-Zainal et al., 2016).

1.1.3 Meme Kanseri Sınıflandırması

Meme kanseri, çeşitli moleküler özelliklere sahip ve farklı klinik seyirler gösteren heterojen bir hastalıktır. Bu çeşitlilik, meme kanserinin her hastada farklı seyretmesine ve tedavilere farklı yanıtlar vermesine neden olmaktadır. Bu durum hem hastalığın tanısını zorlaştırmakta hem de prognozu belirlemede önemli bir değişken olarak karşımıza çıkmaktadır (Song et al., 2014).

İnsan meme bezinin temel yapı birimleri, süt üretiminde görevli salgı bezleri lobüller ve bunlara bağlı dallanma gösteren kanallardır (duktus). Bu yapılar, epitelyal ve miyoepitelyal hücreler tarafından kaplanır. Meme dokusu, bu hücrelerin yanı sıra yağ dokusu ve bağ dokusundan da oluşur. Meme kanserleri, genellikle epitelyal kökenli ve "karsinom" olarak adlandırılan kötü huylu tümörlerdir. Bu tümörler, ortaya çıktıkları bölgeye göre duktal karsinom (süt kanallarında) veya lobüler karsinom (süt bezlerinde) olarak sınıflandırılır. Karsinomlar çevre dokuya yayılan tümörlerdir. Yayılmayanlar ise invaziv olmayan karsinomlardır ve 'in situ karsinom' olarak isimlendirilirler (duktal karsinom in situ (DCIS), lobüler karsinom in situ (LCIS)) (Harbeck et al., 2019).

Bunun yanı sıra heterojen özelliklere sahip meme kanserlerinin moleküler alt tipleri bazı hormon reseptörleri ifadesine göre sınıflandırılmıştır; östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) ile proliferasyon belirteci Ki67. 2013 St. Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı ile meme kanseri moleküler olarak meme kanseri beş biyolojik sınıfa ayrılmıştır: Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif, Normal benzeri ve Bazal benzeri.

Luminal A; ER+ ve/veya PR+, HER2-, düşük Ki-67 ekspresyonuna sahip meme kanserinin diğer alt tiplere göre daha yavaş büyüyen moleküler alt tipidir. Meme kanseri olgularının %50-60'ını oluşturan ve en yaygın görülen alt tiptir. Bu gruptaki hastalarda hormon tedavisi uygulanabilir.

Luminal B; meme kanseri olgularının %10-20'sini oluşturur. ER+ ve/veya PR+, HER2 değişken, yüksek Ki-67 ekspresyonuna sahiptir. Luminal A'ya göre daha yüksek nüks oranı, kötü prognoz, yüksek histolojik derece ve artmış proliferasyon indeksi ile ilişkilidir. Luminal B tipi meme kanserinin tedavisinde hormon tedavisi, kemoterapi ve anti-HER2 tedavisi kullanılmaktadır.

HER2 pozitif; Meme kanseri vakalarının %15-20'sinde görülür. Bu alt tip ER-, PR-, HER+ hormon reseptörü tipine sahiptir. Luminal alt tiplerden daha hızlı büyür. Hızlı metastaz potansiyeli ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Ancak anti-HER2 tedavisine yanıt verdiği için tedavi başarısı yüksektir.

Normal benzeri; ER+ ve/veya PR+, HER2- hormon reseptörü tipine sahiptir ve meme kanserlerinin %5-10'unu oluşturur. Luminal A tümörlerine benzer hormon reseptör tipine sahip olsa da görece daha kötü prognoza sahiptir.

Bazal benzeri (Üçlü negatif) meme kanseri; ER-, PR-, HER2- hormon reseptörü tipine sahiptir ve meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. Diğer alt tiplere göre daha kötü bir prognoza sebep olmaktadır. Genellikle daha agresiftir. BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları taşıyan bireylerde daha sık görülür. Bu tür meme kanserinin tedavisinde hormonal tedavi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Goldhirsch et al., 2013, Eliyatkin et al., 2015, Feng et al., 2018, Harbeck et al., 2019, Sert and Küçükkılınç, 2022).

1.1.4 Meme Kanseri Tanı ve Tedavi

Meme kanseri teşhisi, mamografi, ultrason, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve biyopsi gibi çeşitli testlerle gerçekleştirilebilir. Ayrıca, kanserin meme ve kol altındaki lenf düğümlerine metastazı röntgen, kemik taraması, bilgisayarlı tomografi (BT veya CAT), pozitron emisyon tomografisi (PET) veya PET-BT taraması, MRI, kan testleri, tam kan sayımı (CBC), kan tümörü belirteç testleri, genomik analiz, tümörün moleküler testi ve genetik testler ile belirlenebilir.

Meme kanseri, tedavi seçenekleri açısından oldukça çeşitlidir ve tedavi, kanserin türüne ve metastaz durumuna bağlıdır. Her bireyin tedavi planı, kişiye özgü özelliklere göre şekillendirilmelidir. Bu özellikler arasında meme kanserinin türü, evresi, hasta yaşı, cinsiyeti,

diğer kronik hastalıklar, menopoz durumu, ilaç direnci, genetik profil ve epigenetik faktörler önemli rol oynamaktadır. Meme kanserinin tedavisi; kemoterapi (Paklitaksel, doksorubisin), hormonterapi (tamoksifen, letrozol), immünoterapi gibi sistemik tedaviler ile cerrahi tedavi, radyoterapi gibi lokal tedavi yöntemlerini de içermektedir. Genellikle meme kanseri olan hastalar bu yöntemlerin kombine kullanılmasıyla tedavi edilmektedir (Song et al., 2014, Harbeck ve ark., 2019).

Meme kanserinin patogeneğinde ER α (Estrojen Reseptörü alfa) önemli bir rol oynar ve meme kanserlerinin yaklaşık %75'inde bu hormon reseptörü fazla miktarda ifade edilir. Bu nedenle, ER α klinik tedavi açısından endokrin tedavi için önemli bir hedef olarak seçilmiştir. Membranda konumlanan ER α , Tirozin Kinaz Src, PI3K ve Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) gibi farklı proteinlerle kompleksler oluşturur. Östrojen hormonu, bu protein komplekslerine hızlı bir şekilde bağlanır ve konformasyon değişiklikleri meydana gelir, ardından MAPK ve AKT gibi sinyal yolları aktive olur. Bu yollar, hücresel çoğalmayı uyarır. ER α sinyal yollarının onkogenik aktivitesi, anti-östrojen ilaçlar kullanılarak inhibe edilir. Ancak, bu ilaçların başlangıçta etkili olmasına rağmen, hastalığın ilerlemesi ve tümör gelişimi sürecinde etkisini kaybederek direnç geliştirdiği gözlemlenmiştir (Luo and Zhang, 2016, Tian and Schiemann et al., 2017, Feng et al., 2018).

Meme kanseri tedavilerindeki gelişmelere rağmen, tedaviye direnç kazanan hücreler nedeniyle metastatik meme kanseri hastalarında yüksek oranda ölüm görülmektedir. Bu nedenle araştırmacılar yeni tedavi yaklaşımları ve potansiyel terapötik aday molekülleri araştırmaya devam etmektedir (Akram et al., 2017).

Geleneksel kanser tedavilerine ek olarak, gen tedavisi; özellikle zor tedavi edilen kanser türlerinde etkinliği artırmak ve radyasyon tedavisinin sınırlamalarını azaltmak amacıyla geliştirilen yeni bir stratejidir. Bu tedavi yöntemi, hedef hücrelere terapötik geni bir vektör aracılığıyla transfer etmeyi amaçlar. Ancak başarılı bir gen tedavisi için, terapötik genlerin degrade olmadan doğrudan hastalık bölgesine yönlendirilmesini sağlayan bir taşıyıcı sistem gereklidir. Bu taşıyıcı sistemler arasında viral vektörler, polikasyonik polimerler, lipidler ve lipozomlar kullanılmaktadır.

Son yıllarda RNA interferans (RNAi) teknolojisinin keşfedilmesiyle siRNA (small interfering RNA) ve miRNA'lar (mikro RNA) kullanılarak meme kanseri tedavisinde gen tedavisi çalışmaları yaygınlaşmıştır (Natarajan and Venugopal, 2011).

Tümör baskılayıcı gen mutasyonlarına dayalı kanserlerin tedavisinde, inaktif hale gelen tümör baskılayıcı genlerin işlevini yeniden kazandırmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Wild-type (yabani tip) tümör baskılayıcı genin transfeksiyonu, bu tür genlerin normal fonksiyonlarını yeniden kazandırabilir, hücrelerin sağlıklı büyüme fenotipini geri getirebilir veya apoptozu indükleyerek tümör hücrelerinin anormal büyümesini kontrol altına alabilir.

Ayrıca, antisens RNA kullanımı, spesifik ribozimler aracılığıyla onkogenlerin anormal aktivasyonunu engellemek için etkili bir yöntemdir. RNAi, gen ekspresyonunu düzenleyen güçlü ve evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır. RNAi, gen dizilerinin çift sarmallı RNA (dsRNA) formunda vücuda verilmesiyle gerçekleştirilir. Bu RNA dizileri, hücre içi bir RNase III enzimi olan Dicer tarafından siRNA ve miRNA'lara parçalanır ve böylece hedef mRNA'nın yıkımını sağlar (Fire et al., 1998, Ambros, 2004, Du and Zamore, 2005).

RNAi'nin gen susturma kapasitesi, özellikle onkogeneze rol oynayan genlerin inhibisyonu için büyük bir potansiyele sahiptir. Küçük moleküllü inhibitörler ve monoklonal antikörelara kıyasla RNAi, birçok önemli kanser hedefini etkili bir şekilde düzenleyebilir (Fire et al., 1998). RNAi'nin uygulanabilirliği aşağıdaki mekanizmalarla desteklenir:

- Onkogen transkriptlerinin susturulması
- Apoptozu indükleme ve proliferasyonu azaltma
- Kanser ilerlemesini destekleyen miRNA'ların inhibisyonu
- Hücre farklılaşmasını destekleyen miRNA'ların taklit edilmesi

RNAi tabanlı tedaviler, yalnızca onkogenleri hedeflemekle kalmaz, aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesi (Yuan et al., 2004, Purow et al., 2005, Xiao et al., 2005), anjiyogenez (Filleur et al., 2003, Takei et al., 2004, Kilic et al., 2005) ve hatta Epstein-Barr virüsü (EBV) ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi onkojenik virüslerin kodladığı onkogenlere karşı da etkili olabilir.

RNAi'ye dayalı kanser tedavisinde iki temel strateji geliştirilmiştir:

1. Gen terapisi; viral vektörler, hücelere küçük saç tokası RNA (shRNA) öncüllerini kodlayan genleri taşır. Bu öncüller, hücre içinde endojen miRNA'lar gibi işlenir ve gen susturmayı sağlar.
2. Küçük molekül ilaç taşıma; tamamlanmış siRNA moleküllerinin taşınması ve hedef hücrelerde etkinliğinin sağlanması amaçlanır (Dykxhoorn and Lieberman, 2005, Dykxhoorn et al., 2006).

RNAi tabanlı tedaviler, kemoterapi veya radyoterapi ile kombine edildiğinde kanser hücrelerini bu standart tedavilere karşı daha duyarlı hale getirebilir (Yagüe et al., 2004, Peng et al., 2004, Chang et al., 2005). Bu kombinasyonlar, kanser tedavisinde daha yüksek etkinlik ve daha az yan etki sağlama potansiyeline sahiptir.

RNAi'nin esnekliği ve güçlü gen susturma yeteneği, özellikle dirençli ve agresif kanser tiplerinin tedavisinde umut verici bir yaklaşımdır. Bu terapiler, kanserin biyolojik mekanizmalarını daha iyi anlamaya yönelik yeni araştırmalarla birlikte, gelecekte kanser tedavisinde önemli bir rol oynayabilir.

1.1.5 Rapamisin ve Meme Kanseri

Memelilerde rapamisin hedefi (mammalian target of rapamycin- mTOR), hücre büyüme ve proliferasyonun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolunun bir bileşenidir. PI3K/Akt/mTOR, hücre içinde kritik bir sinyal iletim yoludur. Bu sinyal yolu, hücrelerin dış ortamdan gelen büyüme faktörleri ve hormonlar gibi uyarıcılara yanıt vererek hücre proliferasyonunu ve hayatta kalımını sağlar. Özellikle tümör hücrelerinde bu yolun oldukça önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Cantley 2002). PI3K yolunun anormal aktivasyonu, birçok kanser türünde yer almakta olup, bu yolun artan aktivasyonu genellikle kanser tedavilerine direnç ile ilişkilendirilir (Myers and Cantley, 2010, McCubrey et al., 2007). mTOR, hücre büyüme ve proliferasyon için gerekli olan protein sentezini düzenleyen iki farklı çok proteinli kompleks oluşturabilir: mTORC1 ve mTORC2 (Vivanco and Sawyers, 2002, Bhaskar and Hay, 2007, Lee and Hung, 2007). mTOR'un iki kompleksi, mTORC1 ve mTORC2, hücre büyümesinde rol oynar (Wullschleger et al., 2006, Betz and Hall, 2013). mTORC1; mTOR, Raptor, GβL (SEC13 proteini ile ölümcül memeli protein 8) ve mTOR ile

etkileşime giren alan içeren protein (DEPTOR)'dan oluşur ve kısmen rapamisin tarafından inhibe edilir (Kim et al., 2002). Bu hücrel mekanizma, hücrenin çevresel koşullara adaptasyonunda kritik bir rol oynayarak, besin ve büyüme faktörlerinin varlığında hücre büyümesini desteklerken, stres durumlarında katabolik süreçleri aktive eder (Kim et al., 2003, Fang et al., 2001).

MTOR sinyal yolu hücre büyümesi, proliferasyonu ve hayatta kalması için kritiktir ve rapamisin, kanserin bu ayırt edici süreçlerini inhibe eder. Bu sebeple kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir mTOR inhibitörü olan rapamisinin; kanser hücrelerinde etkinliğinin artırılması içinyeni tedavi yaklaşımları üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Rapamisinin meme hücreleri dahil birçok tümör hücre hattında büyümeyi inhibe ettiği bilinmektedir (Seto, 2012). Rapamisin özellikle G1 fazından S fazına geçiş için gerekli olan spesifik proteinlerin sentezlenmesini etkileyen süreçlerle ilişkilidir. Bu müdahale, geç G1 fazında hücre döngüsünün S fazının başlangıcından önce duraklamasına neden olur (Barbet ve ark., 1996). Rapamisin tedavisinin androjen reseptörü (AR) protein seviyesini yükselttiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, AR'nin mTOR sinyal yolu ile düzenlendiğini ve rapamisinin bu yolağı inhibe ederek dolaylı yoldan AR seviyesini etkilediğini düşündürmektedir (Cinar et al., 2005).

1.1.6 Androjen Sinyali ve Meme Kanseri

Androjen sinyali, kas kütlesi, kas gücü, kemik mineral yoğunluğu, prostat büyümesi, spermatogenez gibi erkek cinsel özelliklerinin gelişimi ve sürdürülmesi için kritiktir. Aynı zamanda kadın fizyolojisi ve üremesinde de çok önemli bir rol oynar. Androjen sinyali; prostat kanseri, meme kanseri, diyabet, metabolik sendrom ve Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Jiang et al., 2009). Androjenin insan meme kanseri hücrelerinde hem in vitro (laboratuvar ortamında) hem de in vivo (canlı organizmalarda) proliferasyonu inhibe ettiği bilinmektedir. Klinik gözlemler ise, androjenlerin veya androjenik bileşiklerin kadınlarda meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu (çoğalmasını) baskıladığı ve böylece tümörün büyüme hızını azalttığını göstermektedir (Labrie ve ark., 1992).

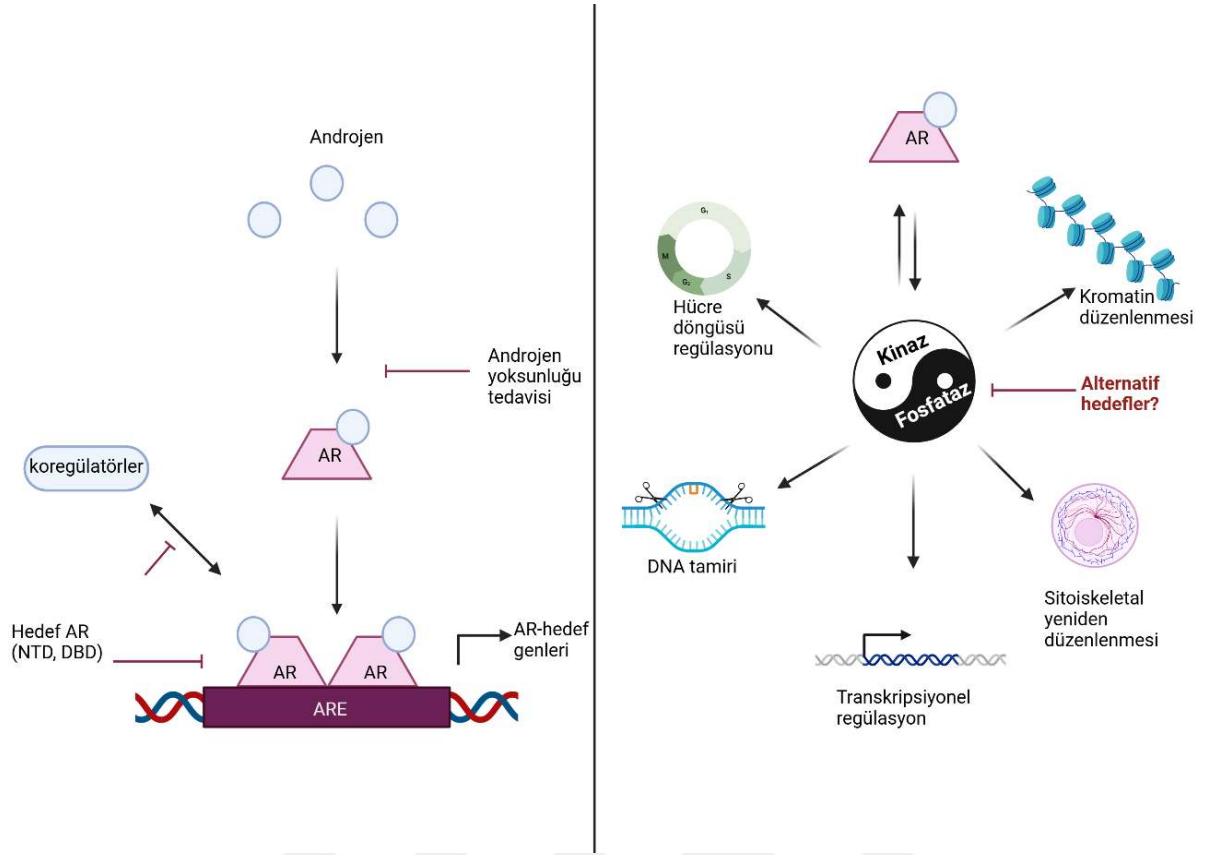
AR, androjen sinyalinin önemli bir elemanıdır. Androjen bağlanması sonrası AR, şaperon proteinlerden ayrılarak lokalize olduğu sitoplazmadan çekirdeğe geçer ve androjen yanıt elementleri vasıtasıyla androjen duyarlı genlerin (androgen responsive genes- ARG) transkripsiyonunu aktive eder. Bu sinyal yolağının prostat kanserinde hücre döngüsü

regölasyonu, DNA tamiri, kromatin organizasyonu, hücre iskeleti reorganizasyonu ve hedef genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Şekil 1.1) (Venkadakrishnan et al., 2020). Son çalışmlar, AR sinyalizasyonunun meme kanseri, glioblastoma ve AR eksprese eden diğer tümör türlerinde de önemli olabileceğini göstermektedir (Schweizer and Yu, 2017). Prostat kanseri gibi meme kanseri de hormonal olarak regüle edilmektedir. Uygulanan hormon tedavilerinin çoğu ER sinyalini baskılamaya odaklanırken, son zamanlarda androjen sinyalinin de meme kanseri hücrelerinin sağkalımında önemli bir regölator olduğu anlaşılmıştır (Fioretti et al., 2014, Pietri et al., 2016).

AR, meme kanseri hastalarının tedavisinde yeni bir belirteç ve potansiyel yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmaktadır (Nicolas Diaz-Chico et al., 2007). Meme kanserinde AR ekspresyonu östrojen reseptörü-pozitif (ER+) hastalarda sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Östrojen reseptörü-negatif (ER-) hastalara göre ER+ hastalarda AR'nin immünoboyanmasının anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir (Peters et al., 2009). ER+ hastaların ise AR+ olanlarının AR- olanlarına göre daha iyi prognoza sahip oldukları bildirilmiştir (Bozovic-Spasojevic et al., 2017). Bu, östrojen yanıt elemanlarına (ERE) bağlanma konusunda AR ve ER arasındaki rekabet ve bunun sonucunda ER' ne bağlı gen transkripsiyonunun bozulması ile ilişkilendirilmiştir (Need et al., 2012).

Ortaya çıkan kanıtlar, androjen sinyal yolunun meme kanseri patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir. Androjen reseptör tabanlı tedaviler araştırılmakta olup androjen duyarlı genler meme kanseri çalışmlarında incelenmektedir. TRIM36'nın androjen duyarlı bir gen olduğu ve prostat kanserinde anti-androjen ilaçların etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (Liang et al., 2018).

Meme kanseri literatüründe TRIM36 ile ilişkili bir bilgiye rastlanmamış olup, yapılan tarama sonucu özetlenen bu bilgiler ışığında meme kanserogeneğinde rolü olabileceği düşünülmektedir.

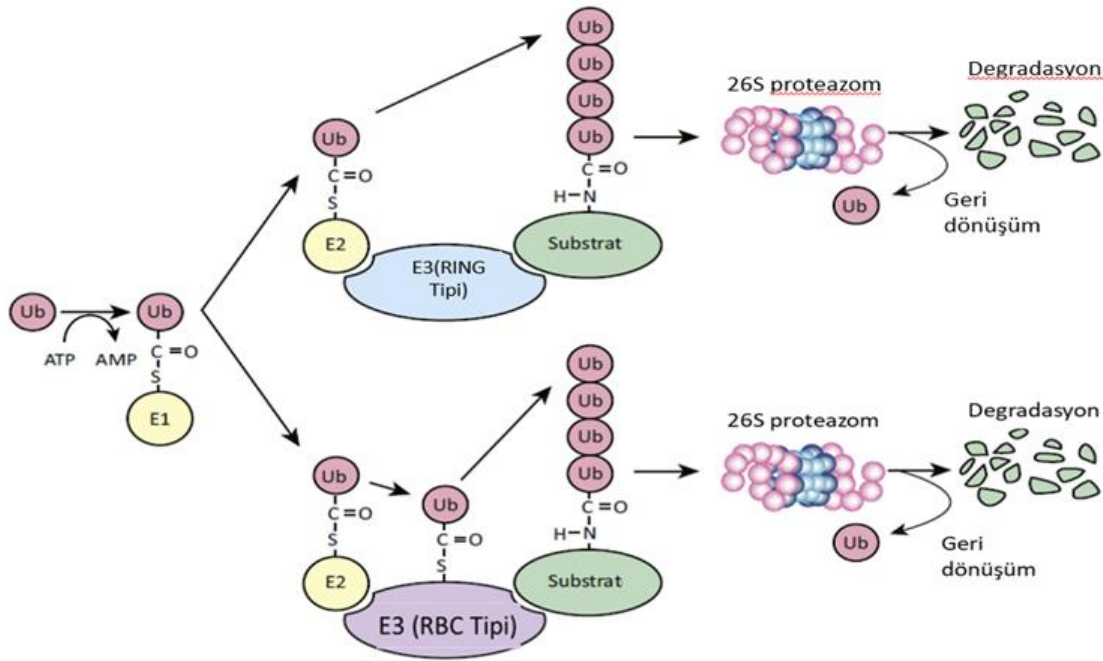


Şekil 1.1 AR sinyali (sol), AR'nin kinazlar ve fosfatazlar üzerindeki kontrolü ve etkileşimleri yoluyla bazı hücresel işlemin düzenlenmesi (sağ) (BioRender.com ile oluşturuldu) Venkadakrishnan et al., 2020).

1.2 UBİKÜİTİNASYON

Ubikuitin, tüm ökaryotlarda 76 amino asit rezidüsü içeren yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Farklı hücre tiplerinde ifade edildiği için (ubiquitous - her yerde) bu adı almıştır. Ubikuitinin karboksi terminalindeki glisin (Gly) rezidüsünün, kovalent bağ ile hedef protein üzerindeki lizin (K) amino asidinin e-amino grubuna konjugasyonu olarak bilinen ubikuitinasyon, ökaryotik hücrelerde protein yıkımının başlıca mekanizmasıdır. 1975'te ubikuitinin keşfedilmesinden bu yana (Goldstein et al., 1975), yapılan araştırmalar ubikuitin sisteminin hücre döngüsü, hücre içi sinyalizasyon, DNA onarımı, protein kalite kontrolü ve transkripsiyonel düzenlemede işlev gören proteinlerin degradasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ubikuitin konjugasyonu, E1 ubikuitin aktive edici enzim, E2 ubikuitin konjugasyon enzimleri (ubikuitin taşıyıcı protein) ve E3 ubikuitin ligazları ile katalize edilir (Hershko et al., 1998, Kuang et al., 2013, Jacomin et al., 2018, Grumati & Dikic, 2018).

Ubikuitin ilk olarak ATP'ye bağımlı olarak insanda iki adet farklı E1 enzimleri tarafından aktive edilir. E1'in sistein (Cys) rezidüsü ile ubikuitinin karboksi terminalindeki glisin (Gly) rezidüsü arasında enerji bakımından zengin olan tiyoester bağı oluşur. Böylece ubikuitin aktifleşmiş olur. Aktif ubikuitin daha sonra yaklaşık 38 farklı (insanlarda) ubikuitin konjuge eden enzimden (E2) birinin aktif bölgesindeki sistein (Cys) rezidüsüne tiyoester bağı ile bağlanır ve E2 enzime transfer edilmiş olur. Daha sonra ubikuitinin spesifik bir hedef proteine transferini sağlamak için bir ubikuitin ligaz (E3) hem E2'ye hem de hedef proteine bağlanır. E3 enzimi aracılığıyla ubikuitinin glisin (Gly) rezidüsü ile hedef proteinin lizin (Lys) rezidüsü arasında bir izopeptid bağı oluşur ve ubikuitin hedef proteine aktarılır, böylece ubikuitinlenmiş protein oluşur (Şekil 1.2) (Passmore & Barford, 2004, Haas & Rose, 1982, Haas et al., 1982).



