



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE TWIST1
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ HEDEF
GENLERİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ İLE
BELİRLENMESİ

ŞEHRİBAN BÜYÜKKILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran, 2022

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Şehriban BÜYÜKKILIÇ

Tarih:25/07/2022

**Meme Kanseri Hücresinde TWIST1 Transkripsiyon Faktörü Hedef Genlerinin
Transkriptom Analizi ile Belirlenmesi**

Şehriban BÜYÜKKILIÇ

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Jüri

Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

2022, 57

ÖZET

Meme kanseri, Dünya’da kadınlar arasında yaygın görülen multifaktöriyel bir hastalıktır. Kansere bağlı ölümlerin büyük çoğunluğu, metastaza bağlı olarak meydana gelmektedir. Günümüzde kanser metastazının hücrelerin epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) süreci ile başladığı bilinmektedir. Bu sürecin temel tetikleyicilerinden biri, TWIST1 transkripsiyon faktörüdür. Bu tez çalışmasında endojen olarak TWIST1’i yüksek düzeyde ifade eden metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde anti-sense oligonükleotidler yardımı ile *TWIST1* geninin baskılanması ve buna bağlı olarak değişen transkriptom profili ile hedef genlerin belirlenmesi amaçlandı. Bunun için antisense-TWIST1 cDNA dizisi klonlanmış pcDNA3.1 plazmid vektörü ve kontrol olarak boş plazmid vektörü, hücelere lipofektamin yardımı ile transfekte edildi. Transfekte edilen hücreler, G418 içeren ortamda kültüre edilerek seçildi. Seçilen tek koloni 3 ay boyunca seçici besiyerinde çoğaltıldı ve protein lizatları elde edildi. Western blot yöntemi ile TWIST1 baskılanması protein düzeyinde doğrulandı. Söz konusu hücrelerden izole edilen RNA örneklerine ait transkriptom verileri DNBseq platformu aracılığıyla analiz edildi. Bu verilerin analiz sonuçlarına göre; 633 adet gen 2-kat ve daha fazla ifade artışı gösterirken, 604 adet farklı genin ise 2-kat ve daha fazla azalış gösterdiği saptandı. Bu genler içinde dikkate değer bir çoğunluğunun hücre membranı ve hücre dışı komponentler ile ilişkili olduğu anlaşıldı. Bu genlerden integrin sinyali ile ilişkili olan; *İntegrin beta-8*, *İntegrin-1 binding protein*, *İntegrin alfa-3*, *Talin-1*, *Filamin-beta*, *PAR6-Beta*, *Fibronektin*, *Aktinin alfa-1*, *Kollajen-5A2*, *Kollajen-4A2*, *Kollajen-3A1* ve *Kollajen-12A1* genleri olası TWIST-1 hedef genleri olarak belirlendi. Seçilen bu genlerin ifade değişimleri qRT-PCR yöntemi ile doğrulandı. Bulgulara göre, TWIST1’in baskılanmasına bağlı olarak *İntegrin beta-8* ve *Kollajen-3A1* gen ifadeleri artarken diğerlerinin doğru orantılı olarak azaldığı saptandı. Sonuç olarak, TWIST1 transkripsiyon faktörünün İntegrin yolağı üzerinde önemli bir regülatör olduğunu ve bu bağlamda önemli bir terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, TWIST1, Transkriptom analizi, İntegrin yolağı.

MS THESIS

**IDENTIFICATION OF TWIST1 TRANSCRIPTION FACTOR TARGET GENES İN
BREAST CANCER CELLS BY TRANSCRIPTOME ANALYSIS**

Master Student Name

ŞEHRİBAN BÜYÜKKILIÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF INSTITUTE OF SCIENCE OF NECMETTİN

ERBAKAN UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Department Of Molecular Biology And Genetic

Advisor: Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Jury

Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Ashı DAĞERİ

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

2022, 57

ABSTRACT

Breast cancer is a multifactorial disease that is common among women around the world. The majority of cancer-related deaths occur due to metastasis. Today, it is known that cancer metastasis begins with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of cells. One of the main triggers of this process is the transcription factor *TWIST1*. In this thesis, it was aimed to determine the suppression of *TWIST1* with the help of anti-sense oligonucleotides in metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells that endogenously express *TWIST1* at a high level and accordingly the changing transcriptome profile. For this, the plasmid vector pcDNA3.1 with cloned antisense-*TWIST1* cDNA sequence and an empty vector as a control were transfected into cells with the help of lipofectamine. Transfected cells were selected by culturing in medium containing G418. The selected single colony was grown on selective medium for 3 months and protein lysates were obtained. *TWIST1* suppression was confirmed at the protein level using the western blot method. The transcriptome data of the RNA samples isolated from the cells in question were obtained via the DNBseq platform. According to the results of the analysis of these data; It was determined that 633 genes showed a 2-fold or more expression increase, while 604 different genes showed a 2-fold or more decrease. A remarkable majority of these genes were found to be associated with cell membrane and extracellular components. Associated with integrin signal from these genes; Integrin beta-8, Integrin-1 binding protein, Integrin alfa-3, Tallin-1, Filamin-beta, PAR6-Beta, Fibronectin, Actinin alfa-1, Collagen-5A2, Collagen-4A2, Collagen-3A1 and Collagen-12A1 genes were identified as possible *TWIST1* target genes. Expression changes of these selected genes were confirmed by qRT-PCR method. Accordingly, it was determined that Integrin beta-8 and Collagen-3A1 gene expressions increased due to the suppression of *TWIST1*, while the others decreased in direct proportion. According to these findings, it is thought that the *TWIST1* transcription factor is an important regulator on the Integrin pathway and can be considered as an important therapeutic target in this context.

Keywords: Breast cancer, *TWIST1*, Transcriptome analysis, Integrin pathway.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Suray Pehlivanoglu'na, ilgisi ve önerileri için sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan tüm hocalarıma teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de bu vesileyle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında bana verdikleri destekleri için Kübra Seyhan ve Feyza Kostak'a teşekkür ederim.

Saygılarımla.

Şehriban BÜYÜKKILIÇ

KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser türlerinin görülme sıklığı ve adlandırılması	4
2.2. Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme kanserinin moleküler biyolojisi ve genetiği.....	7
2.3. İntegrin Yolağının Meme Kanseriyle İlişkisi	7
2.4. <i>TWIST1</i> Geni ve Yapısı	10
2.4.1. <i>TWIST1</i> proteini ve yapısı	11
2.4.2. <i>TWIST1</i> 'in hücredeki fonksiyonu	12
2.5. Omik Teknikleri.....	12
2.5.1 Transkriptom analizleri.....	13
2.5.2. Transkriptom analiz basamakları.....	14
2.6. Biyoinformatik Analizler	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Hücre kültürü	16
3.2. MDA-MB-231 hücrelerine plazmid vektörlerin transfeksiyonu	16
3.3. Transfekte edilen hücrelerinin seçilimi.....	16
3.4. Western blot deneyi	17

3.4.1. Protein lizatlarının hazırlanması	17
3.4.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	17
3.4.3. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)	17
3.4.4. Proteinlerin membrana transferi	18
3.4.5. İmmünblotlama ve görüntüleme	19
3.5. Test ve kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin matrijel içeren ortamda kültüre edilmesi	19
3.6. MDA-MB-231 hücrelerinden total RNA izolasyonu	20
3.7. MDA-MB-231 hücrelerinin transkriptom analizleri.....	21
3.8. Transkriptom verilerinin biyoinformatik analizi	22
3.9. cDNA kütüphanesinin elde edilmesi	22
3.10. Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	26
4.1. Bulgular	26
4.1.1. Hücre kültürü	26
4.1.2. Plazmid vektörlerin MDA-MB-231 hücrelerine transfeksiyonu ve seçilimi	26
4.1.3. Antisense oligonükleotidler ile TWIST1 baskılanma düzeyinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi.....	28
4.1.4. Transkriptom analizi sonuçları	29
4.1.4.1. İfadesi değişen genlerin (DEG) analizi.....	32
4.1.4.2. DEG analizi ile belirlenen genlerin biyolojik fonksiyonları.....	33
4.1.5. Hedef genleri belirlenmesi.....	34
4.1.6. Kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış MDA-MB-231 hücrelerinin matrijel kaplı yüzeydeki hücre morfolojileri.....	36
4.2. Tartışma	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
5.1. Sonuçlar	45
5.2. Öneriler	47
6. KAYNAKLAR	48

TABLO LİSTESİ

Tablo1: Meme kanserinde risk faktörleri.....	7
Tablo2: Yükleme jelinin içeriği.....	19
Tablo3: Ayrıştırıcı jelin içeriği	19
Table4: Biosystem cDNA kittinde yer alan bileşenler ve kullanılan hacimleri.....	23
Tablo5: Çalışmada kullanılan qRT-PCR primerler.....	25
Tablo6: qRT-PCR içeriği.....	26
Tablo7: qRT-PCR şartları.....	26
Tablo 8. Transkriptom analizi genel okuma sonuçları.....	31
Tablo9: StringTie ile anotasyonu gerçekleştirilen transkriptler.....	32
Tablo 10. Transkriptom analizinde yapılan hizalama sonuçları.....	33
Tablo11: Transkriptom analizi sonucunda belirlenen genlerin hücresel fonksiyonları..	35
Tablo12. Hedef genlerin transkripsiyon analizi sonucunda değişen ifadelerine ait veriler.....	35

GRAFİK LİSTESİ

Grafik1: FastqC sonuçlarının, multiqC aracılığıyla birleştirilmesi ile elde edilen ortalama kalite sonuçlarına ait grafik.....	32
Grafik2: FasqC, Sekans kalite ve duplikasyon seviyesine ait veriler.....	32
Grafik3: Kontrol ve test karşılaştırılması sonucunda elde edilen DEG dağılım grafikleri.....	34
Grafik4: DEG ısı haritası.....	34
Grafik5: qRT-PCR çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.....	36
Grafik6: TWIST1 ifadesi baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde kontrole kıyasla ifadesi değişen genlerin qRT-PCR verileri.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil1: Meme dokusunun anatomik yapısı.....	6
Şekil2: İntegrinlerin moleküler yapısı.....	8
Şekil3: A)integrin ailesi,B) integrinlerin şematik gösterimi.....	9
Şekil4: İntegrinlerde hücre içinden dışına (inside-out) doğru ve hücre dışından içine (outside-in) doğru sinyal iletimi ve bu sinyallerin iletimde görev yapan moleküler.....	10
Şekil5: İnsan TWIST1 geninin yapısı.....	10
Şekil6: Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan TWIST1 heterodimer ve homodimer konfarmasyonu.....	12
Şekil7: Omik analiz yöntemlerinin alt birimleri.....	14
Şekil8: Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü.....	27
Şekil9: TWIST1-AS-pcDNA3.1 plazmid vektör ile transfekte edilen ve G418/Neomycin’li besiyerinde seçilen koloninin morfolojik görüntüsü	28
Şekil10. Kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış (TW-AS) MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	29
Şekil11: Boş ve TWIST1-AS pcDNA3.1 vektörlerinin transfekte edildiği ve Neomycin ile seçilen MDA-MB-231 hücrelerinde TWIST1 ve Beta-Aktin (ACTB) protein ifadeleri (A) ve karşılaştırmalı grafiği (B).....	30
Şekil12: Matrijel kaplı hücre kültür kaplarında kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış (TW-AS) MDA-MB-231 hücrelerinin <i>in vitro</i> morfolojileri.....	38
Şekil 13: TWIST1’in MD-MD-231 hücrelerinde transkripsiyonunu etkilediği genlerin şematik gösterilmesi.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	deoksiribonükleik asit
EMT	epitelyal mezenkimal transisyon
WHO	dünya sağlık örgütü
IGF-1	büyüme faktör-1
AKT	serin/trozin protein kinaz
c-Myc	multifonksiyonel transkripsiyon faktörü
RAS	guanozin-nükleotid bağlayıcı protein
TP53	tümör baskılıcı gen
BRCA1	meme kanseri geni 1
BRCA2	meme kanseri geni 2
P53	tümör baskılıcı gen
MCF-7	michigan kanser vakfi-7
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
HBOC	over kanser sendromu
VPF	vasküler geçirgenlik faktörü
VEGF	vasküler endotel büyüme faktörü
HER-2	epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
bHLH	bazik heliks-loop heliks
PDGF	trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TGF- β	dönüştürücü büyüme faktörü beta
IGF-1	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü-1
TNF- α	tümör nekroz faktörü alfa
NF-K β	nükleer faktör kappa b
SP1	özgüllük protein-1
AP2	aktive edici bindi protein-2
STAT3	sinyal dönüştürücü transcrition-3
B-HLH	temel-sarmal-döngü-sarmal
E1A	edenovirüs-erken bölge-1A
NLS	nükleer lokalizasyon sinyası
GTP	guanozin trifosfat
GSYİH	guanozin difosfat

GTPaz	guanozin trifosfat kinaz
PI3K-3	fosfa'dilinositol 3-kinaz
Mtor	memeli hedefi rapamisinini
NF-kB	nükleer faktör kappa B
AKT	protein kinaz-B
UV	ultraviyole
RPE	retina pigment epiteli
MgCl ₂	magnezyum klorür
FBS	fetal sığır serumu
Nm	nanometre
TEMED	tetra etil metilen diamin
SDS	sodyum dodesil solfat
kDa	kilodalton
TNF	tümör nekroz faktörü
µL	mikrolitre
mM	milimolar
EGF	epidermal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin bölünme sinyallerine ihtiyaç duymadan çoğalması sonucunda meydana gelen multifaktöriyel bir hastalıktır. Kanser progresyonu, yaşam tarzı, çevre, hormonlar gibi faktörler ile genetik faktörlerin birlikteliği sonucunda meydana gelmektedir. Kanser gelişimi cinsiyete bağlı olarak farklılık arz edebilmektedir. Erkek hastalarda trake, bronşit ve akciğer kanserleri öne çıkmakta iken kadın hastalarda ise meme kanseri daha sık görülmektedir.

