



**DPPL2 PROTEİNİN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Ali GÜZEL

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ**

Yüksek Lisans Tezi – 2018

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DPPL2 PROTEİNİNİN APOPTOZ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI

Mehmet Ali Güzel

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. İBRAHİM TEKEDERELİ

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2015-31 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Meme Kanseri	5
2.1.1. Meme Yapısı	5
2.1.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi.....	5
2.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	6
2.2. Meme Kanseri Genetiği.....	8
2.2.1. Meme Kanseri Oluşumunda Etkili Onkogenler	9
2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin Meme Kanserinde Etkisi	10
2.2.3. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri	10
2.2.4. Meme Kanseri Tipleri.....	13
2.2.5. Meme Kanseri Tedavi Şekilleri.....	14
2.2.6. DPPL2 Proteini.....	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Çalışmada Kullanılacak Malzemeler.....	19
3.2. Çalışmada Kullanılacak Kimyasallar	20

3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler	22
3.4. Çalışmada Kullanılan Antikorlar	22
3.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	22
3.5.1. 10X Yürütme Tamponu	22
3.5.2. 10X TBS (Tris-Buffer-Salin)	23
3.5.3. 1X Yürütme Tamponu	23
3.5.4. Transfer Solüsyonu	23
3.5.5. TBS/Tween -20	23
3.5.6. Lizis Solüsyonu	23
3.6. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	24
3.6.1. MDA-MB-231 Hüce Hattı	24
3.6.2. MCF-7 Hücre Hattı	24
3.6.3. MCF10A Hücre Hattı	24
3.7. Çalışmanın Aşamaları	25
3.7.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması	25
3.7.2. Hücrelerin Çözülmesi	25
3.7.3. Hücrelerin Pasajlanması	25
3.7.4. Hücrelerin Besi Yerlerinin Değişimi	26
3.7.5. Hücrelerin Lizis Edilmesi	26
3.7.6. Protein Miktarının Belirlenmesi	26
3.7.7. Western Blot Analizi	27
3.7.8. SiRNA ile DPPL2 İfadesinin Baskılanması	28
3.7.9. Apoptoz Değerlendirilmesi ve Hücre Proliferasyonu	29

4. BULGULAR	30
4.1. DPPL2 Protein İfadesinin Hücrelerde Gösterilmesi.....	30
4.1.2. siRNA Uygulanan Hücrelerin Görüntüleri,.....	31
4.1.3. MTS ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	31
4.1.4. Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptozun belirlenmesi	33
4.1.5. Annexin Boyama ile Apoptoz belirlenmesi	33
4.1.6. Hücre Döngüsü Analizi	36
4.1.7. Caspase İfadesinin Western Blot ile Gösterilmesi	41
4.1.7.1. MDA-MB 231 Hücre Hattında Caspase İfadesi.....	41
4.1.7.2. MCF-7 Hücre Hattında Casapase İfadesi	42
4.1.7.3. MCF10A Hücre Hattında Caspase İfadesi	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR.....	47
EKLER	52
ETİK KURUL RAPORU	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZET

DPPL2 Proteinin Apoptoz Üzerine Etkilerinin Meme Kanseri

Hücrelerinde Araştırılması

Amaç: Literatürde sadece meme kanserli dokularda ekspresyonunun arttığı bildirilen DPPL2 proteininin fonksiyonlarının nasıl icra ettiği bilinmemektedir. Çalışmada amaç, DPPL2 proteinin, hücre ölümü, hücre döngüsü ve hücre proliferasyonu üzerine etkisinin meme kanseri hücrelerinde araştırılması ve DPPL2 proteininin kanser oluşum sürecindeki rolünün belirlenmesidir.

Materyal ve Metod: Çalışmada MCF10A normal meme epitel hücresi, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmıştır. DPPL2 protein varlığının hücrelerde analiz edilmesi için Western Blot tekniği kullanılmıştır. Oluşturulan siRNA sistemleri ile DPPL2 proteinin baskılanması sağlanmıştır. Hücre proliferasyonu MTS yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre döngüsü ve hücre apoptozu Flow Sitometri yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: Western Blot analizi sonucunda DPPL2 proteinin MCF10A ve MCF-7 de yüksek düzeyde, MDA-MB-231'de düşük düzeyde ifade edildiği görülmüştür. siRNA uygulamasından sonra DPPL2 proliferasyonunun tüm hücre hatlarında azaldığı görülmüştür. DPPL2 hücre proliferasyonunun MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde % 20, MCF10A hücrelerinde ise %25 azaldığı belirlenmiştir. DPPL2 siRNA uygulaması sonucu apoptoz miktarları, MDA-MB-231 hücrelerinde %1,6, MCF-7 hücrelerinde %0,06 ve MCF10A hücrelerinde ise %1,98 olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmada meme kanseri hücreleri ve meme epitel hücrelerinde DPPL2 proteinin apoptozdaki rolü araştırıldı. DPPL2 proteinin baskılanmasının hücre proliferasyonuna azaltıcı yönde, hücre apoptozuna ise artırıcı yönde etki ettiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: DPPL2, Meme kanseri, Epitel hücre

ABSTRACT

The Investigation of the Effects of DPPL2 Protein on Apoptosis in Breast Cancer Cells

Aim: It is not known how DPPL2 protein, which is reported that its expression is increased only in breast cancer tissues in literature, performs its functions. The aim of the study is to investigate the effect of DPPL2 protein on cell death, cell cycle, and cell proliferation in breast cancer cells and to determine the role of DPPL2 protein in the cancer formation process.

Material and Method: In the study, MCF10A normal mammary epithelial cells, MDA-MB 231 and MCF-7 cell lines were used. The Western Blot technique was used to analyze the presence of DPPL2 protein in cells. Suppression of DPPL2 protein was achieved by generated siRNA systems. Cell proliferation was determined by the MTS method. Cell cycle and cell apoptosis were performed by flow cytometry method.

Findings: In consequence of Western Blot analysis, it was seen that DPPL2 protein was expressed in high levels in MCF10A and MCF-7, in low level in MDA-MB-231. It was seen that DPPL2 proliferation was decreased in all cell lines after the treatment of siRNA. DPPL2 cell proliferation was reduced by 20% in MDA-MB-231 and MCF-7 cells and by 25% in MCF10A cells. The amounts of DPPL2 siRNA apoptosis were determined to be 1.6% in MDA-MB-231 cells, 0.06% in MCF-7 cells and 1.98% in MCF10A cells.

Conclusion: In the study, DPPL2 protein analysis was performed in breast cancer cells and mammary epithelial cells in vitro. It was seen that DPPL2 protein suppression effected in a decreased manner on cell proliferation, and in an enhanced manner on cell apoptosis.

Key Words: DPPL2, Breast Cancer, epithelial cell

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BRCA1	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni 1
BRCA2	: Meme Kanseri Yatkınlık Yeni 2
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
ER	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
DPPL1	: Fosfolipit Fosfataz1
DPPL2	: Fosfolipit Fosfataz2
PAP	: Fosfatidat fosfataz
DAG	: Diaçilgliserol
PA	: Fosfataz
NEM	: <i>N</i> -ethylmaleimide
P53	: Tümör Protein 53
ATM	: Mutant Ateksi Telenjiektazi
MCF7	: ER+/PR+ Meme Kanseri Hücre Hattı
MCF10A	: Normal Meme Epiteli Hücre Hattı
MDA-MB-231	: ER-/PR-/HER2- Meme Kanseri Hücre Hattı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IHC	: İmmünohistokimyasal

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil.1. Yağ Asidinin Yapısı. R1 ve R2, Yağ Grupları.....	2
Şekil.2. Fosfolipit Sentezi Basamakları.....	3
Şekil.3. Memenin Anatomik Yapısı.....	5
Şekil.4. 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri (TÜİK).....	6
Şekil.5. Meme Kanserinde Belirli Genlerin Kanser Yapma İnsidansı.....	13
Şekil.6. MCF10A, MCF-7 ve MDA-MB -231 Hücre Hatlarında DPPL2 Protein İfadesinin Gösterilmesi.....	34
Şekil.7. Kültüre Alınan ve siRNA Uygulanacak MDA-MB-231 hücrelerinin Tedavi Edilmeden Önceki Görüntüsü.....	36
Şekil.8. MDA-MB-231 Hücre Hattında DPPL2 Proteinin Proliferasyonu.....	35
Şekil.9. MCF -7 Hücre Hattında DPPL2 Proteinin Proliferasyonu.....	35
Şekil.10. MCF10A Hücre Hattında DPPL2 Proteinin Proliferasyonu.....	36
Şekil.11. MDA-MB 231 Hücre hattında sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Miktarları.....	37
Şekil.12. MDA-MB-231 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	37
Şekil.13. MCF10A Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Miktarları.....	38
Şekil.14. MCF10A Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	38
Şekil.15. MCF-7 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Miktarları.....	39
Şekil.16. MCF-7 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	39

Şekil.17. MDA-MB-231 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Miktarı.....	40
Şekil.18. MDA-MB-231 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Yüzdesi.....	40
Şekil.19. MCF10A Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Miktarı.....	41
Şekil.20. MCF10A Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Yüzdesi.....	42
Şekil.21. MCF-7 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Miktarı.....	43
Şekil.22. MCF-7 Hücre Hattında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Apoptoz Yüzdeleri.....	43
Şekil.23. MDA-MB 231 Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulamasının Caspase-3 ve Caspase-9 İfadesinin Western Blot ile Gösterimi.....	44
Şekil.24. MCF7 Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulamasının Caspase-3 ve Caspase-9 İfadesinin Western Blot İle gösterimi.....	45
Şekil.25. MCF10A Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulamasının Caspase -9 Aktivitesinin Western Blot ile Gösterimi.....	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo.1. Meme kanseri tipleri.....	14
Tablo.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	20
Tablo.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	21
Tablo.4. Çalışmada kullanılan kitler.....	23
Tablo.5. Çalışmada kullanılan antikorlar.....	23
Tablo.6. Protein Standartlarının Konsantrasyonları.....	29



1. GİRİŞ

Kanser normal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize olan bir hastalık grubudur. Amerikan Kanser Derneğine (American Cancer Society)'ne göre de 2014 yılı içinde Amerika'da yaklaşık olarak 1.665.000 yeni kanser vakasının tespit edilmesi ve 585.720 kişinin ise kanserden ölmesi beklenmektedir (1). 1975 yılı istatistiklerinde 2 yıllık sağ kalım oranı %49 iken 2003-2009 yılları arasında 6 yıllık sağ kalım oranı % 68'dir. Sağ kalım oranındaki gelişme, kanserin erken dönemde tanısı ve tedavisindeki gelişmeyi yansıtmaktadır. 2013'de De Santis tarafından yapılan araştırmalar da 2014'deki verilerle benzerlik göstermektedir (2).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşitlerindedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre meme kanseri kadınlarda en yüksek insidansa sahiptir (34.73/100000) (3). Güncel Globocan verilerine göre ise kanser olan her dört kadından biri meme kanseridir (4). Kanser oluşumuna katılan genler tümör supressör ya da protoonkogen olarak görev yapmaktadırlar. Protoonkogenler kanser oluşumuna iki şekilde neden olurlar:

1-Protoonkogenlerin yapısında meydana gelen değişimlerle onkogenik özellik kazanması

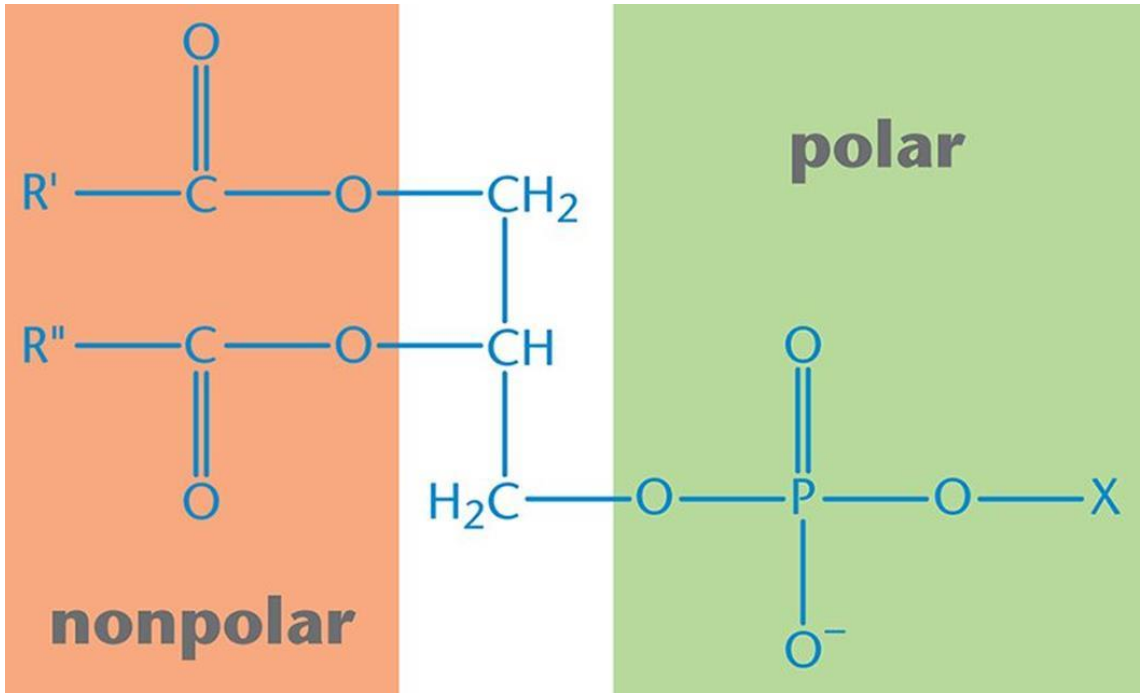
2-Protoonkogenlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler ile onkogenik karakter kazanması

Tümör süpressör genler hücre büyümesinin ve bölünmesinin kontrolünü sağlayan genler olduklarından mutasyona uğramaları kanserleşmeye yol açar.

Meme kanserinin tanı ve tedavisi sürecinde son on yılda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmelerde yapılan çalışmalarda risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, etkin biçimde tarama stratejilerinin kullanılmasının ve genetik bilimindeki gelişmelerin rolü yüksektir. Özellikle BRCA-1 ve BRCA-2 genlerindeki mutasyonların meme kanseriyle ilişkisinin saptanması ve bu kişilerin periyodik aralıklarla takibinin yapılması neticesinde erken tanı konan ve tedavi edilebilen hasta sayısında önemli artışlar olmuştur (5).Teknolojinin gelişmesi ile ilaçlar ve yeni cerrahi yöntemlerin katkısı ile meme kanserleri ölümlerinin sayısı azalmaktadır.

Ancak ilaçlara karşı direnç ve ileri evre metastatik kanserler hala büyük sorun olarak bulunmaktadır. Bu sorunların aşılabilmesi için yeni ilaçlara veya var olan, cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavileri ile kombine edilerek kullanılacak yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç bulunmaktadır.

Hücre membranının en önemli yapıtaşlarından olan fosfolipitler bir fosfat bağlı polar baş grup ve iki yağ asidi zincirinden oluşmaktadır.



Şekil 1: Yağ asidinin yapısı. R' ve R'', yağ asidi grupları; X, fosfolipitin tipini belirleyen alkol grubu.

Polar kısım suya eğilimli bölüm, apolar kısmı ise sudan kaçan kısım (6).

Gliserol-3- fosfat ile 2 molekül yağ açıl coA, açıl transferazlar tarafından katalizlenen iki kademeli bir reaksiyonda birleşirler ve fosfatidat oluşur (7). Fosfatidat ise fosfolipit sentezinde bir ara bileşiktir ve memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum ve mitokondri dış zarlarında sentezlenmektedir.

Fosfatazlar farklı maddeleri defosforile etme yeteneğine sahip bir grup proteinlerdir. Fosfatazlar, klasik serin/treonin fosfatazlar, protein tirozin fosfatazlar, aspartat bağlı tirozin fosfatazlar olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır (8). Bu sınıflandırma, katalitik etki ve bu proteinlerin yapısal benzerlik aminoasit sekansına dayanmaktadır.

Apoptoz, programlanmış hücre ölüm süreci olarak bilinmektedir. Apoptoz genlerin düzenlemiş olduğu, organizmada hemostazın korunduğu, protein sentezi, RNA ve enerjiye ihtiyaç duyulan ve hücrelerin kendi kendilerini programlı olarak yok ettiği bir süreçtir. (11).

Bu çalışmada hücre membranı komponentlerinden olan fosfolipit sentezinde bir ara bileşik olan fosfatidatların defosforile edilmesinde görev alan DPPL2 proteininin apoptoz süreci ile ilişkisinin meme kanseri hücrelerinde araştırılması planlandı.