Şekil 1.2 Ubikuitin-Proteazom Sistemi (Hatakeyama (2017)'dan uyarlanmıştır).

Bir tane ubikuitin bağlanmış olan hedef proteine birçok ubikuitin bağlanmasıyla ubikuitin zinciri oluşur ve bu zincir proteinin yıkımı için bir sinyal görevi görür. Deneysel kanıtların çoğu, zincirlerin substrata bağlı ubikuitinden başlayarak sırayla oluşturulduğunu göstermektedir, ancak zincirlerin E2 veya E3 üzerinde oluşturulduğuna ve substratlara blok halinde aktarıldığına dair kanıtlar da vardır (Bazirgan ve Hampton, 2008; Li vd., 2007; Ravid ve Hochstrasser, 2007; Wang ve Pickart, 2005). Zincir oluşumu ubikuitin üzerindeki yedi iç

lizin rezidüsü veya N terminusu aracılığıyla gerçekleşebilir (Vijay-Kumar vd., 1987; Behrends ve Harper, 2011; Clague ve Urbe, 2010).

Proteinler monoubikuitinlenebildiği gibi birden çok bölgeye ubikuitin bağlanması ile multi-monoubikuitinlenebilir ya da bir bölgeye bir ubikuitin zincirinin bağlanmasıyla poliubikuitinlenebilir. Ubikuitin modifikasyonunun türü, ubikuitin reseptörleri ve hedef protein üzerindeki ubikuitin zincirlerini kaldıran veya kesen ~100 farklı deubikuitinasyon enziminin (DUB) karşıt etkisi gibi diğer faktörlerle birlikte modifikasyonun işlevini belirler. Örneğin monoubikuitinasyon, proteinin hücre içi yerleşimi veya aktivitesini değiştirebilirken, poliubikuitinasyon genellikle proteinin proteazom tarafından tanınarak yıkıma gönderilmesini sağlar. Bu mekanizma, hücredeki hatalı veya hasar görmüş proteinlerin temizlenmesi, protein kalitesinin kontrolü ve çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesi açısından hayati öneme sahiptir. Ubikuitinasyon ve deubikuitinasyon süreçlerindeki aksaklıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, ubikuitin-proteazom sistemi, proteinlerin ömrünü ve işlevini düzenleyerek hücresel homeostazın korunmasına yardımcı olur.

1.3 E3 UBİKUITİN LİGAZLAR

Proteinler, E3'ler ile katalize edilen çoklu ubikuitin zincirleri oluşturmak üzere ek ubikuitinler eklenerek yıkım için işaretlenebilirler (Cooper ve Hausman, 2009). Ubikuitin molekülü, yedi dahili lizin (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ve K63) veya ilk metiyonin (M1) üzerinden ubikuitinlenir ve poliubikuitin zincirleri oluşturur (Sasaki et al., 2015). Bu şekilde çok sayıda ubikuitin eklenmiş proteinler proteazom adı verilen çok birimli proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkılırlar (Cooper ve Hausman, 2009). Proteazom aracılı degradasyonu takip edecek olan K11 veya K48'e bağlı ubikuitin zincirinin proteolitik fonksiyonuna ek olarak, son zamanlarda poliubikuitinasyonun proteolitik olmayan fonksiyonları bildirilmiştir. K63'e bağlı ubikuitin zinciri ve M1 (doğrusal)'e bağlı ubikuitin zincirleri gibi ubikuitin zincirlerinin proteolitik olmayan fonksiyonları bildirilmiştir. Bu fonksiyonlar arasında immünolojik sinyalizasyonda protein kinaz aktivasyonu, membran trafiği, DNA onarımı, hücre döngüsü düzenlenmesi, protein lokalizasyonu ve aktivitelerinin düzenlenmesi, otofaji, apoptoz ve kanser oluşumu bulunur (Sasaki et al., 2015).

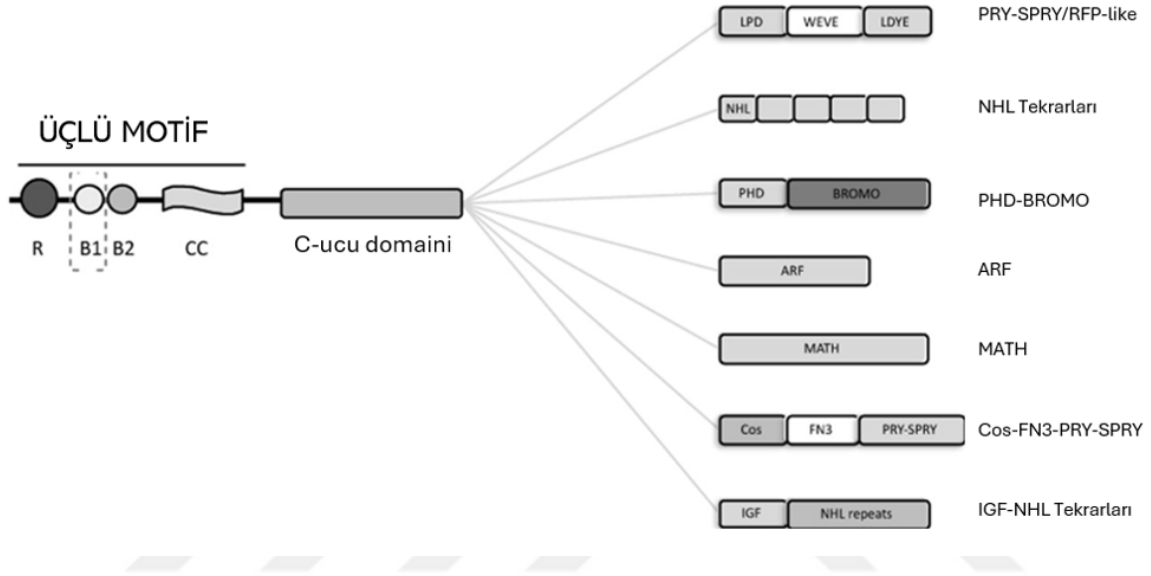
E3 ubiquitin ligazları, hedef proteinlerin tanınmasından doğrudan sorumludur ve sayıları E1 ve E2 enzimlerine kıyasla oldukça fazladır (insanlarda 600-1000). Domain özelliklerine göre, E3 ubiquitin ligazlar 4 aileye sınıflandırılmıştır: E6-AP COOH terminus homologu (HECT) ailesi, U-Box alanı içeren protein ailesi, RING-parmak içeren protein ailesi ve RBR E3'ler (Hatakeyama, 2017, Yang et al., 2021). E3 ligazların büyük çoğunluğu, gerçekten ilginç yeni gen (Really Interensting New Gene - RING) ve RING ile ilişkili E3'ler grubuna aittir (Deshaies ve Joazeiro, 2009).

RING parmağı küçük bir çinko bağlama alanı olup birçok farklı proteinde bulunmaktadır. Çalışmalar bu domainin E2 ubiquitin konjugasyon enzimleriyle etkileşime girerek ubiquitinasyonu teşvik edebileceğini göstermiştir. Bunun yanısıra RING parmağı içeren herhangi bir proteinin E3 ubiquitin ligaz olarak rol alabileceği düşünülmektedir (Saurin et al., 1996). RING'ler, E2 enzimlerinin bağlanabilmesi için iki Zn^{2+} iyonunu çapraz destekli bir düzende koordine eder. Kanonik RING'in temel dizi ifadesi Cys-X2-Cys-X(9-39)-Cys-X(1-3)-His- X(2-3)-Cys-X2-Cys-X(4-48)-Cys-X2-Cys'dir (X herhangi bir amino asittir). RING domainlerinin üç boyutlu yapısı; korunmuş sistein ve histidin rezidülerinin, bu domainin çekirdeğine gömüldüğünü ve burada iki çinko atomunu bağlayarak genel yapıyı korumaya yardımcı olduğunu göstermektedir. RING proteinlerinde bu alanla beraber çeşitli korunmuş motifler de gözlenmiştir. Bu motiflerin kompozisyonları göz önüne alınarak RING proteinleri alt ailelere ayrılmıştır. En büyük alt aile olan TRIM/RBCC, insanlarda ~80 temsilciye sahiptir ve bir/iki B box ve bir sarmal bobinin varlığı ile karakterize edilir (Meroni & Diez-Roux 2005, Sardiello et al., 2008).

1.3.1 TRIM Protein Ailesi

TRIM (tripartite motif family – üçlü motif ailesi) ailesi proteinleri, hücrelerde hücre içi sinyalizasyon, transkripsiyon, otofaji, doğal bağışıklık, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı ve karsinogenez gibi birçok farklı süreçte role sahiptir değişimleri nörodejeneratif hastalıklar, gelişimsel bozukluklar ve kanser gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Yaklaşık olarak 80 farklı TRIM proteininin varlığı bilinmektedir (Hatakeyama, 2017). TRIM ailesi proteinleri bir RING domaini, bir veya iki B box domaini, bir sarmal bobin (coiled coil) domaini ve bir değişken C-terminal domaini ile karakterize edilir (Reymond et al., 2001). Bu domainler aracılığıyla birçok hücresel proteinle etkileşimde bulundukları veya homodimer oluşturdıkları bilinmektedir (Hatakeyama, 2017). Ayrıca TRIM proteinlerinin C terminalinde de TRIM alt

ailelerinde farklı olmak üzere spesifik domainleri vardır: COS alanı, fibronektin tip III tekrarı (FNIII), PRY alanı, SPRY alanı, asit bakımından zengin bölge (ACID), filamin tipi IG alanı (FIL), NHL alanı, PHD alanı, bromodomain (BROMO), Meprin ve TRAF-homoloji alanı (MATH), ADP-ribosilasyon faktörü aile alanı (ARF) ve transmembran bölgesi (TM) (Şekil 1.3) (Short ve Cox, 2006).



Şekil 1.3 TRIM Ailesi Proteinlerinin Domainleri (Napolitano et al., 2011'den uyarlanmıştır).

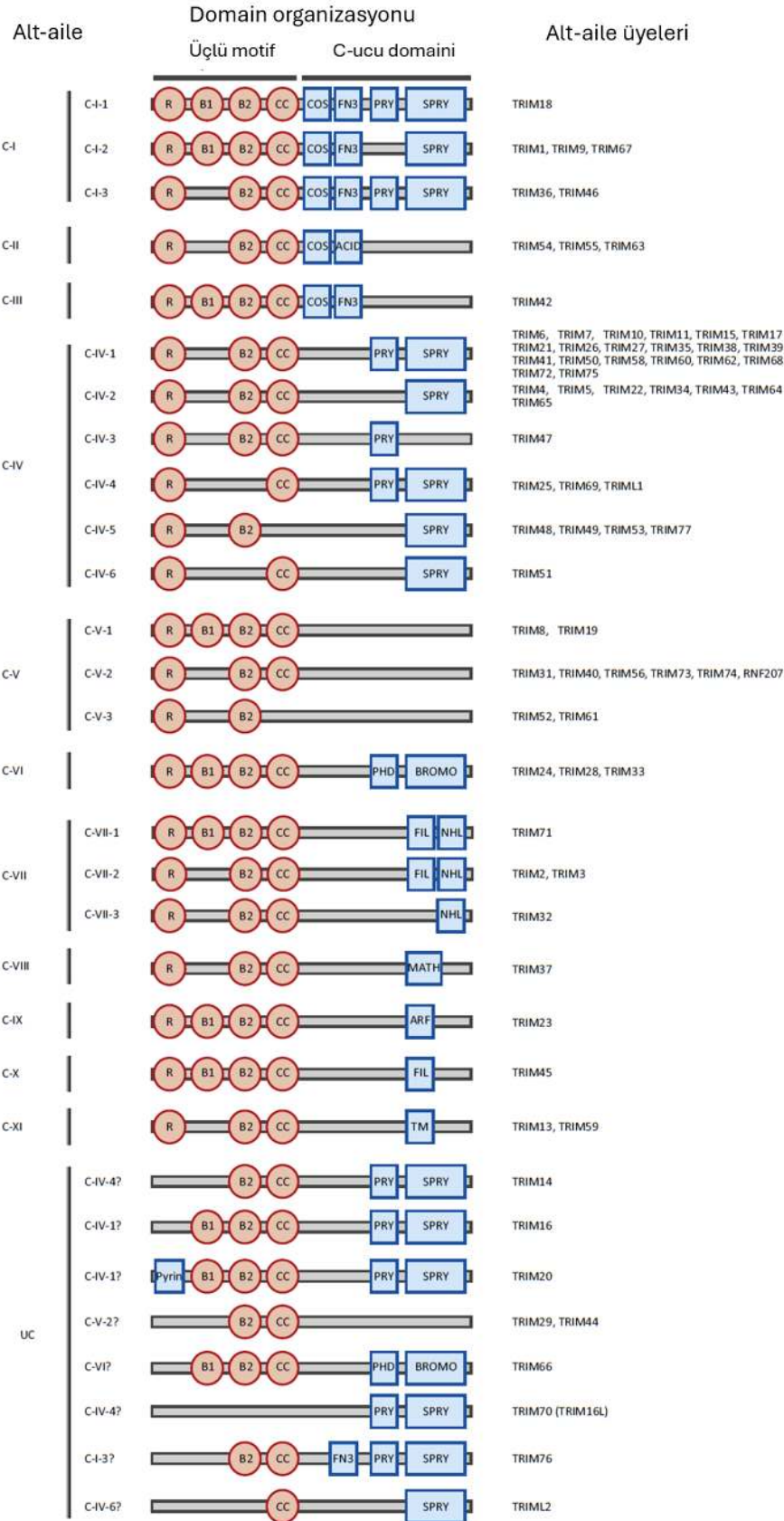
RING domaini nispeten kısadır (iki çinko iyonunu koordine eden sistein açısından zengin motif) ve bu dizi fonksiyonel olarak çeşitli proteinlerde bulunur (Borden ve Freemont, 1996). Histidin ve sisteinden zengin RING finger, ubiquitin'in bir E2 konjüge enziminden belirli bir hedef substrata transferine aracılık eden ve bunu yaparken sıklıkla proteazom tarafından imha edilecek substratı hedefleyen E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir (Xu et al., 2003). Birkaç TRIM proteininin de RING domaini üzerinden kendi kendini ubiquitine ettiği gösterilmiştir (Duan et al., 2008; Huang et al., 2013; Yamauchi et al., 2008). RING domaininden yoksun bazı TRIM proteinleri vardır. Örneğin; TRIM16'nın B-box domaini aracılığıyla E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Hatakeyama, 2017).

RING domaininin hemen downstreami, protein-protein etkileşimlerine aracılık eden başka bir çinko bağlayıcı motif olan B-kutusu (B-box)'dur. RING finger'a yapısal ve fonksiyonel benzerliği göz önüne alındığında, iki domainin nispeten yakın bir zamanda ortak bir atadan ayrıldığı öne sürülmüştür (Massiah et al., 2007). Histidin, sistein ve aspartik asitten

zenginlerdir. B-boxlar iki çeşide sahiptir: tüm TRIM proteinlerinde bulunan tip 2 B-box (B2) ve yarıdan daha az miktarda bulunan tip 1 (B1). İşlevleri tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak B2, T5a'da bulunan tek B-box motifi olup, burada T5 dimerlerinin yüksek dereceli oligomerizasyonunun bir supramoleküle birleşmesine aracılık ettiği bilinmektedir (Li and Sodroski, 2008). Ayrıca TRIM21'in otoinhibisyonunda rol aldığı gösterilmiştir (Dickson et al., 2018).

Sarmal bobin (coiled-coil, CC) motifi, yaklaşık 100 aminoasit içeren ve tüm TRIM ailesi üyelerinde B-box'ı takip eden yüksek oranda α –helical bir bölgedir. Bu alan her zaman hidrofobik rezidüler (özellikle lösin) açısından zengin olmasına rağmen, CC'lerin primer dizisinin farklı TRIM'ler arasında korunmuşluğu düşüktür (Goldstone vd., 2014). Bu bölge diğer CC içeren proteinlerle oligomerizasyon oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Reymond et al., 2001).

TRIM proteinleri, C terminal alanlarına dayanarak tek başına veya kombinasyon halinde 10 farklı motiften herhangi birini içerebilen 11 farklı alt gruba ayrılır (Ozato et al., 2008,). C-terminal alanı substrat alımını kolaylaştırır, fakat ilave rollerinin olabileceği de düşünülmektedir. Bunlarla beraber RING domaini bulunmayan TRIM'ler de tanımlanmış olup ayrı bir sınıf altında incelenmektedir (Şekil 1.4) (Hatakemaya, 2017).



Şekil 1.4 TRIM Proteinlerinin Sınıflandırılması (Hatakeyama, 2017’den uyarlanmıştır).

1.3.2 TRIM Proteinlerinin Fonksiyonları

TRIM ailesi proteinlerinin hücre içi sinyalizasyon, transkripsiyon, otofaji, doğal bağışıklık, hücre döngüsü, DNA onarımı ve karsinogenez dahil olmak üzere birçok önemli hücresel süreçte farklı roller üstlendikleri bilinmektedir.

TRIM proteinlerinden bazılarının otofajinin düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir. TRIM55/MuRF2, p62 ile etkileşime girdiği gösterilen ilk TRIM proteindir ve kas proteinlerinin yenilenme sürecinde rol oynar (Perera et al., 2011). TRIM ailesinin birkaç üyesinin ULK1 ve Beclin1 ile etkileşerek otofaji indüksiyonunu desteklediği gösterilmiştir (Fusco et al., 2018). TRIM5a gibi otofajiyi teşvik eden TRIM'lerin aksine, TRIM17 çeşitli seçici otofaji hedeflerini bozulmaya karşı korur. Bununla birlikte, TRIM17 aynı zamanda oto-antikorların ortadan kaldırılmasına da katkıda bulunur, bu nedenle hedefe bağlı olarak otofajiyi pozitif veya negatif olarak düzenler (Mandell et al., 2016).

TRIM proteinlerinin ubiquitinasyonu, otofaji ile ilişkili süreçlerdeki etkinliklerini doğrudan etkileyerek, bu proteinlerin hücresel homeostazın korunmasındaki ve stres yanıtındaki işlevlerini düzenler. TRIM13, endoplazmik retikulum zarında bulunan ve zar boyunca uzanan bir proteindir. Ayrıca, ubiquitin aracılı bir mekanizma ile çalışan ve endoplazmik retikulumun belirli bölümlerinin otofaji yoluyla parçalanmasında görev alan bir ER-faji (endoplazmik retikulum-faji) reseptörü olarak işlev görür (Ji et al., 2019). TRIM13, K63 bağlantılı ubiquitinasyon ile modifiye edildiğinde, bu protein p62 adlı başka bir adaptör proteiniyle birleşir ve TRIM13-p62 kompleksi oligomerizasyona uğrar. Oligomerleşen kompleksler ER bölmeleri ile birlikte ayrılır ve otofagozomlara hedeflenir (Ji et al., 2019). Otofagozomlar hücre içindeki atıkları lizozomlara taşır ve burada yıkılır.

TRIM32, atrofik koşullarda kas otofajisi için BECN1 tarafından düzenlenen otofaji proteini 1 (AMBRA1) ve ULK1'de aktive edici molekülü bağlayarak rol oynar ve K63'e bağlı poliubikuitin yoluyla ULK1 aktivitesini uyarır. (Di Rienzo et al., 2019).

TRIM proteinleri doğal bağışıklıkta da önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda tanımlanan TRIM proteinlerinin neredeyse yarısının doğal bağışıklık tepkilerini artırdığı gösterilmiştir, ancak TRIM'lerin bağışıklık sinyali sırasında olumsuz düzenleyici rollerinin olduğu da tespit edilmiştir (Versteeg, et al., 2013, Wynne, et al., 2014). TRIM52, NF-κB

sinyalinin etkinleştirir ve bu etkinleştirme RING domainine bağlıdır. Ayrıca TRIM52 ekspresyonu, tümör nekroz faktörü α (TNF α) ve interlekin 1b (IL-1b) ekspresyonu ile indüklenir. (Fan et al., 2017). TRIM38, TNFR ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) ile etkileşime girer ve K48'e bağlı poliubikütilasyonu ve dolayısıyla TRAF6'nın proteazomal degradasyonunu destekler (Zhao et al., 2012). TRIM7, TLR4 aracılı sinyalin pozitif bir regülatörü olarak işlev görürken (Lu et al., 2019), TRIM9 tip I interferon (IFN) sinyalleme sisteminin pozitif bir regülatörü ve NF- κ B aktivasyonunun negatif bir regülatörüdür. (Qin et al., 2016; Shi et al., 2014).

TRIM proteinleri; kanser, bulaşıcı hastalıklar, gelişimsel hastalıklar ve nöropsikiyatrik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Watanabe and Hatakeyama, 2017). Birçok TRIM proteininin hem tümör baskılayıcıları hem de onkogenler olarak kanserlerde çok yönlü rolleri vardır (Çizelge 1).

Çizelge 1.1 TRIM ailesine ait bazı genler ve bu genlerin farklı kanser türlerinde uğradıkları değişimler (Hatakeyama 2011).

Gen	Kanser Tipi	Değişim
TRIM8	Glioblastoma	Heterozigozite kaybı/delesyon
	Larinks kanseri	Nodal metastaz ilerlemesi ile korelasyon
TRIM19	Akut promiyelositik lösemi	Kromozomal translokasyon (RARA)
TRIM24	Papiller tiroit kanseri	Kromozomal translokasyon (MTC1)
	Karaciğer kanseri	Kromozomal translokasyon (BRAF)
	Meme kanseri	Artmış gen ekspresyonu
TRIM25	Ovaryum kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Meme kanseri	Erken teşhiste zorluk
	Endometriyal kanser	Azalmış gen ekspresyonu
TRIM27	Lenfoma	Kromozomal translokasyon (RET)
	Meme kanseri	Artmış gen ekspresyonu
TRIM29	Akciğer kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Mesane kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Kolon kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Ovaryum kanseri	Artmış gen ekspresyonu
	Endometriyal kanser	Artmış gen ekspresyonu
	Meme kanseri	Azalmış gen ekspresyonu
	Mide kanseri	Artmış gen ekspresyonu
TRIM33	Kronik miyelomonositik lösemi	Azalmış gen ekspresyonu
TRIM40	Kolon kanseri	Azalmış gen ekspresyonu
TRIM68	Prostat kanseri	Artmış gen ekspresyonu

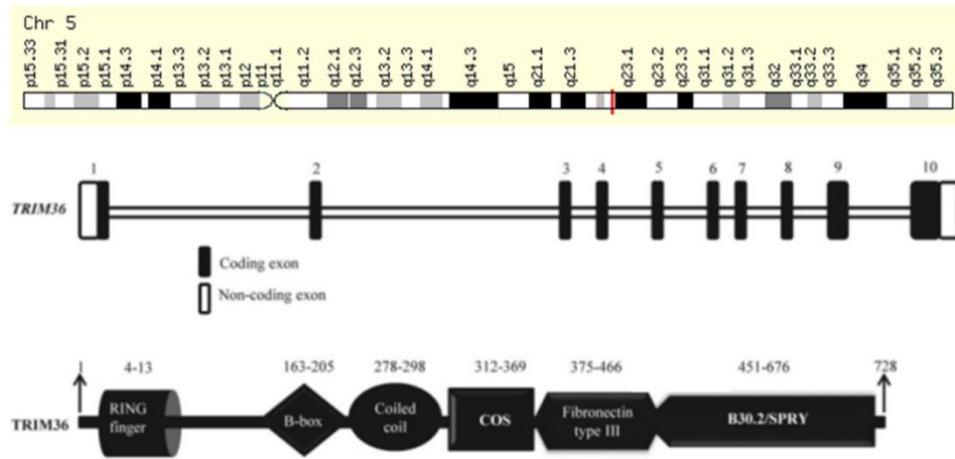
TRIM19'un translokasyonu akut promiyelositik lösemi (APL) patogenezinde yer alır. (Goddard et al., 1991). TRIM24, prostat kanseri hücrelerinde hücre büyümesini destekleyen ve mide kanseri ve hepatosellüler karsinomda bir proliferasyon regülatörü olarak rol oynayan onkojenik bir transkripsiyon aktivatörüdür. (Fang et al., 2017b; Groner et al., 2016). TRIM28'in over kanserinde tümör oluşumu (Hu et al., 2015) düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca TRIM28, B hücreli Hodgkin olmayan lenfomada (B-NHL) tümör gelişimini teşvik edici bir işlev gördüğü de gösterilmiştir (Zhang et al., 2018). TRIM22 ve TRIM24 degradasyon için p53'ü hedefler (Appikonda et al., 2016; Obad et al., 2004), TRIM13 aşırı ekspresyonu p53'ün stabilizasyonuna ve ardından apoptozun indüksiyonuna neden olur (Joo et al., 2011). TRIM29, Wnt / β -katenin sinyal yolunu düzenler ve mide kanserinde bir onkogen görevi görür (Qiu et al., 2015), TRIM8 glioma dokularında aşağı regüle edilir ve aktive edilmiş STAT (PIAS3) Protein inhibitörleriyle etkileşerek onları negatif olarak düzenler. (Micale et al., 2015; Okumura et al., 2010).

Bazı TRIM proteinleri hücre büyümesi ve hücre döngüsü aşamalarının kontrolünde önemli roller üstlenmektedir. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki; çoğu TRIM proteini susturulması G0/G1'deki hücrelerin yüzdesinin artması ve S veya G2-M fazlarındaki hücrelerin fraksiyonunun azalmasına yol açmaktadır. Özellikle TRIM8, TRIM14, TRIM27, TRIM28, TRIM29, TRIM52, TRIM59, TRIM66 ve TRIM68 ifade edilmemesi veya susturulması hücre döngüsünün durmasına yol açmıştır (Caratozzolo et al., 2012, Zhan et al., 2015, Chen et al., 2015, Qi et al., 2016, Xu et al., 2016, Airken et al., 2017, Tan et al., 2017, Liu et al., 2017, Benke et al., 2018, Zhang et al., 2018, Venuto et al., 2019, Mu et al., 2019). TRIM proteinleri; hücre döngüsü ve proliferasyonu için önemli rollere sahip p53 gibi proteinler, JAK/STAT gibi sinyal yolları üzerinde etkilidir. Hücre döngüsü düzensizliği, kontrol noktalarındaki bozukluklar DNA onarımının etkinliğini azaltarak kromozomal instabiliteye yol açabilir. Dolayısıyla hücre döngüsü bozuklukları kanser gelişimine ve ilerlemesine sebep olabilir. Mitoz bölünme esnasında kardeş kromatidlerin ayrılmasını sağlayan, mikrotübüllerin hatalı bağlanmasını önleyen kinetokor proteinlerinin proteolizini düzenleyen dolayısıyla kromozom ayrılmasında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan TRIM proteinlerinden biri TRIM36'dır (Miyajima et al., 2009).