Kadınların %70'in etkilenen meme kanseri, dünya çapında kadınların ölümüne neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Meydana geldikleri doku tipi aynı olmasına karşın, WHO (World Health Organization) açıklamasına göre tümör sınıflandırmasında meme kanserine ait 20 major tip ve 18 minor alttipi mevcuttur. Meme kanserinin kadınlarda daha sık görülmesinin nedeni; kadın meme dokusunun kanser oluşumunu tetikleyen lezyonlara erkeklere göre daha yatkın olmasından kaynaklanmaktadır.

TWIST1 geni ilk olarak *Drosophyla melanogaster* embriyolarında morfogenezis aşamasında tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde *TWIST1*'in onkogenik özellikleri olan bir transkripsiyon faktörü olduğu anlaşılmıştır. *TWIST1*, promotorlarında E-box dizisi taşıyan birçok genin ifadelenmesini düzenlemektedir. Tümör hücrelerinin invazyonu ile ilgili yapılan araştırmalarda anahtar noktanın E-Kaderin kaybı olduğu ve *TWIST1*'in E-kaderin genini transkripsiyonel düzeyde baskıladığı anlaşılmıştır. Örneğin, meme kanseri tanısı konan hastalardan elde edilen invazif duktal karsinoma örneklerinde %97 oranında E-Kaderin ifadesinin azaldığı ve beraberinde *TWIST1* seviyesinde de artış olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı meme epitel hücrelerinde *TWIST1* gen ifadesi oldukça düşüktür, ancak metastatik karsinoma dokularında *TWIST1* ifadesinin artması dikkat çekicidir. Bu bağlamda son zamanlarda literatürde, *TWIST1*'in kanser metastazında ve epitelyal-mezenkimal transisyon sürecinde anahtar rol oynadığı açıklanmıştır.

Gelişen teknolojilerle birlikte hastalıkların oluşum mekanizmaları gün geçtikçe daha da aydınlatılmaktadır. Bu kapsamda transkriptom analiz yöntemleri iyi gelişmeler kaydetmiştir. Transkriptomik analizler sayesinde hücredeki tüm transkripsiyonal ifade türlerini ve miktarını eş zamanlı olarak incelemektedir. Bu yöntemler, örneklere ait genlerin bir kısmını ya da tamamının ekspresyon düzeyleri ile birlikte tek nükleotid

değişimlerine (SNP) insersiyonlar, delesyonlar, translokasyonları ve kodlanmayan RNA'ları da inceleme olanağı sunmaktadır. Transkriptom analizleri bölgesel yapılabileceği gibi tüm genomu kapsayacak şekilde de yapılabilir. Transkriptom analizleri sayesinde günümüzde kanser gibi multifaktoriyel hastalıklardaki hücrel mekanizmalar detaylı olarak incelenebilmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmamızda MDA-MD-231 hücrelerinde endojen olarak mevcut olan TWIST1 ifadesinin baskılandığı durumda mRNA transkriptlerindeki değişimi ve olası TWIST1 hedefi olabilecek genleri belirlemeyi amaçladık.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin bölünme sinyallerinden bağımsız olarak sürekli bölünmeleri sonucunda meydana gelen multifaktöriyel bir hastalıktır (Eroğlu, E. 2019, ;Sudhakar, A., 2009). Kanser oluşumunu tetikleyen unsurların başında yaşam tarzı, çevre, hormonlar gibi genetik olmayan faktörler ile birlikte genetik faktörler gelmektedir. (Eroğlu, E. 2019). Normal hücrelerde meydana gelen genetik instabilite kanser gelişimini tetikler (Kandel E.S.,1999). Bununla birlikte, komşu hücrelerle ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitelerini kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen hasarlar kanserleşme sürecine eşlik eder (Eroğlu, E. 2019; Sudhakar, A., 2009).

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerin aksine, bölünme sinyalinden bağımsız bölünmeye devam etmektedirler. Sağlıklı hücrelerin DNA'sında meydana gelen hasar sonucunda hücre bölünmesi durdurulur ve DNA onarımı gerçekleşir. Hasar onarılamayacak kadar büyükse hücreler ölüm yollarından biri olan apoptozis ile yaşamsal döngüsünü sonlandırır. Kanserleşme sürecine giren olan hücreler zamanla apoptozise direnç kazanırlar (Eroğlu, E. 2019; Kandel E.S.,1999). Sürekli bölünme özelliği kazanan hücreler apoptozis yolağını kontrol eden genlerde oluşan mutasyonlar ile bu direnci kazanılır (Eroğlu, E. 2019). Bu genler temel olarak retinoblastoma ve TP53 genleridir (Bray, F. ve ark., 2018). Kanser hücrelerinin devamlı olarak bölünmesi tümöral doku gelişimini sağlar. Kanser hücrelerinde telomeraz enzim aktivasyonu artarak, hücrelerin immortalizasyonu tetiklenir (Eroğlu Köksal, E., 2019 ;Sudhakar, A., 2009). Primer tümör oluşması sonucunda, mutasyonların artarak birikmesi ve epigenetik modifikasyonlarla gen ekspresyon düzeylerinin değişimine bağlı olarak kanser hücreleri metastaz özelliği gelişir. (Eroğlu, E., 2019). Kansere bağlı ölümlerin çoğu metastaza bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Bu olayda epitelyal hücreler Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecine girer ve epitelyal karakterini kaybederek invazyon kabiliyetine sahip, metastatik mezenkimal karakter kazanırlar (Kandel E.S., 1995).

Dünyada meydana gelen tüm ölümlerin ilk sebebi kardiyovasküler hastalıklar iken, kansere bağlı ölümler ikinci sırada yer almaktadır (Bora B. ve ark., 2018). Türkiye’de bu durum istatistiksel olarak benzer düzeydedir. Kansere bağlı ölümler, tüm ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Ölüme sebep olan kanser türleri toplumun yaşına, cinsiyetine ve yaşam koşullarına göre farklılık göstermektedir. İstatistiklere göre Türkiye’de kadınların %45,6’sında görülme oranıyla meme kanseri kadınlarda görülen kanser türleri arasında ilk sırada gelmektedir. Erkek hastalarda ise %70,6’lık yüzdeliğe sahip olan trake, bronşit ve akciğer kanserleri ilk sırada yer almaktadır (Bora B., ve ark., 2018). Diğer kanser türlerinin istatistiklerine bakıldığında; prostat kanseri erkeklerde %41,7, kadınlarda ise tiroid kanseri %22,4 oranla önemini korumaktadır. Ayrıca, kolorektal, mide, mesane, uterus, over ve hematolojik malignansiler de ülkemizde sıklıkla görülen kanser türleri arasındadır (Dindaroğlu, G. 2019).

Kadınların yaklaşık %50’sinde meme kanseri gelişebilmektedir (Şahin, H., ve ark., 2020). Meme kanseri üzerine yapılan araştırmalara göre, bu oran günümüzde artmaya devam etmektedir (Şekil 2). Bu alanda yapılan çalışmalar çoğunlukla meme kanseri genetiğini açıklama ve anlamaya yönelik olmaktadır (Şahin, H., ve ark., 2020; Çakmak, G., ve ark., 2020). İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla, hastalık durumunda hangi genlerin aktif rol oynadığı da hangi genlerin pasifleştiği biraz daha anlaşılabilir olsa da, yeni genler ve bu genlerin kanser türlerinin meydana gelmesindeki rolü tam olarak aydınlatılmamış olup bu alanda bilgi eksiklikleri mevcudiyetini korumaktadır. Bilgi birikiminin artmasıyla meme kanseri başta olmak üzere, birçok hastalığın etiyojisi daha iyi anlaşılacak olup, kanser tedavilerine yeni bir yaklaşım getirilebileceği düşünülmektedir (Çakmak, G., ve ark., 2020).

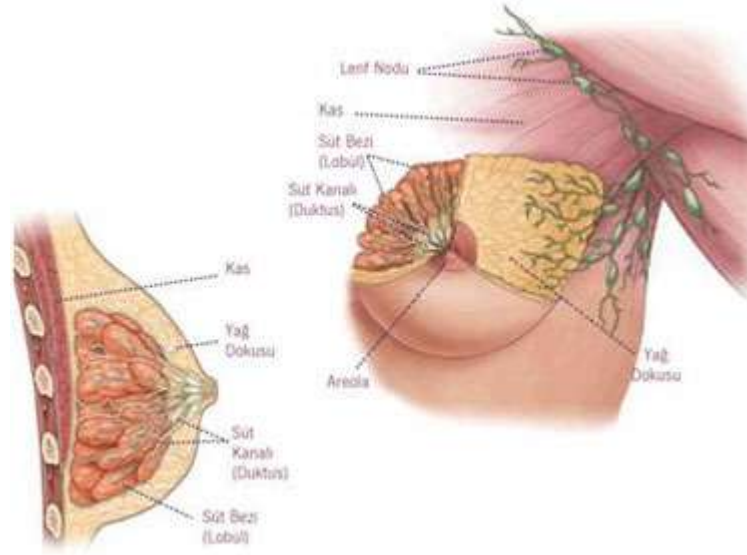
2.1.1. Kanser türlerinin görülme sıklığı ve adlandırılması

Günümüzde en önemli sağlık sorunu haline gelen kanser, oluştuğu dokuya göre adlandırılmakta ve birçok türde dokuya özgü kanser türleri gelişmektedir (Bulut, D., 2019). Metastaz yoluyla meydana gelen kanser türleri adlandırılırken yayılım gösterdikleri dokudan değil, köken aldıkları dokuya göre adlandırılır. Kanser hastalarının fizyolojik özellikleri, yaşları, yaşam koşulları, medeni durumları gibi özellikleri kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bu da kanser türlerinin çeşitlilik oluşturmasını açıklarken, aynı zamanda her kanser türünün görülme sıklığının farklı olmasına zemin hazırlamaktadır. Ayrıca, cinsiyet açısından kadınlarda ve erkeklerde ilk sırada akciğer

kanseri görülürken, ikinci sırada kadınlarda meme kanseri, erkek hastalarda ise prostat kanseri yer almaktadır (Bulut, D. 2019). 2020 global kanser istatistiklerine göre; 19.3 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış ve yaklaşık 10 milyon vakada kanser kaynaklı ölümler meydana gelmiştir. Kadınlarda meme kanseri vakalarının, tüm kadın vakaların %11.3'ünü oluşturduğu saptanmıştır (Lortet-Tieulent, J., ve ark., 2020).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, tüm dünyada kadınların ölümüne neden olan hastalıkların başında gelmektedir. 2008'den itibaren meme kanser insidansı %20'den daha fazla artmıştır. Dünya çapında 184 ülkenin 140'ında kadınlarda tanı konan kanser türlerinin başında meme kanseri gelmektedir. İstatistiklere göre Türkiye'de her 4 kadından birine meme kanseri tanısı konmaktadır. WHO (World Health Organization) yaptığı açıklamada, tümör sınıflandırmasında meme kanserine ait 20 major tip ve 18 minor tip tanımlanmıştır (Gökdeniz Yıldırım, A., 2019). Meme kanserinin erkeklere göre kadınlarda daha sık görülüyor olmasının sebebi; anatomik olarak kadın meme dokusunun erkek meme dokusuna göre lezyonlara daha yatkın olmasıdır (Şekil 3). Kadın meme dokusu, her yaşta farklılık gösteren dinamik bir yapıya sahiptir. Ayrıca meme dokusu, çeşitli fizyolojik değişikliklere duyarlıdır (Doğum, emzirme, menopoz vb.) (Gökdeniz Yıldırım, A., 2019). Tüm kanser türlerinde olduğu gibi, meme kanserinde de kişinin diyetle aldığı yağ ve kolesterol, hastalığın seyrinde önemli rol oynar (Kutlu, S., 2019). Meme dokusu zamanla değiştiği için yağ ve kolesterol alımı premenopozal ve postmenopozal süreçleri meme kanseri oluşumunda aynı oranda etkili değildir (Gökdeniz Yıldırım, A., 2019; Gül, A., ve ark., 2021). Meme kanserinin bu kadar yaygın olması ve yüksek mortaliteye sahip olmasının nedenini anlamak için, bu hastalığın genetik yapısını detaylıca incelemek ve anlamlandırmak gerekmektedir (Gökdeniz Yıldırım, A.,2019; Bray, F. ve ark. 2018).



Şekil 1. Meme dokusunun anatomik yapısı meme kanseri oluşumu (Dindaroğlu, G. 2019).

Meme kanseri diğer kanser türlerine göre daha erken yaşta ortaya çıkabilmektedir. Bunun sebebi meme dokusunun ergenlik döneminde başlayarak menopoz dönemine kadar aktif olarak salgılanmakta olan ovaryan hormonlarına duyarlı olmasına dayanır. Bununla birlikte bu zamana kadar meme kanseri üzerinde etkisi olan birçok faktör tanımlanmıştır (Gökdeniz Yıldırım, A., 2019). Bu faktörlerden en önemli olanlar yaş ve cinsiyettir. Meme kanseri yaşa bağlı olarak görülme sıklığı artmakta olup kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülmektedir. Bir diğer faktör de aile öyküsüdür (Güneş, B., D., ve ark., 2021; Gül, A., ve ark., 2021). Yakın akrabası (anne-kız kardeş) meme kanserine sahip kadınlarda meme kanseri gelişme oranı diğer bireylere kıyasla 2-3 kat daha fazladır. Bunun nedeni tam olarak bilinmese de bazı genetik faktörlerin (büyüme faktörü-1 (IGF-1)) etkili olabileceği düşünülmektedir (Bügül Kılınçarslan, M. 2021; Dekkers, J. F., ve ark., 2021). Meme kanserini tetikleyen diğer faktörler; iyonize radyasyon, östrojen düzeyi, beslenme gibi faktörlerdir (Güneş, B., D., ve ark., 2021) (Tablo 1).

Tablo 1. Meme kanserinde risk faktörleri (Gökdeniz Yıldırım, A., 2019).