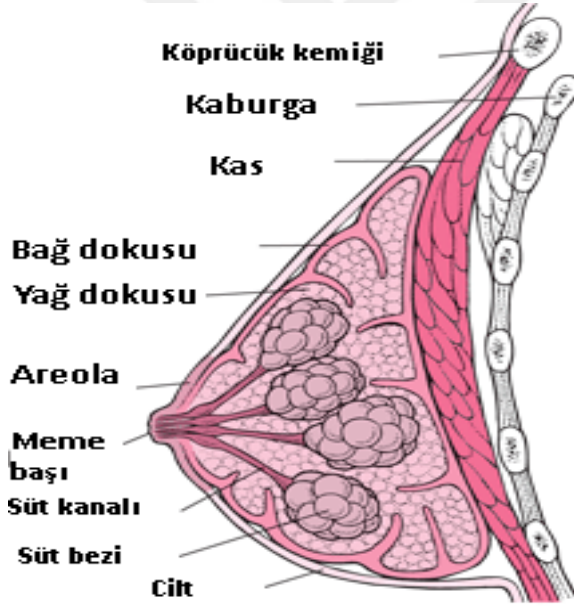


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Meme Yapısı

Meme yapısı, lobüler olarak bilinen süt bezleri, süt kanalları, bağlayıcı dokular ve yağ dokusundan meydana gelen stromadan oluşmaktadır. Göğüs ön yüzeyinde yer alan meme 15-20 tane bez dokusu lobundan oluşmuştur. Memeyi oluşturan loblar birbirine fibröz doku ile bağlanmışlardır. Loblar arasında ise bol miktarda yağ dokunun varlığı mevcuttur (12).



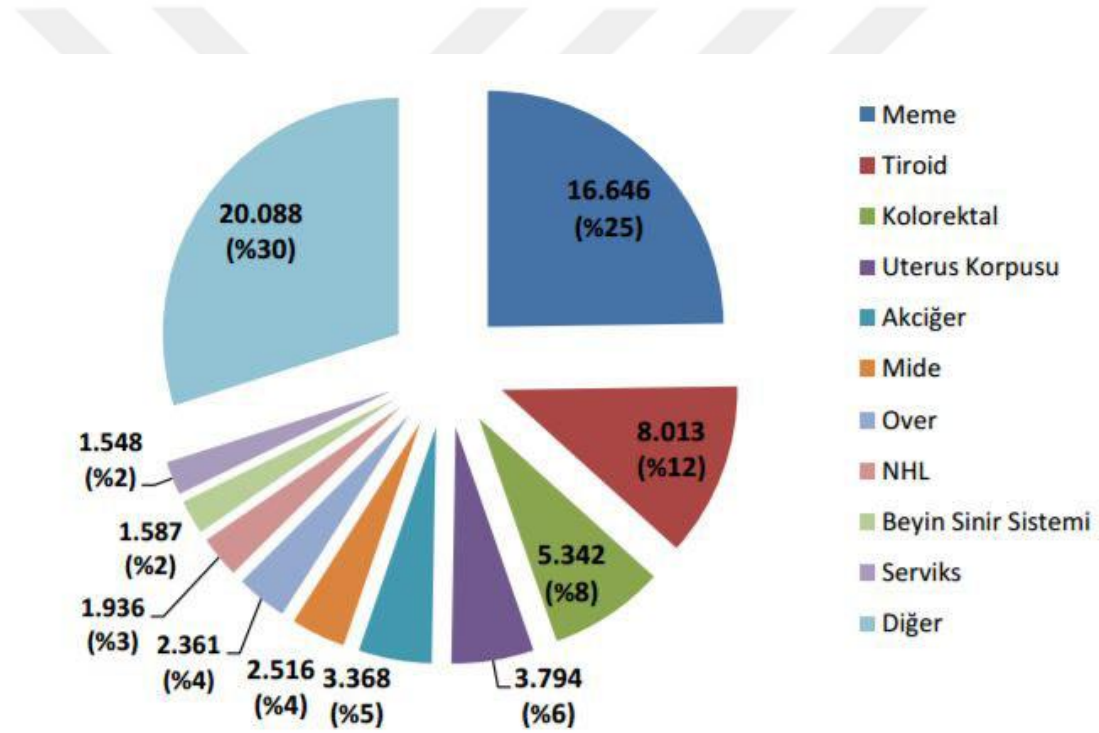
Şekil 3: Memenin anatomik yapısı (13).

2.1.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri Dünya Sağlık Örgütü 2008 verilerine göre, melanoma dışı deri kanserleri hariç tutulduğunda tüm dünyada akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkla

görülen, kadınlarda ise en çok görülen ve en fazla ölüme neden olan kanser türü olarak belirtilmiştir (1). Türkiye’de ise Sağlık Bakanlığının yayınladığı 2004-2006 yılları arasındaki kanser istatistiklerinde, kadınlarda, deri kanserleri dahil olmak üzere meme kanseri en fazla görülen kanser türü olarak belirtilmiştir (2).

2008 yılında dünya çapında yapılan araştırmalar sonucunda 12,7 milyon kanser vakasının tespit edildiği ve bunların 7,6 milyonun kanser nedeniyle öldüğü tespit edilmiştir. Olguların % 56’sı, ölümlerin ise % 64’ü ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde görülmektedir (14).



Şekil.4. Türkiye’de görülen kanser çeşitleri (15).

2.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Hormonal Faktörler:

Meme kanserlerinde destekleyici tedavilerde tamoksifenin, kullanım sürecince kontralateral meme kanserlerinin beklendiğinden az olması, tamoksifenin meme kanserinde koruyucu bir rolü olduğu görüşünü güçlendirmektedir (16).

Vücuttaki hormonların seviyesi meme kanserinin oluşmasında ve ilerlemesinde önemli yer tutmaktadır. Menstrual döngü süresince bireyin yüksek düzeyde östrojene maruz kalması kişinin yaşamını olumsuz etkilemektedir. Doğum sayısının birden fazla olması, reproduktif yaşamın uzun sürmesi ideal doğum yaşının normalden daha geç olması gibi hormonal risk faktörlerinin çoğu, menstrual döngü süresince kişinin yüksek oranda östrojen salgılamasının sonuçlarıdır. Over tümörlerinin fonksiyonel halde oldukları yerlerin östrojen üzerinde bulunması postmenopozal dönemdeki kadınlarda artan meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Kadınların menopoz dönemlerinde oral kontraseptif kullanmaları ve bu süreçte hormon tedavisi almaları hormonal dengesizliğe yol açarak meme kanserine neden olabilmektedir (17).

Çevresel Faktörler

Beslenme:

Yağlı yiyeceklerin sürekli olarak tüketilmesinin serum östrojen düzeyini artırarak meme kanseri riskini artırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Yapılan bazı araştırmalarda kırmızı eti çok tüketen toplumlarda meme kanseri oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir (18). Meme kanserinde korunmada D vitamini alımının etkili olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (19).

Egzersiz:

Meme kanseri olan kadınlarda özellikle menopoz öncesi dönemde egzersiz faaliyetlerin artmasının meme kanseri riskini azalttığı yönünde bulgular mevcuttur (20). Yapılan çalışmalarda düzenli yapılan egzersizlerin anovulotuar döngü sayısında artışa yol açarak meme kanseri riskini azalttığı gözlemlenmiştir.

Alkol:

Yapılan araştırmalarda alkol tüketme süresi ve tüketilen alkol miktarının meme kanseri riskinde artışa sebep olduğuna dair bulgular mevcuttur. Yapılan çalışmalarda alkol alımındaki günlük 1 ünitelik artışın meme kanseri riskini %7-10 artırdığı belirtilmiştir (21). Östrojen serum seviyelerinin alkol tüketimi sayesinde yükseldiği bilinmektedir. Yakın dönemlerde yapılan çalışmalarda alkol tüketim miktarının artması ile östrojen pozitif reseptör meme kanseri sayısının arttığı gözlemlenmiştir (22).

Radyasyon:

Kadınlarda meme gelişiminin en yoğun olduğu dönem 10-14 yaş aralığıdır. Bu meme gelişiminin kritik olduğu dönemde kadınların radyasyon yayan ortamda bulunmalarının meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir. Fakat kadınlar tanı konulması amacıyla hastanelerde radyasyona maruz kalabilmektedir. Bu tanı sürecinde alınan radyasyon ile meme kanseri riski arasındaki ilişki hala tartışma konusudur (23).

Sosyoekonomik Düzey:

Genel olarak meme kanseri sosyoekonomik durumu yüksek olan kadınlarda daha fazla görülmektedir. Bu yüzden meme kanseri riskinde yükselen sosyoekonomik durumun artan meme kanseri riskiyle alakalı olduğu düşünülmektedir. Fakat sosyoekonomik düzey, meme kanserinde bağımsız bir risk faktörü olarak düşünülmemiş, mevcut olan bu durumun üreme alışkanlıklarından kaynaklandığı düşünülmüştür (24).

Genetik Faktörler

Aile Öyküsü:

Meme kanseri üzerinde yapılan çok yönlü araştırmalarda ailede meme kanseri bireyin varlığının meme kanseri oluşumunda risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur. Fakat meme kanserinin oluşumunda ailesel ya da genetiksel yatkınlık, hastalığın %15-20'sini oluşturmaktadır. Diğer geriye kalan %80-85 oranındaki hastalarda ise ailesel ya da genetiksel yatkınlık bulunmamaktadır (25).

2.2. Meme Kanseri Genetiği

Meme karsinogenezi, hücre büyümesi, hücre gelişmesi, hücre yolaklar ve genetiksel değişimleri içeren çoklu bir mekanizma sonucu oluşmaktadır. Kanser oluşumuna neden olan temel genler, onkogenler ve protoonkogenlerdir. Onkogenlerin aktive olması kanser oluşumuna neden olmaktadır. İnsan kanser türlerinin oluşumunda birçok onkogen görev almaktadır. Transgenik fare modelleri üzerinde yapılan deneylerde meme kanserine özgü belirli onkogenlerin varlığı gözlenmiştir (26).

Meme kanseri oluşumunda etkili olan bir diğer gen grubu tümör baskılayıcı genlerdir. Tümör baskılayıcı genler genellikle metastatik potansiyel üzerine negatif etki

yaparlar. Tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar bu genlerin etkisini kıracağından kanserleşme artmış olacaktır (27).

2.2.1. Meme Kanseri Oluşumunda Etkili Onkogenler

CerbB-2 (HER2/Neu):

EGFR (Epidermal growth factor receptor) ailesinin bir üyesi olan *cerbB-2* meme kanserlerinde genetik değişiklikler gösteren en yaygın protein olarak bilinmektedir. Protoonkogen olan *cerbB-2* kromozomda 17q12'de yerleşiktir ve transmembran tirozin kinaz büyüme reseptörünü kodlamaktadır. *cerbB-2* onkogenin protein ürünlerinin hücre farklılaşması ve hücre bölünmesinde görev aldığı bilinmektedir. Meme kanserleri için değerli bir prognostik belirteç olarak görülmektedir. Bunun sebebi ise, gen üretimini çok miktarda artırarak meme kanseri patolojisine katılmış olmasıdır. Bu sebepten dolayı meme kanserleri araştırmalarında üzerinde en çok durulan onkogenlerden biri olmaktadır (28).

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (*EGFR*):

EGFR ailesi dört üyeden oluşmaktadır. Bunlar *EGFR*, *HER2*, *HER3* ve *HER4* olarak bilinmektedir. Enzimatik görev olarak, *EGFR*'nin tirozin kinaz aktive ettiği bilinmektedir. *EGFR* geni kromozomun 7q12 bölgesinde bulunmaktadır. *EGFR* ifadesinin kanser hücrelerinde yükselmiş olması *EGFR*'nin onkogen olduğuna işaret etmektedir. Meme kanserlerinin yaklaşık yarısında *EGFR*'nin çok yüksek miktarlarda üretimi görülmüş, ancak bunun ifade edilebilirlik oranı %0-14 arasında değişkenlik göstermiştir (29).

c-Myc:

Hücrel metabolizmada ve proliferasyonda uzman düzenleyiciler olarak bilinmektedir. Normal hücrelerde *c-Myc* genin ifadesi ve fonksiyonu mitotik sinyallerle düzenlenir. Normal hücrelerde *c-Myc* protein düzeyi ve transkripsiyonu düşük ve proliferasyonu azdır. Fakat tümör hücrelerinde *c-Myc* proteinin ve transkripsiyonunun arttığı görülmektedir (30). Yapılan araştırmalar *c-Myc* proteinin mitokondriyal biyogenezde rolünün olduğunu ortaya çıkarmıştır (31). Son yıllarda glikoz ve glutamat metabolizması üzerinde yapılan çalışmalarda kanserle ilişkili değişimlerin *c-Myc* geninin ifadesinden etkilendiğini göstermiştir. *c-Myc* geninin olması gerekenden fazla olmasının genin yapısında değişikliğe yol açarak memede kanserleşmeye yol açtığı

saptanmıştır. Meme kanserlerinin %32'sinde *c-Myc* protoonkogeninin 2-15 kat daha fazla üretildiği saptanmıştır. Meme kanserleri hastalarında üç hastadan birinde *c-Myc* geninin ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Özellikle yaşlı kadınlarda *c-Myc* onkogeni ifadesinin arttığı ve beraberinde meme kanseri oranlarında yüksek olduğu görülmektedir(32).

Ras:

Ras ve *ras* ailesi proteinleri hücre içi sinyal iletiminin anahtarları olarak görev yapmakta ve hücrelerdeki çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü faaliyetlerini yürütmektedirler. Hücreler arası mesajlaşmanın sağlanmasında aracı olarak işlev görmektedir. Mitoz bölünmelerin aktifleşmesinde görev yapmaktadır. Bunu protein kinazlar ile kurduğu ilişki ile gerçekleştirir. Meme kanseri hücrelerinde *ras* proteinlerinin aşırı ifade edilmesi veya nokta mutasyonlarının olması *Ras* proteinlerinin onkogenik özellik kazanmasına neden olmaktadır (33).

2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin Meme Kanseri Etkisi

TP53:

Moleküler ağırlığı 53kD olan bir proteini kodladığından bu isimle anılan *TP53* geni, kromozomun 17p13 bölgesine konumlanmıştır. Tümör baskılayıcı protein olarak bilinen *TP53* geni, hücre döngüsünün kesilmesi, DNA hasarı, apoptozis, anjiyogenezis, senesens ve otofaji gibi önemli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. Bu hücresel süreç aracılığıyla *TP53* tümör baskılayıcı özelliğini göstermekte ve hücrenin genomik stabilitesini sağlamakta ve hücreyi kanser gibi hastalıklara karşı korumaktadır (34). Radyasyona maruz kalma, UV ışığa maruz kalma ya da kanserojenik maddelere maruz kalma sonucu DNA hasarı oluştuğunda, hasarın giderilmesi için aktifleşmektedir. Şayet oluşan bu kusuru giderilemez ise *TP53*, hücreyi apoptoz sürecine götürür. Meme kanseri hastalarında *TP53* geni mutasyonların yarısından fazlasının nokta mutasyonu olarak ortaya çıktığı saptanmıştır (35).

2.2.3. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

***ATM* Geni (Mutant Ataksi Telenjiyektazi):**

ATM geni kromozom 11 de yerleşmiş olan, çekinik olarak diğer nesillere aktarılan, çok karmaşık ve uzun bir gendir. *ATM* geni hastalık oluşumuna iki mutant

allele katılmaktadır. Meme kanseri riski tek mutant allellerde artmış olarak belirtilmiştir. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %3'ü *ATM* gen kaynaklı mutasyonlardan oluşmaktadır (36).

BRCA1 ve BRCA 2:

BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme kanseri yatkınlık genleri olarak bilinmekte ve bu genlerde oluşan mutasyonların kanserleşmeye neden olduğu bilinmektedir. *BRCA* ilişkili meme kanseri riski penetransının oldukça değişkenlik göstermesi, hastalığın yaşam tarzı ve çevresel faktörlerle modifiye edilebileceğini göstermektedir (37).

BRCA1 geni 24 ekzonlu olup kromozom 17q21'de yerleşiktir ve 1863 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. *BRCA1*, DNA'nın tamirinde, transkripsiyonel düzenlemelerde ve hücre büyümesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. *BRCA1* çoğunlukla endokrin dokularda ifade edilmektedir, ancak özellikle erken gelişim dönemlerinde diğer hücrelerde de bulunmaktadır. *BRCA1* en yüksek seviyelerde, sinir sisteminde ve embriyonik fare dokusunda gelişmekte olan nöroepitelde görülmüştür (38).

BRCA2 geni 27 ekzondan oluşmuş olup kromozomda 12q13.2'de yerleşiktir ve 3418 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. *BRCA2* geni hücrelerde özellikle hücre döngüsünün geç-G1/erken-S fazında ifade edilen nükleer bir proteindir. *BRCA2* mutasyonunun sebep olduğu hastalıklar daha düşük penetransa sahiptir. *BRCA2* mutasyonu ile ortaya çıkan sendromlar az olmasına rağmen bazı toplumlarda yaygındır. Örneğin Aşkenazi topluluğunda %1.5 oranında spesifik bir mutasyon (6174delT), İzlandalılarda ise %0.6 oranında başka bir mutasyon (999del5) görülür (39).