1.3.3 TRIM36 / HAPRIN (Androjen Duyarlı Gen)

TRIM36 5q22.3 bölgesinde lokalize 55 kb genomik diziden (10 ekzon içerir) sentezlenen, C-I TRIM alt ailesine ait bir RBCC (RING, B-box, Coiled Coil) proteinidir. İlk olarak 2001 yılında tanımlanan TRIM36 (Reymond et al., 2001); 2004 yılında Balint ve ark. tarafından klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmaya göre 728 aminoasitten oluşan TRIM36 proteini bir RING finger, iki B-box, bir coiled-coil domaini, bir fibronektin tip III motifi ve bir C terminal domaininden oluşmaktadır (Şekil 1.5). Bu protein muhtemel bir nüklear lokalizasyon sinyali içermesine rağmen sadece sitoplazmada bulunduğu görülmüştür (Balint et al., 2004).

Bunların yanı sıra aynı çalışmada TRIM36 ekspresyonunun testis, prostat ve beyin dokularında yüksek olduğu, böbrek, akciğer ve kalpte ise düşük olduğu bulunmuştur. Birçok hücrede sentezlenmesine rağmen mitotik hücrelerde TRIM36'nın bulunmadığı gözlenmiştir (Balint et al., 2004). TRIM36'nın homodimerizasyonu ve mikrotübüllerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Short and Cox, 2006). 2009 yılındaki bir çalışmada ise; TRIM36'nın aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünü yavaşlattığı ve hücre büyümesini sınırladığı gözlenmiştir. (Miyajima et al., 2009).



Şekil 1.5 TRIM36'nın kromozomal lokalizasyonu, gen ve proteinini şematize edilmiş görüntüsü (URL-1).

2017 yılında yapılan bir çalışmada akraba evliliklerinden doğan ve anensefalisi olan 20 haftalık bir fetüste TRIM36 geninde homozigot missense mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyonun hücresel transfeksiyonu veya TRIM36'nın siRNA kullanılarak susturulması kontrollere kıyasla; bozulmuş mikrotübüller, düzensiz iğler, gevşek düzenlenmiş kromozomlar, anormal

hücre bölünmesi, azalmış hücre proliferasyonu ve artmış apoptoza yol açmıştır. Araştırmacılar mutant TRIM36'nın nöral tüp oluşumu sırasında nöral hücre proliferasyonunu olumsuz etkileyerek anensefaliye yol açtığı sonucuna varmıştır (Singh et al., 2017).

HeLa ve LN229 hücre hatlarında TRIM36'nın susturulması, mikrotübüllerin bozulmasına ve düzensiz mitotik iğlere yol açar (Singh et al., 2017). İğ üzerindeki etkiler, hücre proliferasyonunun azalması ve apoptozun artmasıyla ilişkilendirilebilir. Buna karşılık, eksojen TRIM36 ifade edildiğinde bu durumun tersinin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2017). Bununla birlikte, başka bir çalışmada NIH3T3'te TRIM36 aşırı ekspresyonunu takiben hücre büyüme hızında belirgin bir azalma olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada TRIM36'nın mitozdaki rolü, kromozom ayırımında önemli bir rol oynayan kinetokor proteinlerinden biri olan CENP-H ile etkileşimi ile açıklanmıştır (Miyajima et al., 2009). TRIM36, mikrotübül proteinlerinden biri olan tübülün ile kolokelize olduğu için mikrotübül yapısıyla spesifik olarak ilişkilidir ve yeni bir spesifik sentromer protein-H (CENP-H) bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır. TRIM36, CENP-H'yi doğrudan ubiquitinleştirmez ve parçalamaz, ancak CENP-H ile ilişkili proteinlerin proteolizine dahil olabilir (Miyajima et al., 2009). CENP-H, dış kinetokorun montajını yönlendirmede merkezi bir role sahip olan ve kinetokorlara gömülü mikrotübüllerin dinamiklerini düzenleyen bir sentromer proteindir (Hu et al., 2019). CENP-H aberan ekspresyonu kromozomun yanlış toplanmasına neden olur ve kanserlerde sıklıkla gözlenen kromozomal instabilitesinde önemli bir rol oynar (Matson et al., 2012, Tomonaga et al., 2005). TRIM36'nın aşırı eksprese edilmesi, hücre döngüsünü yavaşlatarak ve CENP-H'nin sentromerlere taşınmasını engelleyerek hücre büyümesini baskılar. Bu bulgu, TRIM36'nın kinetokor proteinlerinin kontrolünde rol oynadığını ve bunun kromozomal instabilite ile karsinogenez üzerindeki etkileriyle bağlantılı olabileceğini göstermektedir (Miyajima ve ark., 2009).

TRIM36'nın prostat kanserinde ekspresyon seviyesi yüksek olarak bulunmuş ve karsinogenez ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Balint et al., 2004). Ancak ilginç olarak 2018 yılında TRIM36 seviyesinin yüksek ekspresyonunun prostat kanserinde olumlu prognozla ilişkili olduğu ve hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra apoptozu da teşvik eden TRIM36'nın tümör baskılayıcı bir görevi olduğu ileri sürülmüştür (Kimura et al., 2018). Aynı yıl yayınlanan başka bir çalışmada TRIM36'nın prostat kanseri dokularında yüksek seviyede bulunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte sağkalım ve tümör gelişimi için kritik bir role sahip MAPK/ERK fosforilasyon yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir

(Liang et al., 2018). TRIM36 ekspresyon seviyesinin; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve özofagus kanserinde sağlıklı kontrollere oranla daha düşük olduğu bulunmuştur (Zhan et al., 2015, Zhang et al., 2020). Ayrıca insan nöroblastoma hastaları arasında, daha agresif seyirli olanlarda TRIM36'nın hipermetile olduğu ve düşük ekspresyona sahip olduğu bildirilmiştir (Olsson et al., 2016).

2022 yılında yapılan bir çalışmada TRIM36'nın glikolizle ilişkili protein HK2'nin ekspresyonunu ve prostat kanserinde nöroendokrin farklılaşmasını düzenleyerek glikolizi etkileyebileceğini ve bu düzenleyici mekanizmanın glikolitik inhibitörler ve HK2 inhibitörleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Zhao et al., 2022).



BÖLÜM 2

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 GEREÇ

2.1.1 Ekipmanlar

Buzdolabı (Altus)

Buzdolabı (Bosch)

CO₂'li İnkübatör (Nüve EC160)

Derin Dondurucu (Bosch)

Dikey Elektroforez Sistemi (Biorad)

Dondurucu -80 °C (Nüve)

Güç kaynağı (Biorad)

Hassas Terazı (Rad-Wag)

Inverted Mikroskop (euromex)

Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK 418)

Mikropipet seti (Sartorius)

Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan™ Sky, Cat. No. 51119600DP)

Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R Centrifuge)

Minisantrifüj (Isolab)

Otoklav (Nüve)

pH Metre (Hanna Instruments)

Real-time PCR Cihazı (BIO-RAD CFX96)

Steril kabin (Nüve MN120)

Su banyosu (Nüve NB9)

Termal Blok (Inovia UHB-1)

Thoma lamı (Marienfeld)

Vorteks (Weightlab WN-2800)

Western Blot Transfer Sistemi (Biorad)

2.1.2 Kimyasallar ve Kitler

Akrilamid/Bisakrilamid %30 (Biorad)

Amonyum persülfat (Sigma Aldrich)

Anti-GAPDH (FineTest GAPDH Antibody, Cat. No. FNab03343)

Anti-TRIM36 (Santa Cruz TRIM36 Antibody (SS-03): sc-100881)

Asetik asit (MERCK)

Bradford Reagent 5X (SERVA)

Bromofenol mavisi (MERCK)

BSA (Sigma Aldrich)

cDNA Sentez Kiti (cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (A.B.T.TM))

DMEM (gibco)

DMSO (Sigma Aldrich)

Etanol (Isolab)

FBS (gibco)

Glisin (Sigma Aldrich)

İzopropanol (Kimyalab)

Kristal viyole (MERCK)

Kromojenik Western Blot Kiti (WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit, Cat. No. WB7103)

L-glutamin (gibco)

Metanol (MERCK)

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (SERVA)

PBS (gibco)

Penisilin/Streptomisin (gibco)

Proteaz inhibitör kokteyli (SERVA)

Protein ladder (GeneDireX)

Rapamisin (LC Laboratories)

RIPA Buffer (SERVA)

PureLink™ RNA Mini Kit (invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

Scrambled Kontrol siRNA (Dharmacon™ ON-TARGETplus Non-Targeting Control siRNA D-001810-02-05)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma Alrich)

siRNA Transfeksiyon Ajanı (siRNA transfection reagent, Santa Cruz sc-29528)

SYBR Green Kit (2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX) (A.B.T.™))

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma Alrich)

TRIM36 siRNA (Santa Cruz Biotechnology sc-91989)

Tripan mavisi solüsyon (gibco)

Tripsin-EDTA (gibco)

Tris base (Sigma Aldrich)

TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific)

2-merkapttoetanol (MERCK)

2.1.3 Besiyeri ve Solüsyonlar

%10 Serumlu Besiyeri (Tamamlanmış besiyeri)

445 ml DMEM (high glucose, +L Glutamine)

50 ml 10X FBS

5 ml 100X penisilin/streptomisin

Dondurma Besiyeri

1 ml DMSO

9 ml %10 serumlu medyum

MTT Solüsyonu

5 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

1 ml 1X PBS

Rapamisin Stok Solüsyonu (54,694 mM)

50 mg Rapamisin

1 ml DMSO'da çözülür.

(Rapamisin solüsyonu hazırlandıktan sonra -20°C'de 3 ay saklanabilir.)

%10 SDS Solüsyonu

10 g SDS

Ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

%10 APS Solüsyonu

10 g amonyum persülfat

Ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

(APS solüsyonu taze hazırlanmalıdır, 4°C'de 2 hafta saklanabilir.)

%0,5 Krisal Viyole Solüsyonu

0,5 g kristal viyole

100 ml %25 metanol ile çözülür.

4X Laemmli Yükleme Tamponu

4 ml gliserol

2,4 ml Tris-HCl (1M, pH6,8)

0,8 g SDS

4 mg bromofenol mavisi

0,5 ml 2-merkaptoetanol

3,1 ml ultra saf su

%12 Ayırma Jeli

3,86 ml Ultra saf su

3,05 ml %30 Akrilamid:Bisakrilamid Solüsyonu

3 ml Tris-HCl (1,5M pH 8,8)

120 µl %10 SDS

120 µl %10 APS

12 µl TEMED

%5 Yükleme Jeli

2,92 ml Ultra saf su

540 µl %30 Akrilamid:Bisaakrilamid Solüsyonu

500 µl Tris-HCl (0,5M pH 6,8)

40 µl %10 SDS

40 µl %10 APS

4 µl TEMED

10X Elektroforez Yürütme Tamponu

30,3 g Tris base

144 g Glisin

10 g SDS

Ultra saf su ile 1000ml'ye tamamlanır.

10X Transfer Tamponu

30,29 g Tris base

144,1 g Glisin

Ultra saf su ile 1000ml'ye tamamlanır.

(1X' e seyreltirken 200 ml metanol, 100 ml 10X Transfer Tamponu, 700 ml ultra saf su karıştırılır.)

Kromojenik Western Blot Kiti – Bloklama solüsyonu

14 ml Ultra saf su

4 ml Diluent A

2 ml Diluent B

Kromojenik Western Blot Kiti – Antikor yıkama solüsyonu

150 ml Ultra saf su

10 ml 16X Wash Solüsyonu

Primer Antikor Solüsyonu

10 ml Bloklama Solüsyonu içinde üretici firmanın talimatına göre hazırlanır.

2.1.4 Doku Örnekleri

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri tanısı alan ve mastektomi endikasyonu olan hastalardan onayları dahilinde; mastektomi sonrasında ince iğne aspirasyon biyopsisi ile tümör dokusundan ve en az 5 cm uzaklıktaki normal dokudan (yaklaşık 50 mg ağırlığında) alınmıştır. Dokular TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) içerisine alınmış, RNA izolasyonu yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.5 Hücre Hatları

MCF-7 (ATCC HTB-22, ER+ PR+ HER2-) ve MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, ER- PR- HER2-) insan meme kanseri hücre hatları, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Figen Celep Eyüpoğlu'ndan temin edilmiştir.

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Dokulardan RNA İzolasyonu

Dokudan RNA izolasyon kiti PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Cat. No: 12183018A) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu üreticinin aşağıda belirtilen yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir:

- ✓ Dokular tartılır, her 30 mg doku için 0,6 ml Lysis Buffer deney tüplerine aktarılır ve doku içine konur (Her 1 ml Lysis Buffer'a 10 µl 2-merkaptoetanol eklenmelidir. Taze hazırlanmalıdır).
- ✓ Doku mekanik homojenizatör yardımıyla 30-40 sn boyunca tamamen parçalanana kadar homojenize edilir. Daha sonra 2600 g'de 5 dk santrifüjlenir.
- ✓ Süpernatant yeni bir tüpe aktarılır. Süpernatant hacmi kadar hacimde %70 etanol tüpe eklenir. Karışım homojen olana kadar vortekslenir.

- ✓ Karışımın 700 µl'si spin kolona aktarılır. 12000 g'de 15 sn santrifüjlenir. Toplama tüpüne akan sıvı faz atılarak tüp kolona geri takılır. Bu adım bütün homojenat bitene kadar tekrarlanır.
- ✓ Spin kolona 700 µl Wash Buffer I eklenir. 12000 g'de 15 sn santrifüjlenir. Toplama tüpü akan sıvı faz ile birlikte atılır. Kolona yeni toplama tüpü takılır.
- ✓ 500 µl Wash Buffer II kolona eklenir (Wash Buffer II şişesine kullanmadan önce 60 ml %96-100'lük etanol eklenmelidir.). 12000 g'de 15 sn santrifüjlenir. Toplama tüpüne akan sıvı faz atılarak tüp kolona geri takılır. Bu adım 1 kere tekrarlanır.
- ✓ Membranın kuruması için 12000 g'de 1 dk santrifüjlenir. Toplama tüpü atılır. Kolon RNaz-free bir ependorf tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Kolonun merkezine 30-100 µl RNaz-free su eklenir. ≥ 12000 g'de 2 dk santrifüjlenir. Pürifiye edilmiş RNA -80 °C'de muhafaza edilir.

2.2.2 RNA Konsantrasyon ve Safliklarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve safliklarının ölçülmesi mikropilaka ve µDrop pilaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan™ Sky, Cat. No. 51119600DP) gerçekleştirilmiştir. 230, 260 ve 280 nm dalgaboylarında ölçüm alınarak örneklerin konsantrasyon ve saflikları belirlenmiştir. Blank olarak Purelink™ RNA Mini Kit içindeki RNaz-free su kullanılmıştır.

Ölçümler her RNA örneğinden 2 µl kullanılarak 260, 280 ve 230 nm dalga boylarındaki absorbanlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin ekspresyon analizlerinde kullanılabilir olması için A260:A280 nm dalga boylarındaki absorban oranının 1.8- 2.0 aralığında, A260:A230 nm dalga boylarındaki absorban oranının ise 1.7' den büyük olması beklenmektedir. RNA örneklerinin A260 ölçümü ile belirlenen konsantrasyon değerinin 40 µg/ml'den yüksek olması beklenmiş, 260 nm dalga boyunda µg/ml cinsinden gerçekleştirilmiştir.

2.2.3 cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (A.B.T.™) kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez, kit üreticisinin protokolüne uygun olarak son hacimde 1X Reaction Buffer, 2.5 mM dNTP mix, 50 uM random hexamer, 200 U/µl reverse transcriptase ile 0.5 µl RNase inhibitor, 10 ul RNA ve 3.5 µl RNaz'sız su eklenerek toplam 20

ul hacimlik reaksiyonda, 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, konsantrasyonları ve saflıkları mikrolaka ve µDrop plaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan™ Sky, Cat. No. 51119600DP) ölçüldükten sonra kullanılıncaya dek -20°C'de saklanmıştır.

2.2.4 Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

Sentezlenen cDNA'lar ile 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX) (A.B.T.™) kullanılarak gerçek zamanlı PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kantitatif Real Time PCR deneylerinde Real Time PCR Cihazı (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) kullanılmıştır. GAPDH geni için üretici firmanın talimatlarına uygun olarak primer ve kalıp konsantrasyonları optimize edilmiş, 1, 1/10, 1/100, 1/1000 konsantrasyonlarda kalıp kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiş, standart eğri oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi ile tek bölge çoğaltımı doğrulanmıştır. Deneyler 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. GAPDH geni için reaksiyon son hacimde 1X MasterMix, 0.5 µM forward ve reverse primer, 2 µl cDNA ile 20 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR deneyleri 95 °C'de 10 dk ve ardından 40 döngü olmak üzere 95 °C'de 15 sn 62 °C'de 45 sn koşullarında gerçekleştirilmiştir.

TRIM36 geni için 1, 1/2, 1/4, 1/8 konsantrasyonlarda kalıp kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiş, standart eğri oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi ile tek bölge çoğaltımı doğrulanmıştır. Deneyler 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. TRIM36 geni için reaksiyon son hacimde 1X MasterMix, 0.4 µM forward ve reverse primer, 1.8 µl cDNA ile 20ul toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR deneyleri 95 °C'de 5 dk ve ardından 40 döngü olmak üzere 95 °C'de 15 sn 62 °C'de 45 sn koşullarında gerçekleştirilmiştir.

$2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile tümörlü ve normal dokulara ait TRIM36 ekspresyonlarının kontrole göre (GAPDH) kat değişimleri belirlenmiştir.

2.2.5 Hücre Kültürü

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları laboratuvarımıza dondurulmuş halde kuru buz ile ulaştırılmıştır. Dondurulmuş hücrelerin açılması için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- ✓ Kriyoviallerdeki hücreler 37 °C'de çözünene kadar inkübe edilir.
- ✓ Çözündükten sonra içerisinde 2 ml %10 serumlu tamamlanmış besiyeri bulunan 15 ml'lik bir falkon tüpüne aktarılır. 1200 g'de 5 dk santrifüjlenir.
- ✓ Santrifüj sonrasında süpernatant dökülür. Hücre peleti üzerine 4 ml taze besiyeri eklenir. Yavaşça pipetaj yapılır ve sonrasında T25 flaska ekim gerçekleştirilir. Invert mikroskop ile incelenerek 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılır.

Hücreler ekildikten 3 gün sonra besiyeri değişimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için;

- ✓ Flasktaki besiyeri çekilerek atılır.
- ✓ 1 ml PBS ile flask yüzeyi yıkanır, PBS toplanarak atılır.
- ✓ T25 flask için 4 ml taze besiyeri kenardan eklenerek flask tabanına yayılır. Invert mikroskop ile incelenerek 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılır.

Besiyeri değişimden 3-4 gün sonra, hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında hücreler pasajlanmıştır. Bunun için;

- ✓ Flasktan besiyeri, serolojik pipet yardımıyla çekilerek atık kabına aktarılır. Hücrelerin kalkmasını önlemek için flaskın karşı duvarına gelecek şekilde 1 ml PBS eklenir ve hücreler yavaşça çalkalanarak yıkanır.
- ✓ Serolojik pipet yardımıyla PBS ortamdan uzaklaştırılır. Bu işlem tripsinin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla yapılır.
- ✓ Flaska 1ml Tripsin/EDTA solüsyonu eklenir. Yüzeyin tamamını kapladıktan emin olunduktan sonra 37°C'de 3dk inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanır.
- ✓ Mikroskopta hücrelerin kalktığı gözlemlendikten sonra Tripsin/EDTA solüsyonunun iki katı kadar besiyeri ilave edilir. Flaskın yüzeyi iyice yıkanarak serolojik pipet ile 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplanır.
- ✓ 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelete 1 ml besiyeri eklenir. Pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde homojen dağılması olarak sağlanır.
- ✓ Sayım için 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne 10 µl hücre ve 10 µl tripan mavisi eklenir. Pipetaj yapıldıktan sonra hemositometreye konur ve mikroskopta sayım yapılır.
- ✓ Sayılan hücre sayısı x dilüsyon katsayısı x 10000 formülü ile 1 ml besiyerinde kaç hücre olduğu hesaplanır ve santrifüj tüpüne besiyeri eklenerek sulandırılır.
- ✓ T25 flasklardan her birine 750.000 hücre ekilecek şekilde hesaplama yapılarak belirlenen hacim flaska aktarılır. Flaskta toplam 4 ml besiyeri olacak şekilde son hacim

serumlu besiyeri ile tamamlanır. Invert mikroskop ile incelenerek 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılır.

- ✓ Dondurulmak istenen hücreler santrifüj sonrasında 1.000.000 hücreye 1 ml olmak üzere dondurma besiyerinde (%90 DMEM, %10 DMSO) çözündürülür. Kriyoviallere 1'er ml olacak şekilde aktarılır. -20 °C'de 1 saat, -80 °C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılır.

2.2.6 Sitotoksisite Testi (MTT Testi)

MTT testi rapamisin'in farklı konsantrasyonlarının hücrelere olan sitotoksik etkisini ölçmek ve IC₅₀ değerine ulaşabilmek için de kullanılmıştır. Rapamisin (50mg) üreticinin talimatına uygun olarak 1ml DMSO'da çözülmüştür. Tamamlanmış besiyeri ile istenen konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Optimizasyonlar sonucu karar verilen konsantrasyonlar MCF7 için; 0, 10, 25, 50, 75, 100, 200 nM ile MDA-MB-231 hücreleri için; 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 µM'dır. Hücrelere uygulanan ilaç konsantrasyonları DMSO'nun toksik olduğu dozun altında (<%1) kalacağı şekilde düzenlenmiştir. Farklı rapamisin konsantrasyonları belirlenmiş ve bu konsantrasyondaki ilaçlar 3 tekrar halinde hücrelere uygulanmıştır. Bunun için aşağıdaki yönergeler takip edilmiştir:

- ✓ 96 kuyulu plakalara 24, 48 ve 72. saatlerde ölçüm alınacak ve her ölçümden 3 tekrar olacak şekilde kontrol, DMSO-kontrol ve farklı konsantrasyonlarda rapamisin içeren besiyeri uygulanmak üzere 10'ar bin hücre/kuyu tam besiyeri ile ekilir. Bir gün hücrelerin tutunması beklenir.
- ✓ Ertesi gün besiyerleri çekilip atılır. Kontrole yine tam besiyeri, diğer kuyulara ilaçlı besiyeri eklenir. 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılır.
- ✓ İnkübasyon sonrasında MTT testi için besiyeri çekilip atılır ve yerine 190 µl besiyeri ile 10 µl 5mg/ml MTT eklenir. 4 saat karanlıkta inkübe edilir.
- ✓ İnkübasyon sonrası besiyeri çekilip atılır. 100 µl DMSO eklenir. 20 dk oda sıcaklığında karanlık bir ortamda çalkalayıcıda inkübe edilir. 570 nm'de mikropłaka okuyucuda ölçüm alınır.
- ✓ Kontrol grubunda canlılık oranı %100 kabul edilerek diğer kuyulardaki % canlılık oranı hesaplanır. Hücrelerin yarısının öldüğü doz IC₅₀ değeri olarak belirlenir.

2.2.7 siRNA Transfeksiyonu

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine ayrı ayrı TRIM36 siRNA (siTR36) (Santa Cruz Biotechnology sc-91989), kontrol siRNA (siNC) (Dharmacon™ ON-TARGETplus Non-Targeting Control siRNA D-001810-02-05) ile tek başına transfeksiyon ajanı (siRNA transfection reagent, Santa Cruz sc-29528) üretici firmanın protokolüne göre uygulanmıştır. Kontrol olarak hiç uygulama yapılmamış hücreler de kullanılmıştır. Bunun için aşağıdaki yönerge takip edilmiştir:

- ✓ 6 kuyulu plakalara 3 tekrar olmak üzere kontrol, transfeksiyon ajanı, siNC ve siTR36 uygulanmak üzere 200'er bin hücre/kuyu antibiyotiksiz besiyeri ile ekilir. Bir gün hücrelerin tutunması beklenir.
- ✓ Ertesi gün kuyu başına 100 pmol siRNA ve 250 µl serumsuz besiyeri yavaşça karıştırılarak birleştirilir. 5 dk RT inkübe edilir. Başka bir tüpte kuyu başına 5 µl transfeksiyon ajanı ve 250 µl serumsuz besiyeri yavaşça karıştırılır. 5 dk RT inkübe edilir. 5 dk sonunda bu iki tüpteki karışım yavaşça pipetaj yapılarak birleştirilir ve 20 dk RT inkübe edilir.
- ✓ 20 dk sonunda bu karışımdan 500 µl kuyulara yavaş yavaş eklenir. 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılır.
- ✓ 4-6 saat sonra besiyeri değiştirilerek serumlu antibiyotikli besiyeri eklenebilir. 48 saat boyunca 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası protein izolasyonu yapılır.

2.2.8 Rapamisin uygulaması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine rapamisinli besiyeri veya DMSO'lu besiyeri (IC50 çalışmaları sonunda belirlenen dozlardaki DMSO oranına uygun olarak MCF-7 için %0,0002, MDA-MB-231 için %0,076 oranında DMSO içeren besiyeri) uygulanmış ve 24 saat inkübasyondan sonra protein izolasyonu yapılmıştır. Kontrol olarak uygulama yapılmamış hücreler kullanılmıştır. Bunun için aşağıdaki yönergeler takip edilmiştir:

- ✓ 6 kuyulu plakalara 3 tekrar olacak şekilde kontrol, DMSO-kontrol ve rapamisin içeren besiyeri uygulanmak üzere 200'er bin hücre/kuyu tam besiyeri ile ekilir. Bir gün hücrelerin tutunması beklenir.

- ✓ Ertesi gün besiyerleri çekilip atılır. Kontrol kuyusuna yine tam besiyeri, DMSO-kontrol kuyusuna DMSO içeren besiyeri ve diğer kuyulara rapamisinli besiyeri (MTT ile belirlenen konsantrasyonlarda) eklenir. 37 °C'deki %5 CO₂'li etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası protein izolasyonu yapılır.