Yaşam tarzına bağlı faktörler	Genetik kaynaklı faktörler
Alkol kullanımı	Yaşlanma
Obezite	Genetik miras
Fiziksel aktivite eksikliği	Ailesel meme kanseri geçmişi
Geç hamilelik	Yoğun meme dokusu
Emzirmeme	İrk ve etnik köken
Doğum kontrol hapları	
Hormonal tedaviler	

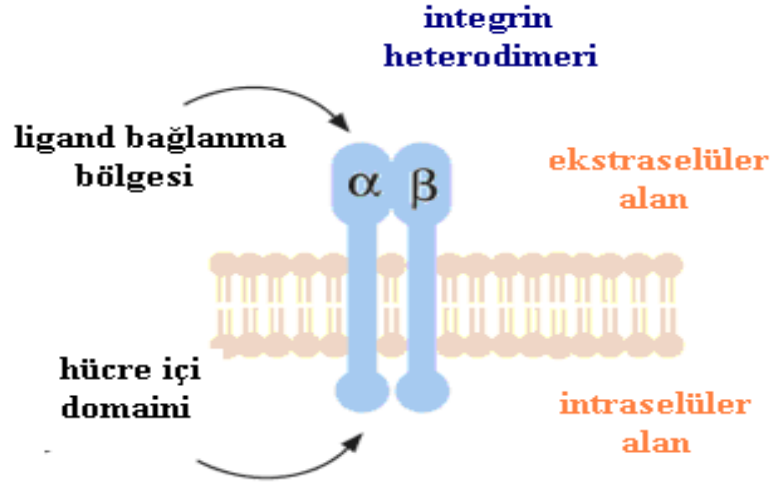
2.2.1. Meme kanserinin moleküler biyolojisi ve genetiği

Meme kanserini tetikleyen birçok mekanizma bulunmuş olsa da, bu mekanizmaların işleyişi tam olarak aydınlatılmamıştır (Kleer, C., ve ark., 2000). Bazı mekanizmalar beslenme ile ilişkili iken, bazıları da genetik faktörlerle de ilişkilidir. Günümüzde BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonların doğrudan meme kanseri oluşumu ile ilişki olduğu bilinmektedir (Biancolella, M., ve ark., 2020; Dekkers, J., F., ve ark., 2021). Bu genler insan genomunda sırasıyla 17. ve 13. kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. Mutant BRCA1 ve BRCA2 genlerini taşıyan insanların %85'inde meme kanseri oluşumu görülmektedir (Weigelt, B. ve ark., 2005). 13. kromozomda lokalize olan retinoblastoma geni bir tümör süpressör genidir. Eğer kromozomun bu bölgesinde heterojinite kaybı olursa premenopozal meme kanseri gelişebilmektedir (Weigelt, B. ve ark., 2005; Dekkers, J. F., ve ark., 2021). Ayrıca 17. kromozomda bulunan p53 geni meme kanseri oluşumunda etkin rol oynar. p53 geninde meydana gelen mutasyonlar genin aktivite kaybına sebep olmakla birlikte meme kanseri oluşumuna zemin hazırladığı bilinmektedir (Eroğlu, E. 2019). Meme kanserinin gen profili incelendiğinde geniş bir spektruma sahip olduğu görülmektedir. BRCA1, BRCA2, İntegrin, Kaderin, HER2, EGFR, p53, Ki67, Katepsin D, PCNA gibi genler meme kanserinde kilit noktalarda görev yapmaktadırlar (Çapanoğlu, G., ve ark., 2018).

2.3. İntegrin Yolağının Meme Kanseriyle İlişkisi

Temelde integrinler, hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlar (Kumar, C., C., 1998). İntegrinler, nonkovalent şekilde bir arada duran α ve β alt birimlerinden meydana gelmiş transmembran glikoproteinlerdir (Çelik, E., 2008; Kumar, C., C., 1998) (Şekil 4). İntegrinlerin her alt birimi; ekstrasellüler domain, hücre membranı boyunca uzanan bir domain ve kısa katalitik özelliği olmayan bir kuyruktan meydana gelmektedir.

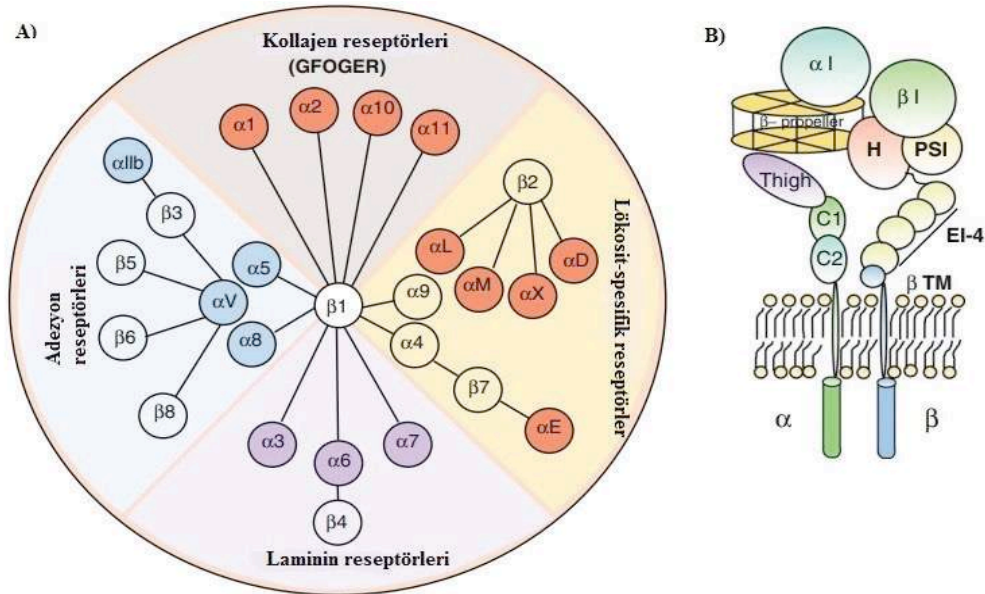
İntegrinlerin minimum 24 farklı kombinasyonu mevcuttur. Bu kombinasyonları meydana getiren 16α ve 8β zinciri olmak üzere toplamda 24 tane integrin alt birimi vardır (Çelik, E., 2008). Bu alt birimlerin kombinasyonu tüm integrinler için farklıdır. İntegrinlerin her biri ayrı birer liganda bağlanır. Örneğin integrin $\alpha1\beta1$ heterodimerine kollajen bağlanabilmektedir (Çelik, E., 2008).



Şekil 2. İntegrin moleküler yapısı (Çelik, E., 2008).

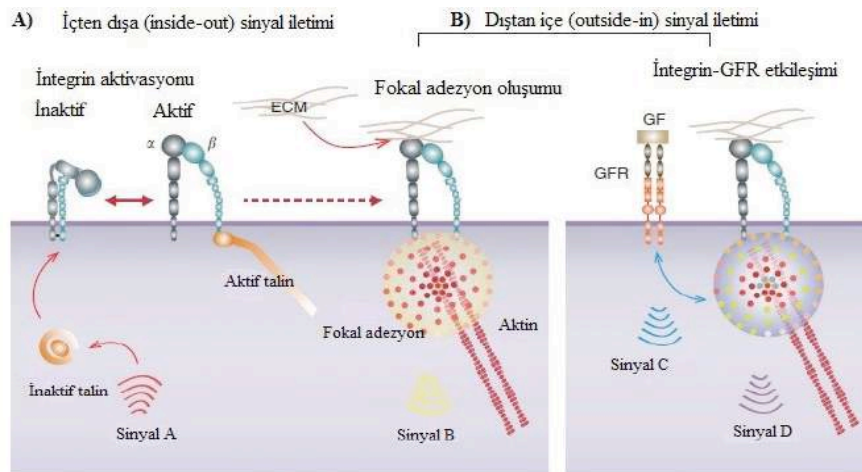
İntegrinler, ekstraselüler matriks (ECM) ile etkileşime giren heterodimerik reseptörlerdir. ECM elemanları, glikozaminoglikanlarla ve diğer makromoleküllerle etkileşim halinde üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Bu kompleksin en temel görevi, hücre migrasyonu, hücreler arası adezyon, hücrelerin canlılığının devamlılığı ve proliferasyonunu sağlamaktır. ECM elemanlarının yapıları bulunduğu dokuya göre farklılık göstermektedir (Kumar, C., C., 1998; Çelik, E., 2008).

Yapılan çalışmalarda metastatik kanser hücrelerinde ECM'ye bağlanma afinitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Holle, A. W, ve ark., 2016). İntegrin ifadesi ve etkileşimde bulunduğu ECM komponentleri kanser gelişimini destekler. Herbir integrinin yapısal olarak alt birimlerine göre afinitesinin yüksek olduğu belirli ECM bileşenleri mevcuttur (Çelik, E., 2008) (Şekil 5). İntegrin sinyal yolları; gen ekspresyonun düzenlenmesi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre sağkalım sinyalleri ve hücre adezyon yollarının düzenlenmesi gibi temel hücresel mekanizmalarda rol alırlar (Özkara, G., ve ark., 2020).



Şekil 3. A) İntegrin ailesi, B) İntegrin altbirimlerinin şematik gösterimi (Özkara, G., ve ark., 2020).

İntegrinler, ECM ile etkileşime girdiği zaman aktive olarak fokal adezyonların oluşmasını sağlar. Ayrıca kendine özgü yolları aktive etme özelliğine sahiptir (Şekil 6). Bu yollardan biri de PI3K sinyal yolağıdır (Apaydın, E. 2019; Çelik, E., 2008). PI3K, SH-2 domaini taşıyan FAK ve Src fosfotirozinleri ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda PI3K plazma membranına transloke olur ve sinyal yolağı aktive olur. PI3K sinyal yolağının aktive olması hücre içi görev yapan bazı moleküllerin sentezi için önemlidir (Apaydın, E. 2019; Özkara, G., ve ark., 2020).

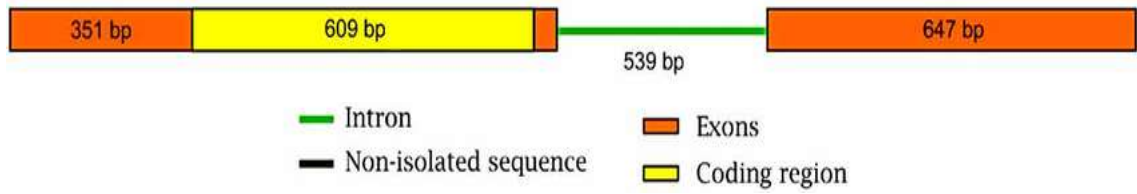


Şekil 4. İntegrinlerde hücre içinden dışına (inside-out) doğru (A) ve hücre dışından içine (outside-in) doğru (B) sinyal iletimi ve bu sinyallerin iletimde görev yapan moleküller (Özkara, G., ve ark., 2020).

2.4. *TWIST1* Geni ve Yapısı

TWIST1 geni, bazik heliks-loop heliks (bHLH) yapısal özelliğine sahip bir transkripsiyon faktörünü kodlar. *TWIST1* transkripsiyon faktörü, erken embriyonik gelişim dönemlerinde rol almaktadır (Wang, T., ve ark., 2021) *TWIST1* geni, insan genomunda 7p21’de lokalizedir; 2188 bç uzunluğunda iki ekzondan (960 ve 647 bç) ve bir introndan (539 bç) meydana gelmektedir (Wang, T., ve ark., 2021) (Şekil 7).

Homo sapiens TWIST1 gene (2188 bp)



Şekil 5. İnsan *TWIST1* geninin yapısı (Pehlivanoğlu, S., ACAR, Ç. A., 2020).

TWIST1 geni ilk olarak *Drosophila melanogaster* mezoderm spesifik genlerini transkripsiyonel aktivasyonu nedeniyle keşfedilmiştir. Letal mutant *D. melanogaster* 'de gözlenen kıvrılmış “TWISTed” yapıdaki morfolojiden dolayı gene bu isim verilmiştir (Thisse, B., ve ark., 1987). Bunun yanısıra *TWIST1* geninin sinonimleri de mevcuttur. Örneğin Acrocephalosyndactyly 3 (ACS3), b-HLH DNA binding protein, H-TWIST. *TWIST1*, promotör bölgesinde E-Box dizisi “CANNTG” taşıyan genlerin transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir (Liu, L., ve ark., 2021). Bu nedenle, *TWIST1* embriyonik tabakaların oluşumunda, morfogenezde, ostogenezde ve tümörgenezde önemli rollere sahiptir (Mater, Y., 2019; Pilanci, K., ve ark., 2016).

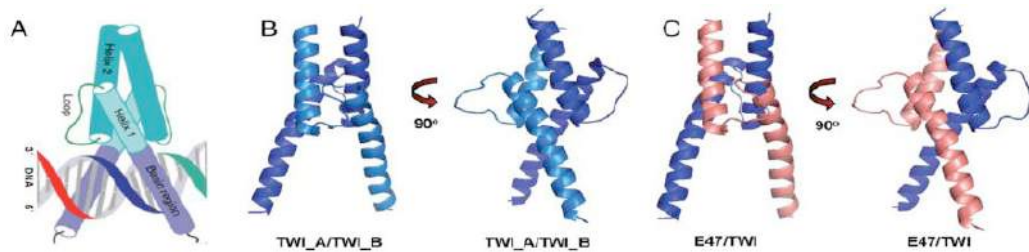
Son yıllarda *TWIST1*'in bir onkogen olduğu kanıtlanmıştır. *TWIST1*, bir proto-onkogen olan *AKT2* ekspresyonunu arttırmakla birlikte *p53* ve *E1A* gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılamaktadır. *TWIST1*, Bununla birlikte osteosarkomaya sahip hastalarda *TWIST1* geninin yüksek seviyede eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Glioma, prostat, mide, karaciğer, gastrik gibi birçok kanser türlerinde ifadesinin yükseldiği belirlenmiştir (Dindaroğlu, G. 2019; Pehlivanoğlu, S., ACAR, Ç., A., 2020).