PALB2 Geni :

Meme kanserinin gelişiminde etkili olduğu bilinen *BRCA1 ve BRCA2*'nin yanısıra, 2014 yılında *PALB2* geninin meme kanseri oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur. *PALB2* geni kromozomun 16p12.2 bölgesinde yerleşiktir. *PALB2* geni tümör süpressör işlevi olan bir protein kodlamaktadır. *PALB2* geni *BRCA2*'nin büyük bir bağlanma partneri olarak tanımlanmıştır (40).

***PTEN* GENİ:**

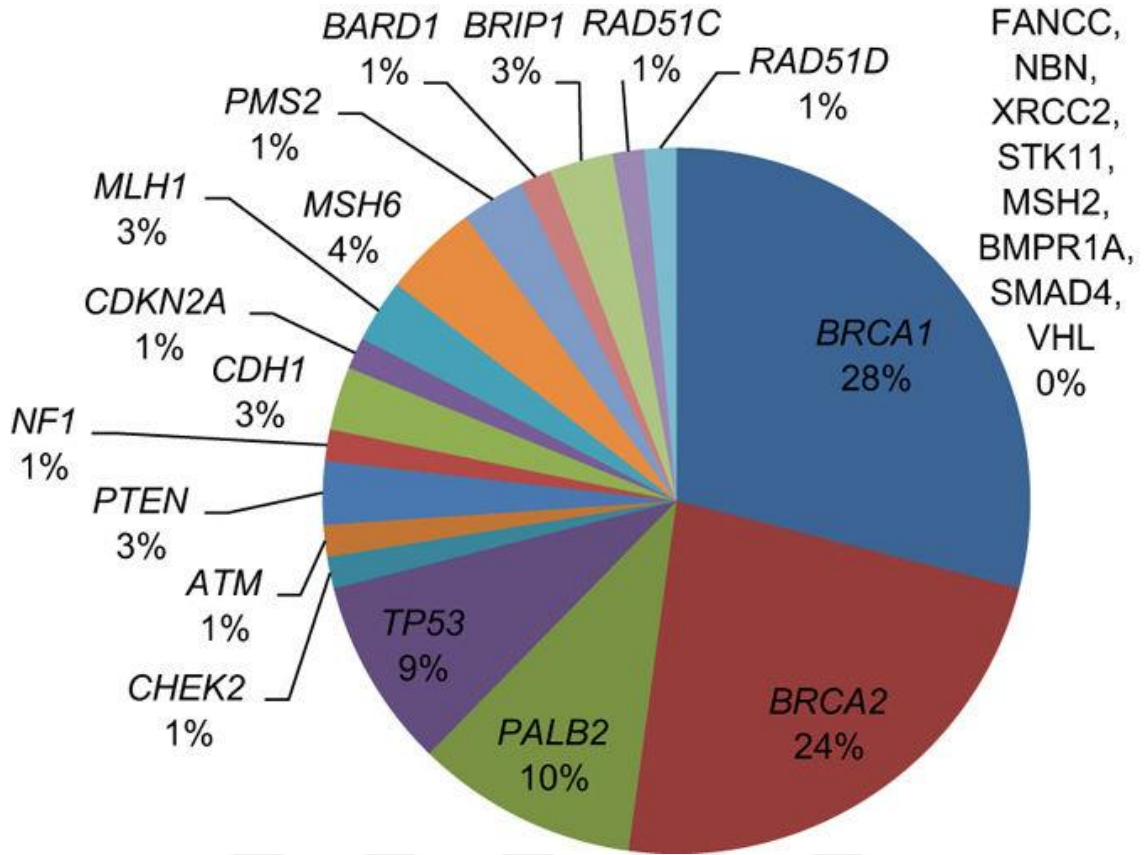
Tümör baskılanmasında görevli bir fosfataz olan *PTEN*, kromozomun 10q22-23 bölgesinde yerleşik olarak bulunmaktadır. Protein tirozin fosfataz ailesinin üyesi olan *PTEN*, 403 aminoasit dizisinden oluşmaktadır. Lipit fosfataz olan *PTEN* genel olarak PI3-Kinaz sinyal yollarını düzenlemektedir (41). Kadınlarda yüksek oranlarda gözlenen ve dominant olarak kalıtılan Cowden Sendromlu hastaların %80'inde *PTEN* geni mutasyonu gözlenmesi *PTEN* geninin meme kanserinde yatkınlık geni olduğunu göstermektedir (42).

***CHEK2* GENİ:**

Checkpoint kinase 2 olarak adlandırılan *CHEK2* geni insan kromozomunda 22q12.1'e yerleşik olarak bulunmaktadır. *CHEK2* geni, DNA hasarına karşı hücrel yanıtta görev alan önemli bir sinyal ileticisi olarak görev yapmaktadır. *CHEK2* Serin tironin kinaz ailesinin bir üyesidir. *CHEK2* geninde meydana gelen mutasyonların Li-Fraumeni sendromu ile ilişkili olup olmadığı hala tartışılmalı bir konudur (43).

***BRIP1* GENİ:**

BRIP1 geni *BRCA1* ile ilişkili bulunduğundan diğer ismi BACH1 (BRCA1 Associated C-Terminal Helikaz 1)'dir. Kromozomun 17q22 bölgesine yerleşik olup *BRCA1* genin hemen yanında bulunmaktadır. Erken meme kanseri başlangıcında *BRIP1* geni mutasyonları görülmüştür (44).



Şekil.5. Meme Kanseri Gen Mutasyonları İnsidansı (45).

2.2.4. Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri memenin çeşitli bölgelerinde meme dokusunu oluşturan doku tiplerinden ortaya çıkabilmektedir.

Tablo.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2003

1-İn situ karsinom
-İn situ duktal karsinom
-İn situ lobüler karsinom
2-İnvaziv Karsinom
-İnvazif duktal karsinom
- Pleomorfik karsinom
- Melanositik özellikli karsinom
- Osteoklastik dev hücreli karsinom
- Koryokarsinomatöz özellikli karsinom

- Tubuler karsinom
- İnvaziv lobüler karsinom
- İnvazif kribriform karsinom
- Meduller karsinom
- Müsinöz karsinom
 - Müsinöz karsinom
 - Taşlı yüzük hücreli karsinom
 - Müsinöz kist adenokarsinom
- İnvaziv papiler karsinom
- Sekretuar karsinom
- Apokrin karsinom
- Adenoik kistik karsinom
- Metaploid karsinom
 - Saf epitelyal karsinom
 - Mixt epitelyal-Mezenşimal
- İnflamatuar karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- Onkositik karsinom
- Adeno kistik karsinom
- Yağ bezi karsinomu
- Bilateral meme karsinomu
- Asinik hücreli karsinom

2.2.5. Meme Kanseri Tedavi Şekilleri

Meme kanseri önemli bir sağlık problemi olduğu için meme kanseri tedavisinde doğru yaklaşım çok önemlidir.

Meme kanseri olan kadınlarda tedavi şekilleri kanserin evrelerine göre, kemoterapi, radyoterapi, cerrahi tedavi, hormonal tedavi ve immünoterapi gibi bir çok yöntemle yapılmaktadır. Meme kanseri tedavi şekilleri sistematik tedaviler ve lokal tedaviler diye ikiye ayrılmaktadır.

Lokal Tedavi:

Lokal tedavide amaç memedeki tümörün ortaya çıkarılmasıdır. Radyoterapi ve Cerrahi yöntemlerin kullanıldığı bu tedavide amaç, tümörün farklı yerlere ulaşmasını engellemektir.

Cerrahi Tedavi:

Meme kanserinin tedavisinde meme koruyucu ameliyatlar ve mastektomi olmak üzere iki tür tedavi uygulanmaktadır.

Meme koruyucu ameliyatlarda sadece tümör çıkarılmakta meme ise alınmamaktadır. Meme koruyucu ameliyatlar parsiyel mastektomi ve lumpektomi olmak üzere iki yöntemle uygulanmaktadır. Parsiyel mastektomide memenin dörtte biri ya da daha fazlası kanserli doku ile birlikte alınmaktadır. Lumpektomi de ise normal meme dokusu ile çevrili 3-4 cm'yi geçmeyen kanserli dokular çıkarılmaktadır. Her iki yöntem sonunda da memede kalmış olabilecek kanserli hücreleri yok edebilmek için radyoterapi uygulanması gerekmektedir.

Radyoterapi:

Radyoterapi meme kanseri tedavisinde sistematik ve cerrahi tedavi ile beraber önemli bir modelini oluşturmaktadır. Radyoterapi hastalığın evresine bağlı olarak bölgesel yineleme riskini azaltır, sağkalımı azaltır ve semptom palyasyonu sağlar (46). Erken evre meme kanserinde, meme koruyucu cerrahi sonrası radyoterapi, tedavinin mutlak bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (47). Daha ileri evre olgularda adjuvan radyoterapinin lokal yineleme riskini azalttığı ve aksilla metastazı yapmış olgularda sağkalımı arttırdığı gözlenmiştir (48).

Hormonal tedavi:

Meme kanserinin tedavisinde hormonal tedavi amaçlı en çok Tamoksifen kullanılmaktadır. Tamoksifen seçici östrojen reseptörü olarak işlev görmektedir. Meme kanserlerinde meme tümörlerinin %60-70 dolaylarında östrojen reseptörü ifadesinin bulunması tamoksifenin endokrin tedavi için kuvvetli bir aday olduğunu göstermektedir (49). Meme kanseri tedavisinde tamoksifenin haricinde Anastrozole, Letrozole, Exemestane ve Goserelin hormonal tedavi amaçlı kullanılan ilaçlardır.

Kemoterapi:

Kemoterapötik tedavilere en duyarlı kanserlerden biri meme kanseri olmasına rağmen, meme kanserinde kemoterapötik tedavi sağlanamamaktadır. Kemoterapi hasta olan bireylerin yaşam kalitesini artırmak ve semptomların giderilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde en çok kullanılan kemoterapik ajanlar taksanlar ve antrasiklinlerdir (50).

2.2.6. DPPL2 Proteini

DPPL2 diğer ismiyle PPAPDC1A (Phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A) geni fosfatidat fosfataz aktivitesi olan bir protein olarak bilinmektedir. Fonksiyonel olarak DPPL2 proteinin *in vitro* ortamda magnezyum bağımsız olarak fosfaditat fosfataz aktivitesinin olduğu bulunmuştur. DPPL2'nin diaçilgliserolde fosfatidik asit dönüşümünü katalizlediği belirtilmiştir (9).

DPPL1 ve DPPL2, maya diaçilgliserol profosfat fosfataz (DGPP) ile büyük oranda homojenik benzerlik göstermektedir. DPPL1 mRNA'ları çeşitli dokularda yaygın olarak ifade edilebilmektedir. DPPL2 mRNA'ları ise birkaç dokuda ifade edilmektedir. Bu dokular beyin, böbrek ve testislerdir (9).

Takeuchi ve arkadaşları çeşitli doku cDNA'ları kullanarak yapılan real-time PCR çalışmaları ile DPPL1 ve DPPL2'nin dokulardaki ifade düzeyine bakmışlardır. DPPL1 geninin pankreas ve prostat dokularında yüksek düzeyde ifade edildiğini belirtmişlerdir. Ancak beyin, kalp, plasenta, akciğer, karaciğer, kemik iliği, iskelet kasları, mide, timüs, testis ve dalak dokularında DPPL1 ve DPPL2 ifade düzeyinin az olduğunu belirtmişlerdir (9).

DPPL2 mRNA'sı ile yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçlarında öncelikli olarak insan endotel hücrelerindeki ifadesi araştırılmıştır. Bu hücreler; insan göbek bağı endotel hücreleri (HUVECs), insan deri mikrovasküler endotel hücreleri (HDMECs), insan akciğer mikrovasküler endotel hücreleri (HLMVECs), insan aort endotel hücreleri (HAECs) ve insan akciğer arter endotel hücreler (HPAECs)' dir. Araştırma sonucunda insan akciğer mikrovasküler endotel hücreleri ile insan aort endotel hücrelerinde DPPL2 ifadesinin yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir (9).

Manzano ve arkadaşları tarafından 41 östrojen reseptör negatif meme kanseri hastaları ile hem ERBB2⁺ hem de ERBB2⁻ iki grubu karakterize etmek amacıyla moleküler mikroarray fosfatom çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada östrojen negatif meme kanseri hastalar ile östrojen pozitif meme kanseri hastalarda DPPL2 geninin ifade düzeyi karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda ERBB2 tümörlerinde en çok ifade edilen fosfatazlardan birinin DPPL2 olduğunu belirtmişlerdir (8).

Dahl ve arkadaşları DNA mikroarray analizleri, cDNA dot blot analizleri ve revers transkripsiyon-PCR tekniklerini kullanarak invazive duktal meme karsinomları ve normal meme dokusu hücrelerini karşılaştırmışlardır. Yapılan analiz sonuçlarında DPPL2 proteinin meme kanseri dokularındaki seviyesinin normal meme dokusundaki DPPL2 seviyesinden %84 daha fazla bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu analiz sonuçları DPPL2'nin, lipid fosfat fosfataz ailesinin yeni bir üyesi olduğunu göstermektedir (10).

Kang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda kalıcı ve geçici dişlerin oluşumunda genlerin etkileşim durumlarına baktıklarında, dört genin merkezci yapıda olduğunu görmüşlerdir. Bunlardan birinin DPPL2 geni olduğunu belirtmişlerdir. DPPL2 geninin kalıcı ve geçici dişlerin ifadesinde farklı düzeylerde ifade edildiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları revers transkripsiyon-PCR sonuçlarında DPPL2 ifadesinin kalıcı dişlerde daha az olduğunu bulmuşlardır (51).

Zhang ve arkadaşları tarafından akciğer karsinomlarında LPP(lipid fosfat fosfataz) protein ailesinin ifade edilmesine bakılmıştır. Kanser Genom Atlası (TCGA)'dan elde edilen verilerden akciğer karsinomlarındaki RNA ifade düzeyine bakılmıştır. TCGA'nın sonuçlarına göre akciğer karsinomlarında DPPL2 düzeyinin diğer LPP'lerle kıyaslandığında yüksek olduğu belirtilmiştir. Akciğer karsinomlarında ve hücrelerinde DPPL2'nin aşırı ifadesi ile akciğer kanseri hastalarının ilerleyen klinik patolojik özellikleri ve kötü prognozla pozitif bir ilişkisinin olduğu görülmüştür.

Zhang ve arkadaşları tarafından 8 çift akciğer karsinomlarından gerçek zamanlı PCR ve 265 akciğer karsinom dokularından immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, DPPL2 proteinin yüksek miktarda ifadesi artan akciğer karsinomlarının klinik patoloji ile ilişkilendirilmiştir. Analiz sonuçları DPPL2 proteininin yüksek miktarda ifadesinin, akciğer hücrelerinde tümörleşmeyi ve proliferasyonu artırmasının yanı sıra katyon kanallarında kalsiyum geçirgenliğini sağladığını göstermiştir. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, DPPL2 proteinin

akciğer kanserlerinin ilerlemesinde önemli bir rolünün olduğunu ve insan akciğer kanserlerinin tedavisinde DPPL2'nin potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir (52).

Kresovich ve arkadaşları Viva Cohort Projesi ile kord kanında DNA metilasyonuna ve onun erken ve orta yaş çocuklukta şışmanlıkla olan ilişkisini araştırmışlardır. Bireylerin kord kanındaki CpG bölümlerinden PRLHR, KPRP, SLC9A10, MYLK2 ve DPPL2'deki metilasyonları saptamışlardır. Bunlarda oluşan metilasyonun erken çocuklukta aşırı kilolukla ilişkisini araştırılmıştır. Deney sonuçlarında özellikle DPPL2'nin erken yaş ve orta yaş çocuklarda subskapular ve triseplerde ifade edildiği belirtilmiştir.

Sonuç olarak yağ doku ilişkili olan bu dört promotor bölgenin CpG bölümlerine bakıldığında DPPL2 miktarının artan düzeyde ifade edilmiş olmasının DPPL2'nin yağ doku ilişkili olaylar için belirteç olabileceğini belirtmişlerdir (53).