2.2.9 siRNA ve Rapamisin Kombine Uygulaması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine ayrı ayrı siTR36, siNC ve sadece transfeksiyon ajanı transfekte edilmiştir. Kontrol olarak uygulama yapılmamış hücreler kullanılmıştır. 48 saat sonra hücrelere uygun konsantrasyonlarda rapamisinli besiyeri veya DMSO'lu besiyeri (kontrol grubuna) uygulanmış ve 24 saat inkübasyondan sonra protein izolasyonu yapılmıştır.

2.2.10 Protein İzolasyonu

Transfeksiyon ve ilaç deneyleri için uygulama yapılan 6 kuyulu plakalardaki hücrelerden protein izolasyonu yapmak için RIPA Buffer (SERVA – Cat. No. 39244) kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre aşağıdaki protokol izlenmiştir:

- ✓ Kullanmadan hemen önce proteaz inhibitörü (SERVA – Cat. No. 39102.01) eklenir.
- ✓ Hücrelerden besiyeri çekilip atılır.
- ✓ Soğuk PBS ile 2 defa yıkanır.
- ✓ 1 ml soğuk RIPA Buffer eklenir.
- ✓ 5 dk buz üzerinde inkübe edilir. Hücreler kazınır. Lizat mikrosantrifüj tüpüne toplanır.
- ✓ 14.000 g'de 15 dk santrifüjlenir.
- ✓ Protein içeren süpernatant yeni tüpe aktarılır. Kullanılincaya kadar -20 °C'de saklanır.

2.2.11 Total Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin ilerleyen deneylerde kullanılacak miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi ile konsantrasyonları belirlenmiştir. Bunun için Bradford Reagent (SERVA – Cat. No. 39222) kullanılmış ve aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- ✓ Standart serisi olmak üzere bovin serum albümin (BSA) kullanılarak 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

- ✓ 2 hacim Bradford Reagent ve 5,5 hacim ddH₂O birleştirilerek dilüe Bradford solüsyonu elde edilmiştir.
- ✓ 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 50 µl standart/örnek, 200 µl dilüe Bradford solüsyonu eklenir. 5 dk RT inkübe edilir.
- ✓ Mikroplaka okuyucuda 595 nm dalgaboyunda ölçüm alınır.
- ✓ Standartların ölçüm sonuçları kullanılarak bir standart grafiği çizilir. Bu grafiğin denklemine göre konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

2.2.12 SDS Page Elektroforezi ve İmmünoblotlama

Rapamisin uygulanmış ve/veya siRNA ile transfekte edilmiş hücre grupları ve kontroller için kullanılacak hücre gruplarından; protein izolasyonu yapıldıktan ve Bradford yöntemi ile total protein konsantrasyonları belirlendikten sonra %4 yükleme, %12 ayırma jeli kullanılarak SDS-PAGE jel elektroforeziyle proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlanmıştır. Jele kuyucuk başına 10µg protein girilmiştir. Yüklemeden önce proteinler 4X Laemmli yükleme tamponu ile uygun oranlarda karıştırılmış ve 95 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 90V’ta 30dk ve ardından 120V’ta 90 dk elektroforez sonrası jeldeki proteinler ıslak transfer yöntemi ile nitroselülöz membrana aktarılmış ve membranlar sırasıyla önce blocker solüsyonu ile bloke edilmiş, sonrasında birincil ve ikincil antikorla muamele edilmiştir. Membranlara substrat eklendiğinde çıplak gözle görülebilen protein bantları oluşmuş ve membranlar fotoğraflanmıştır. İmmünoblotlama deneyinde birincil antikor olarak TRIM36 antikor (Santa Cruz TRIM36 Antibody (SS-03): sc-100881) ve kontrol olarak GAPDH antikor (FineTest GAPDH Antibody, Cat. No. FNab03343) kullanılmıştır. Bu işlem kromojenik western blot kitiyle (WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit, Cat. No. WB7103) gerçekleştirilmiş olup aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- ✓ Plastik bir kaba bir miktar 1X blotlama tamponu konulur ve kabın içinde 8 adet filtre kâğıdı ıslatılır. Anottan başlanarak fiber ped ve ıslatılan filtre kağıtlarından 4 tanesi transfer kasetinin içerisine yerleştirilir ve üzerinde bir roller ile gezilerek baloncuk varsa çıkarılır.
- ✓ Jelin boyutunda kesilen bir nitroselülöz membran transfer tamponunda ıslatılır ve transfer kasetine yerleştirilir. Tekrar baloncuklar çıkarılır.
- ✓ Jel cam plakaların arasından çıkarılır ve transfer tamponunda ıslatıldıktan sonra kasete yerleştirilir. Baloncuk varsa çıkarılır.

- ✓ Son 4 adet filtre kâğıdı transfer tamponu içinde ıslatılır ve jelin üzerine gelecek şekilde kasete yerleştirilir ve baloncuklar çıkarılır. Sonrasında tekrar bir fiber ped yerleştirilir. Bu aşamada membranın anota jelin ise katoda yakın olmasına dikkat edilmelidir.
- ✓ Transfer kaseti kapatılır ve transfer sistemine yerleştirilir. 240 mA ile 90 dk boyunca transfer gerçekleştirilir.
- ✓ Transferden sonra membranlar 2 defa 5'er dk 20 ml ddH₂O içinde yıkanır.
- ✓ 10 ml Blocking Solution içinde 30 dk bloklama aşaması için oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilir.
- ✓ 2 defa 20 ml ddH₂O içinde 5 dk yıkanır.
- ✓ 10 ml primer antikor solüsyonu içinde 4 °C'de gece boyunca inkübe edilir.
- ✓ Ertesi gün membran 4 defa 5'er dk 20 ml antibody wash solüsyonu içinde yıkanır.
- ✓ 10 ml sekonder antikor solüsyonu içinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
- ✓ Membranlar daha sonra 4 defa 5'er dk antibody wash solüsyonu ile 3 defa 2'şer dk ddH₂O içinde yıkanır. Membranlar kurumadan 5 ml kromojenik substrat içine alınır ve bantlar oluşuncaya kadar (1-60 dk) inkübe edilir.
- ✓ Bantlar oluşunca 20 ml ddH₂O içinde 2'şer dk 2 defa yıkanır, kuru bir filtre kâğıdı üzerinde membran kurutulur ve daha sonra fotoğraflanır.

2.2.13 Koloni-Oluşum Deneyi

Hücre proliferasyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Yukarıda tarif edildiği gibi hücrelere ilaç ve/veya siRNA uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hücreler kaldırılarak 12 kuyulu plakalara 400'er hücre (her bir koşul için 3 tekrar) ekilmiş, 2 günde bir besiyeri değiştirilerek 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1X PBS ile kuyular yıkanmış, 30 dk oda sıcaklığında metanol ile fikse edilmiştir. Daha sonra 30 dk oda sıcaklığında %0,5 kristal viyole ile boyanmıştır. Süre sonunda kuyular yıkanarak oluşan koloniler (≥ 50 hücre/koloni) sayılmış ve fotoğraflanmıştır.

2.2.14 Yara İyileşmesi Deneyi

Hücre migrasyon ve proliferasyonunun değerlendirilmesinde yara iyileşmesi deneyi kullanılmıştır. 3'er tekrar olarak 12 kuyulu plakalara kuyu başına 12×10^4 hücre ekilmiş, ilaç ve/veya siRNA uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler %90 yoğunluğa ulaştığında kuyular PBS ile yıkanarak serumsuz besiyeri eklenmiş ve 200 µl'lik pipet ucu ile lineer bir yarık

oluşturularak fotoğraflanmıştır (0. saat). Yapay yara bölgesine hücrelerin göçü belirli zaman noktalarında (0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatler) mikroskopi ile izlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Yara alanları; ImageJ programı kullanılarak hesaplanmış ve 0. Saatlere kıyasla yara kapanma yüzdeleri her saat için belirlenmiştir.

2.2.15 İstatistiksel Analiz

Meme kanseri hastalarının dokularının kullanıldığı deneyler için örneklem büyüklüğü ortalama etki değeri (Cohen's $d=0,5$) kullanılarak hesaplanmıştır. GPower 3.1.9.7 yazılımı kullanılarak yapılan hesaplamalara göre, %80 güç ve $\alpha < 0,05$ güven seviyesi sağlamak için gerekli olan minimum örnek sayısı hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 29.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testiyle belirlenmiştir. qRT-PCR deneylerinde 2 grup arasındaki karşılaştırmalar için parametrik olmayan ilişkili gruplar t-testi (Wilcoxon işaretli sıralar testi), hücre hatlarının kullanıldığı immünoiblotlama, yara iyileşme ve koloni oluşum deneylerinde 4 grup arasındaki karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlı farklılığın belirlenmesinde Post-hoc Tukey testi kullanılmıştır. Testler sonucunda p değeri 0.05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

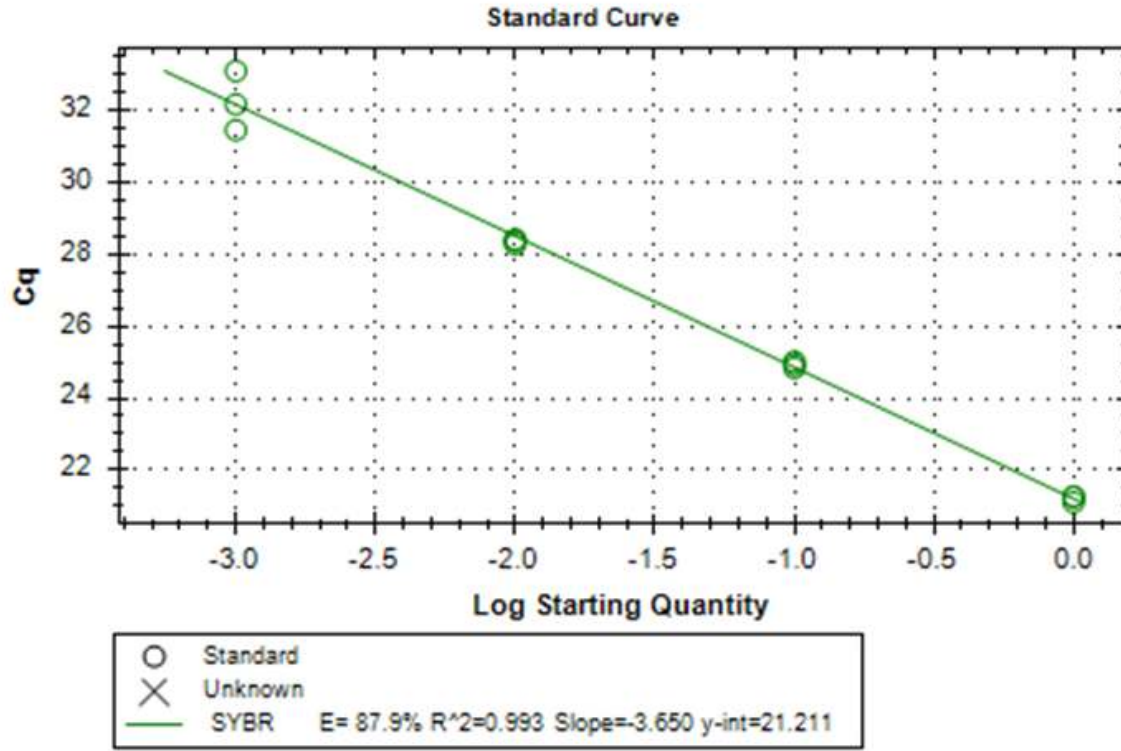
BÖLÜM 3

BULGULAR

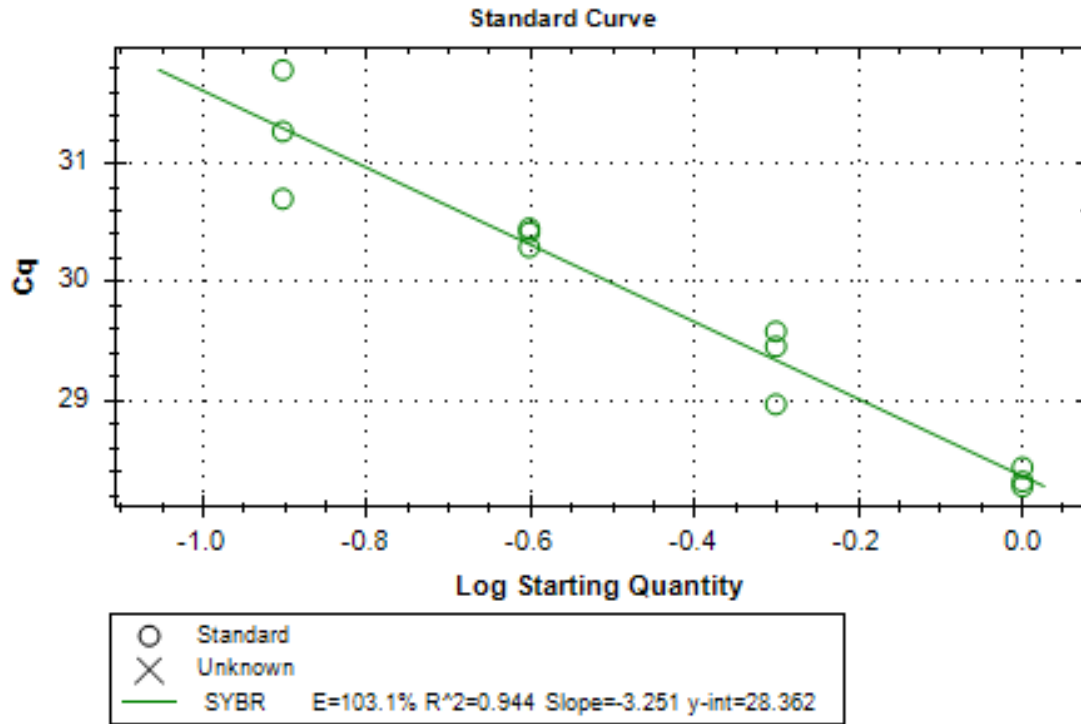
3.1 DOKU DENEYLERİ BULGULARI

3.1.1 Meme Kanseri Hastalarının Tümör ve Normal Dokularında Rölatif TRIM36 Mrna Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

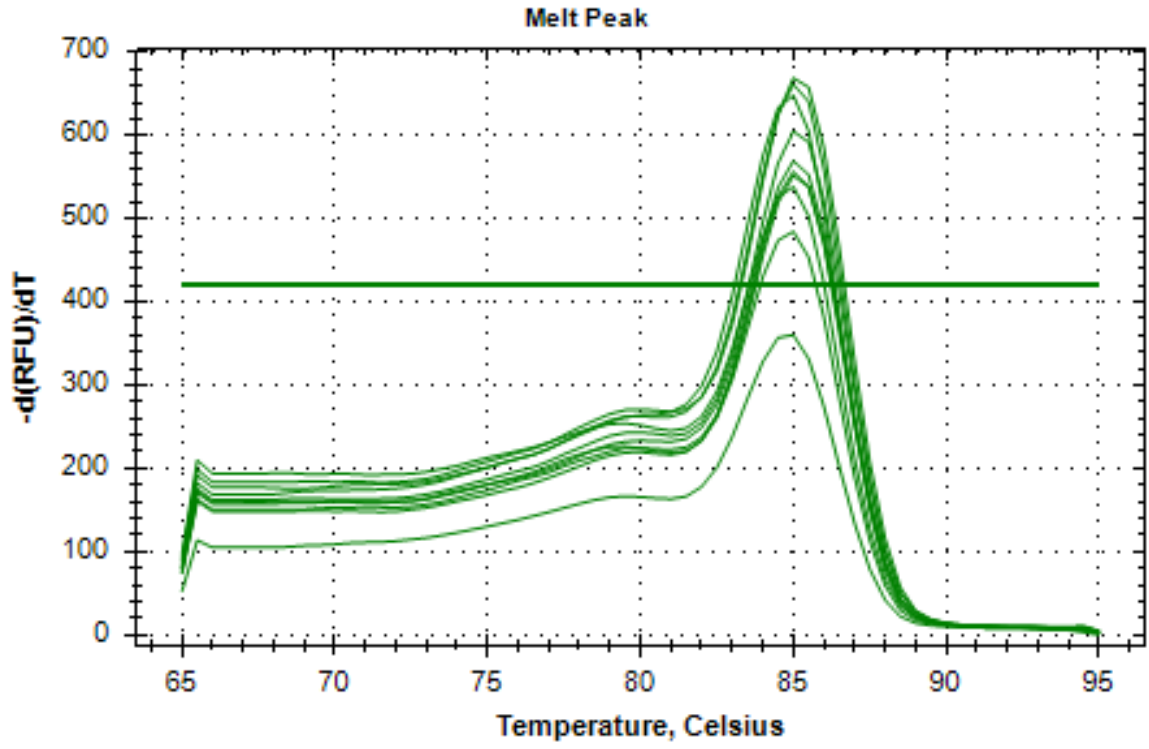
Meme kanseri hastalarından tümör ve komşu normal dokuların kullanıldığı bu çalışmada gerekli örneklem büyüklüğü güç analizi ile en az 78 (her grup için n=39) olarak belirlenmiştir. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hastanesi'nde tanı alan 45 meme kanseri hastasından alınan tümör ve normal meme dokuları çalışmaya dahil edilmiş ve tümör ile normal dokular arasındaki TRIM36 mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Öncelikle hastalardan onayları dahilinde alınan dokulardan RNA izolasyonu yapılmış, RNA konsantrasyon ve saflıkları ölçülerek kalite kontrolü yapılmıştır. Daha sonra RNA konsantrasyonları eşitlenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler öncesinde üretici firmanın talimatlarına uygun olarak primer ve kalıp konsantrasyonları optimize edilmiş, referans gen olarak kullanılan GAPDH için 1, 1/10, 1/100, 1/1000 konsantrasyonlarında, hedef gen TRIM36 geni için 1, 1/2, 1/4, 1/8 konsantrasyonlarında kalıp kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiş ve standart eğrileri (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi yapılarak her primer ile tek bölgenin çoğaltıldığı doğrulanmıştır (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



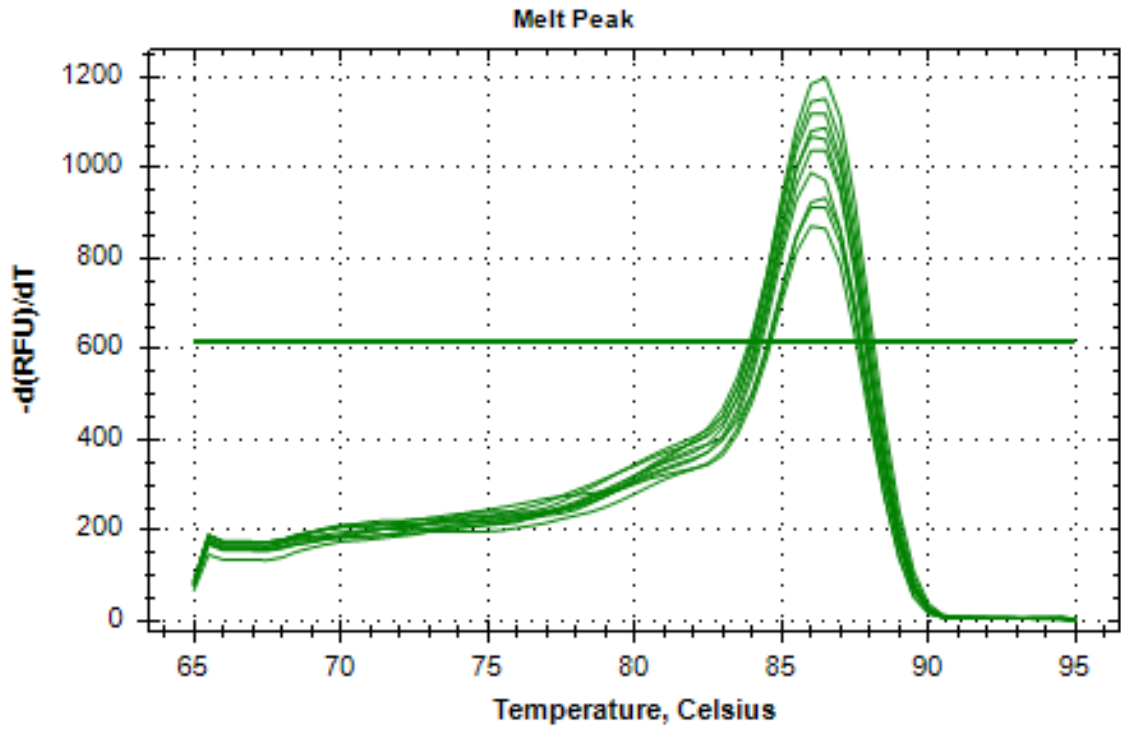
Şekil 3.1 GAPDH geni standart eğrisi



Şekil 3.2 TRIM36 geni standart eğrisi



Şekil 3.3 GAPDH geni qRT-PCR erime piki grafiği



Şekil 3.4 TRIM36 geni qRT-PCR erime piki grafiği

Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle değerlendirilmiştir (Livak and Schmittgen, 2001). TRIM36 mRNA ekspresyon seviyeleri, aynı dokulardaki GAPDH mRNA ekspresyon seviyelerine göre normalize edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle incelenmiştir. TRIM36 ekspresyonunun GAPDH'ye göre kat değişiminin ortanca değeri normal dokularda 0,5218 ve tümör dokularında 0,5775 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

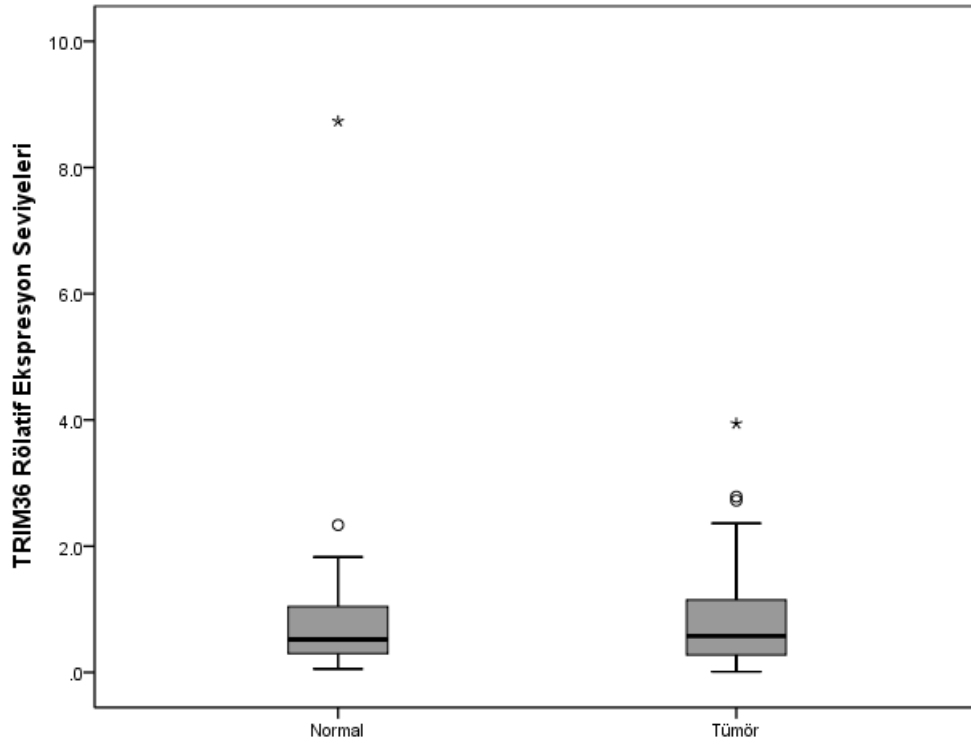
Çizelge 3.1 TRIM36 mRNA ekspresyonu kat değişiminin normal ve tümör dokularındaki tanımlayıcı istatistikleri.

Tanımlayıcı	Normal doku	Tümör dokusu	Toplam	p değeri
İstatistikler	(n=45)	(n=45)	(n=90)	
Ortanca	0.5218	0.5775	0.5252	0.731 ^w
Minimum	0.05	0.01	0.01	
Maksimum	8.73	3.94	8.73	

w: Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi

Normal ve tümör grupları arasındaki rölatif TRIM36 mRNA ekspresyon seviyeleri Wilcoxon işaretili sıralar testi (parametrik olmayan ilişkili gruplar t-testi) ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi %95 güven aralığında $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

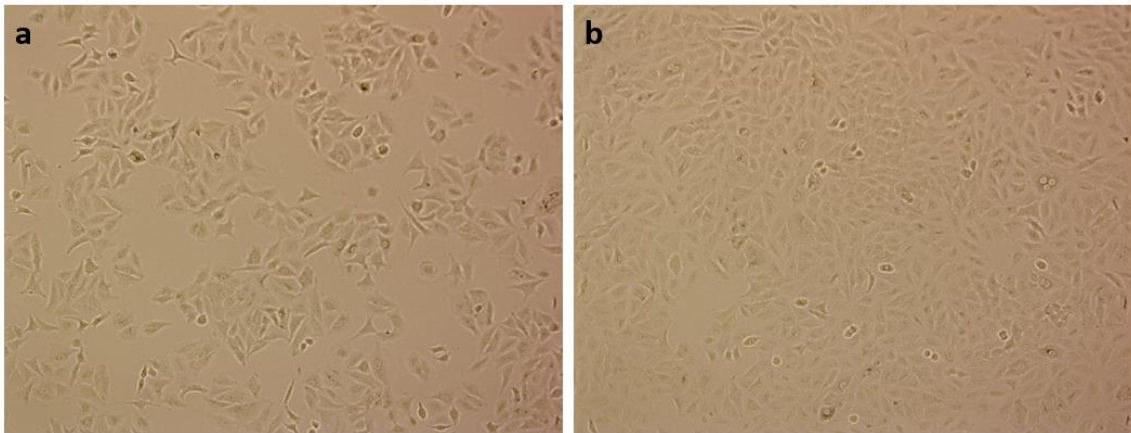
qRT-PCR sonuçları, TRIM36'nın insan meme dokusunda ifade edildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, normal ve tümör dokuları arasında TRIM36 ekspresyon seviyeleri tümör dokusunda 1,10 kat daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0,731$, Çizelge 3.1, Şekil 3.5).