İnsan *TWIST1* geninin faredeki ortolog geni tanımlanmıştır. Fare genomunda *TWIST1* 2q37.3 lokasyonunda lokalize durumda bulunur. İnsan ve fare *TWIST1* genleri arasında yapılan çalışmalar, bu iki genin %96 oranında homoloji gösterdiğini saptanmıştır (Wang, S. M., VE ARK., 1997). Bu benzerlik sadece protein kodlayan bölgelerde değil

aynı zamanda promotör bölgelerinde de mevcuttur. Özellikle genin 5' ucunda 300 bç lik kısmı kapsayan promotör bölgesinde dizi benzerliği %71 oranındadır. İnsan *TWIST1* geninin promotör bölgesinde birçok regülatör proteinin bağlanması için uygun diziler bulunur. Bu bölgenin 824 nükleotidlik bölgesi incelendiği zaman NF -kB, SP1, Rb, AP2, ATF/CREB ve STAT3 bağlanma bölgelerine sahip olduğu saptanmıştır (Pehlivanoglu, S., ve ark., 2020; Jabir, M. S ., ve ark., 2021; Yang, W. H., ve ark., 2012).

2.4.1. TWIST1 proteini ve yapısı

TWIST1, bazik heliks-loop-heliks (bHLH) yapısında, 202 aminoasitten oluşan 21 kDa ağırlığında bir proteindir (Pehlivanoglu, S., ACAR, Ç. A., 2020; Yang, W. H., ve ark., 2021). bHLH transkripsiyon faktörleri, üç alt-aileden meydana gelmektedir. Bunlar; sınıf A, sınıf B ve sınıf C'dir. Sınıf A proteinleri memeli hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilen E2-2, E12, E47, HEB ve Daughterless'dir. B ve C ailelerinin de kendine özgü özellikleri mevcuttur. Sınıf B ailesi transkripsiyon faktörleri, Sınıf A faktörleri ile heterodimer oluşturur. Bu bakımdan TWIST1 Sınıf B bHLH transkripsiyon faktörü sınıfına dâhildir (Şekil 8). Sınıf C bHLH faktörler ise diğerleri ile heterodimer oluşturmaz. TWIST1 protein sekansı üç ana yapıdan meydana gelmektedir (Yang, W. H., ve ark., 2021; Zhu, Q. Q., ve ark., 2016). Bu yapılar, N-terminal bölge (aa 1–108), bHLH bölge (aa 109–163) ve C-terminal bölge (TWIST-box ve WR motif aa-202) olarak adlandırılır. TWIST1 proteinine ait N-terminal bölgesinde bulunan amino asitler yapı itibariyle çoğunlukla polar olup, lizin ve arjinin amino asitlerince zengindir (Yang, W. H., ve ark., 2021; Zhu, Q. Q., ve ark., 2016). C-terminalde bulunan amino asitler ise genellikle non-polardır. Bu nedenle TWIST1 proteininin N-terminaldeki yapısı C-terminaline göre daha fazla hidrofiliktir (Zhu, Q. Q., ve ark., 2016).



Şekil 6. Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan TWIST1 heterodimer ve homodimer konformasyonu (Pehlivanoglu, S., 2014).

2.4.2. TWIST1'in hücredeki fonksiyonu

Genlerin transkripsiyonel regülasyonunda TWIST1 transkripsiyon faktörü, promotör bölgelerinde bulunan ve E-kutusu olarak bilinen "CANNTG" tanıma dizilerine nonkovalent bağlanarak işlev görür (Pehlivanoğlu, S., ACAR, Ç. A., 2020; Pehlivanoğlu, S., 2014). TWIST1 promotörlerine bağlandığı genlerin ifadesini artırabilmekte ve baskılayabilmektedir. TWIST1, morfogenezde miyogenik, nörogenik, kardiyogenik, hematopoietik ve osteogenik hücre farklılaşmalarında, inflamasyon ve tümör oluşumu gibi süreçlerde rol alır (Pehlivanoğlu, S., 2014). Ayrıca AKT2, STAT3 ve c-SRC gibi proto-onkogenlerin ekspresyonunu artırırken p53, p14 ARF ve E1A gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe eder. TWIST1'in embriyonik gelişimdeki rolünü aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda, plasenta ve mezodermal kökenli doku ve hücre tiplerinde yüksek seviyede ifade edildiği ve nükleer lokalizasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Erişkin dokularda ise ifadesi görece olarak azalmış durumdadır (Pehlivanoğlu, S., 2014; Dükel, M., 2016).

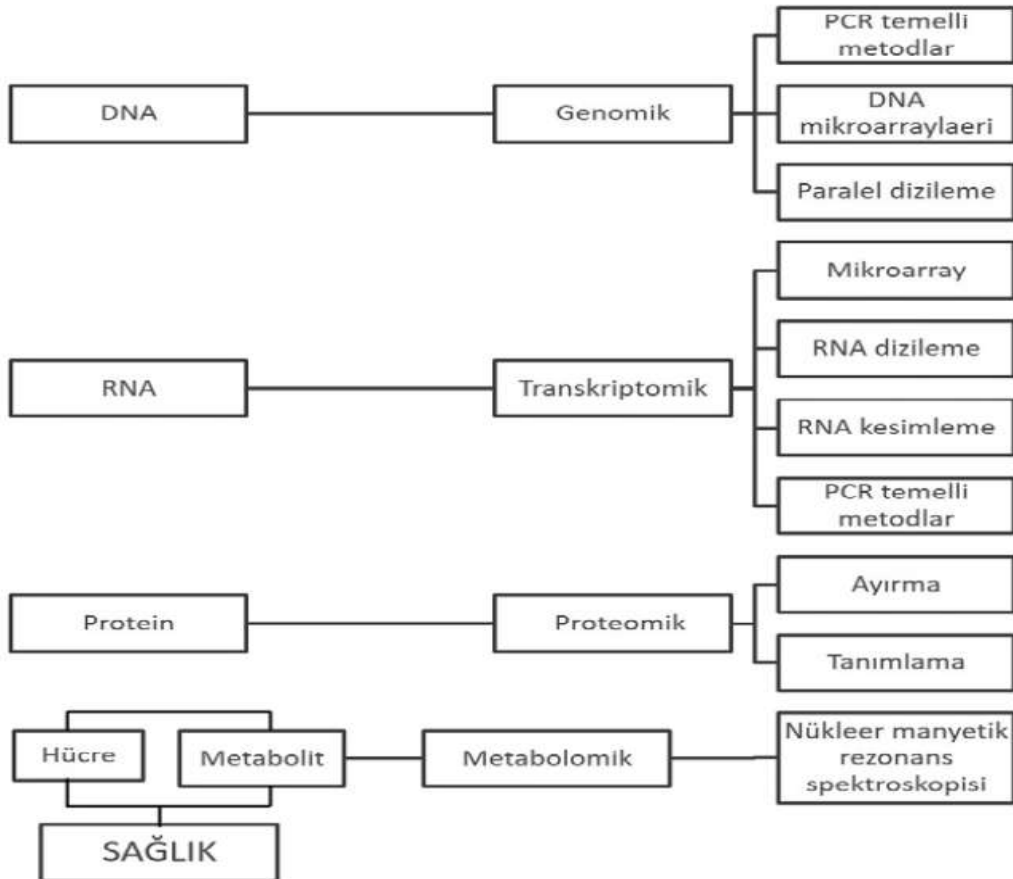
Kanser hücrelerinde TWIST1 ifadesi arttığında E-Kaderin ifadesi baskılanmaktadır. Tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz ile ilgili yapılan araştırmalarda anahtar noktanın E-Kaderin kaybı olduğu gösterilmiştir (Pehlivanoğlu, S., ACAR, Ç. A., 2020; Dükel, M., 2016). Örneğin, meme kanserinin progresyonu ile ilişkili olarak invazif duktal karsinoma örneklerinin %97'sinde E-Kaderin kaybı olduğu gözlemlenmiştir (Dükel, M., 2016). Yetişkin epitelyal hücrelerde TWIST1 geni inaktif halde bulunmaktadır. Bunun tam tersine metastatik karsinoma dokularından alınan örnekler bakıldığında, EMT sürecinde olan hücrelerde, normalde düşük düzeyde ifade olan TWIST1'in transkripsiyonel ifadesinin yükseldiği saptanmıştır (Pehlivanoğlu, S., 2014).

2.5. Omik Teknikleri

Omik latince 'tümü' anlamına gelmektedir. Bir organizmayı meydana getiren yapıların tümü düzenli bir şekilde etkileşim halindedir. Bu etkileşimler, aynı tür yapılar arasında olabileceği gibi farklı yapı ve mekanizmalar arasında da olabilmektedir (Hu, Y., ve ark., 2018; Sarıman, M. ve ark., 2015). Bunlar sadece protein bazında değil, DNA, RNA gibi diğer hücresel bileşenler arasında da söz konusudur (Sarıman, M. ve ark., 2015). Bu etkileşimleri değerlendirebilmek için sistemin bütünüyle ve eş zamanlı olarak incelenmesi gereklidir. Bu çalışmalar, hastalıkların temel mekanizmasının

aydınlatılmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde belirleyici rol oynamaktadır (Hu, Y., ve ark., 2018).

Omik teknolojileri son yıllarda yeni teknolojik gelişmelerle birlikte yaygınlaşma aşamasındadır. Bu yenilikçi yaklaşımlar RNA, proteinler ve ara metabolitler gibi hayati fonksiyona sahip molekülerin analiz edilmesini kapsamaktadır (Hu, Y., ve ark., 2018; Jagannathan, M., ve ark.). Günümüzde kullanılan birden fazla omik teknoloji mevcuttur. Bunlar; proteomik (protein düzeyinde analiz), transkriptomik (mRNA düzeyinde analiz), metabolomik (metabolit düzeyinde analiz) ve genomik (gen düzeyinde analiz) olmak üzere farklı kategorilerde değerlendirilmektedir (Mohammed S., ve ark., 2020; Jagannathan, M., ve ark., 2018) (Şekil 9).



Şekil 7. Omik analiz yöntemlerinin alt birimleri (Kasurka, C., ve ark., 2019).

2.5.1 Transkriptom analizleri

Transkriptom analizinin temeli, bir hücrede bulunan bütün transkriptlerin türlerini ve miktarını eş zamanlı olarak incelenmeye dayanır (Tremblay, B., ve ark., 2021;

Sarıman, M., ve ark., 2015). Bu analiz yöntemleri, RNA miktarına bağlı olarak, genlerin bir kısmını ya da tamamının ekspresyon düzeylerini, tek nükleotid değişimlerini (SNP), insersiyonlar, delesyonlar, translokasyonlar ve kodlanmayan RNA'ları inceleme olanağı sağlar (Sarıman, M., ve ark., 2015). Transkriptom analizi, hücrelerde eş zamanlı gerçekleşen dinamik işleyişi ve genler arasındaki ilişkiyi açıklama imkanı sunar (Sarıman, M., ve ark., 2015). Genlerin nasıl düzenlendiğini açıklamak için, destekleyici moleküllerin fonksiyonunu açıklamak gerekir (Kasurka, C., ve ark., 2019; Jiang, D., ve ark., 2009). Bir genin mRNA'sının transkripsiyonunu aktive eden veya inhibe eden transkripsiyon faktörleri (TF'ler) için bağlanma motifleri olan DNA bağlayıcı elemanlar (RE'ler), promotör bölgesi içinde yer alırlar (Kasurka, C., ve ark., 2019; Jiang, D., ve ark., 2009). İnsanların ortak genomunda bulunan aynı genetik bilginin nasıl bu kadar çok farklı hücre ve doku tipine yol açtığını anlamak için, insan genomunda kodlanmış birçok TF'nin ligand bağlanması, post-translasyonel modifikasyon (PTM) tarafından nasıl düzenlendiği moleküler biyolojik yöntemler aracılığıyla anlaşılabilir (Wang, D., 2010; Hu, Y., ve ark., 2018). Bir genin ekspresyonunu ve bu genin proteininin hangi hücrelerde ne zaman ve hangi miktarda eksprese olduğunu anlamanın temelinde hem mRNA hem de protein ekspresyon bilgilerinin gereklidir (Wang, D., 2010; Sayitoğlu, M., 2020).

2.5.2. Transkriptom analiz basamakları

Transkriptom analizinde izlenmesi gereken temel basamaklar şu şekildedir; örneklerin hazırlanması, örneklere ait total RNA'dan mRNA eldesi, cDNA kütüphanesi hazırlanması ve emülsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (emPZR) (Özdemir Sancı, T., 2020; Zerrin, I. Ş. I. K., 2018). Bu aşamalardan sonra elde edilen verilerin değerlendirilmesi biyoinformatik metodlar kullanılarak gerçekleştirilir (Sarıman, M. ve ark., 2015; Geiersbach, K. ve ark., 2020).

Transkriptom analiziyle yüzlerce gigabayt veri elde edilmektedir. Bu verilerin analiz edilmesi sonucunda transkriptoma ait anlamlı bilgiler elde edilerek füzyon genler, tek nükleotid değişimleri, insersiyon, delesyon ve genlerin ifadesi eş zamanlı olarak değerlendirilir ve bu mutasyonlar arasındaki etkileşimlerin aynı anda incelenmesine olanak sağlar (Rochfort, S., 2005; Özdemir Sancı, T., 2020). Tüm bu verileri analiz etmek için donanımlı bir bilgisayar sistemine ve veri depolama kaynaklarına ihtiyaç duyulur (Sarıman, M. ve ark., 2015; Geiersbach, K. ve ark., 2020).