DPPL2 proteinin hücresel olaylardaki rolü bilinmemektedir. Ancak fosfataz aktivitesi ile proteinlerin fonksiyonlarında değişmeler meydana getirmesi beklenmektedir. Böylelikle meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve apoptozda rol oynayabileceği hipotez edilmiştir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılacak Malzemeler

Tablo.2. Kullanılan Cihazlar

Malzeme Adı	Markası
Buz cihazı	Scotsman AF 80
Otoklav	Hirayama
Isı Bloğu	Benchmark
İnkübatör	Euro Elone
Ph metre	Thermo Scientific
Hassas Terazı	AND Company
Santrifüj	Nüve
Laminar Kabin	Euro Elone
Shaker	Gerhardt
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific
Kemolüminesens	ChemiDoc-It2
Su arıtma Cihazı	Direct-Q 3UV
Western Blot Tankı	Bio-Rad
Su banyosu	Benchmark

3.2. Çalışmada Kullanılacak Kimyasallar

Tablo.3. Kullanılan Kimyasallar ve Markaları

Kimyasal	Marka Adı
Akrilamid	Acros Organics
Ammonium Persulfate %98	Acros Organics
Bromophenol Blue	Bio Basic
Bovin Serum Albumin	Sigma
Dimethyl Sulfoxide	Fisher Scientific
Ethanol	Sigma-Aldrich
Glycine	Carlo Erba
Hiperfect Transfection Reagent	Qiagen
Luminol	Sigma
2-Mercaptoethanol, %99,extra pure	Acros Organics
Metanol	Sigma-Aldrich
N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Zymed
2-Propanol	Sigma
Propidium İodide	Sigma
Protease İnhibitör	Sigma
Protogel (%30 Acr., %0,8 Bis)	National Diagnostics
Rnase A	Applicem
Resolving Buffer	National Diagnostics

Sodium Chloride	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate	Fisher Scientific
Stacking Buffer	National Diagnostics
Stripping Buffer	Thermo
Tetramethylethylenediamine %99, Extra Pure	Acros Organics
Tris Base	Sigma
Triton X-100	Fisher Scientific
Trizma Hydrochloride	Sigma
Tween 20	Sigma-Aldrich
DMEM F12 1:1 Mix	PAN Biotech
Trypsin-EDTA	PAA
Fetal Bovine Serum	PAA
L-glutamin	Lonza
Penicilin-Streptomycin	PAN Biotech
MEBM	Lonza
Prism Ultra Protein Ladder (10-180 kDa)	Abcam

3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Tablo.4. Kullanılan Kitler ve Markaları

CellTiter 96@Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
BD pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
BCA Protein Quantification Kit 1000 tests	Abcam
Protein Assay Kit	Bio-rad

3.4. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Tablo.5. Kullanılan antikorlar ve Markaları

DPPL2	Abcam
Caytaxin	Santa Cruz
Beta Actin	Sigma
Caspase 3	Cell Signalling
Caspase 9	Cell Signalling
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz

3.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.5.1. 10X Yürütme Tamponu

1L 10x'lik stok solüsyon için;

- 30 gr Tris Base

- 144 gr Glisin

1L'ye tamamlanarak çözdürüldü. +4°C de muhafazası sağlandı.

3.5.2. 10X TBS (Tris-Buffer-Salin)

1L stok için;

- 31,5 Tris-HCl
- 80 gr NaCl

1L'ye tamamlanarak ve pH:7,6 'da sabitlenecek şekilde çözdürüldü.

3.5.3. 1X Yürütme Tamponu

- 100 ml 10X yürütme tamponu
- %10 SDS 10ml
- 890 ml dH₂O

Proteinlerin büyüklüklerine jelde elektrik akımı ile göre ayrıştırılması için tampon olarak kullanıldı.

3.5.4. Transfer Solüsyonu

- 100 ml 10x'lik Yürütme Buffer
- 700 ml dH₂O
- 200 ml metanol

Jel üzerindeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması amacıyla hazırlandı ve +4°C de muhafazası sağlanarak kullanıldı.

3.5.5. TBS/Tween -20

- 900 ml dH₂O
- 100 ml TBS
- 2 ml Tween-20

Membran yıkamalarında ve membrana antikor uygulamalarında kullanıldı ve oda koşullarında muhafazası sağlandı.

3.5.6. Lizis Solüsyonu

100 ml için;

- %1 Triton-X, 1ml
- 150 mM NaCl, 876 mg
- 25 mM Tris, 303 mg

50 ml distile su üzerine 303 mg Tris eklenerek çözülene kadar karıştırıldı. Çözünme işlemi tamamlanarak pH 7,6'ya sabitlendi. Çözeltiye 876 mg NACI eklenerek çözdürülmesi sağlandı. Üzerine 1ml Triton-X-100 eklenerek çözdürülmesi sağlandı.

3.6. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmalarda, ATCC firmasından MCF10A (ATCC® CRL-10317™), MCF-7 (ATCC® HTB-22™) ve MDA-MB-231(ATCC® CRM-HTB-26™) hücre hatları temin edilerek kullanılmıştır.

3.6.1. MDA-MB-231 Hüce Hattı

MDA-MB-231 hücre hattı meme dokusu epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Hücre kültürü ortamında flaska alındığı zaman, flask tabanına yapışabilmektedir. Progesteron reseptör ve östrojen reseptör olarak negatif olan hücre hattıdır. HER2 amplifikasyonu negatif olan hücre hattıdır.

3.6.2. MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 hücre hattı meme dokusu epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Hücre kültürü ortamıyla beraber flaska alındığında flaskın tabanına yapışabilme özelliğindedir. HER2 amplifikasyonu olarak negatif olmasına karşın, progesteron reseptörü ve östrojen reseptörü pozitif olan bir hücre hattıdır.

3.6.3. MCF10A Hücre Hattı

MCF10A hücre hattı tümörojenik olmayan epitel hücre hatlarıdır. Hücre kültürü ortamıyla beraber flaska alındığında flaskın tabanına yapışabilme özelliğindedir. MCF10A hücre hatları kolera enterotoksin, insülin, glikokordiosit ve epidermal büyüme faktörü (EGF)'ne karşı hassastırlar.

3.7. Çalışmanın Aşamaları

3.7.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için DMEM F-12-1:1 büyüme medyumu kullanıldı. Büyüme medyumunun içerisine 50 ml %10'luk Fetal Sığır Serum(FBS), 5 ml Penisilin/Streptomisin ve 5 ml L-Glutamin eklendi. Hücrelerin ekimi T25 flasklara yapıldı. Haftada en az iki kez (hücrenin yoğunluğuna göre değişir) hücreler tripsin ile kaldırılarak pasajlanması sağlandı. Yapılan tüm hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabin içerisinde gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemleri %5 CO₂ içeren ve 37 °C de çalışan etüvde gerçekleştirildi.

MCF10A hücreleri, MEGM kit(2ml BPE, 0,5ml EGF, 0,5ml İnsülin, 0,5ml hidrokortizon, 0,5ml GA-1000), %5'lik 200 µl kolera toksini, 5ml Pen/Strep ve %10 at serumu içeren MEBM büyüme medyumu ile 25 cm²'lik flasklara ekildi.

3.7.2. Hücrelerin Çözülmesi

DMEM F-12- 1:1 ve MEGM besiyerleri +4°C de bulunan ortamlarından alınıp 37°C ye kadar ısıtılması sağlandı. Her bir hücre hattı için 25 cm²'lik flasklar hazırlandı. Kroviyal tüpte bulunan hücreler -80°C'lik ortamından alınarak hızlıca çözülmesi sağlandı. Çözülen hücreler pipetle birkaç kez karıştırılarak 15 ml'lik Falkon tüplere alındı. Hücrelerin üzerine 5.5 ml'lik besi yeri eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atıldı pellet üzerine 3 ml besi yeri eklenip 25 cm²'lik flasklara alınarak hacmin 6 olması sağlandı.

3.7.3. Hücrelerin Pasajlanması

Doluluk oranları % 70'e ulaşan hücrelerin kültür ortamı atıldı. 25 cm²'lik flasklarda bulunan kültürlerle 2 ml Tripsin ilave edildi. Tripsin eklenen kültürler %5 CO₂ içeren 37°C deki 5 dakika inkübatörde bekletildi. Mikroskop ile hücrelerin morfolojik görünümüne bakıldıktan sonra flask dibine tutunan hücrelerin kaldırılması el darbeleri ile sağlandı. Hücreler flaskın tabanından kaldırıldıktan sonra tripsini ortamdan uzaklaştırmak için 4 ml besi yeri eklenerek 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve elde edilen pelletteki hücre miktarına göre hücreler DMEM F-12-1:1 ve MEBM besi yerleri ile karıştırıldı ve 25 cm²'lik flasklara alındı. Flasklar içinde hücrelerin homojen olarak dağılımlarını sağlamak için flasklar

daireysel olarak çalkalandı. Hücrelerin son durumu faz kontrast mikroskopunda bakılarak değerlendirildi. Hücrelerin % 5 CO₂ içeren 37°C deki inkübatörde muhafazası sağlandı.

3.7.4. Hücrelerin Besi Yerlerinin Değişimi

Ekimi yapılan hücrelerin çoğalma oranı her gün mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Çoğalma oranı % 80'e ulaşamayan ancak kültür ortamı yetersiz görülen hücrelerin flasklarındaki kültür ortamı atılarak üzerlerine taze besi yerleri eklendi.

3.7.5. Hücrelerin Lizis Edilmesi

T 25 flasklarda kültürü yapılan hücreler tripsinle muamele edilerek kaldırıldı. Hücreler 15 ml'lik falkon tüplere medyumuyla beraber aktarıldı. Ardından 1500 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atıldı, kalan pelletin üzerine ise 1 ml PBS aktararak hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Ependorf tüplerde bulunan hücreler 3000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atıldı. Kalan pellet kısmının üzerine 100 µL lizis tamponu eklendi. Hücreler 30 saniye vortekslendikten sonra buz üzerine alınarak 10 dakika süresince bekletildi. Bu uygulama 3 kez tekrarlandıktan sonra bu süspansiyon 13000 rpm de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüjden sonra pellet kısmı atıldı ve süpernatant kısımları yeni bir ependorf tüplere alındı.

3.7.6. Protein Miktarının Belirlenmesi

Hücreler lizis edildikten sonra total protein miktarının belirlenmesi için Protein Assay Kit(Bio-Rad) alınarak Bradford yöntemi kullanıldı. Bradford yöntemi için 3 solusyon kullanıldı.

1-Protein Assay Reagent A

2-Protein Assay Reagent B

3-Protein Assay Reagent S

İlk önce standartlar oluşturuldu. Bunun için 1 ml distile suda 10 mg BSA çözdürülerek ana stok oluşturuldu. Oluşturulan ana stoktan 0, 0.25, 0.5, 1 ve 2 µg/µl'lik konsantrasyonlarda 5 adet standart hazırlandı

Protein miktarının ölçümü, 96 kuyucuklu plâtelere yapıldı. İlk önce hazırlanan standartlardan 5'er µL ilk bes kuyucuğa eklendi.

	1	2	3	4	5
Standart	0 µg/µl	0.25 µg/µl	0.5 µg/µl	1 µg/µl	2 µg/µl
Örnek	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Tablo.6. Protein Standartlarının Konsantrasyonları

Sonrasında Reagent S ve Reagent A'dan sırasıyla 20/1000 ml oranında örnek sayısına göre karışım oluşturuldu ve standartların altındaki her bir kuyucuğa 25 µL eklendi. Hazırlanan protein örneklerinden 5 µL üzerine eklendi.

Sonrasında Reagent B solüsyonundan 200 µL tüm kuyucuklara eklendi (standartlar dahil).

Hazırlanan örneklerin spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı.

3.7.7. Western Blot Analizi

Western Blot analizi için ilk önce ayırıcı jel hazırlandı

% 12'lik jel için: Ayırıcı jel

- 2,6 ml H₂O
- 3,2 ml %30 Akrilamid/Bisakrilamid
- 2 ml 1,5 Tris-HCl ph: 8.8
- 80 µL %10 APS
- 80 µL %10 SDS
- 8 µL TEMED

Yukarıda verilen oranlarda karıştırıldı ve western camları arasına konularak jelin donması sağlandı. Üst kısmında düzgün bir yüzey oluşumu için jelin üzerine 2-propanol eklendi. Jel donduktan sonra üzerindeki 2-propanol boşaltıldı. Boşaltılan yere proteinlerin yürütüleceği kuyucukların oluşturulması için depolayıcı jel hazırlandı.

% 6 'lık jel için: Depolayıcı jel

- 2,6 ml H₂O
- 1 ml % 30 AC/bisACA
- 1.25 ml 0,5M Tris HCl ph:6,8

- 50 µL %10 APS

- 50 µL %10 SDS

- 5 µL TEMED

Yukarıda verilen oranlarda karıştırılarak depolayıcı jel oluşturuldu. Depolayıcı jel, ayırıcı jelin üzerine eklendi. Depolayıcı jelin üzerine tarakların takılmasıyla kuyucukların oluşturulması sağlandı.

Hazırlanmış olduğumuz her bir protein için:

-16 µL yükleme tamponu (%5beta merkaptolanol içeren)

- 35 µL örnek ve su (Protein Quantificationda excel dosyasında ölçülen değerlere göre)

Yukarıdaki verilere göre her biri ayrı birer ependorfa alındıktan sonra 100 °C de 6 dakika inkübe edildi. Sonra ilk sıraya Marker (3 µL) gelecek şekilde örnekler kuyucuklara eşit miktarda (35 µg) olacak şekilde yükleme yapıldı. Yüklene örnekler 120 Volt' ta SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) jel elektroforeziyle 1,5 saat yürütüldü. Elektroforez sonrası örnekler nitrocelülöz membrana transfer edildi. Transfer işleminden sonra membran, 100 ml TBS/T (trans-buffer –salin/Twen 20) ve 2,5 gr süt tozundan oluşan solüsyonla 1 saat bloklanması sağlandı. Sonrasında 5 kez 10 ar dakika arayla TBS/T ile yıkanma sağlandı. 100 ml TBS/T (trans-buffer –salin/Twen 20) ve 2,5 gr süt tozundan oluşan solüsyonda DPPL2 monoklonal antikoru konularak bir gece boyu +4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 10'ar dakika arayla 5 kez TBS/T ile yıkandı. Sonrasında TBS/T ile hazırlanan ve içerisinde %2,5'luk süt tozu solüsyonda anti-rabbit sekonder antikor eklenerek 1 saat +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran tekrar TBS/T ile 10'ar dakika arayla 5 kez yıkandı. Yıkamaların sonunda membranlar ECL solüsyonu ile muamele edilerek UVP ChemiDoc-It² cihazında görüntülendi.

3.7.8. SiRNA ile DPPL2 İfadesinin Baskılanması

Tüm deneylerde siRNA uygulamaları standart olarak hücrelerin ekiminin üzerinden bir gece geçtikten sonra yapıldı. siRNA uygulamasının ilk aşamasında 200000 hücre ekimi yapıldı. Tüm deneylerde siRNA uygulaması yapılan grup tedavi grubu, siRNA uygulanmayan grup ise tedavisiz grup olarak kabul edilmiştir.

siRNA solüsyonu:

- 20µL siRNA
- 190µL Optimem besiyeri
- 15µL Hiperfect Tx ajanı

Yukarıdaki oranlarda mikrotüplere aktarılan örnekler tamamen karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda koşullarında bekletildi. 20 dakika sonra hazırlanan siRNA solüsyonu bir gün önce ekilen hücrelerin üzerine eklenip etüve atıldı. 3 gün sonra etüvden alındı. Hücreler tekrardan Western Blot analiz yapılmak için toplandı.

3.7.9. Apoptoz Değerlendirilmesi ve Hücre Proliferasyonu

Hücrelerin apoptoz değerlendirilmesi Flow Sitometride annexin boyama, hücre proliferasyonu ise MTS Assay Testi yöntemi ile gerçekleştirildi.

1-Flow Sitometri:

Hücrelerin 300.000 olacak şekilde T25 flasklara ekimi yapıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde bir gün boyunca inkübe edildi. Bir gün sonra hücreler tripsinle muamele edilerek kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve pellet PBS (1ml) ile yıkaması yapıldı. PBS ile beraber tekrar 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 100 µL PBS eklenip karıştırıldı. Hazırlanan flow tüplerinin içine 100µL hücrelerden eklendi. Hücrelerin üzerine 5 µL FITC annexin ve 5µL PI boya ekendi. Örnekler alüminyum folyo ile kaplanıp vortekslendikten sonra 15 dakika karanlık ortamda bekletildi. Bekleme süresi dolduktan sonra örneklerin üzerine 400 µL 1x Binding eklendi ve örnekler vortekslenerek Flowsitometri cihazında ölçüldü.