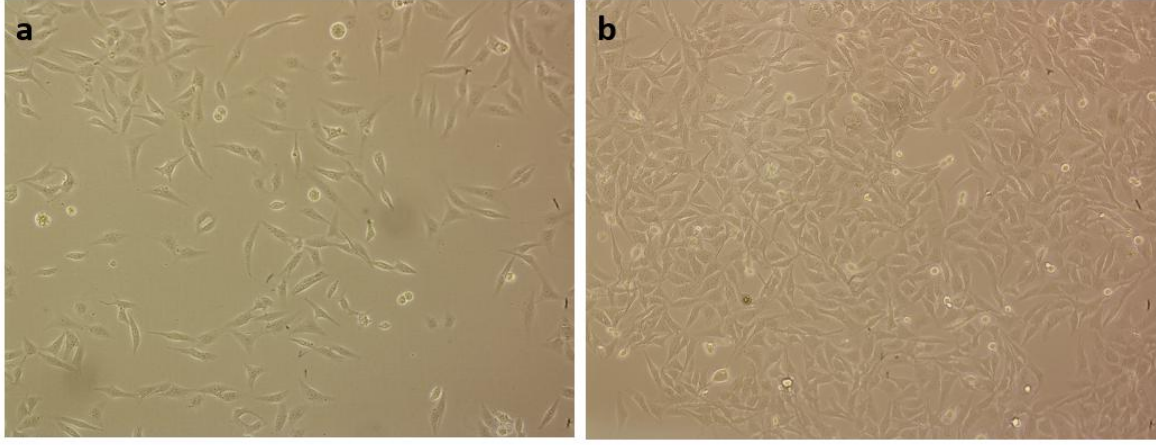
Şekil 3.5 Normal ve tümör dokularında TRIM36 mRNA ekspresyonu kat değişimleri.

3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ BULGULARI

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri %10 serumlu besiyerinde kültüre edilmiştir. Her gün mikroskopik olarak kontrol edilmiştir. Flaskın yüzeyini %80'e yakın oranda kapladıklarında hücreler tripsin ile kaldırılarak pasajlanmıştır (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).



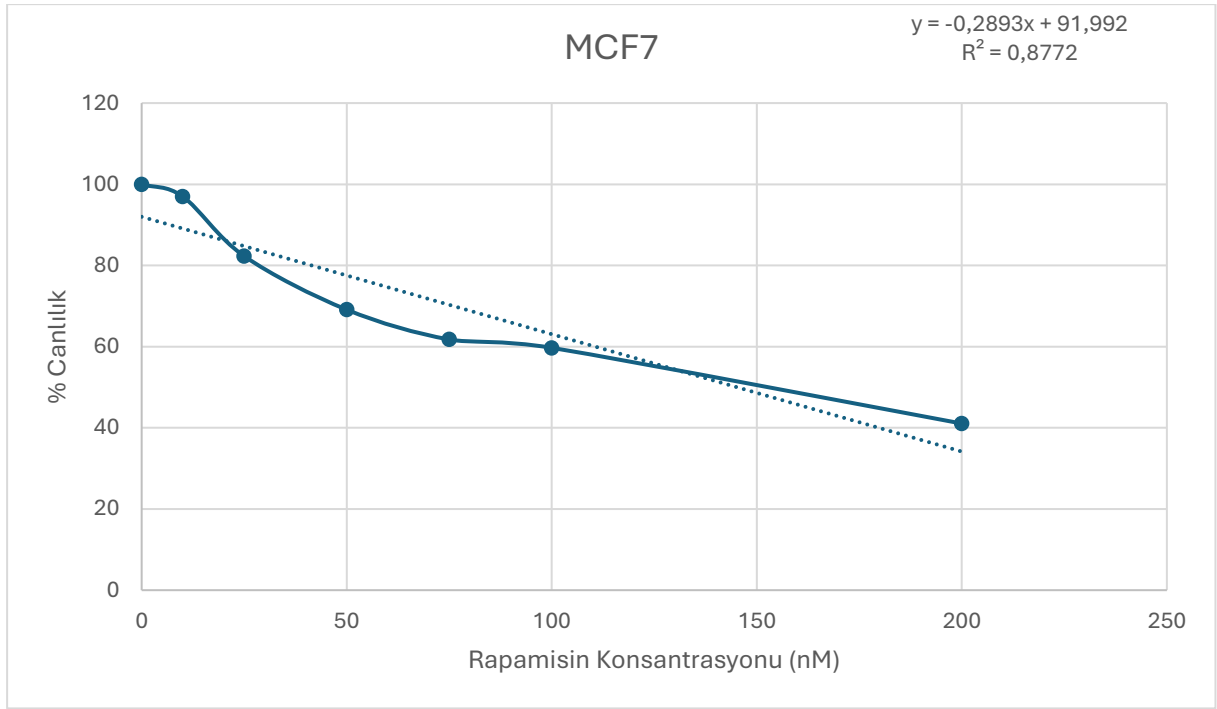
Şekil 3.6 MCF-7 hücreleri (a: %60 konfluent, b: %80 konfluent)



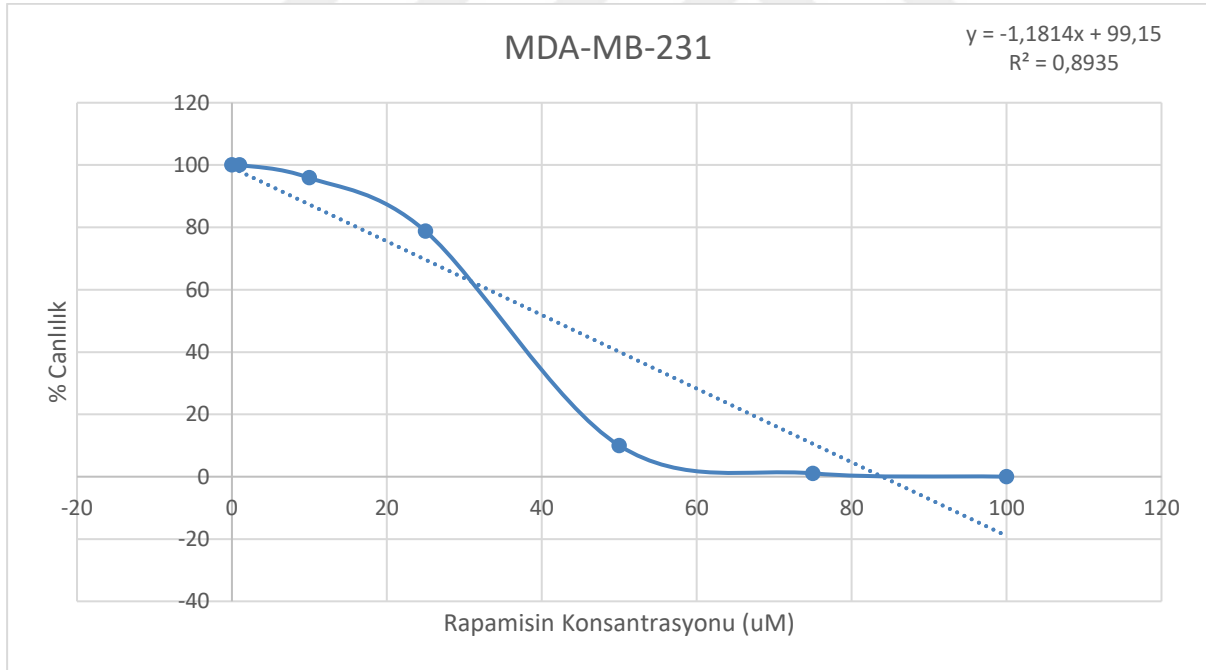
Şekil 3.7 MDA-MB-231 hücreleri (a: %50 konfluent, b: %80 konfluent)

3.2.1 Rapamisinin Hücre Canlılığına Etkisi ve IC50 Değerinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin %50'sini öldüren rapamisin dozu (IC50) belirlenmesi için MCF-7 hücrelerine; 0, 10, 25, 50, 75, 100, 200 nM ve MDA-MB-231 hücrelerine; 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 μ M rapamisin içeren besiyeri uygulanmıştır. MTT testi sonucunda IC50 değerleri 24 saat inkübasyonda MCF-7 için 145,150 nM ve MDA-MB-231 için 41,60 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



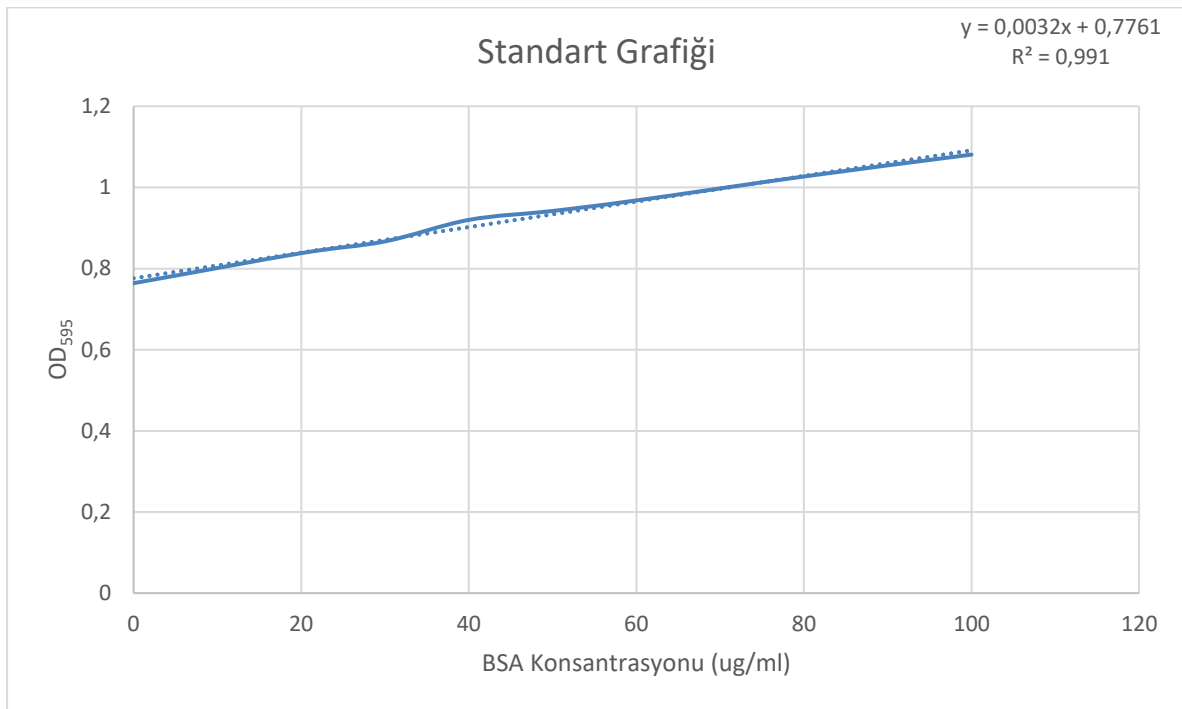
Şekil 3.8 MCF-7 hücrelerinde farklı dozlarda rapamisin uygulamasının canlılık oranına etkisi



Şekil 3.9 MDA-MB-231 hücrelerinde farklı dozlarda rapamisin uygulamasının canlılık oranına etkisi

3.2.2 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

siRNA transfeksiyonu ve/veya rapamisin uygulanmış, ya da kontrol grupları hücrelerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Bradford yöntemi kullanılarak; standart protein serisinin ölçüm sonuçlarıyla bir standart grafiği çizilmiş (Şekil 3.10), izole edilen proteinlerin konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücre grupları arasındaki uygulamalardan kaynaklı farkları belirleyebilmek için bu proteinlerin konsantrasyonları eşitlenerek immüno blot deneylerinde kullanılan jeldeki kuyucuklara aynı miktarda protein yüklenmesi sağlanmıştır.



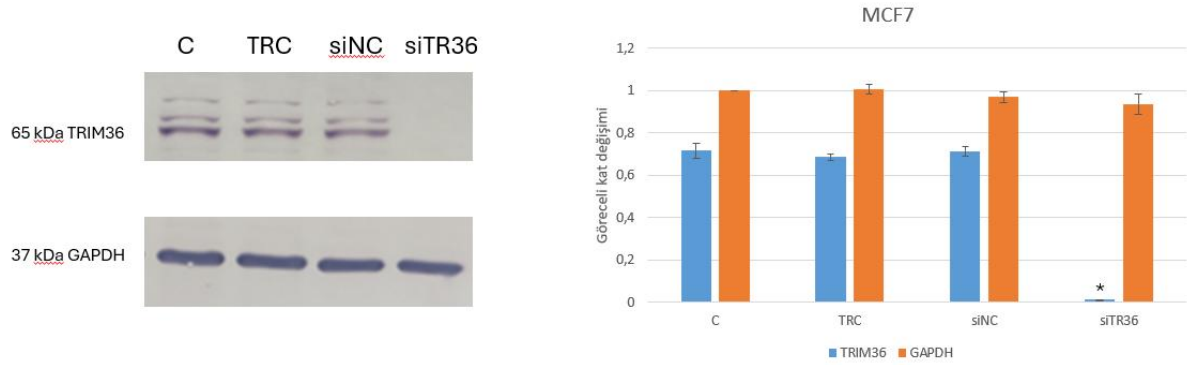
Şekil 3.10 BSA standart serisi ile çizilen standart grafiği

3.2.3 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde siTRIM36 Transfeksiyonu ile TRIM36'nın Susturulması

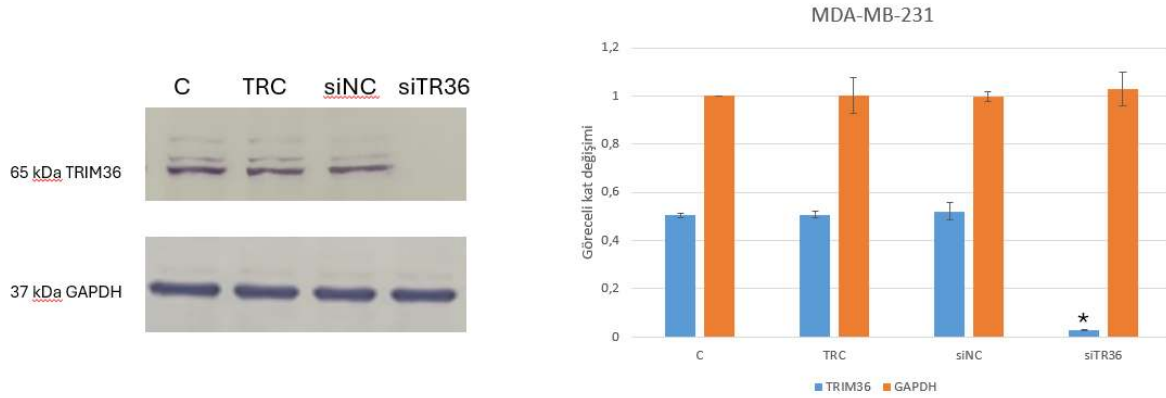
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri; hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubu (C), sadece transfeksiyon ajanı uygulanmış transfeksiyon ajanı kontrolü (TRC), scrambled siRNA uygulanmış kontrol grubu (siNC) ve siTRIM36 uygulanmış deney grubu (siTR36) olarak 4'er hücre grubu oluşturulmuş ve bunlardan 3'er tekrar olacak şekilde protein izolasyonu yapılmıştır. Proteinlerin GAPDH ve TRIM36 antikorları ile immüno blot deneyleri sonucunda referans olarak kullanılan GAPDH'in hücre grupları arasında protein seviyesinin sabit kalırken,

siTR36 grubunda diğer gruplara kıyasla TRIM36 protein seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).

İmmünoblot görüntülerindeki bantların kantifikasyonu ImageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Schneider et al., 2012). Kontrol grubu GAPDH bandı referans alınarak diğer bantların rölatif kat değişimleri hesaplanmıştır. Hücre grupları arasındaki GAPDH ve TRIM36 seviyeleri tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Tukey testi ile anlamlı farklılık olan grup tespit edilmiştir. Gruplar arasında GAPDH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken (MCF-7 $p=0,097$, MDA-MB-231 $p=0,863$), siTR36 gruplarında diğer gruplara oranla TRIM36 ekspresyon seviyesinin anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir (MCF-7 $p<0,01$, MDA-MB-231 $p<0,01$).



Şekil 3.11 MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoblotlarda sırasıyla kontrol (C), transfeksiyon ajanı kontrol (TRC), scrambled siRNA negatif kontrol (siNC) ve siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36). * $p<0,01$



Şekil 3.12 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immüno blot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmüno blotlarda sırasıyla kontrol (C), transfeksiyon ajanı kontrol (TRC), scrambled siRNA negatif kontrol (siNC) ve siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36). * $p < 0.01$

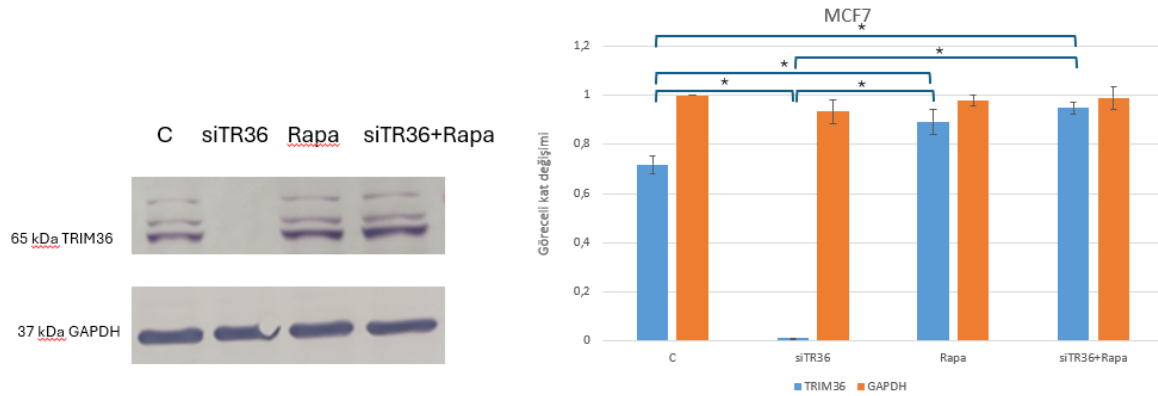
3.2.4 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde siTRIM36 Transfeksiyonu ve/veya Rapamisin Uygulamasının TRIM36 Seviyesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin; DMSO kontrol grubu (C), siTRIM36 uygulanmış deney grubu (siTR36), rapamisin uygulanmış deney grubu (Rapa) ve hem siTR36 hem rapamisin uygulanmış kombine tedavi deney grubu (siTR36+Rapa) olarak 4 grup oluşturulmuş ve bunlardan 3'er tekrar olacak şekilde protein izolasyonu yapılmıştır. Proteinlerin GAPDH ve TRIM36 antikorları ile immüno blot deneyleri sonucunda referans olarak kullanılan GAPDH'in ve hedef protein TRIM36'nın ekspresyon seviyesi değişimleri gösterilmiştir (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14).

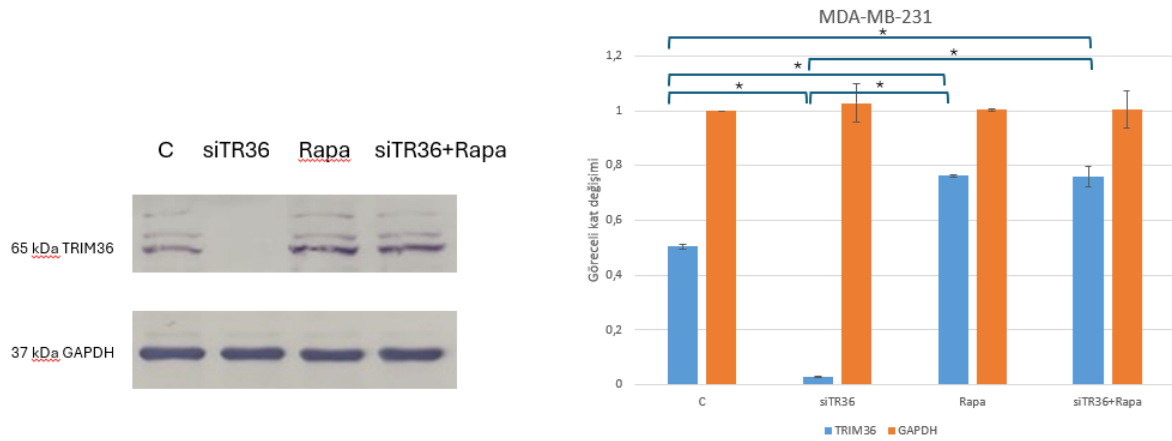
İmmüno blot görüntülerindeki bantların kantifikasyonu ImageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Schneider et al., 2012). Kontrol grubu GAPDH bandı referans alınarak diğer bantların rölatif kat değişimleri hesaplanmıştır. Hücre grupları arasındaki GAPDH ve TRIM36 seviyeleri tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Tukey testi ile anlamlı farklılık olan gruplar tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde gruplar arasında GAPDH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken (siTR36, Rapa ve siTR36+Rapa sırasıyla $p=0,182$, $0,884$, $0,986$), kontrole kıyasla siTR36 grubunda TRIM36 seviyesi anlamlı olarak azalırken ($p < 0,01$); Rapa ve siTR36+Rapa gruplarında anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,01$). siTR36 grubuna kıyasla

kontrol, Rapa ve siTR36+Rapa gruplarında TRIM36 seviyesi anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0,01$). Rapa ve siTR36+Rapa gruplarına kıyasla kontrol ve siTR36 gruplarında TRIM36 seviyesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,01$). Rapa ve siTR36+Rapa grupları arasındaki kat değişimleri ise anlamlı bulunmamıştır ($p=0,285$).

MDA-MB-231 hücrelerinde gruplar arasında GAPDH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken (siTR36, Rapa ve siTR36+Rapa sırasıyla $p=0,867$, $1,000$, $0,999$), kontrole kıyasla siTR36 grubunda TRIM36 seviyesi anlamlı olarak azalırken ($p<0,01$); Rapa ve siTR36+Rapa gruplarında anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). siTR36 grubuna kıyasla kontrol, Rapa ve siTR36+Rapa gruplarında TRIM36 seviyesi anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0,01$). Rapa ve siTR36+Rapa gruplarına kıyasla kontrol ve siTR36 gruplarında TRIM36 seviyesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,01$). Rapa ve siTR36+Rapa grupları arasındaki kat değişimleri ise anlamlı bulunmamıştır ($p=0,994$).



Şekil 3.13 MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immüno blot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmüno blotlarda sırasıyla kontrol (C), siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36), rapamisin uygulanmış deney grubu (Rapa) ve hem siTR36 hem rapamisin uygulanmış deney grubu (siTR36+Rapa). * $p<0.01$

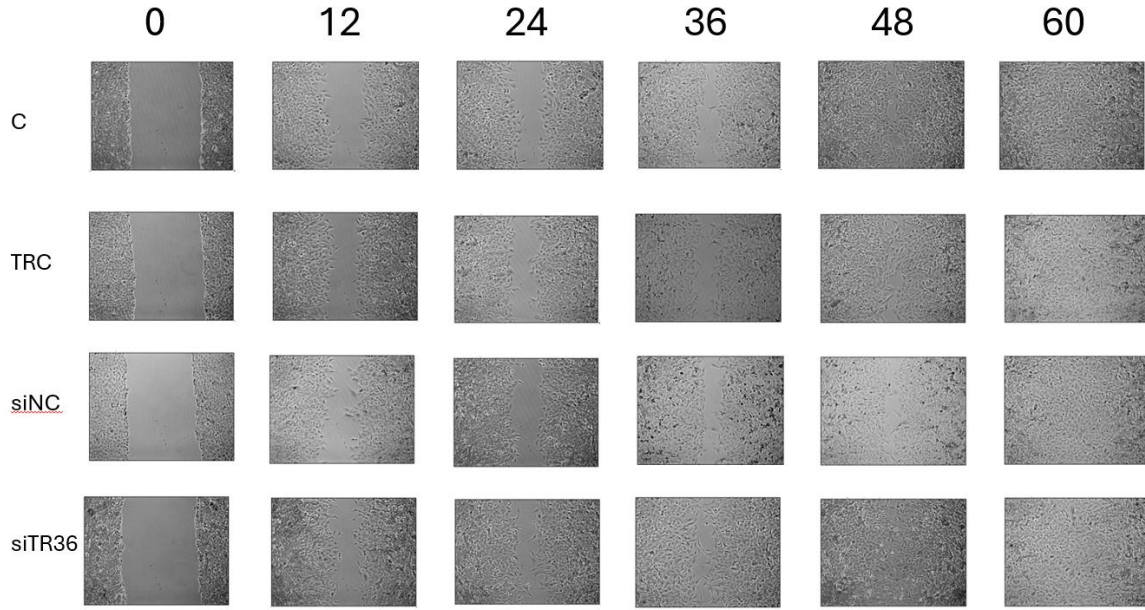


Şekil 3.14 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerin anti-TRIM36 ve anti-GAPDH immünoiblot görüntüsü ile rölatif kat değişimleri. İmmünoiblotlarda sırasıyla kontrol (C), siTRIM36 transfekte deney grubu (siTR36), rapamisin uygulanmış deney grubu (Rapa) ve hem siTR36 hem rapamisin uygulanmış deney grubu (siTR36+Rapa). *p<0.01

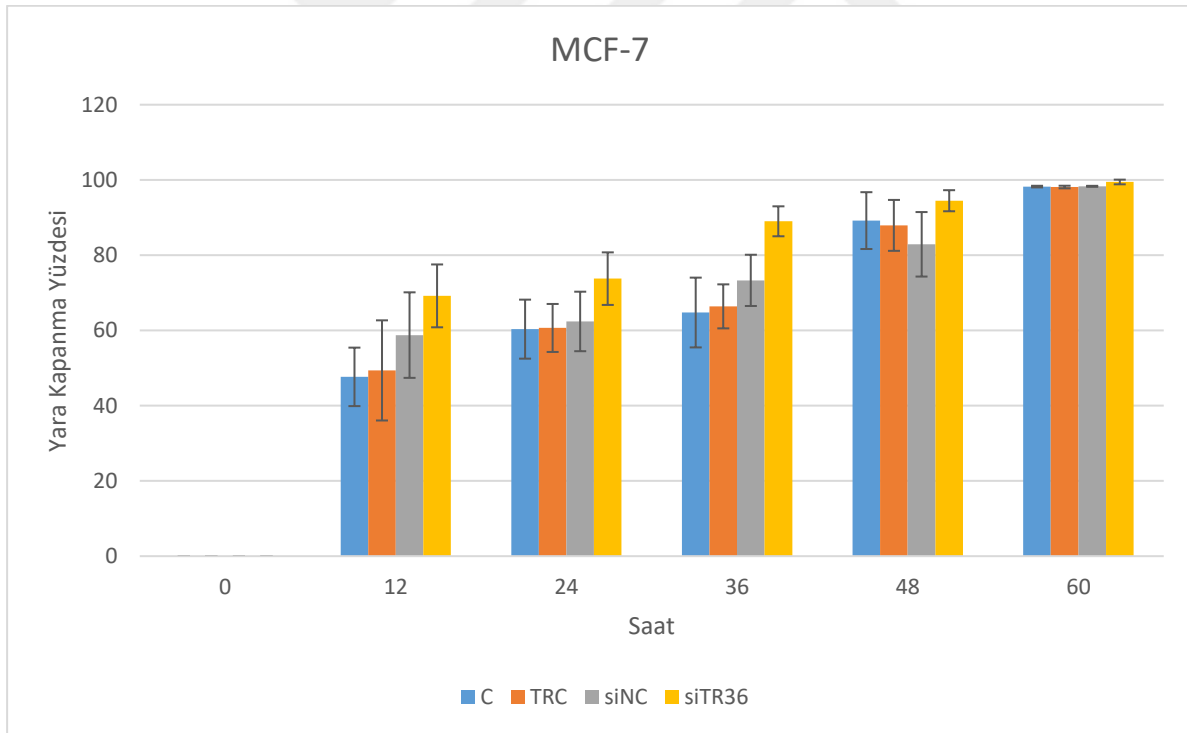
3.2.5 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Azalmış TRIM36 Seviyesinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde siTRIM36 transfeksiyonunun hücre göçü üzerine etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir. C, TRC, siNC, siTR36 hücre gruplarında oluşturulan yapay yaralar 0, 12, 24, 36, 48, 60. Saatlerde fotoğraflanmıştır (Şekil 3.15 ve Şekil 3.17). Yara alanları ImageJ yazılımı ve yara iyileşme aracı (Suarez-Arnedo et al., 2020) kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir grup için 0. Saat grubuna göre yara kapanma yüzdeleri hesaplanarak tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Anlamlı farkın bulunduğu gruplar Tukey testi ile belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde 36. saatte hesaplanan yara kapanma yüzdeleri bakımından siTRC; C (p=0,012) ve TRC (p=0,05) gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. 60. saatte ise siTRC; C (p<0,001), TRC (P=0,003), siNC (p=0,001) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 3.16).