2.6. Biyoinformatik Analizler

Omik teknolojilerinin kullanılması ile elde edilen verilerin biyoinformatik analizler; için geliştirilmiş birçok bilgisayar programı mevcuttur. Bu programlardan Galaxy yazılımı kullanımı kolay ve erişimine açık bir platformdur (Kaya, N. 2019). UNiX shell programı ve Python ise veri analizi için modifikasyon yapmaya elverişli programlardır. (Geiersbach, K. ve ark., 2020). Bu programlara ilave olarak Cujjlinks, (Alternatif kırılma software), Galaxy (RNA-seq data analizi), Gene Ontology Blast2GO, SATSUMA, SPINES, KeGG pathway, STRING database (genlerin birbiriyle etkileşimi), DESeq, baySeq (ekspresyon software), fastQCtoolkit, NGSQCtoolkit (işlem öncesi ve kalite kontrol araçları), MapView IGV (data görüntüleme araçları) gibi programlar, genom analizi teknikleri ile birlikte kullanıma elverişli olan yardımcı programlardır. Bunlar dışında elde edilen genom bilgilerininin dosya formatı genel olarak çapraz-platform (cross-platform) içeren FASTA, FASTAQ, SAM, BAM, VCF, GTF YA DA GFF gibi formatlar tavsiye edilir. Bu formatlarda elde edilen verilere ham(raw) veri denir (SARIMAN, M. ve ark., 2015; Gezici, S., 2017). Bu verilerin içerisinde yer alan bazı kısımların çıkarılması gerekmektedir. Çünkü bu kısımlar verilerin yorumlanmasını ve anlamalandırılmasını zorlaştıran unsurlardır. Bu olgunlaştırma işlemine aynı zamanda ‘‘kalite kontrol işlemi’’ de denir. Kalite kontrol işlemi sonrasında varyat çağırma işlemi yapılır. Bu işlem sırasında genom üzerinde bulunan delesyon, insersiyon gibi mutasyonlar kontrol edilir. Biyoinformatik analizlerde haritalama stratejisi, gen ismi tayini, normalizasyon, gen-gen etkileşimi ve protein özelliklerinin araştırılması gibi basamaklar içermektedir (Geiersbach, K. ve ark., 2020; Ünal, U., 2020). Biyoinformatik analizlerde karşılaşılan sorunların başında hızalama gelmektedir. Sekansı çıkarılan bölgenin genom üzerinde doğru bölge ile eşleşip eşleşmediği en sık karşılaşılan sorunların başında gelmektedir. Ayrıca, genom analizlerinden elde edilen verilerin çok büyük boyutlara ulaşması nedeniyle, depolama sıkıntısı ortaya çıkmaktadır (Geiersbach, K. ve ark., 2020, Ünal, U., 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre kültürü

Bu tez çalışmasında MDA-MD-231 hücrelerini çoğaltmak için hücre kültürü yapıldı. MDA-MD-231 hücreler %10 FBS (Gibco), 1X Penisilin-Streptomisin (Merck) içeren L-Glutaminli DMEM (Sigma) besiyerinde, %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C'deki inkübatörde (Esco) T25 flaklarda (Vwr) kültüre edildi. Konfluent hücreler DPBS (Gibco) ile yıkanarak Tripsin-EDTA (Sigma) yardımı ile pasajlandı. Plazmid vektörlerin hücrelere transfeksiyonu aşamasında Optimem (ThermoFisher Sci.) besiyeri kullanıldı. Transfekte hücreler tek koloni halinde 96-kuyucuklu kültür kaplarında (Costar) G418/Neomycin (Sigma) içeren kültür besiyerinde seçildi. Deney boyunca kültür takibi inverted mikrosopta (Primovert, Zeiss) gerçekleştirildi.

3.2. MDA-MB-231 hücrelerine plazmid vektörlerin transfeksiyonu

Bu çalışmada MDA-MD-231 hücrelerini transfekte etmek için 24-kuyucuklu kültür kaplarında (Costar) yaklaşık %70 konfluent olan MDA-MB-231 hücrelerine TWIST1 antisense cDNA'sı klonlanmış pcDNA3.1 vektörü ile kontrol olarak ayrıca boş pcDNA3.1 vektörü transfekte edildi. Plazmid vektörlerin hücrelere transfeksiyonu LipofectamineTM 3000 ajanı (ThermoFisher Sci.) aracılığıyla gerçekleştirildi. Uygulama ticari kitin protokolüne göre yapıldı. Kısaca, 2 µL Lipofectamine içeren ve final hacmi 25 µL olan Optimem besiyeri hazırlandı. Aynı bir tüpe 2,5 µg/µL plazmid vektör içeren ve final hacmi 25 µL Optimem içeren ikinci bir tüp hazırlandı. Yaklaşık 5 dakika sonrasında bu iki tüp tek bir tüpte birleştirildi ve bu halde oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışım hücre kültürü üzerine damlatıldı ve günlük kültür takibi yapıldı.

3.3. Transfekte edilen hücrelerinin seçilimi

Plazmid vektörlerin transfeksiyon aşamasından sonra transfekte edilen MDA-MD-231 hücrelerinin seçilimi için, hücreler 72 saat boyunca kültüre edildi. Sonrasında, 0,4 µg/mL G418/Neomycin içeren kültür besiyerinde hücreler 1 hafta boyunca kültüre edildi. Tek koloni eldesi için hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına alındı. Tek koloni halinde olan hücreler ilgili kuyucuktan kaldırılarak yaklaşık 3 ay G418/Neomycin içeren

besiyerinde, deneysel çalışmalar için gerekli yoğunluğa ulaşıncaya kadar, çoğaltıldı ve donduruldu.

3.4. Western blot deneyi

Transfekte edilen MDA-MD-231 hücrelerinde TWIST1'in ifadesine protein düzeyinde bakmak için Western blot deneyi gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücrelerine antisense TWIST1 cDNA dizisi klonlanmış pcDNA3.1 vektörü ve ayrıca kontrol boş vektörün transfeksiyonundan ve hücrelerin G418 ile seçiminden sonra TWIST1 protein düzeyi Western blot deneyi ile analiz edildi. Bunun için, söz konusu test ve kontrol hücrelerinden ayrı ayrı total protein lizatları hazırlandı.

3.4.1. Protein lizatlarının hazırlanması

Test ve kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin tüm protein lizatı, proteaz inhibitör kokteyli (Roche) içeren 1X liziz tamponu (Cell Signalling) ile elde edildi. Bunun için hücreler soğuk 1X DPBS ile iki defa yıkandıktan sonra, 100 mm³ petri için yaklaşık 750 µL 1X soğuk liziz tamponu kullanıldı. Hücre kazıyıcısı (Greiner) yardımı ile hücreler kaldırılarak 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi.

3.4.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Protein lizat örneklerindeki protein miktarı Bradford ajanı (BioRad) yardımı ile ölçüldü. Öncelikle, örnekler Bradford ajanı 1:5 oranında olacak şekilde dilüe edilerek hazırlandı. Bovine serum albümin (BSA) standartları için, BSA çalışma solüsyonu 1 µg/µL olacak şekilde hazırlandı ve 1, 3, 5, 7 ve 9 µL miktarlarda 96-kuyucuklu plakadaki kuyucuklara ayrı ayrı konuldu. Lizat örneklerinden 1'er µL alınarak ayrı kuyucuklara konuldu. Her konsantrasyon için üçer tekrar hazırlandı. Örneklerin üzerine son hacmi 100 µL olacak şekilde hazırlanan Bradford ajanı ilave edildi ve 15 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki renk değişimi spektrofotometre (MultiscanGO, ThermoFisher Sci.) yardımı ile 595 nm'de analiz edildi. BSA standardına göre örneklerin protein miktarları hesaplandı.

3.4.3. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Protein miktarları hesaplanan her bir örnekten 50'er µg alınarak poliakrilamid jelle yüklenmiştir. Poliakrilamid jel kuyucukların olduğu üstteki kısım örnek yükleme jeli

(yükleme) Tablo 4’te, alttaki kısmı ise ayrıştırıcı jel (ayrıştırıcı) ise Tablo 5’te verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2. Yükleme jelinin içeriği.

Su	3 mL.
Tampon	1.25 mL.
Acr (29:08)	0,625 mL.
%10 SDS	50 µL.
%10 APS	50 µL.
TEMED	5 µL.

Tablo 3. Ayrıştırıcı jelin içeriği.

Su	11,55 mL.
Tampon	7,5 mL.
Acr (29:08)	10,5 mL.
%10 SDS	0.3 mL.
%10 APS	0.3 mL.
TEMED	30 µL.

Poliakrilamid jel tamamen polimerleştğinde tanka (BioRad) yerleştirdikten sonra elektroforez tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Buzda önceden hazırlanmış olan ve 50 µg protein içeren lizatlar içine β-merkaptotanol eklenmiş yükleme tamponu yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Jele yüklenen örnekler yükleme jelini geçene kadar 80 voltta, ayrıştırıcı jelde ise 120 Voltta yürütüldü.

3.4.4. Proteinlerin membrana transferi

Elektroforez aşamasından sonra jel çıkarılarak transfer için jel kasetine (BioRad) yerleştirildi. Transfer tamponunda ıslatılmış kurutma kağıdı, sünger, jel, PVDF membran, sünger ve tekrar ıslatılmış kurutma kağıdı içeren sandviç hazırlandı. Örneklerin membran yönünde doğru transferi için akım yönü (-)’ten (+) yöne olacak şekilde transfer tamponu bulunan transfer tankına yerleştirildi. Tankın içerisine uygun buz aküsü yerleştirildikten sonra gece boyu 40 voltta proteinler membrana transfer edildi.

3.4.5. İmmünblotlama ve görüntüleme

PVDF membrana aktarılan proteinler uygun antikorlar yardımı ile işaretlendi. Membran TWIST1 ve Beta-Aktin (ACTB) primer antikorları (SantaCruz) ile işaretlendi. Bunun için öncelikle membran %1 BSA içeren TBST bloklama tamponu ile 2 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Sonrasında içerisine 1:1000 oranında primer antikor eklendi ve membran 1 saat çalkalandı. Yıkama işlemi 2x 15 dk olacak şekilde yıkama tamponu ile gerçekleştirildi. Sonra, 1 saat boyunca sekonder (anti-mouse) antikor ile işaretleme yapıldıktan sonra, tekrar aynı yıkama aşaması uygulandı. Membran çalkalayıcıdan penset yardımı ile çıkarılarak üzerindeki tampon kurutma kağıdı yardımı ile sızdırıldıktan sonra üzerine önceden 1:1 oranında karıştırılmış ECL reaktifi membranı tamamen ıslatacak şekilde uygulandı ve 2 dk bekletildi. Sonrasında ECL de süzdürüldükten sonra, membran jel görüntüleme sistemi (BioRad) yardımı ile görüntülendi.

3.5. Test ve kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin matrijel içeren ortamda kültüre edilmesi

Hücreler ekstraselüler matriks elemanlarını içeren matrijel ile kaplanmış kültür kaplarında 72 saat boyunca kültüre edilerek kültür dinamiği ve hücre morfolojileri incelenmiştir. Öncelikle kültür kapları matrijel (Corning) ile kaplandı. Bunun için, önceden 250 µL olarak bölünmüş matrijel buz içinde çözdürüldü. Sonrasında 250 µL alınarak 10 mL soğuk besiyeri içerisinde çözünmesi sağlandı ve boş 6-kuyucuklu kültür kaplarına her kuyuya 2'şer mL konuldu. Bu şekilde 37°C'deki inkübatörde en az 1 saat bekletildi. Süre sonunda matrijel kaplanan kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılarak 1×10^5 hücre/kuyu ekildi ve 72 saat boyunca mikroskopik olarak takip edilerek kültüre edildi.

3.6. MDA-MB-231 hücrelerinden total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için ticari kit (RNeasy mini kit 50, QIAGEN) kullanıldı. Uygulama Kit protokolüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

1. Steril ependorf tüpünün içine 6uL β -Merkapto alındıktan sonra üzerine 600 uL RLT buffer konuldu.
2. Hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri serolojik pipet ile uzaklaştırıldı.
3. Hazırlanan RLT + β Merkapto karışımı hücrelerin bulunduğu flaska alındı ve RLT + β Merkapto karışımı hücreleri liziz hale getirdikten sonra hücre lizatları toplandı.
4. Toplanan hücre lizatları steril eppendorf tüplerine her tüpte 600 uL olacak şekilde dağıtıldı.
5. Eppendorf tüplerinin üzerine total hacim 1 ml olacak şekilde %70 Etanol ilave edildi.
6. 2ml'lik santrifüj (isolab) tüplerinin içerisinde RNase (Qiagen) mini tüpler mevcuttur. Bu tüplere 700uL daha önceden santrifüj tüpüne (isolab) alınan hücre lizatı ve EtOH karışımından ilave edildi.
7. Santrifüj (Isolab) tüpleri 8000g de 15 sn santrifüj (Nuve 1200R) edildi.
8. Santrifüj (Isolab) tüplerindeki süpernatant sıvısı atıldı.
9. 700 uL RW1(RW1 tamponu etanol ile birlikte bir guanidin tuzu içermektedir. Bu tampon silika membrana spesifik olarak bağlı olmayan karbonhidratlar, proteinler, yağ asitleri vb. gibi biyomolekülleri uzaklaştırmakta kullanılan bir yıkama tamponudur. Bu tampon aynı zamanda 200 bp'den büyük RNA moleküllerin kolonda kalmasını sağlar.) RNase tampon döndürme tüpüne eklendi.
10. 700 uL RW1 santrifüj (Isolab) tüpüne eklendikten sonra, 8000g de 15 sn santrifüj yapıldı.
11. Santrifüjden sonra santrifüj tüplerindeki süpernatant sıvısı atıldı.
12. 500 uL RPE Tampon RNase (Tampon RPE; hafif bir yıkama tamponu olmakla birlikte RNeasy (Qiagen) Kitlerinin temel bileşenlerinden biridir. Temel görevi protokolda daha önce kullanılan tamponlar nedeniyle ortamda bulunabilen tuz ve benzeri bileşenleri ortamdaki uzaklaştırmaktır.) santrifüj tüpüne eklendi.
13. 500 uL RPE Buffer RNase eklendikten sonra, tüpler 8000 g de 2 dk süreyle santrifüj (Nuve 1200R) edildi.
14. Santrifüjden sonra örnekler 2 mL'lik steril santrifüj (Iso) tüplerine alındı.