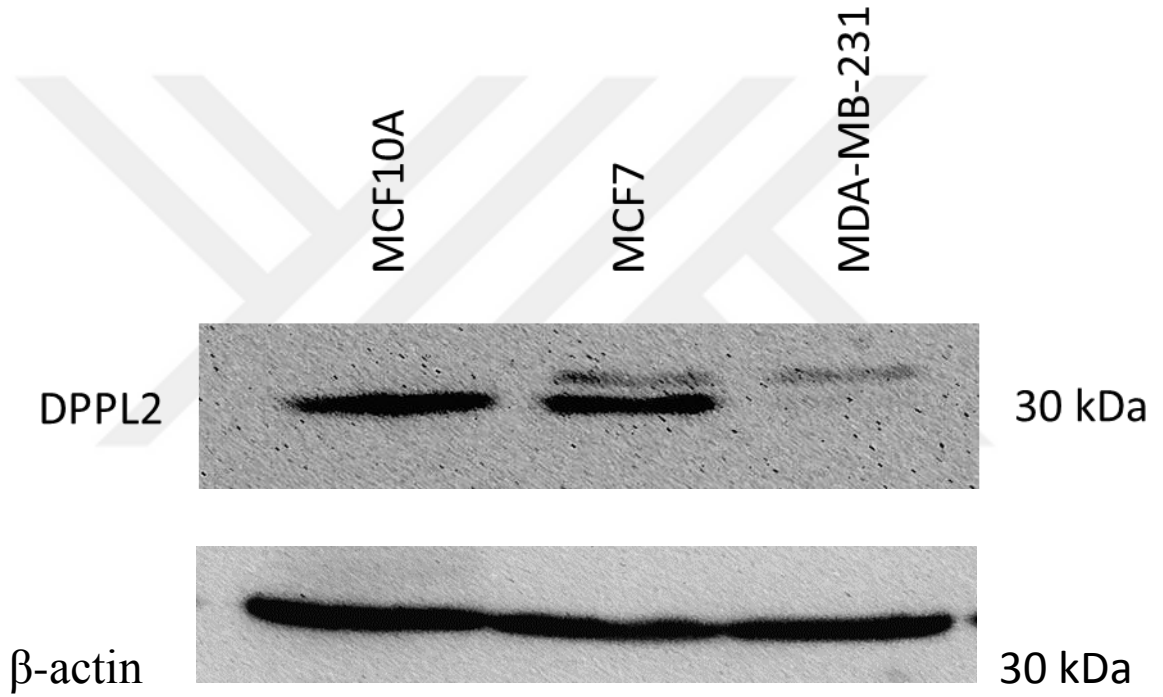
2-MTS Assay:

Hücrelerin her bir kuyucuğa 1500 hücre olacak şekilde 96 well platelere ekimi yapıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde bir gün boyunca inkübe edildi. 24 saat sonra hücrelere DPPL2 siRNA uygulaması yapıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen hücrelere MTS solüsyonu eklenerek sonuçların analizi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. DPPL2 Protein İfadesinin Hücrelerde Gösterilmesi

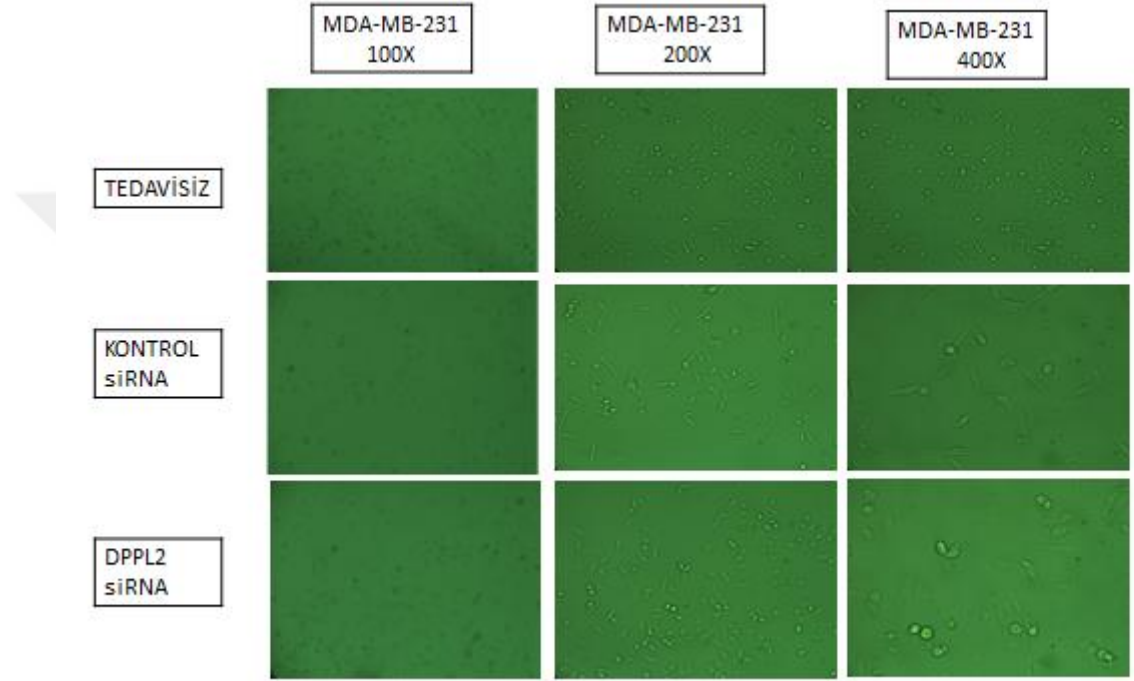
Çalışmada MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücre hatlarında DPPL2 protein ifadesi Western Blot tekniği ile belirlenmiştir. Western blot analiz sonuçlarına göre MCF10A, MCF-7 hücrelerinde DPPL2 ifadesi yüksek düzeyde görülürken, MDA-MB-231 hücrelerinde DPPL2 ifadesinin düşük olduğu belirtilmiştir.



Şekil.6. MCF10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında DPPL2 Protein İfadesinin Gösterilmesi.

4.1.2. siRNA Uygulanan Hücrelerin Görüntüleri,

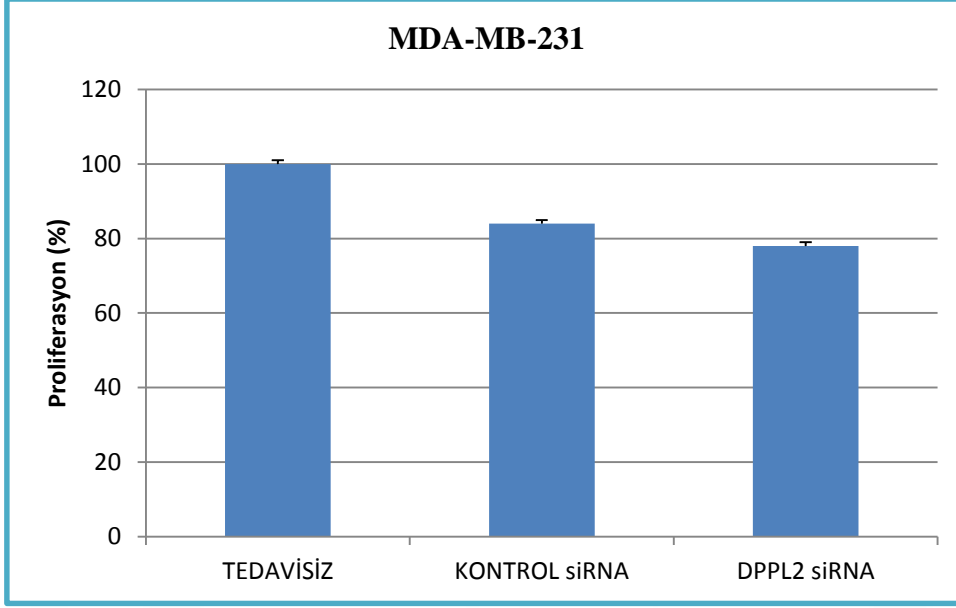
Çalışmada DPPL2 protein varlığının kanser hücrelerindeki ifadesini belirlemek amacıyla siRNA uygulaması yapılmıştır. siRNA uygulaması ile DPPL2 proteinin ifadesi baskılanmış ve hücrelerin siRNA uygulamasından 72 saat sonraki morfolojik görüntüleri Şekil. 7’de gösterilmiştir.



Şekil.7. Kültüre Alınan ve siRNA Uygulanacak MDA-MB-231 Hücrelerinin Tedavi Edilmeden Önceki Görüntüsü.

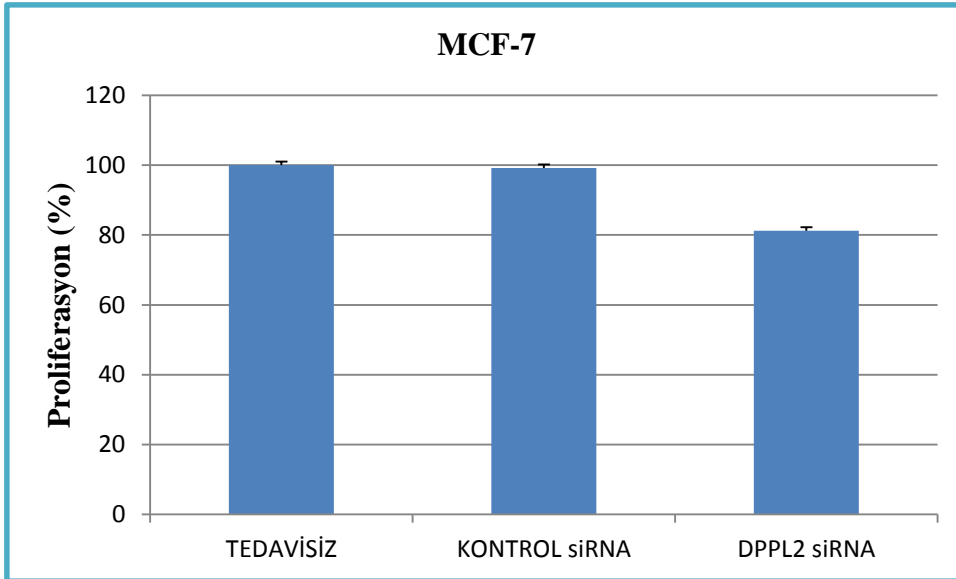
4.1.3. MTS ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde oluşan hücre proliferasyonuna bakılmıştır. Şekil.8.de MDA-MB-231hücrelerinin stepkrofotometre analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Tüm MTS Assay çalışmalarında Student T Non Parametrik Test ile istatistik analizler yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulaması yapılan grup karşılaştırıldığında ise hücrelerdeki canlılık oranının yaklaşık olarak %16 oranında azaldığı görülmüş ve bu fark anlamlı görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil.8. DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu MDA-MB-231 Hücrelerindeki Proliferasyon. DPPL2'nin susturulmasıyla hücre proliferasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

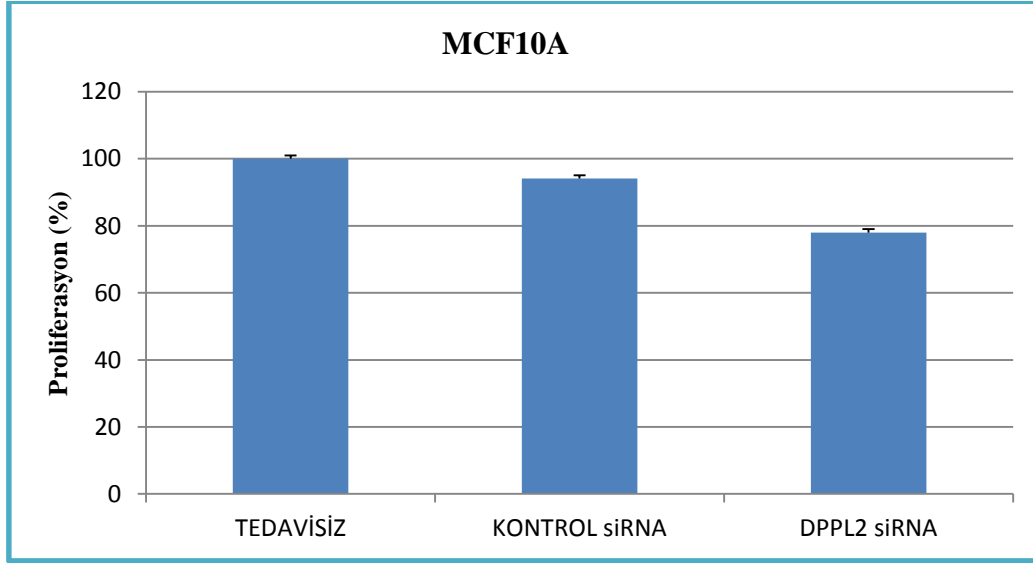
Çalışmada DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda MCF-7 hücre hatlarında meydana gelen hücre proliferasyonuna bakılmıştır. Şekil 9'de MCF-7 hücresinin spektrofotometre analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulaması yapılan grup karşılaştırıldığında ise hücrelerdeki canlılık oranının yaklaşık olarak %18 oranında azaldığı görülmüş ve bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil.9.

DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu MCF-7 Hücrelerindeki Proliferasyon. DPPL2'nin susturulmasıyla hücre proliferasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmada DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda MCF10A hücre hatlarında meydana gelen hücre proliferasyonuna bakılmıştır. Şekil.10. MCF10A hücresinin spektrofotometre analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulaması yapılan grup karşılaştırıldığında ise hücrelerdeki canlılık oranının yaklaşık olarak %20 oranında azaldığı görülmüş ve bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

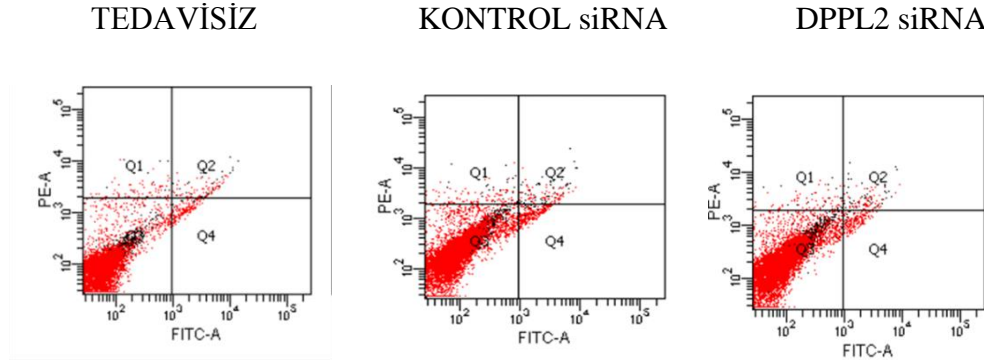


Şekil.10. DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu MCF10A Hücrelerindeki Proliferasyon. DPPL2'nin susturulmasıyla hücre proliferasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

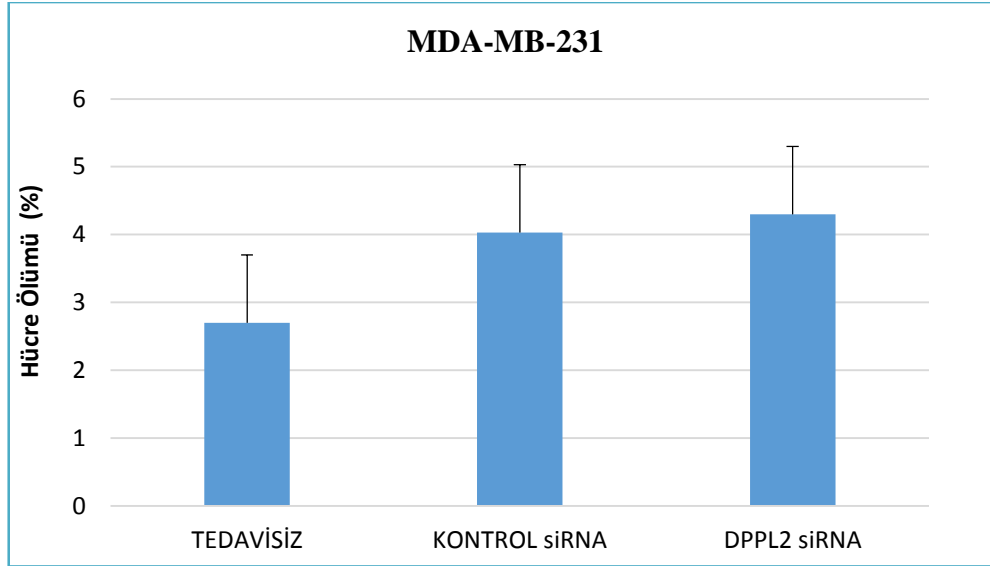
4.1.4. Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptozun belirlenmesi

4.1.5. Annexin Boyama ile Apoptoz belirlenmesi

Çalışmada apoptoz değerlendirilmesi için Annexin boyama ile Flow Sitometri uygulaması yapılmıştır. Şekil.11'de DPPL2 siRNA uygulaması sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde tedavisiz grup, kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA grubundaki apoptoz yüzdeleri Flow Sitometri analizi verileriyle gösterilmiştir. Şekil.12'de MDA-MB-231 hücrelerinde Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında apoptoza uğrama bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulanan hücreler kıyaslandığında DPPL2 siRNA uygulanan hücrelerde % 1,6 daha fazla hücre ölümü görülmüş ve bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

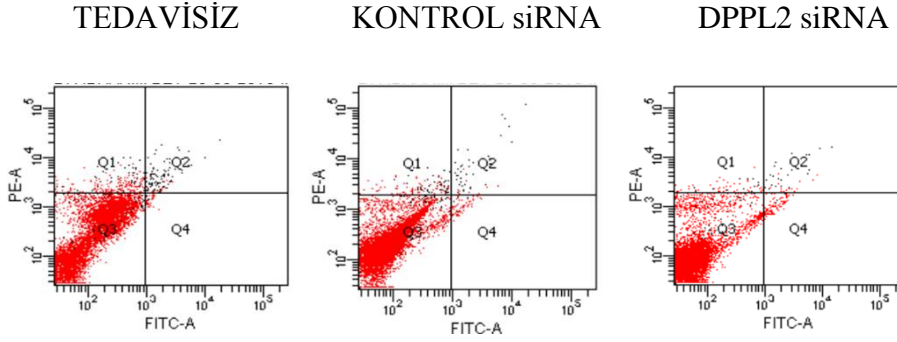


Şekil.11. MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri (Q2+Q4=apoptoz yüzdeleri).