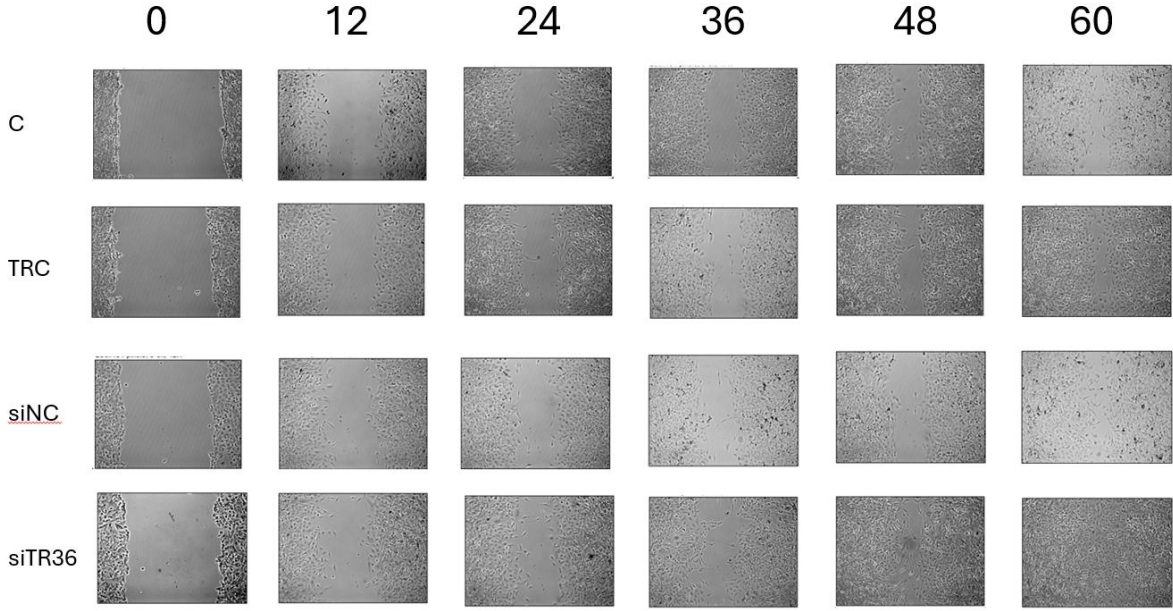


Şekil 3.15 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.

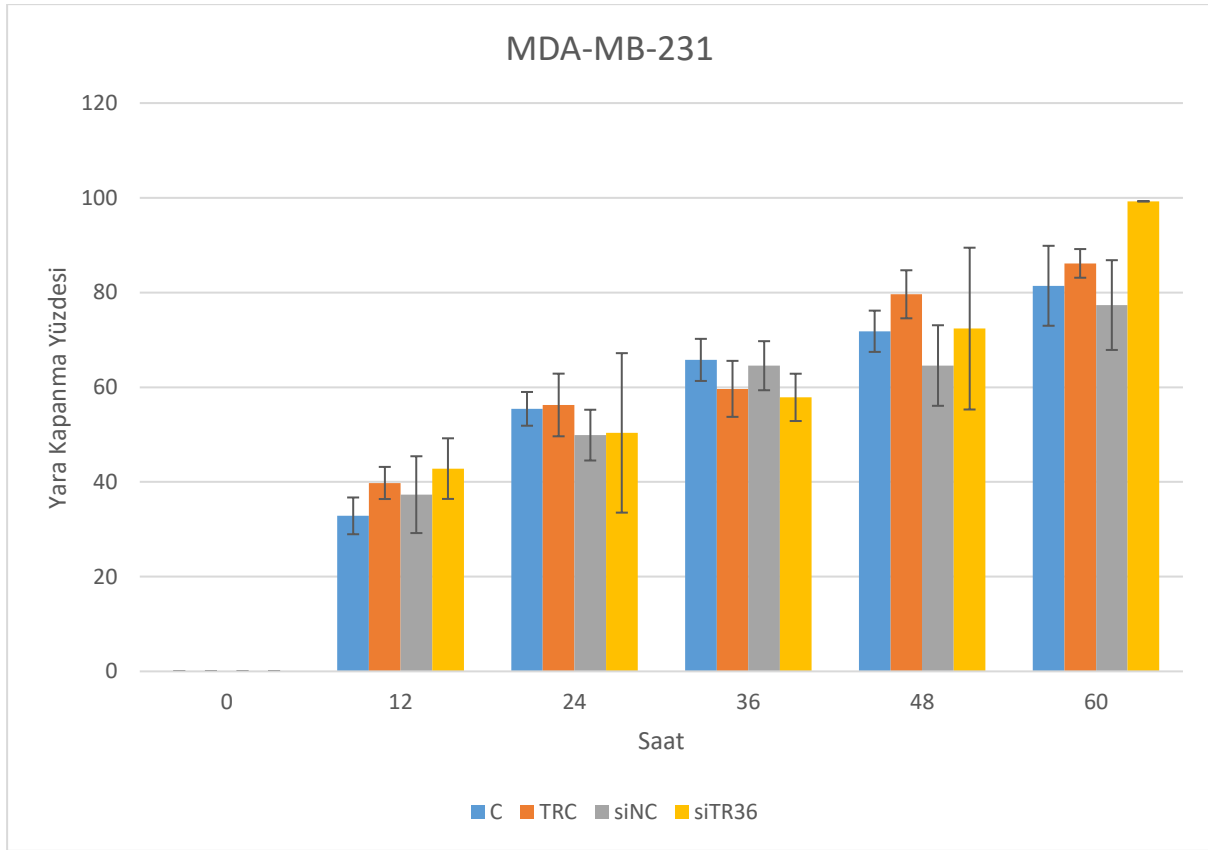


Şekil 3.16 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.

MDA-MB-231 hücrelerinde 60. saatte hesaplanan yara kapanma yüzdeleri bakımından siTRC; C ($p=0,044$) ve siNC ($p=0,016$) gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.18).



Şekil 3.17 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.



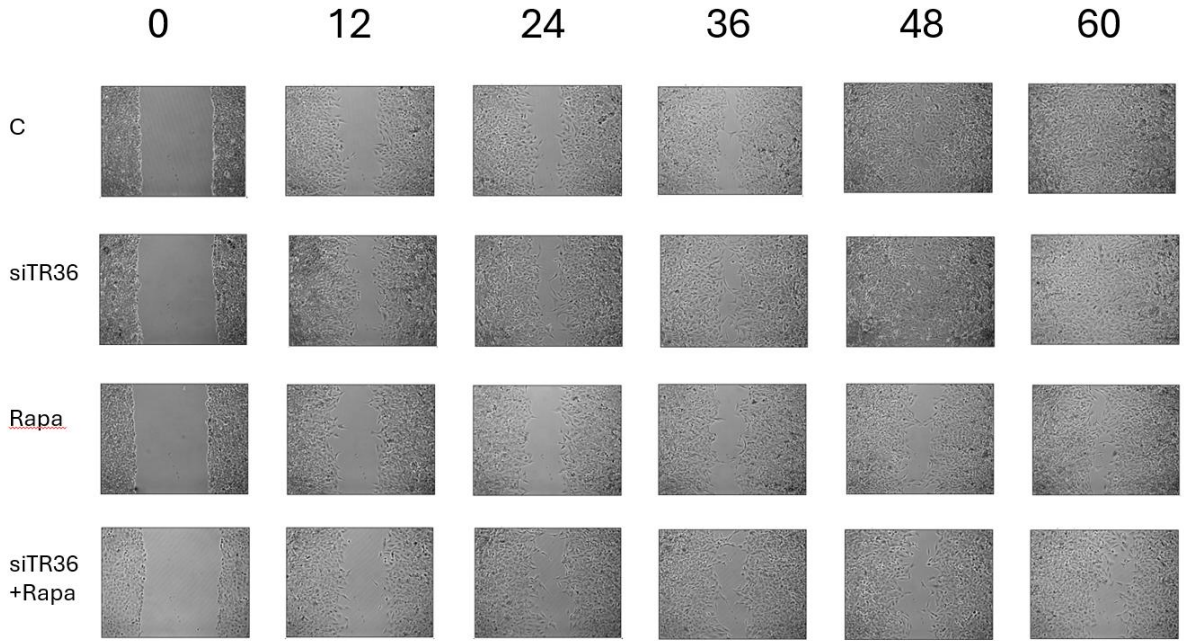
Şekil 3.18 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.

3.2.6 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde TRIM36 Susturulmasının ve/veya Rapamisin Uygulamasının Hücre Göçü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

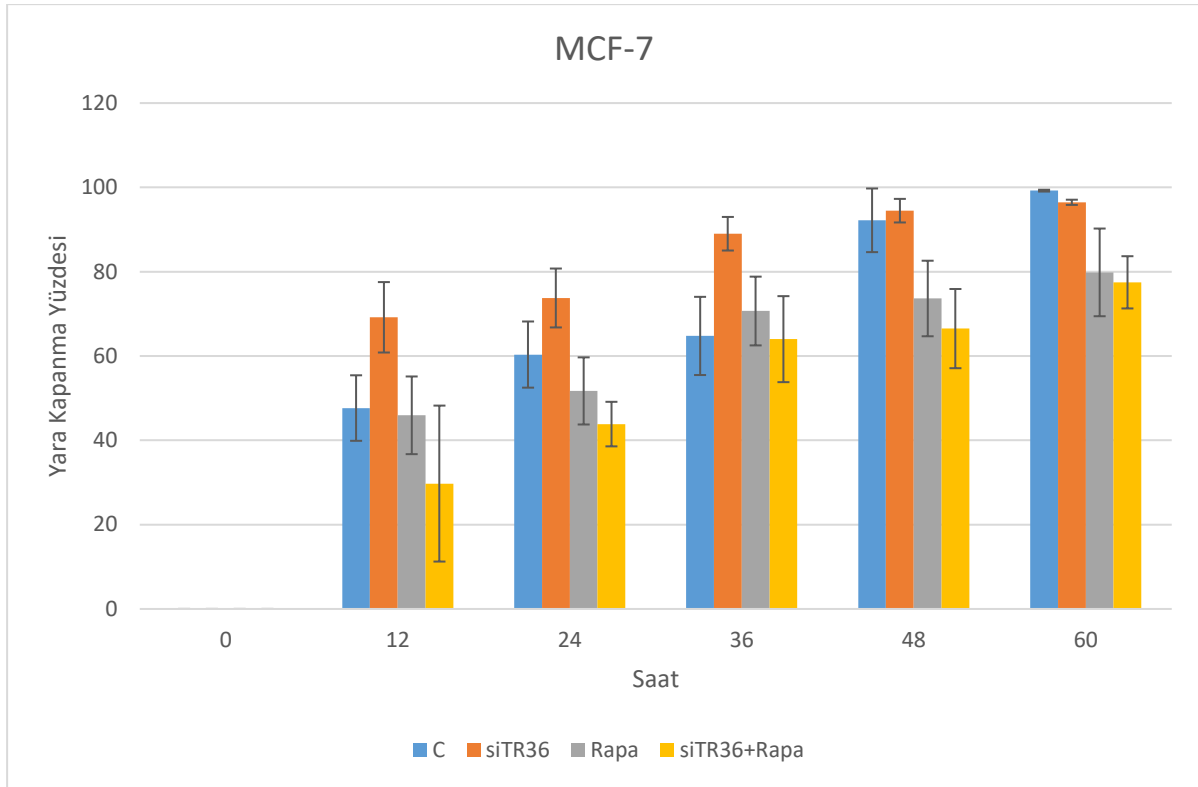
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde siTRIM36 transfeksiyonunun ve/veya rapamisin uygulamasının hücre göçü üzerine etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir. C, siTR36, Rapa, siTR36+Rapa hücre gruplarında oluşturulan yapay yaralar 0, 12, 24, 36, 48, 60. Saatlerde fotoğraflanmıştır (Şekil 3.19 ve Şekil 3.21). Yara alanları ImageJ yazılımı ve yara iyileşme aracı (Suarez-Arnedo et al., 2020) kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir grup için 0. Saat grubuna göre yara kapanma yüzdeleri hesaplanarak tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Anlamlı farkın bulunduğu gruplar Tukey testi ile belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde 12. saatte hesaplanan yara kapanma yüzdeleri bakımından siTR36; siTR36+Rapa ($p=0,024$) grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. 24. saatte siTR36; Rapa ($p=0,023$) ve siTR36+Rapa ($p=0,080$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 36. Saatte siTR36; C ($p=0,031$) ve siTR36+Rapa ($p=0,027$) gruplarından anlamlı

derecede yüksek bulunmuştur. 48. saatte siTR36; Rapa ($p=0,044$) ve siTR36+Rapa ($p=0,010$) gruplarından yüksek, siTR36+Rapa; C ($p=0,015$) grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. 60. Saatte siTR36; Rapa ($p=0,046$) ve siTR36+Rapa ($p=0,022$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunurken, siTR36+Rapa; C ($p=0,010$) grubundan düşük bulunmuştur (Şekil 3.20).

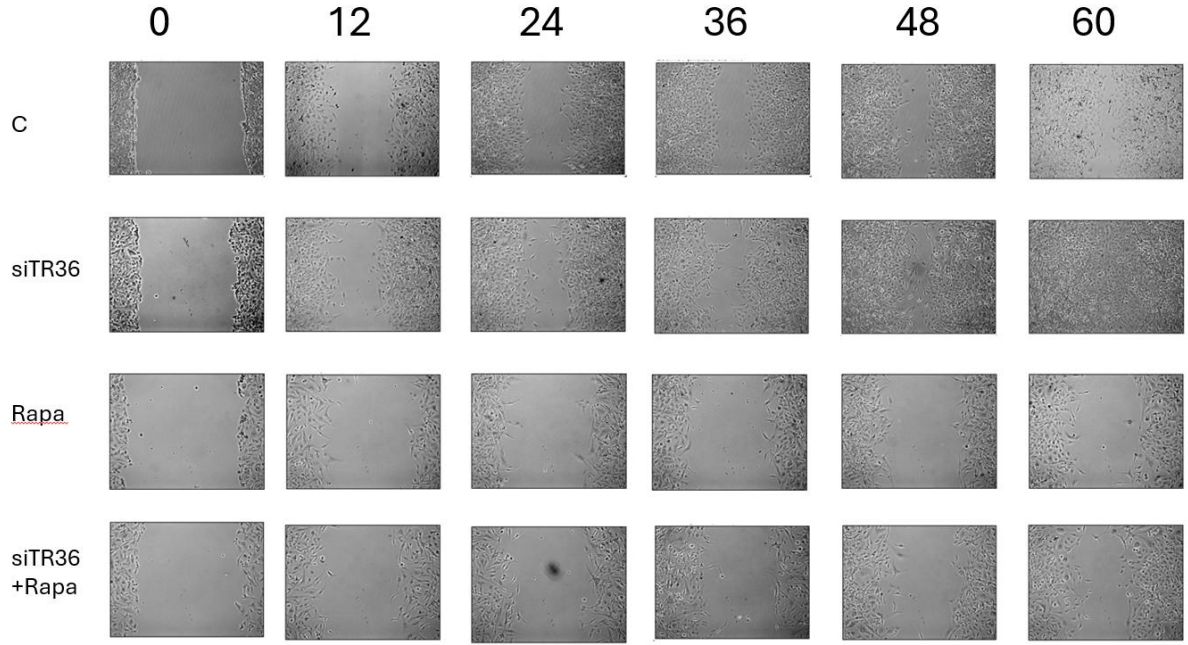


Şekil 3.19 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.

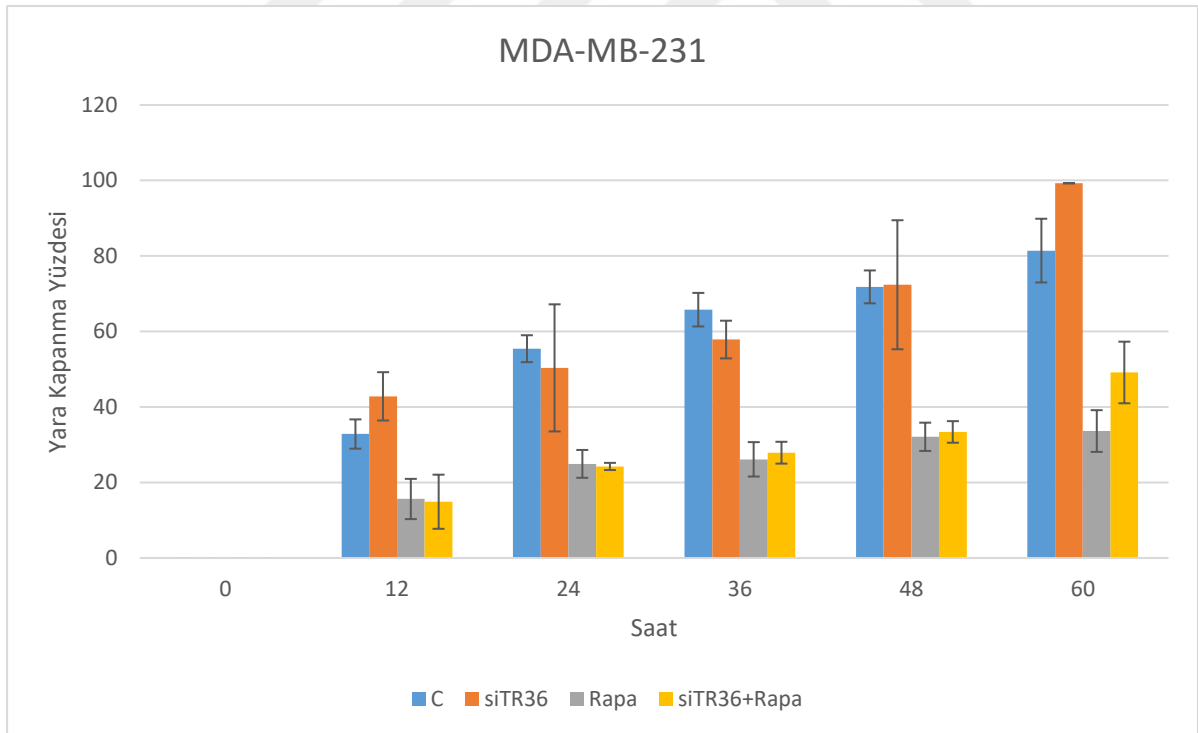


Şekil 3.20 MCF-7 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.

MDA-MB-231 hücrelerinde 12. saatte hesaplanan yara kapanma yüzdeleri bakımından siTR36; Rapa ($p=0,002$) ve siTR36+Rapa ($p=0,002$) grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber Rapa ($p=0,032$) ve siTR36+Rapa ($p=0,030$) C grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. 24. saatte siTR36; Rapa ($p=0,023$) ve siTR36+Rapa ($p=0,019$) grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Rapa ($p=0,012$) ve siTR36+Rapa ($p=0,011$) C grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. 36. Saatte siTR36; Rapa ($p<0,001$) ve siTR36+Rapa ($p<0,001$) grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Rapa ($p<0,001$) ve siTR36+Rapa ($p<0,001$) C grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. 48. saatte siTR36; Rapa ($p=0,002$) ve siTR36+Rapa ($p=0,003$) grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Rapa ($p=0,003$) ve siTR36+Rapa ($p=0,004$) C grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. 60. Saatte siTR36; C ($p=0,043$), Rapa ($p<0,001$) ve siTR36+Rapa ($p<0,001$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunurken, Rapa ($p<0,001$) ve siTR36+Rapa ($p=0,001$) C grubundan düşük bulunmuştur (Şekil 3.22).



Şekil 3.21 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara görüntüleri.

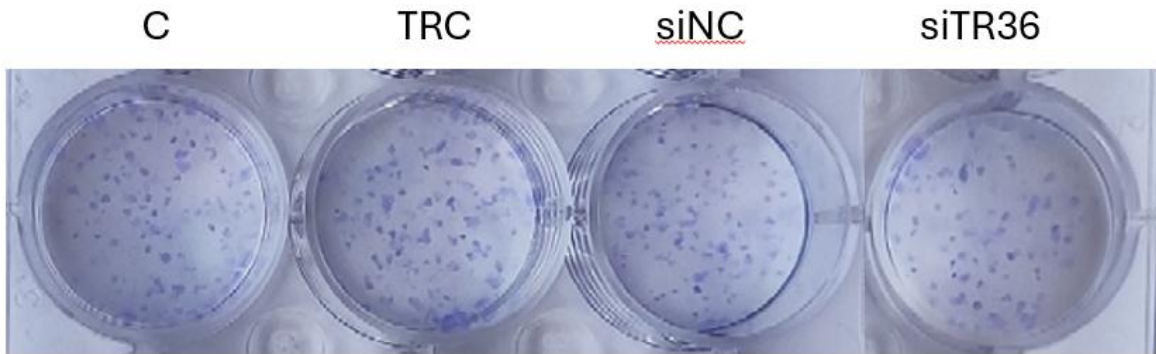


Şekil 3.22 MDA-MB-231 hücre gruplarında 0, 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerdeki yara kapanma yüzdeleri.

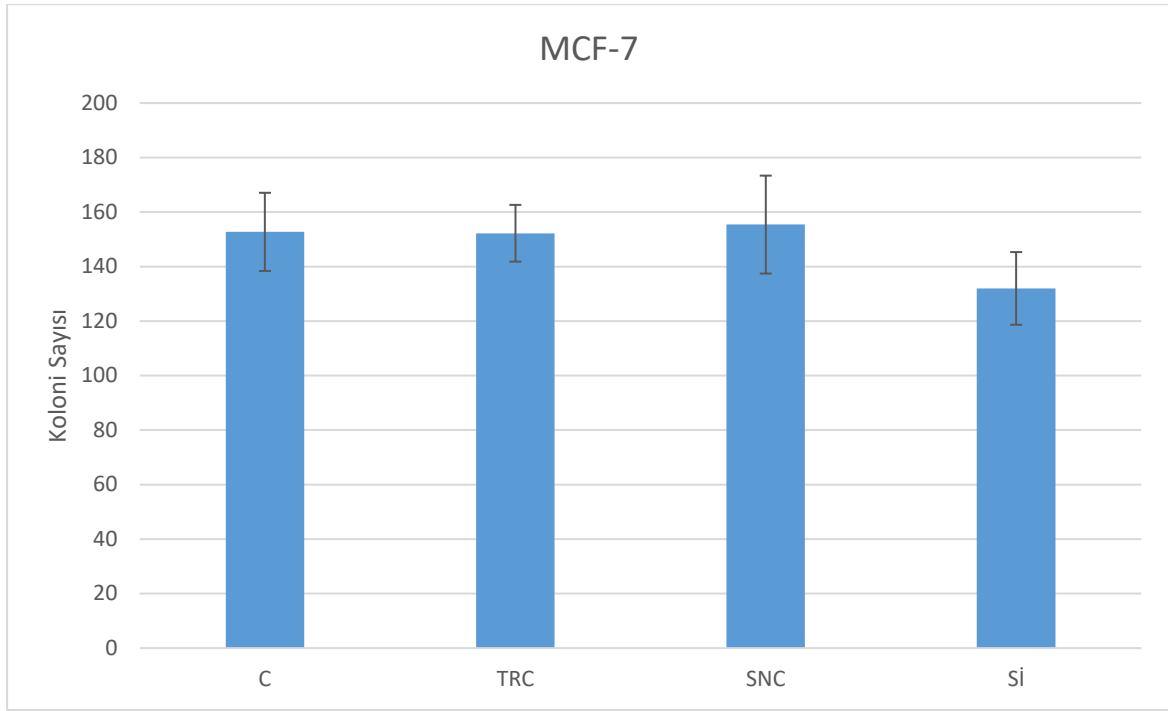
3.2.7 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Azalmış TRIM36 Seviyesinin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde siTRIM36 transfeksiyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkileri koloni oluşum deneyi ile tespit edilmiştir. Deney sonunda C, TRC, siNC, siTR36 hücre gruplarında gözle görülen koloniler manuel olarak sayılarak kaydedilmiştir. 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneylerdeki hücre gruplarının koloni sayılarının ortalamaları alınarak tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Anlamlı farkın bulunduğu gruplar Tukey testi ile belirlenmiştir.