15. Tüplerin içine 50uL RNase içermeyen H₂O pipet ucu örneğe dokunmayacak şekilde eklendi.
16. 50uL RNase Free H₂O eklendikten sonra örnekler oda sıcaklığında 1 dk süreyle bekletildi.
17. 1 dk bekleme süresinden sonra örnekler 8000 g de 1 dk olacak şekilde santrifüj (Nuve 1200R) edildi.
18. Santrifüjden sonra RNase Mini Tüplerdeki örnekler 2 ml'lik santrifüj tüplerine alındı.
19. Tüpler parafin ile kaplandıktan sonra, saklama koşullarına uygun şekilde dondurucuya alındı.

3.7. MDA-MB-231 hücrelerinin transkriptom analizleri

TWIST1 ifadesi baskılanmış ve kontrol MDA-MB-231 hücrelerinden total RNAlar izole edildi. Örneklerin transkriptom analizi DNBSseq platformunda Genoks Teknoloji Şirketi'nden hizmet satın alması ile gerçekleştirildi. Yapılan transkriptom çalışması özetle; RNA depleasyonu, parçalanması, cDNA eldesi, kütüphane oluşturulması, daireselleştirme ve sekans çalışması aşamalarından oluşmaktadır. İlk aşamada, mRNA ve benzer uzunlukta olan lncRNA'ların amplifikasyonları gerçekleştirildi. Burada, poli-T oligonükleotidler yardımı ile poli-A içeren mRNA'ların amplifiye edilerek istenmeyen RNA fragmentlerin tükenmesi sağlanır. Sonra, çoğaltılan mRNA'lar yüksek sıcaklık ve +2 değerli katyonlar varlığında fragmente edilir. Söz konusu fragmentlerden ters transkriptaz yardımı ile cDNA eldesi gerçekleştirilir. cDNA eldesinden sonra dsDNA oluşması için ikinci DNA ipliği sentezlenir. Bu sentez Polimeraz I ve RNaz H yardımı ile gerçekleştirilir. dsDNA fragmentlerine 3'-ter bölgesine Adenin eklenir. Bunu ligasyon aşaması ile adaptör ve barkodların eklenmesi işlemleri takip eder. Bu yapılar PCR aşamasının başlayabilmesi için gereklidir. Sonrasında daireselleştirme aşamasında DNA nanoball (DNB) yapılarının oluşumu sağlanır. Bu yapı PCR hatalarının azaltılmasına yardımcı olur. DNB yapıları meydana getirildikten sonra, sekans aşamasına geçilir. Bu aşamada, her bir DNB yapısı DNBSseq G-400 patern array platformuna yerleştirilir ve burada flow cell'de DNA dizileri sekanslanır. Bu teknolojiye, cPAS teknolojisi kullanılarak tüm DNB yapılarındaki diziler ayrı ayrı sekanslanır. Sekanslama aşamasında, florokromlar ile konjuge edilmiş dNTP'ler kullanılır. dNTPlerin bağlanması ve bunlardan gelen sinyaller doğrultusunda dijital veriler elde edilir. Çalışmamızda örnek başına, 6 GB clean FASTQ verisi elde edilmiştir.

3.8. Transkriptom verilerinin biyoinformatik analizi

Elde edilen verilerden gürültüyü azaltmak için adaptör sekanlarından, çok düşük okuma değerlerinden ve özgün olmayan sekanslardan kurtulmak için filtreleme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elde edilen tüm okumalar STAR yazılımı kullanılarak referans genomu göre hizalandı. Hizalanan okumaların STAR ve Samtools yazılımları aracılığıyla FASTQ girdi dosyalarından BAM çıktı dosyaları elde edilir. Hizalanan BAM dosyaları HISAT2 yazılımı ile kümeleme ve anotasyon işlemleri gerçekleştirildi. Referans genomda birden fazla dizi ile işleşen diziler transkriptom analizinden çıkarıldı. Özgün transkriptlerin eldesi için StringTie yazılımı kullanıldı. Bu yazılım ile sekanslar yeniden bir araya getirildi. Buradan birleştirilmiş GTF dosyası oluşturuldu. Bu dosyaların karşılaştırılması ile her gen için ikili (test / kontrol) gen ifade değişimleri karşılaştırıldı. Ortalama gen ifade değeri, kat artışı, *p* değeri ve standart hata değeri belirlendi.

3.9. cDNA kütüphanesinin elde edilmesi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA elde etmek için ticari kiti (Applied systems) kullanıldı. cDNA elde etmek için yapılan tüm deneyler buz üzerinde gerçekleştirildi ve aşağıda verilen miktarlarda reaksiyon hazırlandı.

Tablo 4. Biosystem cDNA kiti içinde yer alan bileşenler ve kullanılan hacimleri.

Solüsyon	1X
10X RT Tamponu	2.0 µL
25X dNTP Karışımı (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primerler	2.0 µL
Ters Transkriptaz	1.0 µL
RNaz İnhibitörü	0.5 µL
Steril H ₂ O	3.7 µL

Hazırlanan reaksiyon tüpleri PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için Thermal Cycler cihazında (BioRad) aşağıdaki şekilde uygulandı;

1. 25°C 10 dk
2. 37°C 120 dk
3. 85°C 5 dk
4. +4°C ∞

3.10. Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Test ve kontrol MDA-MB-231 hücre RNA örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR çalışması gerçekleştirildi. Söz konusu örneklerde; Aktinin α 1, Kollajen-5A2, Kollajen-3A1, Kollajen-4A2, Kollajen-12A1, Fibronektin-1, Filamin- β , Integrin-1BP, Integrin α -3, Integrin β -8, PAR6 β , ve Talin-1 gen ifade düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışma için gerekli primer dizileri Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>) yardımı ile tasarlandı. Tasarlanan primerlerin dizileri aşağıda tablo 5 'te verildiği gibidir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan qRT-PCR primerleri.

Gen	Primerler	Tm (°C)
Aktinin α 1	İleri: 5'- CAACAAGCACACCAACTACAC -3'	62
	Geri: 5'- AGGATCTGGTTCTCTACCTCAT -3'	
Col5A2	İleri: 5'- AGCTGGGAAACGTGGATTAC -3'	62
	Geri: 5'- GAAGACCCTGAAGACCAGTAAAG -3'	
Kollajen3A1	İleri: 5'- CTGGCATTTCCTTCGACTTCT -3'	62
	Geri: 5'- AGCTTCAGGGCCTTCTTTAC -3'	
Kollajen4A2	İleri: 5'- CCTGGTGATGTCTGCTACTATG -3'	62
	Geri: 5'- GCTGATGTAGGGCTTGATCTC -3'	
Kollajen12A1	İleri: 5'- GTTAAGTGGGATCCTGCTAGTG -3'	62
	Geri: 5'- TCCTCCTATTGTGGTCGTTTG -3'	
Fibronectin-1	İleri: 5'- GTATCCCTCGTGGCCATAAA -3'	62
	Geri: 5'- TCGGTGTTGTAAGTGGAATAG -3'	
Filamin Beta	İleri: 5'- CGACATCCCACCTTCTCCTTATC -3'	62
	Geri: 5'- GCCTACTTCTTCGCCAGTTT -3'	
Integrin -1 binding protein	İleri: 5'- CAGTGTGACTACCATTCTGTT -3'	62
	Geri: 5'- TACCACTGCCTTCCCTTCTA -3'	
Integrin Alpha-3	İleri: 5'- GCAGATGGATGTGGATGAGAA -3'	62
	Geri: 5'- GGTCTTGTGGACGATGTTGA -3'	
Integrin Beta-8	İleri: 5'- CCTGGAACCTGGTAGAGTAGAT -3'	62
	Geri: 5'- GGAAATCTCTTGGGAAGAGTGAG -3'	
PAR-6 Beta	İleri: 5'- GAGGATGAAGACAGCGAAGAAG -3'	62
	Geri: 5'- TGA CTCCAGGCTCTCAGTATTA -3'	
Talin-1	İleri: 5'- GTGCAAACCAGGCAATTCAG -3'	62
	Geri: 5'- ACAGTGCAGAGGTGTGTTTAG -3'	

qRT-PCR çalışması, Ampigene qPCR Green Mix HI-Rox (Enzo) kiti kullanılarak Quantstudio3 cihazında (Applied Biosystems) gerçekleştirildi. Öncelikle, Ampigene qPCR Green Mix HI-Rox kit reaksiyonu her örnek için tablo 6'da verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 6. qRT-PCR reaksiyon içeriği.

Ampigene qPCR Green Mix	10 μ L
İleri Primer (μ M)	1 μ L
Geri Primer (μ M)	1 μ L
cDNA (20 ng)	1 μ L
PCR grade H ₂ O	7 μ L

Reaksiyon miksi buz üzerinde hazırlandıktan sonra örnekler Quantstudio3 (Applied Biosystems) cihazı için uygun 0.2 mL'lik 96-kuyucuklu PCR plakasına pipetlendi ve plaka cihaza yerleştirildi. Örneklerin analizi için Quantstudio3 (Applied Biosystems) cihazında uygulanan program aşağıdaki tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. qRT-PCR sıcaklık şartları.

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	2 dk
40	95 °C	5 sn
	60 °C	20 sn

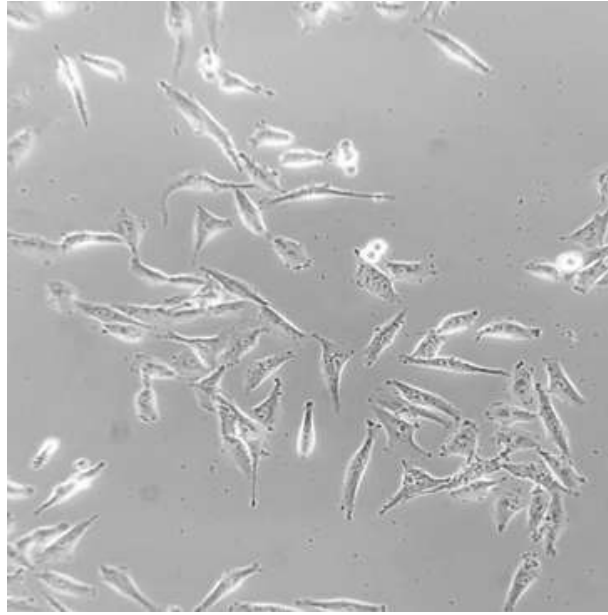
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu tez çalışmasında, metastatik meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) endojen olarak yüksek düzeyde ifade edilen TWIST1 transkripsiyon faktörünü, antisense oligonükleotidler ile baskılayarak MDA-MB-231 hücrelerinde integrin yolağı ile ilişkili olan TWIST1 hedef genlerini transkriptom profilinin değerlendirilmesi ile belirlemesi amaçlandı.

4.1.1. Hücre kültürü

In vitro hücre kültürü yöntemi ile MDA-MB-231 hücrelerinin kültürasyonu başarı ile gerçekleştirildi. Mikrobiyal kontaminasyon olmadan, %5 CO₂, %95 nem ve +37°C ortama sahip etüvde inkübe edilerek ve belirli periyotlarla uygun besiyeri ile beslenerek hücrelerin çoğalması sağlandı. Kültür ortamındaki MDA-MB-231 hücrelerinin görünümü aşağıda verilmiştir (Şekil 11).

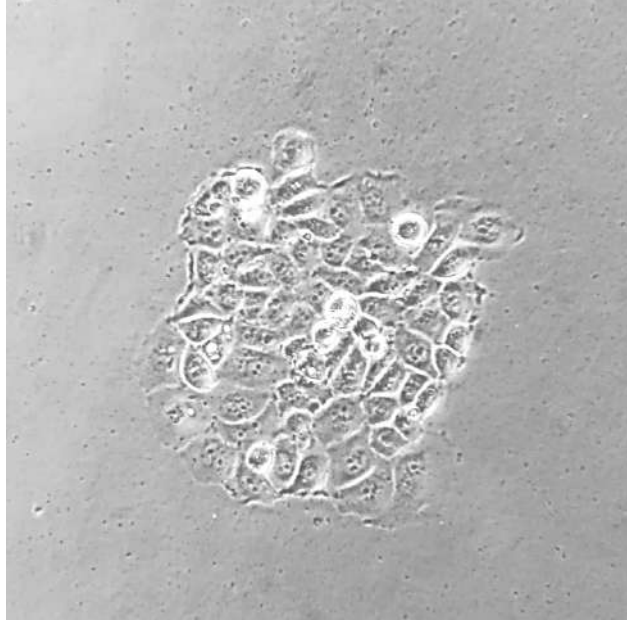


Şekil 8. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (Objektif 20X).