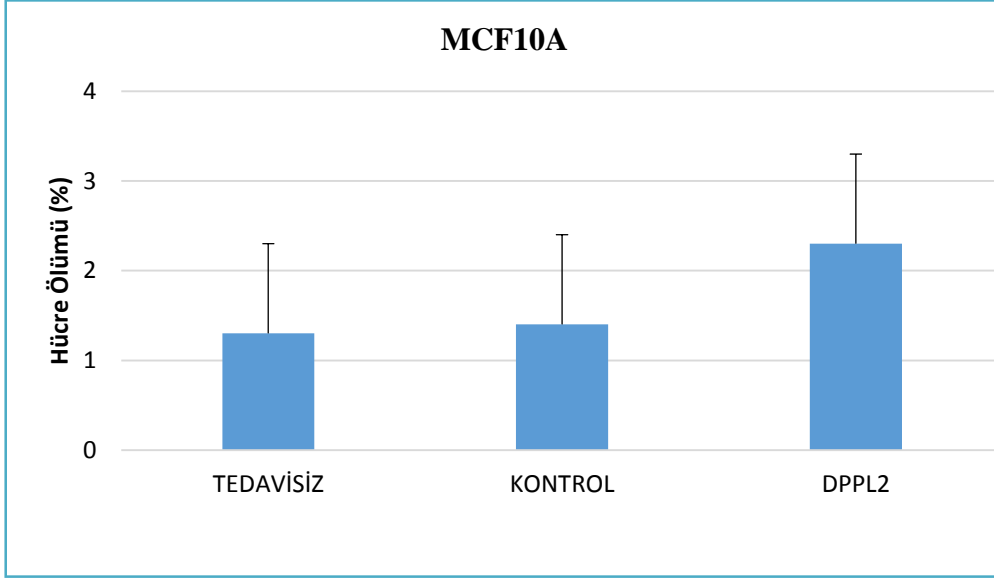


Şekil.12. DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p>0,005$).

Şekil.13’de DPPL2 siRNA uygulaması sonucu MCF10A hücrelerinde tedavisiz grup, kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA grubundaki apoptoz yüzdeleri Flow Sitometri analizi verileriyle gösterilmiştir. Şekil.14’da Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında apoptoza uğrama bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulanan hücreler kıyaslandığında, DPPL2 siRNA uygulanan hücrelerde % 1,98 daha fazla hücre ölümü görülmüş ve bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,005$).

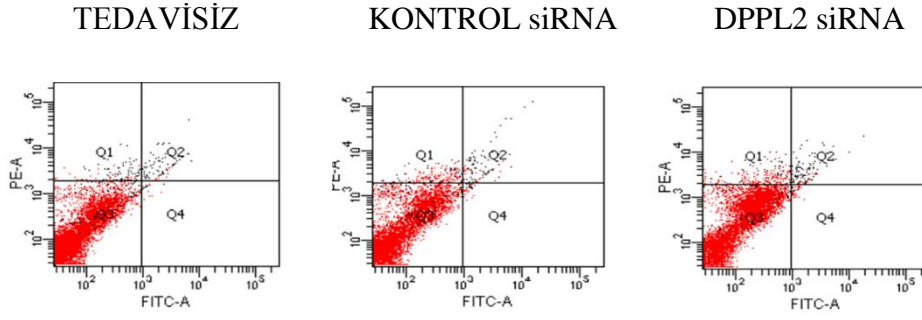


Şekil. 13. MCF10A Hücre Hattında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri (Q2+Q4=apoptoz yüzdeleri).

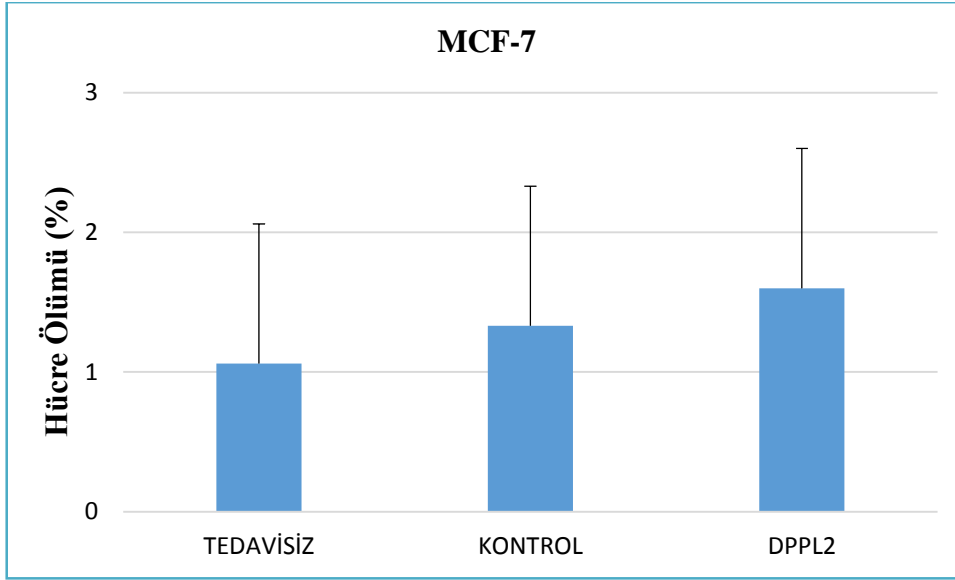


Şekil.14. DPPL2 siRNA Uygulaması Sonrası MCF10A hücrelerinde hücre ölüm yüzdesi ($p>0,05$)

Şekil.15’de DPPL2 siRNA uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinde tedavisiz grup, kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA grubundaki apoptoz yüzdeleri Flow Sitometri analizi verileriyle gösterilmiştir. Şekil.16’de Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında apoptoza uğrama bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Tedavisiz grup ile DPPL2 siRNA uygulanan hücreler kıyaslandığında DPPL2 siRNA uygulanan hücrelerde % 0,66 daha fazla hücre ölümü görülmüş ve bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil.15. MCF-7 Hücre Hatlarında Sırasıyla Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri(Q2+Q4=apoptoz yüzdeleri).

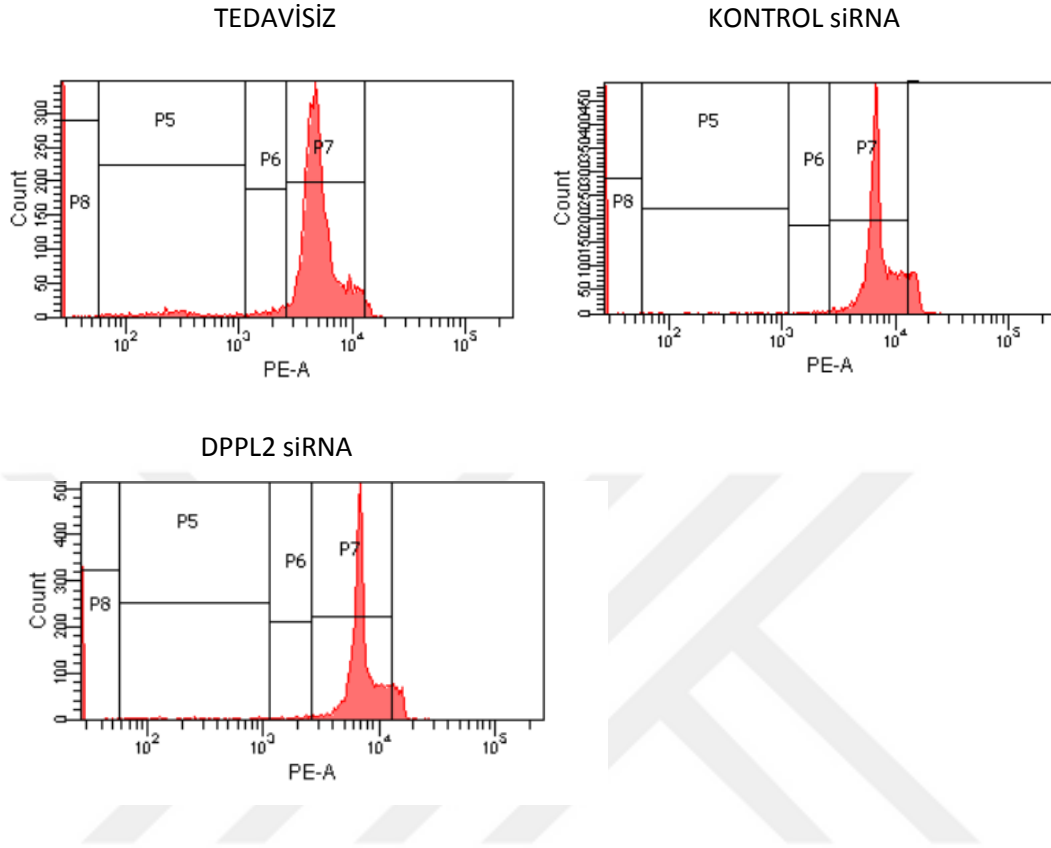


Şekil.16. DPPL2 siRNA Uygulaması Sonrası MCF-7 hücrelerinde hücre ölüm yüzdesi ($p>0,005$).

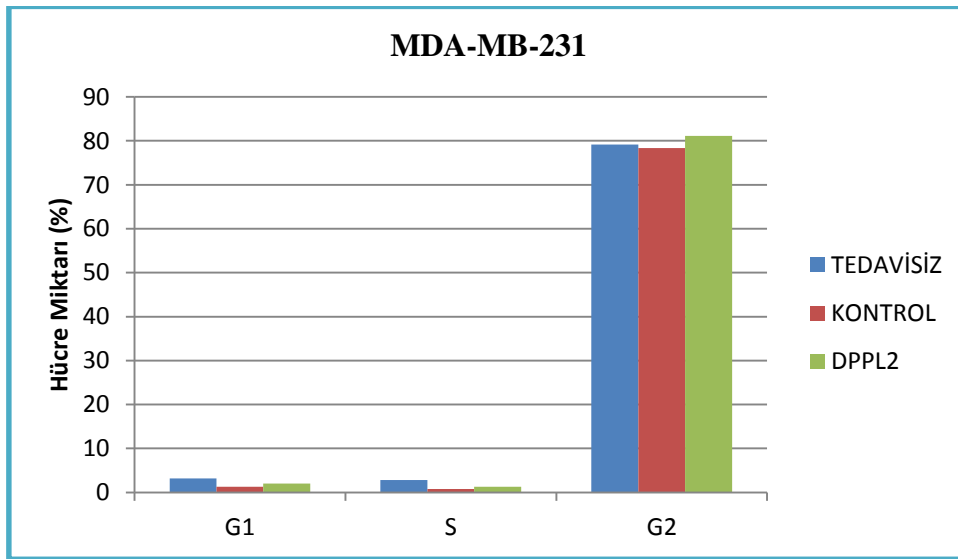
4.1.6. Hücre Döngüsü Analizi

Çalışmada DPPL2 siRNA uygulamasından sonra MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde Flow Sitometri tekniği ile hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Şekil.17'da MDA-MB-231 hücre hattında Flow Sitometri ile yapılan hücre döngüsü analizi verileri gösterilmiştir. Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak Şekil.18'de gösterilmiştir. DPPL2 siRNA uygulaması sonucu hücre döngüsü evrelerinde (G1,S,G2) oluşan hücre miktarı yüzdelerine bakıldığında tedavi gruplarının hepsinde G1 ve S fazlarında %5 in altında hücre miktarı

görülmüştür. Hücre miktarının %80'e yakın olanı hücre döngüsünün G2 evresinde gerçekleşmiştir.

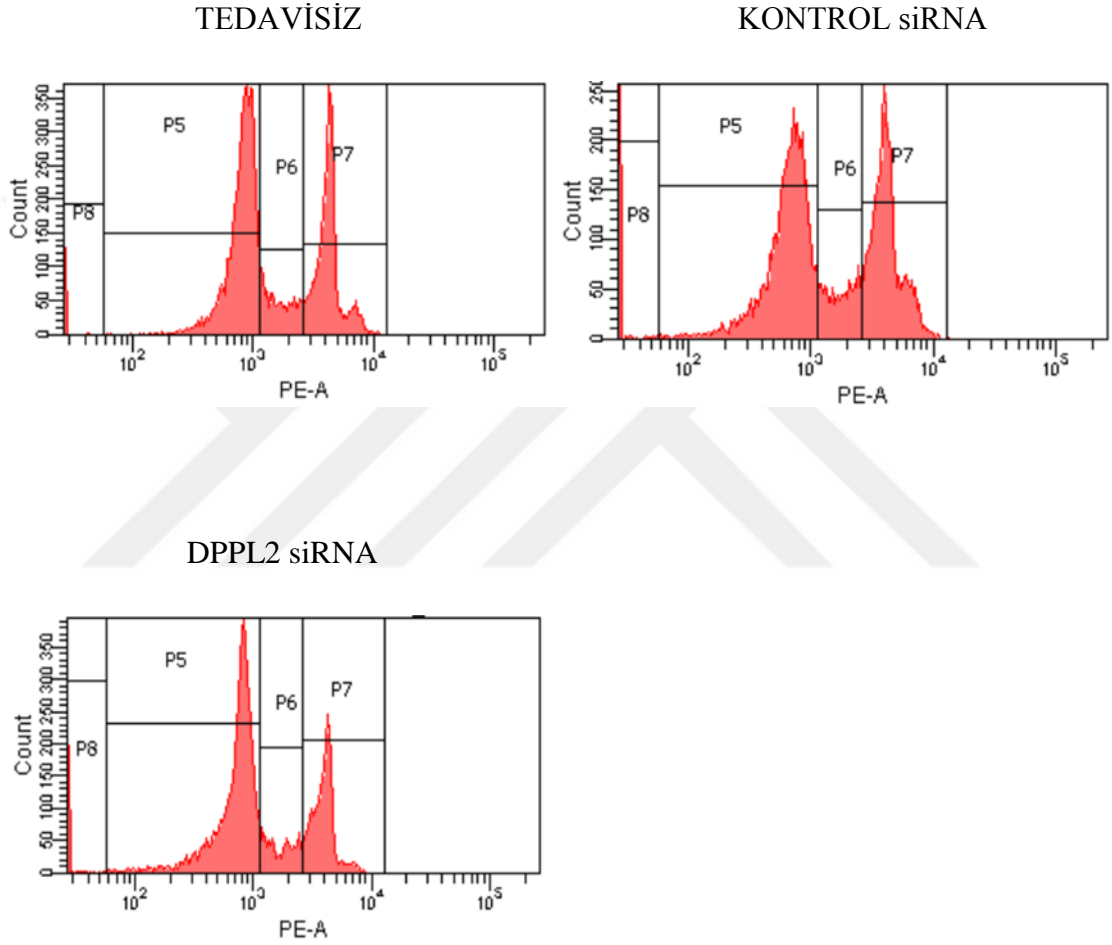


Şekil.17. MDA-MB-231 Hücre Hattında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsünde Oluşan Hücre Miktarları(P5:G1 Fazı, P6:S Fazı, P7:G2 fazı).