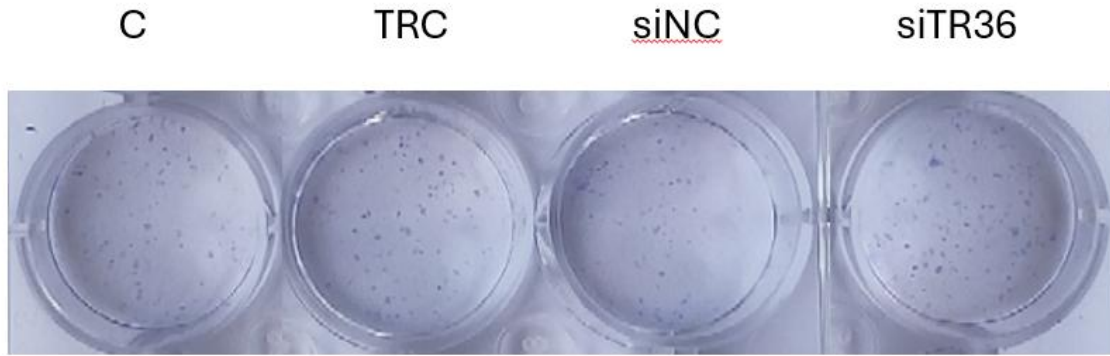
MCF-7 C, TRC, siNC, siTR36 hücre grupları arasında koloni sayısı bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak siTR36 grubunda daha az sayıda koloni olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24). MDA-MB-231 hücre grupları arasında da koloni sayıları bakımından bir fark gözlenmezken, siTR36 grubundaki koloniler kontrollere kıyasla daha fazla sayıdadır (Şekil 3.25 ve Şekil 3.26).



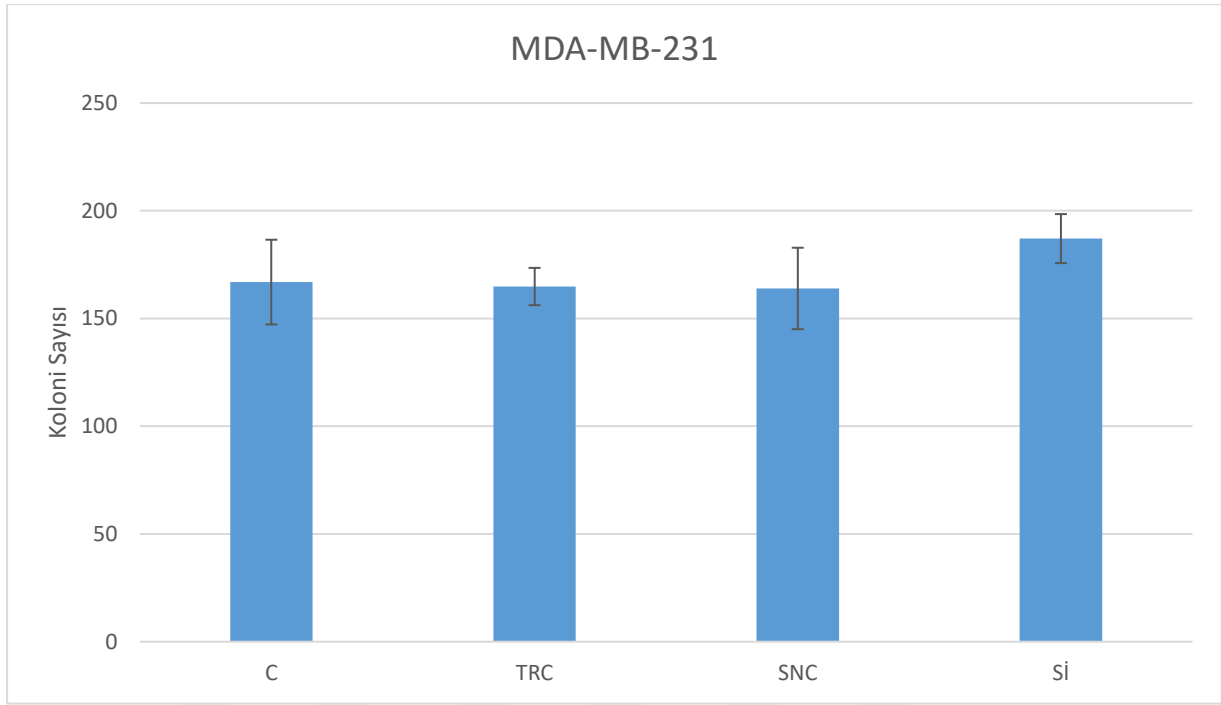
Şekil 3.23 MCF-7 hücre grupları koloni oluşum deneyi.



Şekil 6 MCF-7 hücre grupları koloni sayıları.



Şekil 3.25 MDA-MB-231 hücre grupları koloni deneyi.

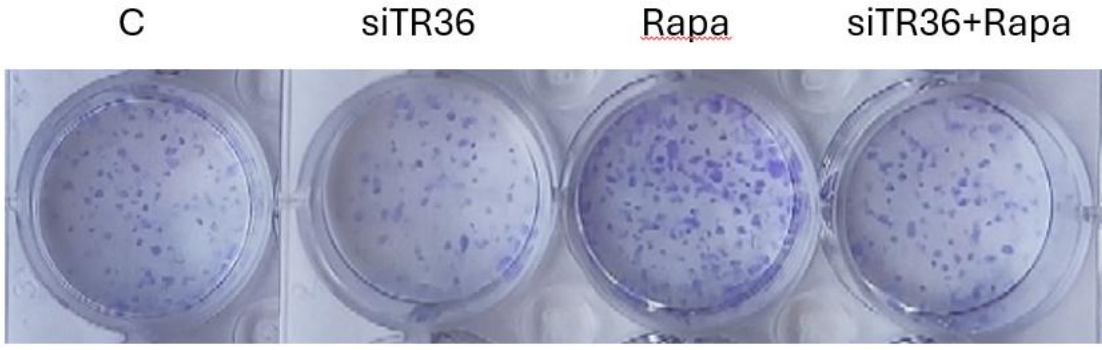


Şekil 3.26 MDA-MB-231 hücre grupları koloni sayıları.

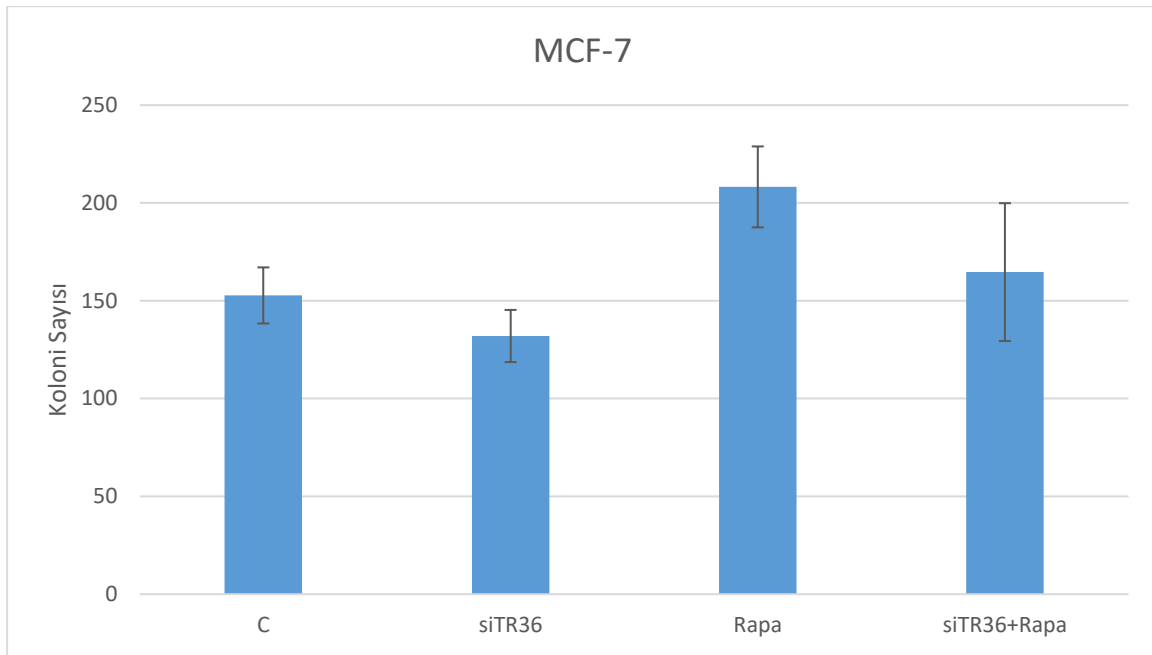
3.2.8 MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde TRIM36 Susturulmasının ve/veya Rapamisin Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde siTRIM36 transfeksiyonunun ve/veya rapamisin uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkileri koloni oluşum deneyi ile tespit edilmiştir. Deney sonunda C, siTR36, Rapa, siTR36+Rapa hücre gruplarında gözle görülen koloniler manuel olarak sayılarak kaydedilmiştir. 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneylerdeki hücre gruplarının koloni sayılarının ortalamaları alınarak tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Anlamlı farkın bulunduğu gruplar Tukey testi ile belirlenmiştir.

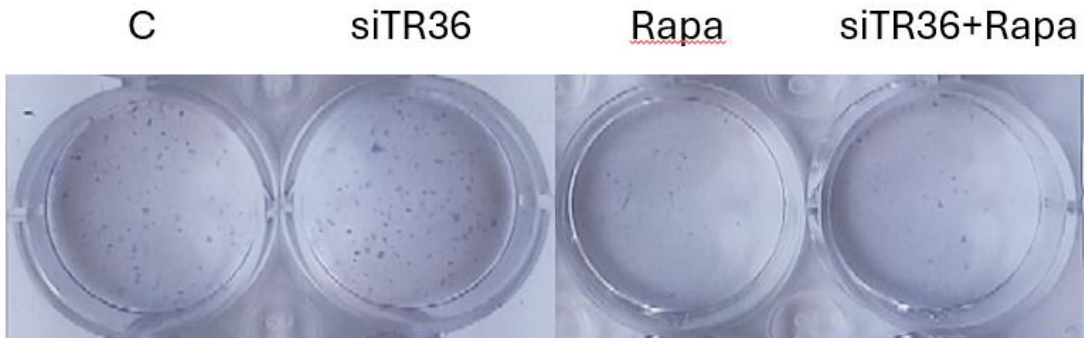
MCF-7 Rapa grubu; C ($P=0,020$) ve siTR36 ($p=0,002$) gruplarına kıyasla daha fazla koloni sayısına sahiptir (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28). MDA-MB-231 hücre grupları arasından Rapa; C ($p=0,011$) ve siTR36 ($P=0,002$) gruplarına, siTR36+Rapa; C ($p=0,001$) ve siTR36 ($p<0,001$) gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük koloni sayısına sahiptir (Şekil 3.29 ve Şekil 3.30).



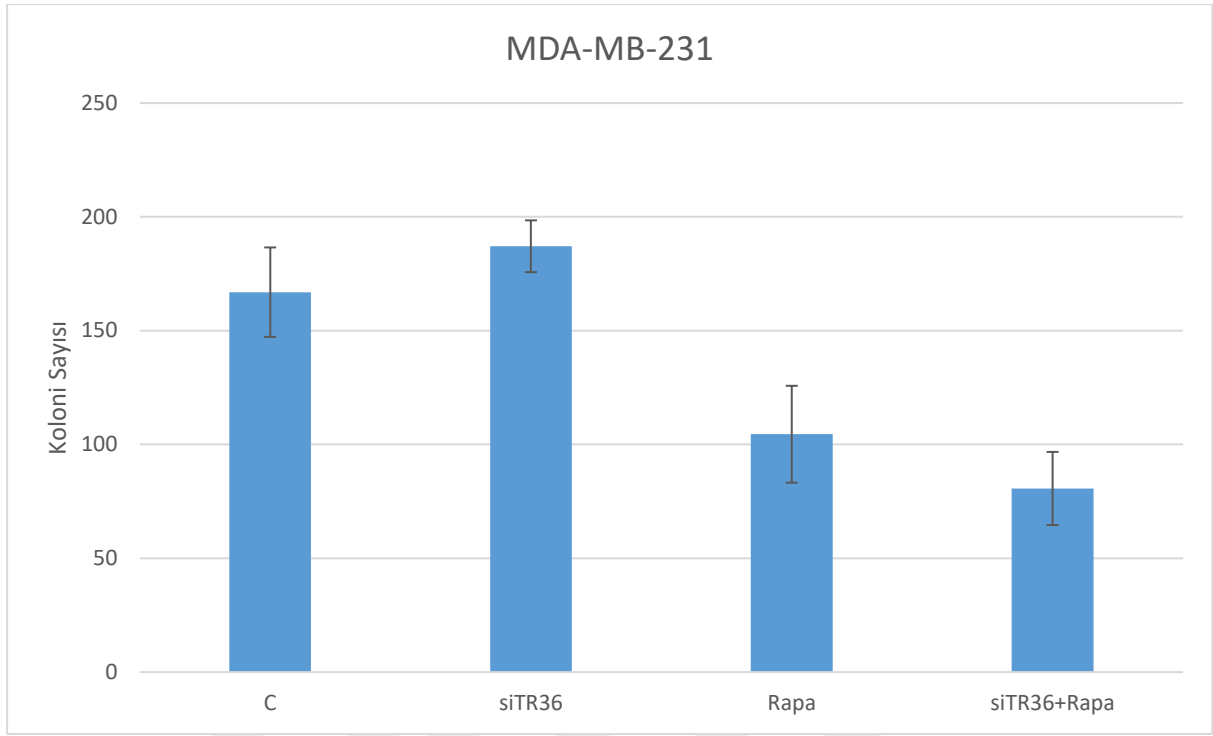
Şekil 3.27 MCF-7 hücre grupları koloni oluşum deneyi.



Şekil 3.28 MCF-7 hücre grupları koloni sayıları



Şekil 3.29 MDA-MB-231 hücre grupları koloni oluşum deneyi.



Şekil 3.30 MDA-MB-231 hücre grupları koloni sayıları.



BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen ve en ölümcül kanser türlerinden biridir ve son yıllarda TRIM protein ailesi üyelerinin rollerinin yoğunlukla incelendiği kanserler arasında yer alır. Örneğin, TRIM25 bir ERE'e sahiptir ve ekspresyonu östrojen tarafından indüklenir. TRIM25 'in meme kanseri ve over kanserlerinde kadın üreme organları olan meme bezi ve uterusunda ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Ikeda et al., 2000, Horie et al., 2003). İnsan meme kanseri hücrelerinde (MCF7) yüksek TRIM25 ekspresyonunun tümör büyümesini hızlandırdığı, buna karşın bu genin susturulmasının tümör progresyonunu yavaşlattığı tespit edilmiştir. Ayrıca, TRIM25'in aşırı ekspresyonunun, hücre döngüsü inhibitörü 14-3-3σ'yı parçalayarak meme kanseri gelişimini teşvik ettiği bulunmuştur (Urano et al., 2002). Benzer şekilde, TRIM24'ün aşırı ekspresyonu, meme kanseri hastalarında kötü prognoz ve azalmış sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Chambon et al., 2011). TP53'ü transkripsiyonel olarak baskılayan TRIM29'un (Yuan et al., 2004), pankreas kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve metastatik aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir (Wang et al., 2009). Buna karşılık, insan meme hücre hattı MCF10A'da TRIM29 ekspresyonunun azalmasının, in vitro olarak hücre büyümesini artırdığı, hücre hareketliliğini güçlendirdiği ve 3D asiner oluşumunu bozduğu belirlenmiştir. MCF7 hücrelerinde TRIM29'un ekspresyonunun artması, hücre bölünme oranlarının azalmasına yol açmıştır (Liu et al., 2012). Ayrıca, meme kanseri hücre hatlarında TRIM47'nin susturulmasının, PI3K/Akt sinyal yolunun inaktivasyonuna yol açarak hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunun inhibisyonuna neden olmuştur (Wang et al., 2020).

Bunun yanı sıra, çeşitli TRIM proteinlerinin meme kanserinde farklı roller oynadığı bilinmektedir. Örneğin, TRIM3, TRIM6, TRIM11, TRIM14, TRIM27, TRIM32, TRIM37, TRIM39, TRIM44, TRIM59 ve TRIM63 onkogenik olarak tanımlanırken, TRIM16, TRIM21, TRIM31, TRIM35 ve TRIM62 tümör baskılayıcı işlev görmektedir (Cao et al., 2024).

Bugüne kadar, bu çalışmanın odak noktası olan TRIM36 ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi özel olarak araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, insan meme kanseri hücreleri enjekte edilmiş farelerden elde edilen tümör dokularını kullanan bir çalışmada, insan meme mikroçevresini taklit eden bu implante meme dokusundaki kanser hücrelerinde 94 genin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiş ve TRIM36 ekspresyon seviyelerinde bir azalma rapor edilmiştir (Zheng et al., 2016).

TRIM36 ekspresyonu insan meme kanseri dokularında çalışılmamakla birlikte prostat, akciğer, özofagus kanserlerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, TRIM36 ekspresyonunun prostat kanseri dokularında yükseldiği tespit edilmiş olup bu durum, kanser oluşumunda rol aldığına işaret etmektedir (Balint et al., 2004). Ancak ilginç bir şekilde, bir çalışmada yüksek TRIM36 ekspresyon seviyelerinin prostat kanserinde olumlu bir prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kimura et al., 2018). Aynı yıl yayımlanan bir başka çalışmada, prostat kanseri dokularında yüksek TRIM36 ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Ancak TRIM36'nın, tümör gelişiminde kritik bir rol oynayan MAPK/ERK fosforilasyon yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Liang et al., 2018). Buna karşın, TRIM36 ekspresyon seviyelerinin, sağlıklı kontrollere kıyasla küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve özofagus kanseri dokularında düşük olduğu bildirilmiştir (Zhan et al., 2015, Zhang et al., 2020). İnsan nöroblastoma hastalarında, TRIM36'nın hipermetile olduğu ve daha agresif hastalık seyri gösteren bireylerde daha düşük seviyelerde ifade edildiği tespit edilmiştir (Olsson et al., 2016).

Daha yakın zamanda, 2023 yılında yayımlanan bir çalışmada, TRIM36'nın FOXA2 ile doğrudan etkileşimde bulunarak bu proteini baskıladığı ve böylelikle Nrf2/GPX4 ferroptoz sinyal yolunu aktifleştirdiği rapor edilmiştir. Bu etkileşim, TRIM36'nın kolorektal kanserde tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceğini göstermektedir (Liu et al., 2023).

Bu çalışmada, kadın meme kanseri hastalarında TRIM36'nın mRNA ekspresyon seviyeleri (GAPDH mRNA seviyelerine normalizasyonuyla) analiz edilmiştir. TRIM36 ekspresyonunun tümör ve normal meme dokuları arasında farklılık gösterip göstermediği değerlendirilmiştir. Bulgulara göre, TRIM36'nın meme dokularında ifade edildiği doğrulanmış, ancak normal ve tümör dokuları arasında ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, TRIM36'nın meme kanseri gelişimindeki potansiyel rolünü aydınlatmak için ek moleküler mekanizmaların araştırılması gerektiğini göstermektedir.

TRIM36, androjen yanıtı bir gen olarak tanınmakta ve prostat kanserinde anti-androjen ilaçların etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Liang et al., 2018). Androjen sinyali, erkeklerde kas kütlesi ve gücü, kemik mineral yoğunluğu, prostat büyümesi, spermatogenez, kıl dağılımı ve nöronal yeniden şekillenme gibi cinsel özelliklerin gelişimi ve korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Ayrıca kadın fizyolojisi ve üreme süreçlerinde de önemli bir etkisi bulunmaktadır.

Androjen sinyallemesinin, prostat kanseri, meme kanseri, diyabet, metabolik sendrom ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir (Jiang et al., 2009). Özellikle, androjenlerin hem in vitro hem de in vivo olarak insan meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiş ve klinik gözlemler, androjenlerin veya androjenik bileşiklerin kadınlarda meme kanserine karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir (Labrie et al., 1992).

Anti-androjen ilaçların etkinliğini artırdığı bilinen, androjen yanıtında rol oynayan TRIM36'nın meme kanserinde önemli ve henüz keşfedilmemiş roller üstlenebileceği, özellikle bu rollerin androjen sinyal yollarıyla etkileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte androjen reseptörü seviyesini yükselttiği bilinen aynı zamanda mTOR inhibitörü olan rapamisin (antiproliferatif ve immünosupresif özellikleri bilinen bir makroliddir) kemoterapi veya hormon tedavileri ile birlikte kullanıldığında bazı tedaviye dirençli meme kanseri vakalarında ilaç etkinliklerini güçlendirdiği ve tümör progresyonunu engellediği bilinmektedir. Ancak mTOR inhibitörlerinin immünosupresyon ve metabolik bozukluklar gibi yan etkilerinden dolayı kombine tedavi arayışları sürmektedir. Bu bağlamda TRIM36'nın meme kanserindeki olası rolünün aydınlatılması ve rapamisin ile kombine bir gen tedavisi yaklaşımının etkinliğinin araştırılması önem arz etmektedir.

Bu çalışma kapsamında MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında TRIM36 ekspresyon seviyesi azaltılarak ve/veya rapamisin uygulanarak hem TRIM36'nın meme kanseri ile ilişkisi hem TRIM36 ile rapamisin ilişkisi araştırılmıştır. Öncelikle bulgulara göre TRIM36'nın 65 kDa olan varyantı daha fazla olmakla birlikte 81 ve 83 kDa'luk varyantlarının da (sırasıyla varyant 4, 5 ve 1) meme kanseri hücrelerinde eksprese edildiği gözlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda rapamisin uygulanmış her iki meme kanseri hücre hattında TRIM36 protein seviyesinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Rapamisinin mTOR'u inhibe eden, hücre proliferasyon ve büyümesini önleyen rolleri göz önünde bulundurulduğunda

TRIM36'nın mTOR yolağı ile ilişkili olabileceği ya da rapamisin tarafından doğrudan indüklenebilen bir hedef olabileceği akla gelmektedir. Aynı zamanda TRIM proteinlerinin bazı üyelerinin otofaji ve hücrel stres yanıtında rolleri olduğu bilinmektedir. Rapamisin ile indüklenen otofajik süreçlerin TRIM36 ekspresyonunun artmasına yol açıyor olabileceği de olasıdır.

Yakın zamanda TRIM36 protein seviyesinin tümör boyutu, tümör evrelemesi ve metastaz ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Zhang et al., 2020) Aynı araştırma grubu daha sonraki çalışmalarında, TRIM36 ekspresyon seviyesinin artmasının, özofageal skuamöz hücreli karsinoma (ESCC) hücrelerinde ve dokularında β -katenin ubiquitilasyonunu ve yıkımını tetikleyerek hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Zhao et al., 2022). Hepatoselüler karsinoma (HCC) doku ve hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada yine TRIM36'nın tümör baskılayıcı rol oynadığı bildirilmiştir. si-TRIM36'nın Wnt/ β -katenin yolunu güçlendirdiğini ve bunun sonucunda HCCLM3 ve Huh7 hücre hatlarında proliferasyon, migrasyon ve invazyonu artırdığı gösterilmiştir. Dolayısıyla TRIM36'nın, Wnt/ β -katenin yolağını inhibe ederek apoptozu artırdığı, proliferasyon, invazyon ve migrasyonu önemli ölçüde azalttığı düşünülmüştür. Ayrıca TRIM36'nın HCC dokularında downregüle olduğu ve bunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Tong et al., 2022). Benzer şekilde akciğer adenokarsinoma (LUAD) hastalarında TRIM36'nın düşük ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş ve ek olarak hücre hatlarında yapılan deneylerle hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve LUAD hücre hatlarında apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (Yu et al., 2022). Prostat kanseri hücre hatları ile yapılan başka bir çalışmada da TRIM36'nın MAPK/ERK sinyal yollarını zayıflatarak ve apoptozla ilişkili yolları düzenleyerek bir tümör baskılayıcı rol oynadığı ileri sürülmüştür (Kimura et al., 2018, Liang et al., 2018).

Bu çalışmada ise meme kanseri hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231'de TRIM36 susturulduğunda hücre göçünün arttığı gözlenmiştir. Ancak MCF-7 de bu artış anlamlı bulunurken, MDA-MB-231'de anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bulgu yapılan diğer çalışmaları da destekler nitelikte olup TRIM36'nın potansiyel bir tümör baskılayıcı olduğunu düşündürmektedir. Kanser hücre göçü metastazın temel aşamalarından biridir ve TRIM36 hücre göçünü önleyerek bu süreci inhibe eden bir baskılayıcı olabilir.

Hücre proliferasyonu bakımından TRIM36'nın susturulmasının her iki hücre üzerinde de anlamlı olarak bir fark oluşturmadığı gözlemlenirken; ilginç olarak MCF-7 hücrelerinde daha

az sayıda koloni oluşumu görülürken MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla sayıda koloni gözlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, meme kanseri hücrelerinin farklı alt tiplerini temsil etmektedir. MCF-7 hücreleri ER pozitif ve daha az agresifken, MDA-MB-231 hücreleri ER negatif ve daha agresif bir fenotipe sahiptir. Bu farklılıklar, TRIM36'nın etkilerini farklı şekillerde göstermesine neden olabilir. Örneğin, TRIM36'nın MCF-7 hücrelerinde apoptozu daha fazla tetikleyerek koloni oluşumunu azaltırken, MDA-MB-231 hücrelerinde farklı sinyal yollarını etkileyerek çoğalmayı teşvik etmesi mümkün olabilir. Bunun yanı sıra TRIM36'nın hangi genlerin ekspresyonunu etkilediği hücre tipine göre değişebilir. Bu durumun aydınlatılabilmesi için bu konuda yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

MDA-MB-231 hücrelerinde hem rapamisin tek başına uygulanması hemde siTRIM36 ile kombine uygulanması kontrole oranla hücre göçünü anlamlı olarak azaltmaktadır. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde rapamisin tek başına uygulanmasının hücre göçü inhibisyonunda daha etkili olduğu, TRIM36'nın susturulmasının rapamisin etkisini azalttığı gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde de rapamisin uygulaması hücre göçünü azaltmıştır ancak kontrole kıyasla anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte bu hücrelerde TRIM36'nın susturulmasıyla birlikte rapamisin uygulanması hücre göçünü anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bu bulgular göz önüne alındığında MCF-7 hücrelerinde kombine uygulama, MDA-MB-231 hücrelerinde sadece rapamisin uygulaması hücre göçünü azaltacak bir terapötik yaklaşım olabilir.

MCF-7 hücrelerinin rapamisin duyarlı MDA-MB-231 hücrelerinin ise rapamisin dirençli olduğu bilinmektedir (Yu et al., 2001, Chang et al., 2007). MCF-7 hücrelerinde, rapamisin düşük konsantrasyonlarda G1 hücre döngüsü durdurulmasına ve apoptozu neden olmaktadır (Tuval-Kochen et al., 2013; Sokolosky et al., 2011). MDA-MB-231 hücrelerinde ise benzer etkileri elde etmek için önemli ölçüde daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Chatterjee et al., 2015). Ancak her iki hücrede de mTOR'u inhibe edebildiği ve meme kanserinde antiproliferatif rol oynadığı gösterilmiştir (Chang et al., 2007).