4.1.2. Plazmid vektörlerin MDA-MB-231 hücrelerine transfeksiyonu ve seçilimi

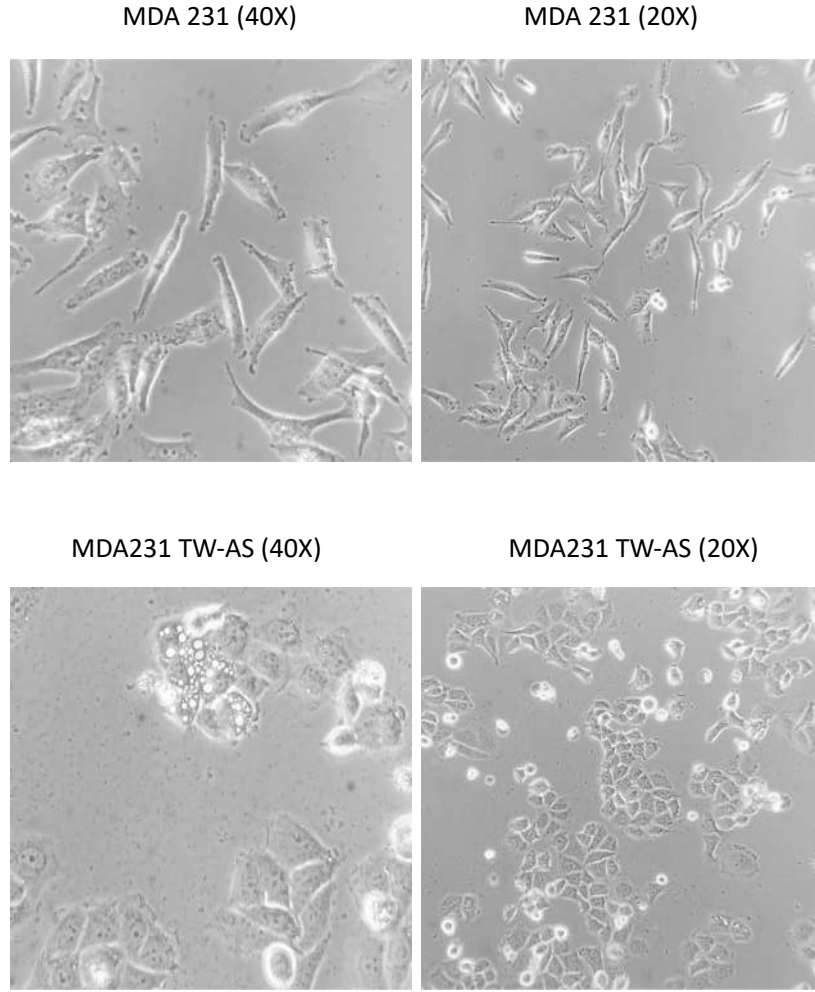
MDA-MB-231 hücrelerine kontrol olarak boş vektör (pcDNA3.1) ve TWIST1 Antisense (AS) dizisini içeren vektörün lipofektamin 3000 ajanı (TWIST1-AS-pcDNA3.1) aracılı transfeksiyonunu gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücreleri karakterleri itibariyle transfeksiyonu zor olan hücrelerdir. Bu nedenle hücrelere transfeksiyon işlemi sonrasında popülasyonda transfeksiyonu başarılı olan hücrelerin

seçilimi için 0,4 ug/mL G418/Neomycin antibiyotiği ilave edildi. Seçilen hücrelerden 96-kuyucuklu kültür kapları kullanılarak tek koloni düşürme tekniği ile morfolojik olarak en iyi koloni seçilmeye çalışıldı (Şekil 2). Koloni seçici besiyerinde toplam 3 ay boyunca kültürü devam edilerek çoğaltıldı.



Şekil 9. TWIST1-AS-pcDNA3.1 plazmid vektör ile transfekte edilen ve G418/Neomycin’li besiyerinde seçilen koloninin morfolojik görüntüsü (Objektif 40X).

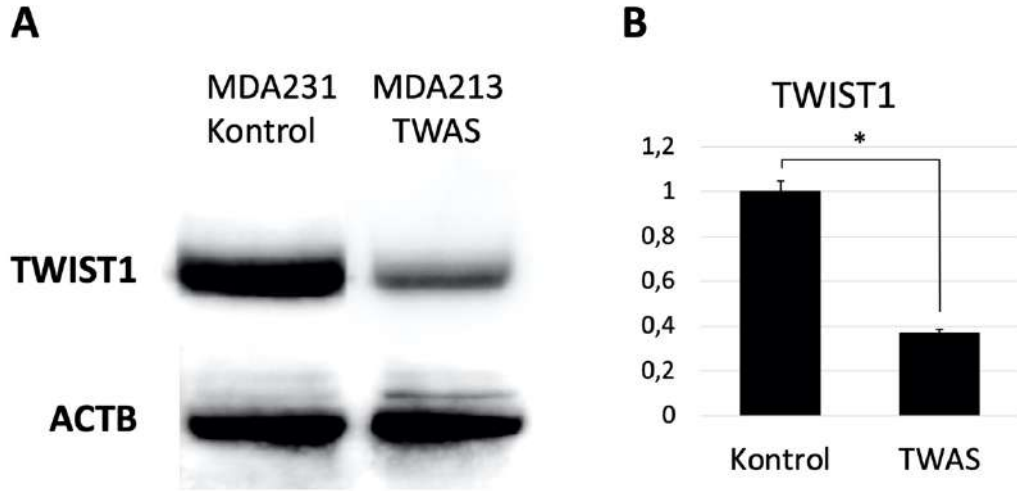
Kontrol olarak boş vektör (pcDNA3.1) ve TWIST1 ifadesinin susturulması için TWIST1-AS-pcDNA3.1 vektör aktarılan hücreler başarı ile kültüre edilerek çoğaltıldı ve stokları oluşturuldu. TWIST1 ifadesi baskılanan hücrelerin morfolojilerinde beklenen morfolojik değişimler gözlemlendi. TWIST1, mezenkimal morfolojinin oluşumu için tetikleyici bir faktör olduğundan, baskılandığı durumlarda hücrelerin bu mezenkimal-benzer morfolojiden uzaklaşıp epitelyal-benzer bir morfolojiye dönüşmesini gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 10. Kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış (TW-AS) MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.

4.1.3. Antisense oligonükleotidler ile TWIST1 baskılanma düzeyinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi

Antisense cDNA dizisi ile endojen TWIST1 ifadesinin baskılanma başarısını protein düzeyinde doğrulamak için Western blot yöntemini uygulandı. Elde edilen bulgulara göre, kontrol hücelere kıyasla TWIST1 ifadesi test hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yaklaşık 2,5-kat baskılandığını gözlemlendi. Western blot deneyinde internal kontrol olarak Beta-Aktin (ACTB) kullanıldı (Şekil 14).



Şekil 11. Boş ve TWIST1-AS pcDNA3.1 vektörlerinin transfekte edildiği ve Neomycin ile seçilen MDA-MB-231 hücrelerinde TWIST1 ve Beta-Aktin (ACTB) protein ifadeleri (A) ve karşılaştırmalı grafiği (B). (*p* değeri: 0,0014).

4.1.4. Transkriptom analizi sonuçları

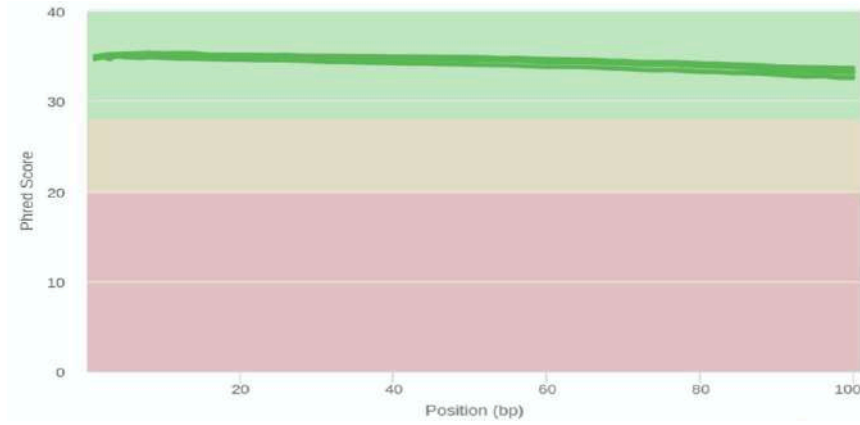
Yapılan çalışma sonucunda toplam 268034 transkript elde edildi. Bu okumalardan 31370 adet okuma nonsense olduğu için elendi. Geriye kalan 236664 okuma içerisinde ifadesi 2 kat ve daha fazla artış gösteren 633 gen saptanırken, 604 tane genin de ifadesinin 2 kat ve daha fazla azalış gösterdiği saptandı.

RNA sekanslama çalışmasından sonra, ham veriler incelendi. Veri incelemesi sırasında, ham okumalardan adaptör dizileri, kontaminasyonu ve düşük kaliteli okumaların çıkarılması gerçekleştirildi. Bir sonraki basamakta verilen veri sonuçlarına ait istatistikler elde edildi (Tablo 8).

Tablo 8. Transkriptom analizi genel okuma sonuçları.

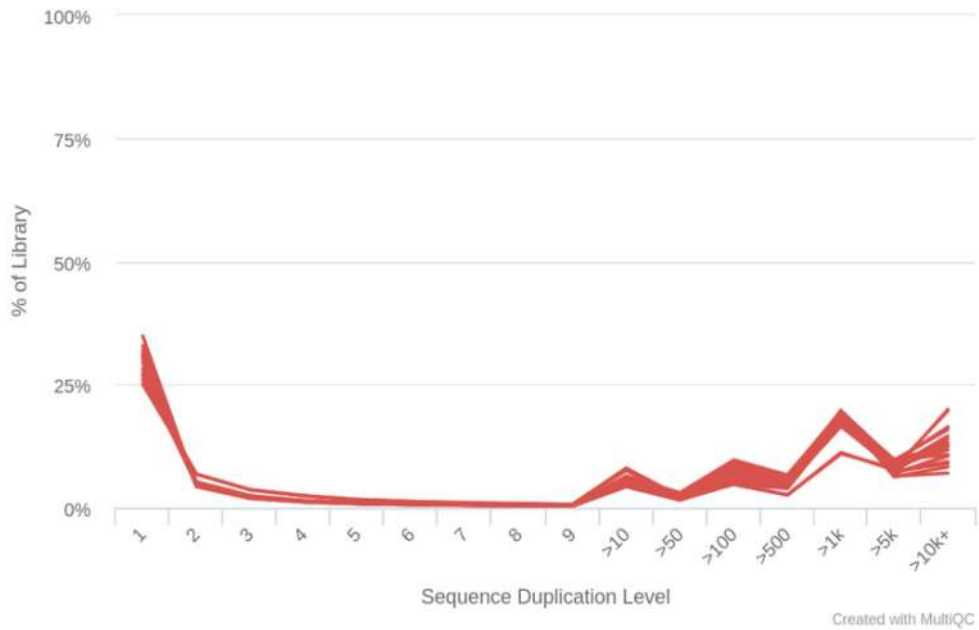
Sample	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len	Q20(%)	Q30(%)
KONTROL-1-MDA-MB231_1_1	42960482	4296048200	100	100	100	96.73	88.25
KONTROL-1-MDA-MB231_1_2	42960482	4296048200	100	100	100	95.93	87.34
KONTROL-2--MDA-MB231_97_1	9761306	976130600	100	100	100	96.56	88.48
KONTROL-2--MDA-MB231_97_2	9761306	976130600	100	100	100	95.27	87.23
KONTROL-2--MDA-MB231_98_1	12511904	1251190400	100	100	100	96.39	87.9
KONTROL-2--MDA-MB231_98_2	12511904	1251190400	100	100	100	94.56	85.57
KONTROL-2--MDA-MB231_99_1	12900067	1290006700	100	100	100	96.36	87.84
KONTROL-2--MDA-MB231_99_2	12900067	1290006700	100	100	100	94.1	84.57
TEST1_100_1	15633698	1563369800	100	100	100	96.91	88.99
TEST1_100_2	15633698	1563369800	100	100	100	95.76	87.73
TEST1_101_1	17594835	1759483500	100	100	100	96.76	88.54
TEST1_101_2	17594835	1759483500	100	100	100	95.95	88.06
TEST1_102_1	22883342	2288334200	100	100	100	96.23	87.12
TEST1_102_2	22883342	2288334200	100	100	100	95.63	87.27
TEST2_103_1	22393794	2239379400	100	100	100	96.1	87.16
TEST2_103_2	22393794	2239379400	100	100	100	94.41	85.19
TEST2_104_1	21212933	2121293300	100	100	100	96.3	87.8
TEST2_104_2	21212933	2121293300	100	100	100	94.6	85.78

Ham verilerin kalite kontrolü yapıldı. Bu çalışmada FastqC (v0.11.9) ile okumaların kalitesini kontrol edildi. Her okumanın kalite kontrolünden sonra, FastqC sonuçlarını birleştirmek için MultiQC (v1.10.1) kullanıldı. MultiQC'den elde edilen istatistikler aşağıda gösterilmiştir (Grafik 1). Transkriptom analizi sonucunda elde edilen verilerin kalite açısından güvenilir olduğu anlaşıldı.



Grafik 1. FastqC sonuçlarının, MultiQC aracılığıyla birleştirilmesi ile elde edilen ortalama kalite verileri.

RNA sekanslarını içeren kütüphanelerin içeriği her organizmada farklılık gösterir. Yüksek düzeyde ifade olunan genlerin saptanması için çok fazla okuma gerekmezken, az miktarda ifade edilen genlerin saptanması için çok fazla okuma almak gerekir. Tüm genlerin ifadesi okunurken her gen için eşit sayıda sekanslama yapılamaz. Bu nedenle yüksek düzeyde eksprese olunan transkriptler bir süre sonra yapılan okumalarda kendi üzerilerine katlanarak duplike olmuş yapılara meydana getirir. Aşağıdaki duplikasyon grafiğinde görüldüğü üzere transkriptlerin %25'i yüksek düzeyde ifade edilmektedir (Grafik 2).



Grafik 2. FastqC: sekansların duplikasyon seviyesine ait veriler.

Elde edilen transkriptom analiz sonuçlarının anlamlandırılması için referans genoma ihtiyaç duyulur. Bu çalışmada referans transkriptler için kullanılan genom *Arabidopsis thalian*'dır. Karşılaştırma için 177.852.361 çift uçlu okumalar kullanıldı. Analiz için referans dizisi almak üzere 268.034 transkript bir araya getirildi. Referans genoma göre transkriptlerin anotasyonu için Stringtie2 yazılımı kullanıldı.

Tablo 9. StringTie ile anotasyonu gerçekleştirilen transkriptlerin özellikleri.

Sample	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len
reference_vs_stringtie_merged.annotated.fa	268034	553106753	8	2064	347561

Çalışma sonucunda ayrıca, hizalanmış ve birleştirilmiş 31370 adet yeni transkript tespit edildi. Bununla birlikte tekrarlı çalışılan kontrol ve test örneklerine ait okunan transkript sayıları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 8).

Tablo 10. Transkriptom analizinde yapılan hizalama sonuçları.