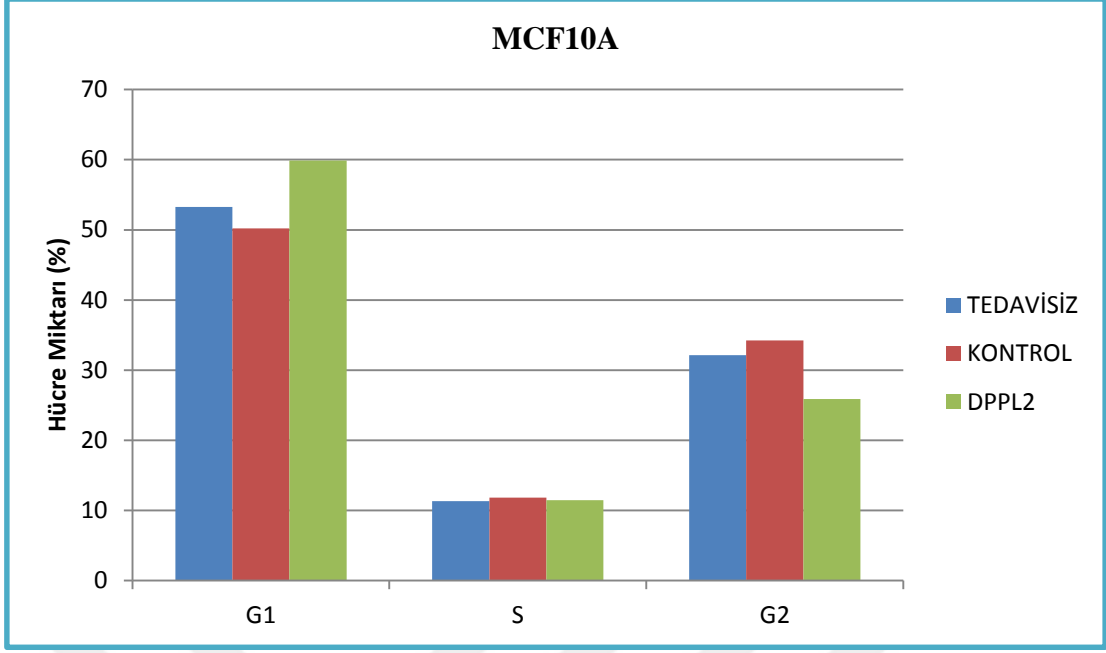


Şekil.18. MDA-MB-231 Hücre Hattında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonrası Hücre Döngüsünde Oluşan Hücre Miktarının Yüzdesi.

Şekil.19’de MCF10A hücre hattında Flow Sitometri ile yapılan hücre döngüsü analizi verileri gösterilmiştir. Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak Şekil.20’de gösterilmiştir. MCF10A hücresinde Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA uygulaması sonucu hücre döngüsü evrelerinde(G1,S,G2) oluşan hücre miktarı yüzdelere bakıldığında tüm tedavi gruplarındaki hücre miktarının %53’ün G1 evresinde ,% 11’nin S evresinde ve %30’ nun da G2 evresinde gerçekleştiği görülmüştür.

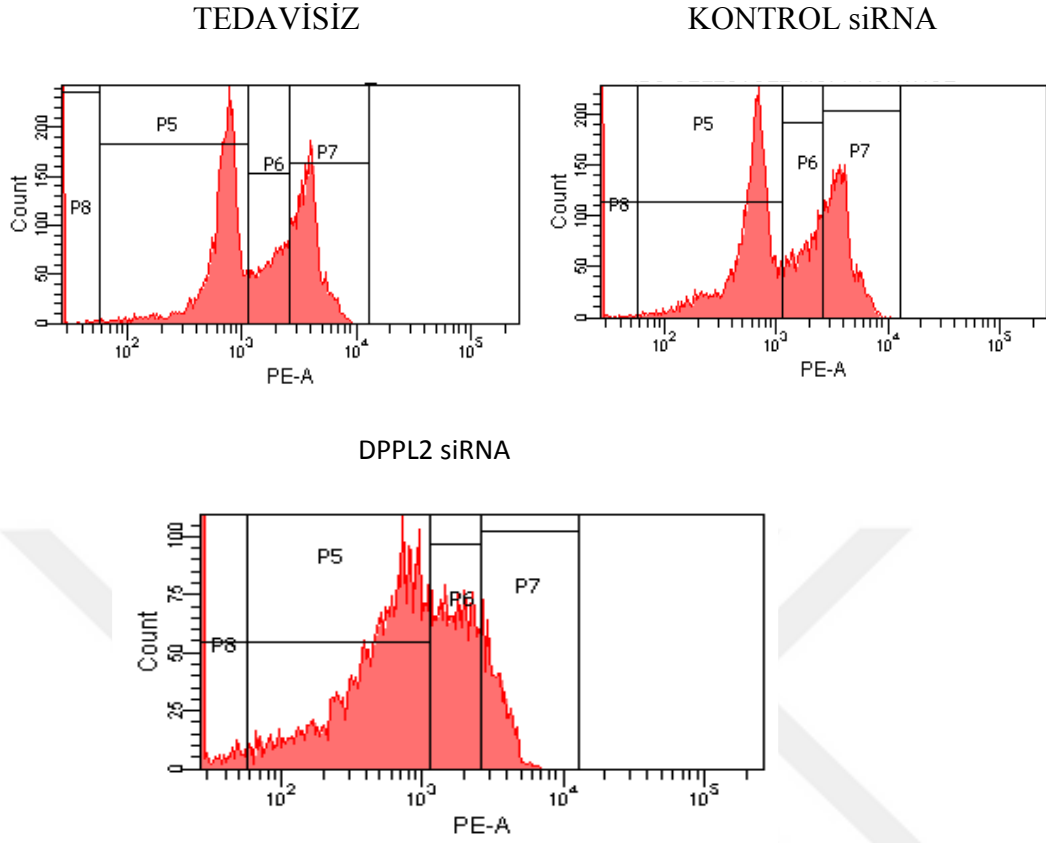


Şekil.19. MCF10A Hücre Hattında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsü Evrelerinde Oluşan Hücre Miktarları (P5:G1 Fazı, P6:S Fazı, P7:G2 fazı).

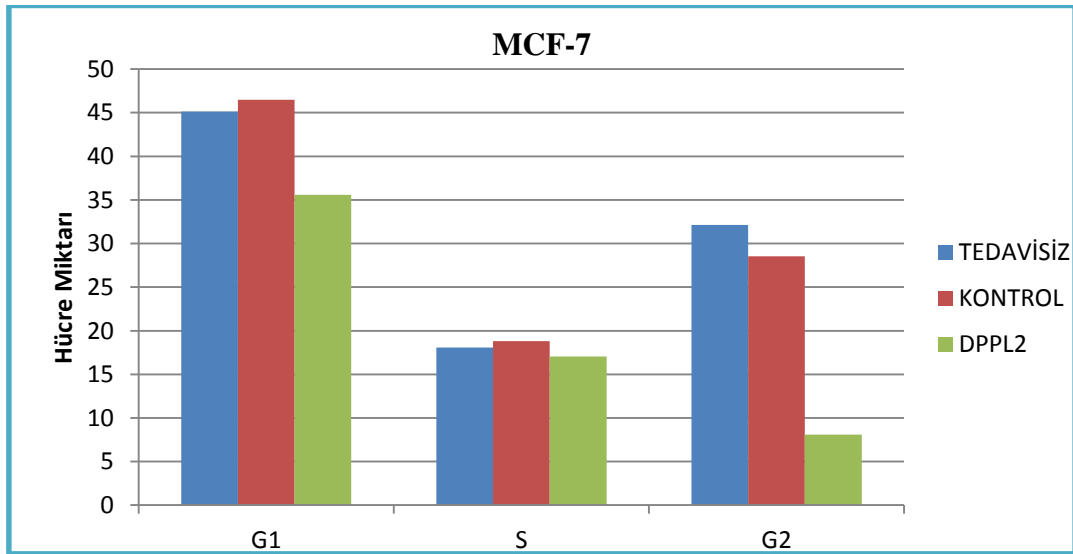


Şekil.20. MCF10A Hücresinde Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonrası Hücre Döngüsünde Oluşan Hücre Miktarının Yüzdesi.

Şekil.21’de MCF-7 hücre hattında Flow Sitometri ile yapılan hücre döngüsü analizi verileri gösterilmiştir. Flow Sitometri analiz verileri grafik haline getirilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak Şekil.22’de verilmiştir. MCF-7 hücresinde Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA uygulaması sonucu hücre döngüsü evrelerinde(G1,S,G2) hücre miktarı yüzdelere bakıldığında tüm tedavi gruplarında hücre miktarının %42’sinin G1 evresinde, %18’nin S evresinde, %23’ünün ise G2 evresinde olduğu görülmüştür.



Şekil.21. MCF-7 Hücre Hattında Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Hücre Döngüsü Evrelerinde Oluşan Hücre Miktarları(P5:G1 Fazı, P6:S Fazı, P7:G2 fazı).



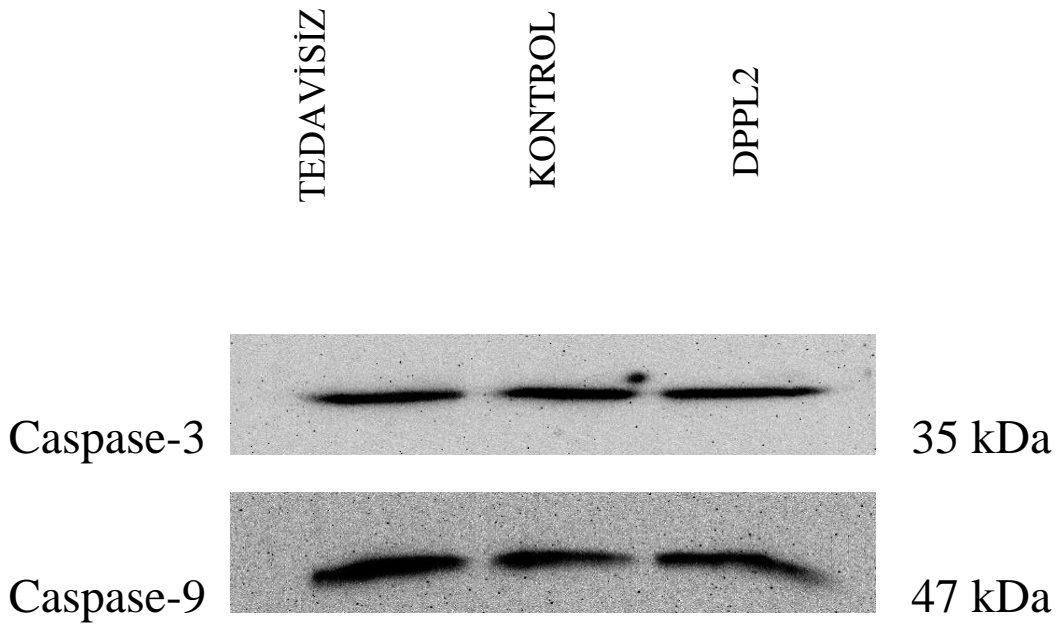
Şekil.22. MCF-7 Hücresinde Tedavisiz, Kontrol siRNA ve DPPL2 siRNA Uygulaması Sonrası Hücre Döngüsünde Oluşan Hücre Miktarının Yüzdesi.

4.1.7. Caspase İfadesinin Western Blot ile Gösterilmesi

Apoptoz, genler tarafından düzenlenen, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyulan hemostasinin korunmasını sağlayan programlı hücre ölümüdür. Caspase-3 ve Caspase-9 apoptoz belirteçleri olduğu için, çalışmada DPPL2 siRNA uygulamasından sonra MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerindeki Caspase-3 ve Caspase-9 ifadelerine Western Blot Tekniği ile bakılmıştır.

4.1.7.1. MDA-MB 231 Hücre Hattında Caspase İfadesi

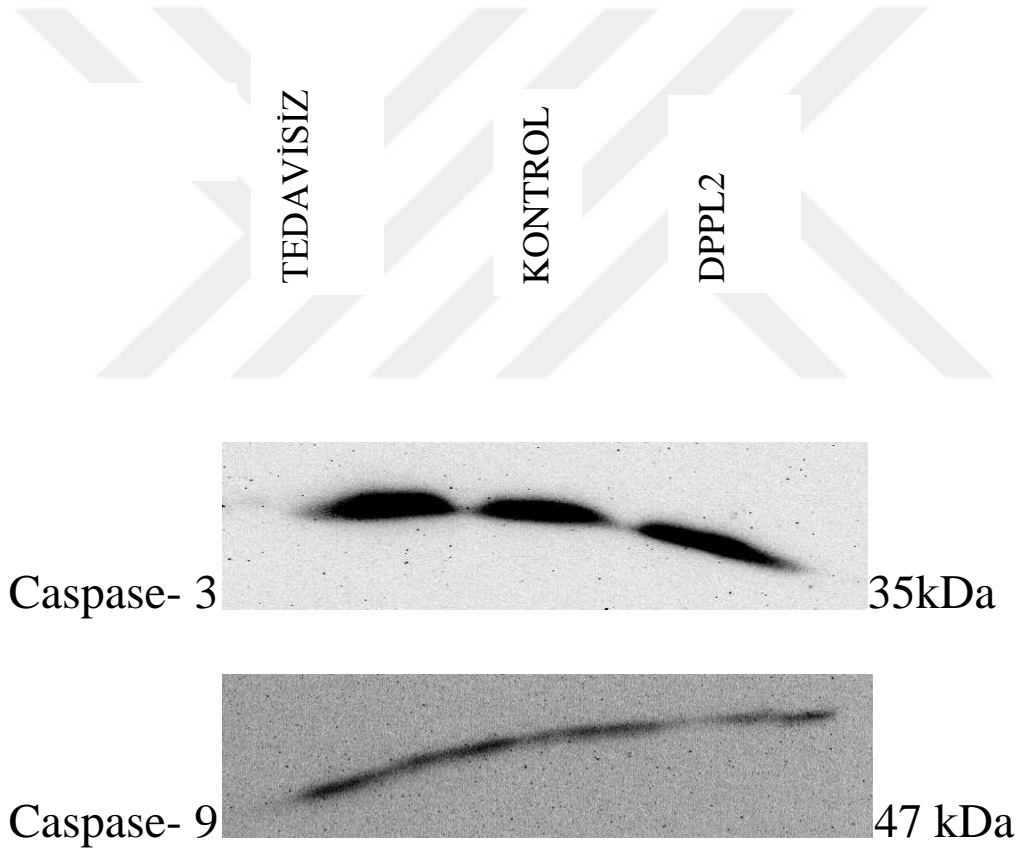
DPPL2 siRNA uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümünün saptanması amacıyla Caspase-3 ve Caspase-9 ifadelerine Western Blot tekniği ile bakılmıştır. Analiz sonuçlarında DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda Tedavisiz grup, Kontrol grubu ve DPPL2 siRNA gruplarında Caspase-3 ile Caspase-9 ifadesinin varlığı Şekil.23'de gösterilmiştir. Caspase-3 ve Caspase-9 ifadesinin yüksek düzeyde görülmesi DPPL2 siRNA uygulamasının hücrede apoptoz oluşturmadığını göstermektedir.



Şekil.23. MDA-M-231 Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucunda Caspase-3 ve Caspase-9 İfadesinin Western Blot ile Gösterimi.

4.1.7.2. MCF-7 Hücre Hattında Caspase İfadesi

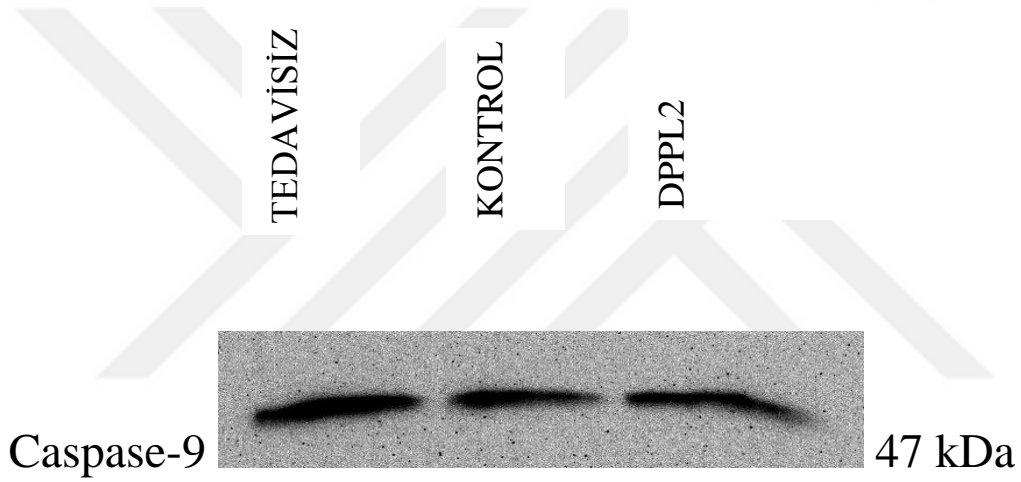
DPPL2 siRNA uygulaması sonrası MCF-7 hücrelerinde hücre ölümünün saptanması amacıyla Caspase-3 ve Caspase-9 ifadelerine Western Blot tekniği ile bakılmıştır. Analiz sonuçlarında DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda Tedavisiz grup, Kontrol grubu ve DPPL2 siRNA gruplarında Caspase-3 ve Caspase-9 ifadesinin varlığı Şekil.24'de gösterilmiştir. Caspase-3 ve Caspase-9 ifadesinin yüksek düzeyde görülmesi DPPL2 siRNA uygulamasının hücrelerde apoptoz oluşturmadığını göstermektedir.



Şekil.24. MCF-7 Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Caspase-3 ve Caspase -9 İfadesinin Western Blot ile Gösterimi.