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde rapamisin tek başına uygulanması, hücre proliferasyonunu paradoksal olarak artırırken, MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. siTRIM36'le rapamisin kombine uygulanması ise, MCF-7 hücrelerinde TRIM36 susturulmasının tek başına uygulandığı gruba kıyasla koloni oluşumunda artışa neden olmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise kombine uygulama, koloni oluşumunu anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde rapamisin paradoksal etkisini ve

TRIM36 susturulmasının potansiyel modölatör rolünü düşündürürken, MDA-MB-231 hücrelerinde kombinasyon tedavisinin anti-proliferatif etkisini göstermektedir.

MCF-7 hücreleri ER+, MDA-MB-231 ise ER- hücrelerdir. MCF-7 hücreleri östrojen hormonuna duyarlıdır ancak MDA-MB-231 hücreleri östrojen sinyaliyle bağımsız bir şekilde proliferasyon gösterirler. Meme kanserinde AR ekspresyonunun ER+ hastalarda sağkalımla ilişkili olduğu bilinmekte, ER- hastalara göre ER+ hastalarda ekspresyonunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Peters et al., 2009). Çalışmamızda androjen duyarlı TRIM36'nın da ER+ olan hücre hattı MCF-7'de daha yüksek seviyede eksprese edildiği gözlenmiştir. TRIM36'nın hücre tipine göre farklı etkiler göstermesi, hücrelerin farklı hormon sinyal yollarına bağımlı olmasıyla ilişkili olabilir. Özellikle östrojen reseptörü (ER) pozitif MCF-7 hücrelerinde ve ER negatif MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen farklı etkiler, östrojen sinyal yolunun TRIM36 ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu modüle edebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla östrojen sinyal yolunu kullanan MCF-7 hücreleri ile östrojen sinyalinden bağımsız MDA-MB-231 hücrelerinde gösterdiği etkiler farklı olarak gözlenmektedir. Yüksek göç yeteneğine sahip oldukları düşünüldüğünde, MDA-MB-231 hücrelerinde TRIM36'nın gerek tek başına gerekse rapamisin ile birlikte kullanımının göç üzerindeki etkisi, MCF-7 hücrelerinde olduğu kadar belirgin olmamıştır. Bu durum, MDA-MB-231 hücrelerinin yüksek göç potansiyelinin, TRIM36 inhibisyonunun etkinliğini sınırlayabileceğini düşündürmektedir.

Meme kanserinde TRIM36'nın dahil olduğu süreçlerin, bu proteinin meme kanseri ile ilişkisinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için etkileşim partnerlerinin, dahil olduğu sinyal yollarının detaylı araştırmalarına ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışmamızda karşılaşılan farklılıkların detaylı incelenmesi, TRIM36'nın meme kanseri tedavisinde potansiyel bir hedef olarak kullanılmasına ışık tutabilir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ilk olarak TRIM36 mRNA ekspresyon seviyeleri normal ve tümörlü meme dokularında incelenmiştir. TRIM36'nın meme dokularında ifade edildiği tespit edilmiş olmakla birlikte, normal ve tümör dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, TRIM36'nın meme kanseri gelişiminde doğrudan bir rol oynamayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu çalışma sınırlı sayıda hasta örneğiyle gerçekleştirilmiştir. TRIM36'nın meme kanserindeki potansiyel rolünü ve diğer moleküler mekanizmalarla ilişkisini daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirmek için daha geniş ölçekli ve kapsamlı veri setlerine sahip çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ek olarak, meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231'de TRIM36 proteinin susturulmasının, rapamisin tek başına veya TRIM36 susturulmasıyla birlikte uygulanmasının hücre göçü ve proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde farklı sonuçlar gözlenmekle beraber kombine uygulamanın meme kanseri patogenezinin kontrolünde yeni bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. TRIM36'nın meme kanserinde tümör baskılayıcı bir rol üstleniyor olabileceği ancak bunun farklı kanser tiplerinde değişiklik gösterebilen bir rol olması muhtemeldir. Bunun aydınlatılması için farklı tipte meme kanseri hücrelerinde de araştırmanın yapılması, ek olarak TRIM36'nın etkileşim partnerlerinin ve görev aldığı sinyal yollarının aydınlatılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Aierken, G., Seyiti, A., Alifu, M., & Kuerban, G.** (2017). Knockdown of Tripartite-59 (TRIM59) inhibits cellular proliferation and migration in human cervical cancer cells. *Oncology Research*, 25(3), 381–388.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U.** (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50, 1-23.
- Ambros, V.** (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Balint, I., Müller, A., Nagy, A., & Kovacs, G.** (2004). Cloning and characterisation of the RBCC728/TRIM36 zinc-binding protein from the tumor suppressor gene region at chromosome 5q22.3. *Gene*, 332, 45–50.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwel, S. B., et al.** (1996). TOR controls translation, initiation, and early G1 progression in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 1227–1238.
- Bazirgan, O. A., & Hampton, R. Y.** (2008). Cue1p is an activator of Ubc7p E2 activity in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12797–12810.
- Behrends, C., & Harper, J. W.** (2011). Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), 520–528.
- Benke, S., Agerer, B., Haas, L., Stoger, M., Lercher, A., Gabler, L., Kiss, I., Scinicariello, S., Berger, W., Bergthaler, A., & et al.** (2018). Human tripartite motif protein 52 is required for cell context-dependent proliferation. *Oncotarget*, 9(18), 13565–13581.
- Bozovic-Spasojevic, I., Zardavas, D., Brohée, S., Ameye, L., Fumagalli, D., Ades, F., ... & Sotiriou, C.** (2017). The prognostic role of androgen receptor in patients with early-stage breast cancer: A meta-analysis of clinical and gene expression data. *Clinical Cancer Research*, 23(11), 2702–2712.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024).** Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.
- Betz, C., & Hall, M. N. (2013).** Where is mTOR and what is it doing there?. *Journal of Cell Biology*, 203(4), 563-574.
- Bhaskar, P. T., & Hay, N. (2007).** The two TORCs and AKT. *Developmental cell*, 12(4), 487-502.
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017).** Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast cancer research and treatment*, 165, 193-200.
- Cantley L. (2002)** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655–1657.
- Cao, J., Yang, M., Guo, D., Tao, Z., & Hu, X. (2024).** Emerging roles of tripartite motif family proteins (TRIMs) in breast cancer. *Cancer Medicine*, 13(14), e7472.
- Caratozzolo, M. F., Micale, L., Turturo, M. G., Cornacchia, S., Fusco, C., Marzano, F., Augello, B., D’Erchia, A. M., Guerrini, L., Pesole, G., & et al. (2012).** TRIM8 modulates p53 activity to dictate cell cycle arrest. *Cell Cycle*, 11(3), 511–523.
- Catsburg, C., Miller, A. B., & Rohan, T. E. (2015).** Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *International journal of cancer*, 136(9), 2204-2209.
- Chambon, M., Orsetti, B., Berthe, M. L., Bascoul-Mollevi, C., Rodriguez, C., Duong, V., ... & Cavaillès, V. (2011).** Prognostic significance of TRIM24/TIF-1 α gene expression in breast cancer. *The American journal of pathology*, 178(4), 1461-1469.
- Chang, I. Y., Kim, M. H., Kim, H. B., Kim, S. H., Kim, H. Y., & You, H. J. (2005).** Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochemical and biophysical research communications*, 327(1), 225-233.
- Chang, S. B., Miron, P., Miron, A., & Iglehart, J. D. (2007).** Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Journal of Surgical Research*, 138(1), 37-44.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chatterjee, A., Mukhopadhyay, S., Tung, K., Patel, D., & Foster, D. A.** (2015). Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF- β and Rb pathways. *Cancer letters*, 360(2), 134-140.
- Chen, Y., Guo, Y., Yang, H., Shi, G., Xu, G., Shi, J., Yin, N., & Chen, D.** (2015). TRIM66 overexpression contributes to osteosarcoma carcinogenesis and indicates poor survival outcome. *Oncotarget*, 6(26), 23708–23719.
- Cinar, B., De Benedetti, A., & Freeman, M. R.** (2005). Post-transcriptional regulation of the androgen receptor by Mammalian target of rapamycin. *Cancer Research*, 65(7), 2547–2553.
- Clague, M. J., & Urbé, S.** (2010). Ubiquitin: Same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 143(5), 682–685.
- Deshaies, R. J., & Joazeiro, C. A.** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 399–434.
- Du, T., & Zamore, P. D.** (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.
- Dykxhoorn, D. M., & Lieberman, J.** (2005). The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.*, 56(1), 401-423.
- Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., & Lieberman, J.** (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene therapy*, 13(6), 541-552.
- Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E.** (2015). Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *The journal of breast health*, 11(2), 59.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., & Chen, J.** (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294(5548), 1942-1945.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G.** (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
- Filleur, S., Courtin, A., Ait-Si-Ali, S., Guglielmi, J., Merle, C., Harel-Bellan, A., ... &**

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Cabon, F.** (2003). SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer research*, 63(14), 3919-3922.
- Fioretti, F. M., Sita-Lumsden, A., Bevan, C. L., & Brooke, G. N.** (2014). Revising the role of the androgen receptor in breast cancer. *Journal of molecular endocrinology*, 52(3), R257-R265.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., ... & Zelada-Hedman, M.** (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The American Journal of Human Genetics*, 62(3), 676-689.
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., ... & Wood, W. C.** (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology*, 24(9), 2206-2223.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., & Boyse, E. A.** (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 11-15.
- Grumati, P., & Dikic, I.** (2018). Ubiquitin signaling and autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 5404-5413.
- Haas, A. L., & Rose, I. A.** (1982). The mechanism of ubiquitin activating enzyme: A kinetic and equilibrium analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 329-337.
- Haas, A. L., Warms, J. V. B., Hershko, A., & Rose, I. A.** (1982). Ubiquitin-activating enzyme: Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 2543-2548.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews Disease primers*, 5(1), 66.

Hatakeyama, S. (2011). TRIM proteins and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 792.

Hatakeyama, S. (2017). TRIM family proteins: Roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 297–311.

Ikeda, K., Orimo, A., Higashi, Y., Muramatsu, M., & Inoue, S. (2000). Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS letters*, 472(1), 9-13.

Horie, K., Urano, T., Ikeda, K., & Inoue, S. (2003). Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2-5), 101-104.

Jacomin, A. C., Taillebourg, E., & Fauvarque, M. O. (2018). Deubiquitinating enzymes related to autophagy: New therapeutic opportunities? *Cells*, 7, 112.

Jiang, M., Ma, Y., Chen, C., Fu, X., Yang, S., Li, X., ... & Li, Y. (2009). Androgen-responsive gene database: Integrated knowledge on androgen-responsive genes. *Molecular Endocrinology*, 23(11), 1927–1933.

Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., ... & Smith-Warner, S. A. (2016). Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *International journal of epidemiology*, 45(3), 916-928.

Katuwal, S., Tapanainen, J. S., Pukkala, E., & Kauppila, A. (2019). The effect of length of birth interval on the risk of breast cancer by subtype in grand multiparous women. *BMC cancer*, 19, 1-7.

Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Wurmbach, J. H., Loges, S., Chalajour, F., Vahid, S. N., ... & Ergun, S. (2005). Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 2361-2369.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163-175.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M.** (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*, 11(4), 895-904.
- Kimura, N., Yamada, Y., Takayama, K. I., Fujimura, T., Takahashi, S., Kume, H., & Inoue, S.** (2018). Androgen-responsive tripartite motif 36 enhances tumor-suppressive effect by regulating apoptosis-related pathway in prostate cancer. *Cancer Science*, 109(12), 3840–3852.
- Kispert, S., & McHowat, J.** (2017). Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 127-132.
- Kitamura, K., Tanaka, H., & Nishimune, Y.** (2003). Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 44417-44423.
- Klauber-DeMore, N.** (2006). Tumor biology of breast cancer in young women. *Breast disease*, 23(1), 9-15.
- Knight, J. A., Fan, J., Malone, K. E., John, E. M., Lynch, C. F., Langballe, R., ... & WECARE Study Collaborative Group.** (2017). Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *International journal of cancer*, 141(5), 916-924.
- Kuang, E., Qi, J., & Ronai, Z. E.** (2013). Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 38, 453–460.
- Labrie, F., Simard, J., de Launoit, Y., Poulin, R., Theriault, C., Dumont, M., ... & Li, S. M.** (1992). Androgens and breast cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 16, 31–38.
- Lee, D. F., & Hung, M. C.** (2007). All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell cycle*, 6(24), 3011-3014.
- Li, W., Tu, D., Brunger, A. T., & Ye, Y.** (2007). A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature*, 446(7133), 333–337.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Liang, C., Wang, S., Qin, C., Bao, M., Cheng, G., Liu, B., & Gu, M.** (2018). TRIM36, a novel androgen-responsive gene, enhances anti-androgen efficacy against prostate cancer by inhibiting MAPK/ERK signaling pathways. *Cell Death & Disease*, 9(2), 1–13.
- Liu, J., Welm, B., Boucher, K. M., Ebbert, M. T., & Bernard, P. S.** (2012). TRIM29 functions as a tumor suppressor in nontumorigenic breast cells and invasive ER+ breast cancer. *The American journal of pathology*, 180(2), 839-847.
- Liu, X., Yan, C., Chang, C., Meng, F., Shen, W., Wang, S., & Zhang, Y.** (2023). FOXA2 Suppression by TRIM36 Exerts Anti-Tumor Role in Colorectal Cancer Via Inducing NRF2/GPX4-Regulated Ferroptosis. *Advanced Science*, 10(35), 2304521.
- Liu, Y., Zhang, B., Shi, T., & Qin, H.** (2017). miR-182 promotes tumor growth and increases chemoresistance of human anaplastic thyroid cancer by targeting tripartite motif 8. *Oncology Targets and Therapy*, 10, 1115–1122.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Luo, A., & Zhang, X.** (2016). ERRF is essential for Estrogen-Estrogen Receptor alpha signaling pathway in ER positive breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(2), 400-405.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Franklin, R. A., Abrams, S. L., Chappell, W. H., Wong, E. W., ... & Martelli, A. M.** (2007). Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Advances in enzyme regulation*, 47(1), 64-103.
- Meroni, G., & Diez-Roux, G.** (2005). TRIM/RBCC, a novel class of ‘single protein RING finger’ E3 ubiquitin ligases. *BioEssays*, 27(11), 1147–1157.
- Miyajima, N., Maruyama, S., Nonomura, K., & Hatakeyama, S.** (2009). TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), 383–387.
- Mu, X., Li, H., Zhou, L., & Xu, W.** (2019). TRIM52 regulates the proliferation and invasiveness of lung cancer cells via the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncology Reports*, 41(6), 3325–3334.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Myers, A. P., & Cantley, L. C.** (2010). Targeting a common collaborator in cancer development. *Science translational medicine*, 2(48), 48ps45-48ps45.
- Natarajan, A., & Venugopal, S. K.** (2011). Translational Research on Breast Cancer: miRNA, siRNA and Immunoconjugates in Conjugation with Nanotechnology for Clinical Studies. In *Breast Cancer-Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*. IntechOpen.
- Need, E. F., Selth, L. A., Harris, T. J., Birrell, S. N., Tilley, W. D., & Buchanan, G.** (2012). Research resource: Interplay between the genomic and transcriptional networks of androgen receptor and estrogen receptor α in luminal breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 26(11), 1941–1952.
- Nicolás Diaz-Chico, B., Germán Rodríguez, F., González, A., Ramírez, R., Bilbao, C., Cabrera de León, A., ... & Díaz-Chico, J. C.** (2007). Androgens and androgen receptors in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1-5), 1–15.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., ... & Stratton, M. R.** (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47-54.
- Olsson, M., Beck, S., Kogner, P., Martinsson, T., & Carén, H.** (2016). Genome-wide methylation profiling identifies novel methylated genes in neuroblastoma tumors. *Epigenetics*, 11(1), 74–84. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1132741>
- Passmore, L. A., & Barford, D.** (2004). Getting into position: The catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochemical Journal*, 379, 513–525.
- Peng, Z., Xiao, Z., Wang, Y., Liu, P., Cai, Y., Lu, S., ... & Han, Z. C.** (2004). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells. *Cancer Gene Therapy*, 11(11), 707-712.
- Peters, A. A., Buchanan, G., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., Centenera, M. M., Harris, J. M., ... & Henshall, S. M.** (2009). Androgen receptor inhibits estrogen receptor- α activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Research*, 69(15), 6131–6140.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Pietri, E., Conteduca, V., Andreis, D., Massa, I., Melegari, E., Sarti, S., ... & Rocca, A.** (2016). Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*, 23(10), R485-R498.
- Purow, B. W., Haque, R. M., Noel, M. W., Su, Q., Burdick, M. J., Lee, J., ... & Fine, H. A.** (2005). Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer research*, 65(6), 2353-2363.
- Qi, Z. X., Cai, J. J., Chen, L. C., Yue, Q., Gong, Y., Yao, Y., & Mao, Y.** (2016). TRIM28 as an independent prognostic marker plays critical roles in glioma progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 126(1), 19–26.
- Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., & Meroni, G.** (2008). Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 225.
- Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N., & Freemont, P. S.** (1996). Does this have a familiar RING? *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 208–214.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Schuur, E. R., & DeAndrade, J. P.** (2015). Breast cancer: Molecular mechanisms, diagnosis, and treatment. In *International Manual of Oncology Practice* (pp. 155–200). Springer, Cham.
- Schweizer, M. T., & Yu, E. Y.** (2017). AR-signaling in human malignancies: prostate cancer and beyond. *Cancers*, 9(1), 7.
- Sert, P. İ., & Küçükkılınç, T. T.** (2022). Current Approaches in Breast Cancer Treatment. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(1), 46–59.
- Seto, B.** (2012). Rapamycin and mTOR: A serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 1(1), 1–7.
- Short, K. M., & Cox, T. C.** (2006). Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8970–8980.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Singh, N., Kumble Bhat, V., Tiwari, A., Kodaganur, S. G., Tontanahal, S. J., Sarda, A., Malini, K. V., & Kumar, A.** (2017). A homozygous mutation in TRIM36 causes autosomal recessive anencephaly in an Indian family. *Human Molecular Genetics*, 26(6), 1104-1114.
- Sokolosky, M. L., Stadelman, K. M., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Martelli, A. M., Stivala, F., ... & McCubrey, J. A.** (2011). Involvement of Akt-1 and mTOR in sensitivity of breast cancer to targeted therapy. *Oncotarget*, 2(7), 538.
- Song, D., Cui, M., Zhao, G., Fan, Z., Nolan, K., Yang, Y., ... & Zhang, D. Y.** (2014). Pathway-based analysis of breast cancer. *American journal of translational research*, 6(3), 302.
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C.** (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS one*, 15(7), e0232565.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., & Muramatsu, T.** (2004). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer research*, 64(10), 3365-3370.
- Tan, Z., Liu, X., Yu, E., Wang, H., Tang, L., Wang, H., & Fu, C.** (2017). Lentivirus-mediated RNA interference of tripartite motif 68 inhibits the proliferation of colorectal cancer cell lines SW1116 and HCT116 in vitro. *Oncology Letters*, 13(5), 2649–2655.
- Tian, M., & Schiemann, W. P.** (2017). TGF- β stimulation of EMT programs elicits non-genomic ER- α activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. *Journal of cancer metastasis and treatment*, 3, 150.
- Tong, Q., Yi, M., Kong, P., Xu, L., Huang, W., Niu, Y., ... & Yan, D.** (2022). TRIM36 inhibits tumorigenesis through the Wnt/ β -catenin pathway and promotes caspase-dependent apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International*, 22(1), 278.
- Tuval-Kochen, L., Paglin, S., Keshet, G., Lerenthal, Y., Nakar, C., Golani, T., ... & Lawrence, Y.** (2013). Eukaryotic Initiation Factor 2 α -a Downstream Effector of Mammalian Target of Rapamycin-Modulates DNA Repair and Cancer Response to Treatment. *PloS one*, 8(10), e77260.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., ... & Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*, 417(6891), 871-875.

URL-1: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRIM36>, Ziyaret tarihi: 19.10.2024.

Üreyen, O., İlhan, E., Dadalı, E., & Gökçelli, U. Evaluation of patients with breast cancer 40 years of age and under and 70 years of age and older. *ANATOLIAN JOURNAL OF GENERAL MEDICAL RESEARCH*, 26(2), 127-132.

van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., & Berol, V. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *British journal of cancer*, 87(11), 1234-1245.

Venkadakrishnan, V. B., Ben-Salem, S., & Heemers, H. V. (2020). AR-dependent phosphorylation and phospho-proteome targets in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 27(6), R193–R210.

Venuto, S., Castellana, S., Monti, M., Appolloni, I., Fusilli, C., Fusco, C., Pucci, P., Malatesta, P., Mazza, T., & Merla, G. (2019). TRIM8-driven transcriptomic profile of neural stem cells identified glioma-related nodal genes and pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(3), 491–501.

Versteeg, G. A., Rajsbaum, R., Sánchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Valdiviezo, J., Shi, M., ... & García-Sastre, A. (2013). The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity*, 38(2), 384–398.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., & Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 194(3), 531–544.

Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7), 489-501.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Wang, L., Heidt, D. G., Lee, C. J., Yang, H., Logsdon, C. D., Zhang, L., ... & Simeone, D. M.** (2009). Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and β -catenin stabilization. *Cancer cell*, 15(3), 207-219.
- Wang, Y., Liu, C., Xie, Z., & Lu, H.** (2020). Knockdown of TRIM47 inhibits breast cancer tumorigenesis and progression through the inactivation of PI3K/Akt pathway. *Chemico-biological interactions*, 317, 108960.
- Wang, M., & Pickart, C. M.** (2005). Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *The EMBO Journal*, 24(24), 4324–4333.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484.
- Wynne, C., Lazzari, E., Smith, S., McCarthy, E. M., Ní Gabhann, J., Kallal, L. E., ... & Jefferies, C. A.** (2014). TRIM68 negatively regulates IFN- β production by degrading TRK fused gene, a novel driver of IFN- β downstream of anti-viral detection systems. *PLoS ONE*, 9(6), e101503.
- Xiao, Z., Xue, J., Sowin, T. J., Rosenberg, S. H., & Zhang, H.** (2005). A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene*, 24(8), 1403-1411.
- Xu, W., Xu, B., Yao, Y., Yu, X., Cao, H., Zhang, J., Liu, J., & Sheng, H.** (2016). RNA interference against TRIM29 inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, 36(3), 1411–1418.
- Yagüe, E., Higgins, C. F., & Raguz, S.** (2004). Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Therapy*, 11(14), 1170-1174.
- Yang, Q., Zhao, J., Chen, D., & Wang, Y.** (2021). E3 ubiquitin ligases: Styles, structures and functions. *Molecular Biomedicine*, 2(1), 1–17.
- Yu, S., Li, W., Liu, X., Zhang, H., Liu, X., & Zhang, L. W.** (2022). TRIM36 enhances lung adenocarcinoma radiosensitivity and inhibits tumorigenesis through promoting RAD51 ubiquitination and antagonizing hsa-miR-376a-5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 628, 1-10.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yuan, J., Yan, R., Krämer, A., Eckerdt, F., Roller, M., Kaufmann, M., & Strebhardt, K.** (2004). Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*, 23(34), 5843-5852.
- Yuan, Z., Villagra, A., Peng, L., Coppola, D., Glozak, M., Sotomayor, E. M., ... & Seto, E.** (2010). The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions. *Molecular and cellular biology*.
- Zhan, W., Han, T., Zhang, C., Xie, C., Gan, M., Deng, K., Fu, M., & Wang, J. B.** (2015). TRIM59 promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells by upregulating cell cycle-related proteins. *PLOS ONE*, 10(11), e0142596.
- Zhang, H., Sun, W., Qiao, G., Zhao, B., Liu, X., & Zhu, F.** (2020). The expression of tripartite motif protein 36 and β -catenin correlates with the prognosis of esophageal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2020, 1–9.
- Zhang, Y., Tao, R., Wu, S. S., Xu, C. C., Wang, J. L., Chen, J., Yu, Y. S., Tang, Z. H., Chen, X. H., & Zang, G. Q.** (2018). TRIM52 up-regulation in hepatocellular carcinoma cells promotes proliferation, migration and invasion through the ubiquitination of PPM1A. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 116.
- Zhao, B., Qiao, G., Li, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, H., & Zhang, L.** (2022). TRIM36 suppresses cell growth and promotes apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Human Cell*, 35(5), 1487-1498.
- Zhao, X., Zhou, T., Wang, Y., Bao, M., Ni, C., Ding, L., ... & Li, J.** (2022). TRIM36 regulates neuroendocrine differentiation of prostate cancer via HK2 ubiquitination and GPx4 deficiency. *Research Square*, Version 1.
- Zheng, M., Wang, J., Ling, L., Xue, D., Wang, S., & Zhao, Y.** (2016). Screening and analysis of breast cancer genes regulated by the human mammary microenvironment in a humanized mouse model. *Oncology letters*, 12(6), 5261-5268.
- Zhou, W., Zhang, Y., Zhong, C., Hu, J., Hu, H., Zhou, D., & Cao, M.** (2018). Decreased expression of TRIM21 indicates unfavorable outcome and promotes cell growth in breast cancer. *Cancer Management and Research*, 10, 3687–3697.



EK AÇIKLAMALAR

EK A: Etik Kurul Onay Belgesi

	T.C. ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı
TOPLANTI TARİHİ	: 10/02/2021
TOPLANTI NO	: 2021/03
KARARLAR :	
15- Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'nın "Meme Kanseri TRIM36'nın Rolü" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,	
Oy birliği ile karar verilmiştir.	
A S L I / G İ B İ D İ R	
Prof. Dr. Günnur ÖZBAKİŞ DENGİZ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı	
Zonguldak BEÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 67600 KOZLU/ ZONGULDAK, Tel:0 372 261 32 60 Fax: 0 372 261 02 65	

EK A: Etik Kurul Onay Belgesi



ÖZGEÇMİŞ

Aycan ÇELİK İstanbul’da ilköğretim ve lise eğitimini bitirdikten sonra, lisans eğitimini Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde, yüksek lisans eğitimini İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda tamamlamıştır. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora yapmış ve burada araştırmalarına devam etmektedir.