4.1.7.3. MCF10A Hücre Hattında Caspase İfadesi

. DPPL2 siRNA uygulaması sonrası MCF10A hücrelerinde hücre ölümünün saptanması amacıyla Caspase-9 ifadesinin Western Blot tekniği ile bakılmıştır. Analiz sonuçlarında DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda Tedavisiz grup, Kontrol grubu ve DPPL2 siRNA gruplarında Caspase-9 ifadesinin varlığı Şekil.25’de gösterilmiştir. Caspase-9 ifadesinin yüksek düzeyde görülmesi DPPL2 siRNA uygulamasının hücrelerde apoptoz oluşturmadığını göstermektedir.



Şekil.25. MCF10A Hücre Hattında DPPL2 siRNA Uygulaması Sonucu Caspase- 9 İfadesinin Western Blot ile Gösterimi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kromozomun 10q26.12 bölgesine yerleşik olan 10 ekzon uzunluğundaki DPPL2 geninin meme kanseri hücrelerinde ifade düzeylerine bakılarak apoptoza olan etkisi, hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü araştırılmıştır. DPPL2 proteininin kanser hücrelerinde ifadesinin belirlenmesi için MDA-MB 231, MCF-7 ve MCF10A hücre hatları kullanılmıştır. Kanser hücrelerindeki durumun belirlenmesi amacıyla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılırken, kanser hücresi ile sağlıklı hücreler arasındaki farkın değerlendirilmesi için MCF10A meme epiteli hücresi kullanılmıştır.

DPPL2 protein ekspresyonları ile ilgili olarak literatürde beyin, böbrek ve testis çalışmaları mevcuttur (9). Çalıştığımız hücre gruplarında DPPL2 ekspresyonları western blot yöntemi ile tespit edilmiş olup buna göre MCF10A ve MCF7 hücrelerinde DPPL2 ekspresyonları yüksek düzeyde tespit edilirken MDA-MB-231 hücrelerinde ise daha az düzeyde ifade edildiği saptanmıştır. Karakter olarak daha agresif ve metastatik olan MDA-MB-231 hücrelerinde daha düşük düzeyde DPPL2 saptanmasının hücreye agresif karakterini kazandırabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca MCF7 hücreleri ER ve PR pozitif fenotip gösterirken MDA-MB-231 hücreleri ER ve PR negatif karakterdedir. Hücre dışı hormonal etkiye bağlı gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli görevler alan bu reseptörlerin varlığı DPPL2'nin düzeyini artırmış olduğu sonucuna varılabilir. Literatürde bu yönde bir bilgi olmadığından ER ve PR'nün susturulduğu hücrelerde DPPL2 ekspresyonunun araştırılması gerekmektedir.

Meme kanseri hastaları ile yapılan çalışmalarda DPPL2 genin ifadesinin yüksek olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (10). Literatürde bu güne kadar DPPL2 hücre proliferasyonu ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada ilk kez, DPPL2 protein ifadesi baskılanarak, MCF10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre proliferasyonu analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinde %25, MCF-7 hücrelerinde ise %20 hücre proliferasyonunda azalma olduğu belirtilmiştir. Fakat bu azalma miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. DPPL2'nin çalışılan tüm hücrelerde kritik görevler alması nedeniyle hem kanser hücre hatlarında hem de immortalize meme epitel hücresinde benzer oranlarda proliferasyonu baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde DPPL2 proteinin hücrelerde apoptoz sürecine olan etkisi üzerine çalışma yapılmadığı görülmektedir. İlk defa DPPL2 proteinin apoptoz üzerine olan etkileri bu çalışmada araştırılmıştır. DPPL2 siRNA uygulamasıyla DPPL2 proteinin etkisi baskılanıp hücrelerde apoptoz miktarı belirlenmiştir. MCF10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak yapılan DPPL2 siRNA uygulaması sonucunda, MCF10A hücresinde % 2,34, MDA-MB-231 hücresinde % 4,3, MCF-7 hücresinde ise %1,66 düzeyinde apoptoz saptanmış olup bu değer anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada apoptoz belirteçleri olması bakımından önemli olan Caspase-3 ve Caspase-9 enzimlerinin DPPL2 siRNA uygulamasından sonra hücredeki ifadesine bakılmıştır. Hücrede apoptoz olması durumunda parçalanması gereken enzimler olan Caspase-3 ve Caspase-9'un MCF10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki ifadelerine Western blot tekniği ile bakılmıştır. Hücrelerde Caspase parçalanmasının olmaması, flowsitometrik olarak annexin V boyanmasının gösterilememesi, DPPL2'nin susturulmasının apoptozu uyarmadığı tezini güçlendirmiştir.

Meme kanseri hücrelerinde DPPL2 proteinin hücre döngüsü üzerine etkisi daha önce araştırılmamıştır. Çalışmada DPPL2 siRNA uygulaması yapılarak hücre döngüsünde hangi evrede ne kadar hücre olduğuna bakılmıştır. MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücreleri kullanılarak yapılan çalışma sonucunda MDA-MB-231 hücresinde G2 evresinde, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde ise G1 ile G2 evresindeki hücre miktarının çok olduğu görülmüştür. DPPL2 proteinin ekspresyonu baskılanarak yapılan hücre döngüsü analizlerinde hücre döngüsü evrelerindeki hücre miktarının fazla olması DPPL2 protein ekspresyonunun hücre döngüsü üzerine etkisinin olmadığı görüşünü güçlendirmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada DPPL2 proteininin *in vitro* ortamlarda meme kanseri hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma yapılırken MDA-MB-231, MCF-7 kanser hücreleri ve MCF10A meme epitel hücreleri kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında DPPL2 protein ifadesinin hücre proliferasyonunda azaltıcı bir etkisinin olduğu fakat bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür. DPPL2 proteinin hücre apoptozundaki ifadesine bakıldığında da anlamlı bir apoptozun oluşmadığı görülmüştür. DPPL2 proteinin hücre döngüsündeki miktarlarına bakıldığında G1 ve G2 evresindeki hücre miktarları anlamlı bulunmuştur. DPPL2 siRNA uygulaması ile proliferasyonun azalması ve hücre döngüsünün belirli fazlarında anlamlı proliferasyonun görülmesi DPPL2 proteininin meme kanseri tedavisinde iyi bir hedef olabileceğini göstermektedir. *In vitro* ortamlarda yapılan bu çalışmaların *in vivo* modellerle desteklenmesi ve bunun nasıl sonuçlar doğuracağına gelecekteki çalışmaların merkezi olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014 64 (1), 9-29
2. De Santis C, Ma J, Bryan L and Jemal,A. Breast cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014; 64 (1), 52-62.
3. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı.Türkiye kanser istatistikleri. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-yılı>
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015, 136 (5): ,359-86.
5. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2006 No: 54 Aralık: 9-13
6. Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing druggability through liposomal formulations: New approaches to an old concept. Volume 2012, Article ID 738432,11.
7. Jeremy M B, John L, Lubert S. Biochemistry, 5th edition. W.H.Freeman. 2002: 1050-65
8. Manzano RG, Martinez EM, Forteza J, Brugarolas A. Microarray phosphatome profilin of breast cancer patients unveils a complex phosphatase regulatory role of the MAPK and PI3K pathways in estrogen receptor –negative breast cancer. *Int J Oncol* 2014, 45 (6): 2250-66
9. MasahiroT, Masayoshi H, Shigeki M, Evellyn B, Jumpe A, Kiyoshi F, Naoyuki K: Cloning and characterization of DPPL1 and DPPL2 representatives of a novel type of mammalian phosphatidate phosphatase. *Gene* 2007, 399 (2): 174-80
10. Dahl E, Gottlob K, Klaman I, Ebner E, Hermann K, Pilarsky C, Dürst M, Klinkhammer –Schalke M, Blaszyk H, Knuechel R, Hartmann A, Rosenthal A, Wild PJ.:Molecular profiling of laser-mikrosissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (13): 3950-60
11. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol pathol* 2007, 35 (4): 495-516

12. Robert A Jesinger, MD, MSE. Breast Anatomy for The Interventionalist. Techniques in Vascular and Interventional Radiology. March 2014. Pages 3-9.
13. Işık G. Meme Kanseri Tedavisinde Paklitaksel Yüklü Polikatyonik ve Anyonik Siklodekstrin Nanoküre Formülasyonu ve In Vitro Değerlendirilmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı.Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi 2013.
14. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011, 6: 69-90
15. 2014 Yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri(TÜİK). <http://kanser.gov.tr/Dosya/2017>
16. McPherson K, C M Steel, J M Dixon. Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *ABC of Breast Diseases*.
17. Khatib Qussama M N (Ed.). World Health Organization. Guidelines for the early detection and screening of breast cancer. *EMRO Technical Publications Series 30*.
18. Cho E, Chen WY, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Hankinson SE, Willett WC. Red meat intake and risk of breast cancer among premenopausal women. *Arch Intern Med* 2006; Vol: 166: 2253-2259
19. Linos E, Willett WC. Diet and breast cancer risk reduction. *J Natl Compr Canc Netw* 2007, 5: 711-718
20. Howard RA, Leitzmann MF, Linet MS, Freedman DM. Physical activity and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in the U.S. radiologic technologists cohort. *Cancer Causes Control* 2009, 20: 323-33
21. Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Ewans DG, Closas MG, Gescher AJ, Key TJ, Saxton JM, Harvie MN. Breast cancer research 2014, risk determination and prevention of breast cancer. *BCR* 2014, 16: 446
22. Suzuki R, Ye W, Rylander-Rudgivist T, Sajas S, Colditz GA, Wolk A. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97: 1601-8.
23. John EM, Phipps AL, Knight JA, Milne RL, Dite GS, Hopper JL, Andrulis IL, Southey M, Giles GG, Whittemore AS. Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the breast cancer family registry. *Int J Cancer* 2007, 121: 386-394.

24. Lagerud M, Bellocco R, Karulsson P, Tejler G, Lambe M. Socioeconomic factors and breast cancer survival a population based cohort study. *Cancer Causes and Control* 2005, 16: 419–430.
25. Haber G, Ahmed NV, Pekoviç V. Family history of cancer and its association with breast cancer risk perception and repeat mammography). *Am J Public Health* 2012, 102 (12): 2322-9.
26. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications *Oncologist* 2004, 9 (4): 361-377.
27. Shah S, Chen B. Testing for HER2 in breast cancer: a continuing evolution. *Patholog Res İnt* 2011,16.
28. Perren TJ. c-erbB-2 Oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991, 63: 328-332.
29. Yarım F, Kazak F. Epidermal büyüme faktörü. *Kocatepe Vet J* 2016, 9 (3): 215-25.
30. Kelly, G L, Rickinson, A B. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *ASH Education Program Book* 2007, 1: 277-284
31. Menssen A and Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *PNAS* 2012, 99 (9): 6274-79.
32. Diao DJ and Dikson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2000, 7: 143-164
33. Telkoparan P ve Tazebay UH. Ras protein ailesi: hücresel işlevi, moleküler kontrolü, onkogenezdaki rolü. *Turk J Biochem* 2011, 36 (4) : 367–373.
34. Kwon SK, Saindane M, Baek KH. p53 stability is regulated by diverse deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2017, 1868 2: 404-11.
35. Sirvent JJ, Mar AF, Olona M and Orti A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol* 2001, 16: 99-106.
36. Ahmed M and Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2005, 25: 5906–5911
37. Kang HS, Hong YB, Yi YW, Cho CH, Wong A, Bae I. Correlations between BRCA1 defect and environmental factors in the risk of breast cancer. *J Toxicol Sci* 2013, 13,3: 355-61

38. Kornelia Polyak. Breast Cancer Gene Discovery. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2002, 18 (4): 1-18
39. Monguaoğlu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydın M, Friedman H. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Human Mutation* 2003, 21 (4): 444-5
40. Zhang K, Zhao J, Zhu X, Luo M, Xu C, Yu J, Deng M, Zhang S, Chen Y. Germline Mutations of PALB2 Gene in a Sequential Series of Chinese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2017 166, 3: 865-73.
41. Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. Journal* 2004, 382: 1-11.
42. Tabanlıoğlu D, Melikoğlu B, Allı N. Cowden Sendromlu bir Olgu Sunumu. *Türkiye Klinikler J Dermatol* 2009, 19 (3): 165-9.
43. Nevanlinna H and Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006, 25 (43): 5912-9
44. Nicolo AD, Tancredi M, Lombardi G, Flemma C, Barbuti S, Cristefano CD, Sabhien B, Bevilacqua G, Drapkin R, Caligo MA. A novel breast cancer-associated *BRIP1 (FANCD1/BACH1)* germ line mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res* 2008, 14 (14): 4672-80.
45. Wong ESY, Shekar S, Domestici MM, Chan C, Sze M, Ang P, Ngeow J, Lee ASG. Inherited breast cancer predisposition in Asians: multigene panel testing outcomes from Singapore. *npj Genomic Medicine* 2016, 15003.
46. Field KM, Boer RH. Male Breast Cancer: A Review. *APJOH* 2009, 1: 1
47. Koukourakis G. Radiation therapy for early breast cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2009 11 (9), 596-603.
48. Ragaz J, Olivetto I A, Spinelli JJ, Phillips N, Jackson S, Wilson KS, Knowling MA, Copping CML, Weir L, Le KGN, Durand R. Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial. *J Natl Cancer Ins* 2005, 97 (2): 116-26.
49. Villegas VE, Rondón-Lagos M, Annaratone L, Castellano I, Grismaldo A, Sapino A, Zaphiropoulos PG. Tamoxifen treatment of breast cancer cells: Impact on Hedgehog/GLI1 signaling. *Int j mol sci* 2016, 17 (3): 308.

50. Hussain S A, Palmer DH, Stevens A, Spooner D, Poole CJ, Rea D W. Role of chemotherapy in breast cancer. *Expert review of anticancer therapy* 2005, 5 (6): 1095-1110.
51. Kang J, Bai R, Liu K, Ji XP, Li Y, Han JY. Identification of significantly different modules between permanent and deciduous teeth by network and pathway analyses. *Genetics and molecular research* 2016,15.4:gmr15047959
52. Zhang X, Zhang L, Lin B, Chai X, Li R, Liao Y, Deng X, Liv Q, Yang W, Zhang M, Lei F, Wu J, Yu S, Li X, Li S, Wu J, Yu S, Li X, Li S, Li Y, Zeng J, Lous W, Ren D, Huang G. Phospholipid Phosphatase 4 promotes proliferation and tumorigenesis, and activates Ca²⁺-permeable Cationic Channel in lung carcinoma cells. *Mol Cancer* 2017, 16: 147
53. Kresovich JK, Zheng Y, Cardenas A, Joyce BT, Rifas-Shimen S, Oken E, Gillman MW, Hivert MF, Baccarelli AA, Hou L. Cord blood DNA methylation and adiposity measures in early and mid-childhood. *Clin epigenetics* 2017, 9: 86

EKLER

EK.1. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı soyadı : Mehmet Ali GÜZEL

Doğum yeri : Malatya

Doğum tarihi : 15.06.1985

Eğitim Bilgileri

Lisans Eğitimi : İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Katıldığı projeler

Meme Kanseri Patogenezinde Yeni Bir Oyuncu: Caytaksin. Tubitak(115s286) Bursiyer.

İş Deneyimi

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD (2013-2015)

İletişim:

E-posta Adresi: maligzl.44@yandex.com



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı : 62594724/...97

19.11.2015

Konu: Y.L. Öğr. Mehmet Ali Güzel'in tez önerisi

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi: 05.11.2015 tarih ve 1504 sayılı yazınız.

İlgide belirtilen yazınız ile 27.10.2015 tarih ve 2015/35-12-02 sayılı Yönetim Kurulu kararı ile ilişkili olarak yüksek lisans öğrencimiz Mehmet Ali Güzel'in "DPPL2 Proteininin Apoptoz Üzerine Etkilerinin Meme Kanseri Hücrelerinde Araştırılması" başlıklı tez önerisi için etik kurul onayı istenmektedir. Ekte sunulan ve tez danışmanı Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ tarafından verilen yanıtta, tez çalışmasının ticari olarak temin edilecek olan hücre soyu ile yapılacağı vurgulanarak, etik kurul onayına gerek duyulmadığı belirtilmektedir.

Bilgilerinize sunar, gereğini arz ederim.


Prof Dr. Elif YEŞİLADA

Anabilim Dalı Başkanı

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Başkanlığı'na

Anabilim Dalımız Yüksek Lisans öğrencisi Mehmet Ali Güzel'in tez başlığı 'DPPL2 proteinin apoptoz üzerine etkisinin meme kanseri hücrelerinde araştırılması' olarak belirlenmiş olup Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce onaylanmıştır. Ancak enstitü yönetim kurulu kararında, etik kurul onayının alınması istenmektedir. Tez çalışmasında; insan veya deney hayvanları ile ilgili bir deney bulunmamakta, sadece ticari olarak temin edilen kanser hücreleri üzerinde çalışma yapılacağından etik kurul onayına gerek duyulmamaktadır. Gereğini bilgilerinize arz ederim.

19.11.2015

Doç. Dr. İbrahim Tekedereli