Sample	Total Bases	Total Reads	Total Mapped Reads	Unmapped Reads
KONTROL-1-MDA-MB231_1	8592096400	85920964	39742713	46178251
KONTROL-2--MDA-MB231_97	1952261200	19522612	8218245	11304367
KONTROL-2--MDA-MB231_98	2502380800	25023808	10362238	14661570
KONTROL-2--MDA-MB231_99	2580013400	25800134	10710467	15089667
TEST1_100	3126739600	31267396	12406841	18860555
TEST1_101	3518967000	35189670	13962485	21227185
TEST1_102	4576668400	45766684	17949628	27817056
TEST2_103	4478758800	44787588	21021083	23766505
TEST2_104	4242586600	42425866	18799153	23626713

4.1.4.1. İfadesi değişen genlerin (DEG) analizi

DEG analizi iki farklı örnek arasında farklı şekilde ifade edilen genlerin tespit edilmesinde kullanılan bir programdır. Bu analiz sayesinde TWIST1 ifadesi baskılanan hücrelerimizde normal hücrelere göre hangi genlerin ne düzeyde ifadesinde değişiklik olduğu saptanmıştır. Kontrol ve test karşılaştırması sonucunda elde edilen MA, dağılım ve volkan grafiği ile ısı haritası aşağıdaki gibidir (Grafik 3,4).

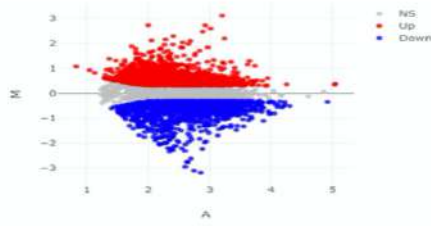


Figure 4.1. MA plot of DEGs.

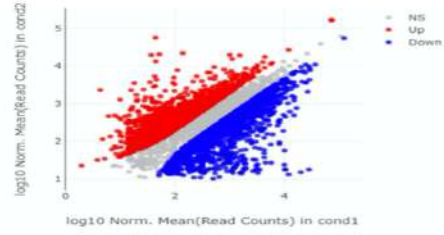
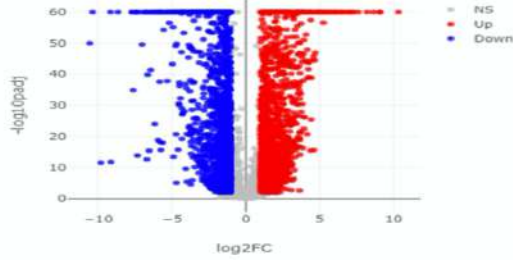


Figure 4.2. Scatter plot of DEGs.



Grafik 3. Kontrol ve test karşılaştırılması sonucu elde edilen DEG dağılım grafikleri.

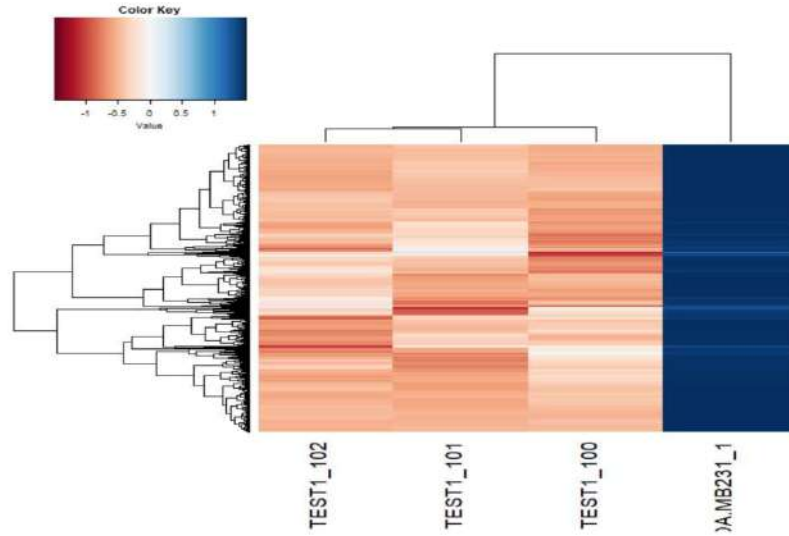


Figure 4.4. Heatmap of DEGs.

Grafik 4. DEG ısı haritası.

4.1.4.2. DEG analizi ile belirlenen genlerin biyolojik fonksiyonları

TWIST1 ifadesini baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre değişen gen ifadelerinin biyolojik fonksiyonları incelendiğinde, ön plana çıkan; hücreyi uyaran çeşitli stimülatör molekülleri kodlayan 498 gen, hücre sinyal yollarını düzenleyen 423 gen, hücre lokalizasyonundan sorumlu 406 gen, hücre canlılığını sağlayan 230 gen ve hücre adezyonundan sorumlu 200 gen saptandı (Tablo 11).

Tablo 11. Transkriptom analizi sonucunda belirlenen genlerin hücrel fonksiyonları.

Gen sayısı	Genin hücre içindeki aktivasyonu
498	Hücre Stimülasyonu
423	Sinyal Yolakları
406	Hücrel Lokalizasyon
230	Hücre Canlılığı
200	Hücre Adezyonu

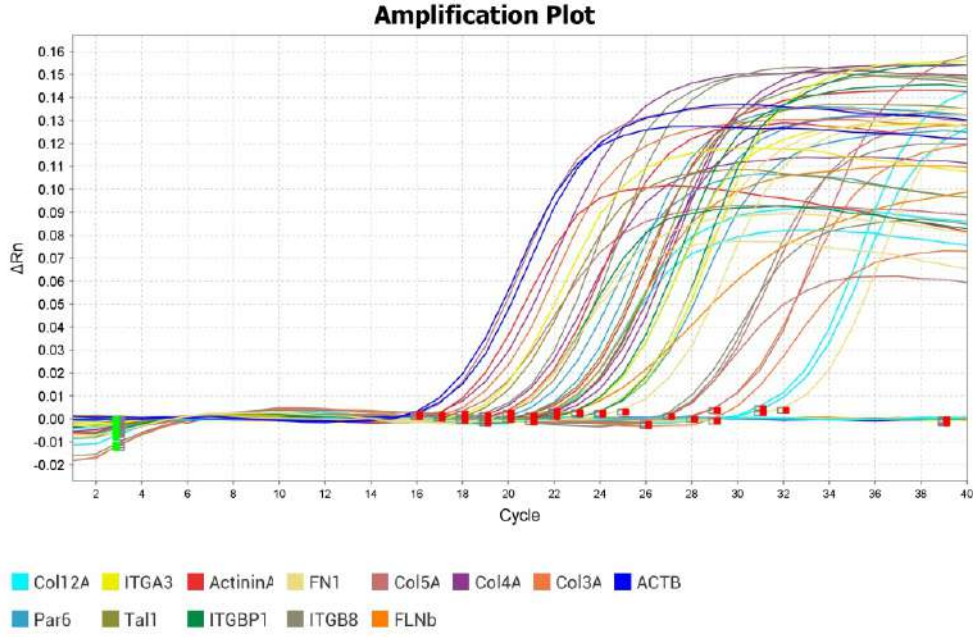
4.1.5. Hedef genleri belirlenmesi

Elde edilen transkriptom sonuçlarına göre, hücre membranı ilişkili hücrel organizasyonlarda ve ekstraselüler bölgelerde rol alan genlerin ifadelerinde değişimler dikkat çekici olmuştur. Bu bakımdan saptanan integrinler (ITGB1BP1, ITGB8 ve ITGA3) ve yolakları ile ilişkili genlerde yaklaşık 2-kat ve daha fazla olacak şekilde anlamlı değişimler belirlendi. Bu genler; İntegrin Alfa 3 (ITGA3), İntegrin Beta 8 (ITGB8), İntegrin bindin-1 protein (ITGB1BP1), Kollajen3A1 (COL3A1), Kollagen4A2 (COL4A2), Kollagen5A2 (COL5A1), Kollagen12A1 (COL12A1), Talin-1(TLN1), Fibronectin-1 (FN1), Filamin β (FLNB), Actinin- α 1 (ACTN1) ve PAR6 genleridir.

Tablo 12. Hedef genlerin transkripsiyon analizi sonucunda değişen ifadelerine ait veriler.

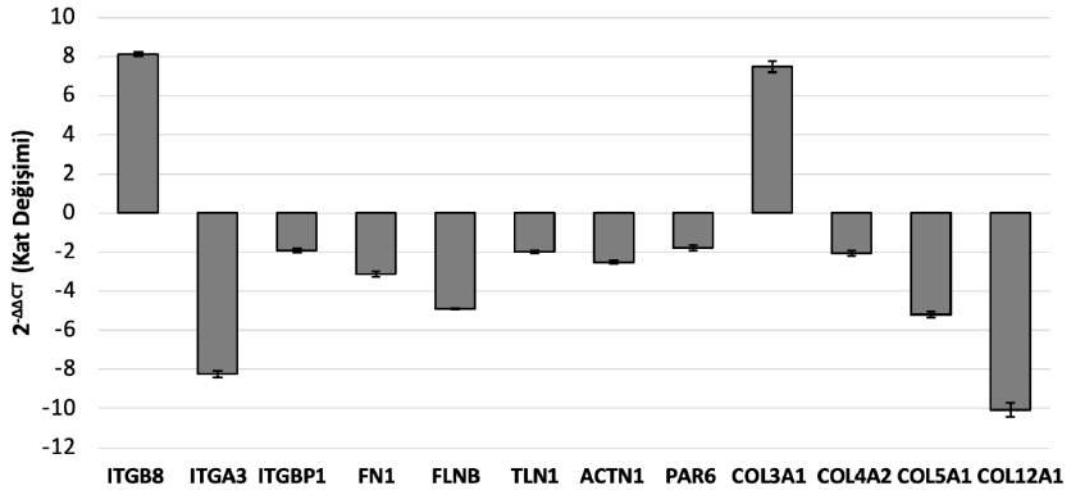
Gen	Ensembl ID	Log2 Kat Değişimi	P Değeri
Kollagen5A2	ENSG00000204262	10,33	0
İntegrin Beta 8	ENSG00000105855	8,06	0
Kollajen3A1	ENSG00000168542	7,28	0
Kollagen4A2	ENSG00000188153	3,21	2.54390652455974e-14
Kollagen12A1	ENSG00000111799	-6,33	5e-323
İntegrin Alfa 3	ENSG00000005884	-4,34	0
Fibronectin 1	ENSG00000115414	-3,03	4.28449587985601e-284
Actinin Alfa 1	ENSG00000072110	-2,45	0
Talin 1	ENSG00000137076	-2,05	0
Filamin B	ENSG00000136068	-1,95	0
PAR 6 B	ENSG00000124171	-1,90	8.9762380759266e-70
Integrin Binding Protein-1	ENSG00000119185	-1,84	7.57419264134553e-39

Söz konusu bu genlerin değişimlerini tasarlanan primerleri kullanarak qRT-PCR yöntemi ile doğrulandı. Quantstudio3 cihazında genlere ait elde edilen amplifikasyon eğrileri Grafik 5'te gösterilmiştir.



Grafik 5. qRT-PCR çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.

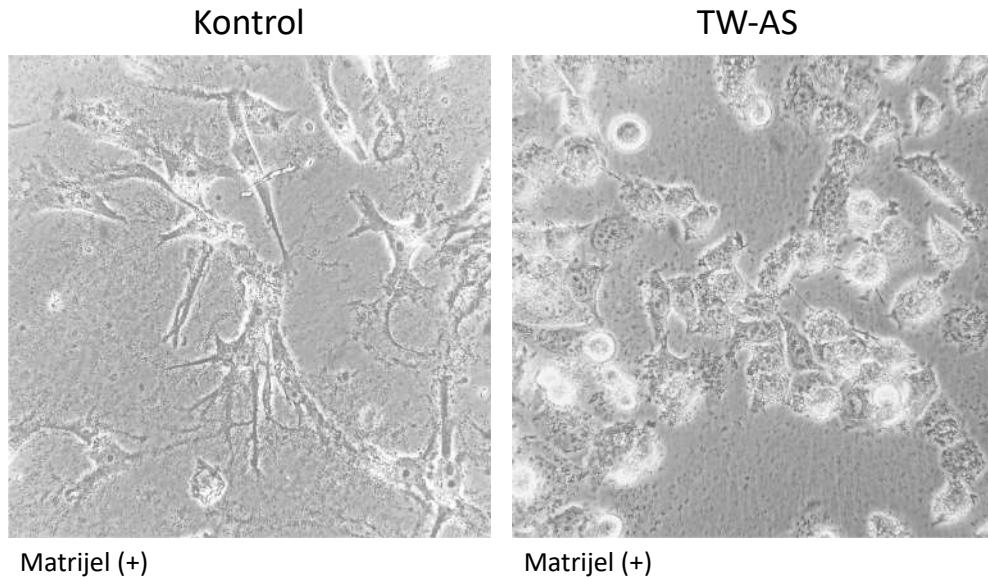
qRT-PCR sonuçlarımıza göre, TWIST1 ifadesi baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre; ITGB8 8.14 kat ve COL3A1 7.5 kat artmış olduğu belirlendi. Bunun aksine ITGA3 8.24 kat, ITG1BP1 1.91 kat, COL4A2 2.1 kat, COL5A1 5.2 kat, COL12A1 10.1 kat, FN1 3.1 kat, FLNB 4.9 kat, TLN1 2 kat, ACTN1 2.5 kat ve PAR6 1.8 kat azalmış olduğu belirlendi (Grafik 4).



Grafik 6. TWIST1 ifadesi baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde kontrole kıyasla ifadesi değişen genlerin qRT-PCR verileri.

4.1.6. Kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış MDA-MB-231 hücrelerinin matrijel kaplı yüzeydeki hücre morfolojileri

TWIST1 baskılanması sonucunda qRT-PCR ile İntegrin yolları ile ilişkili genlerin ifadesinin değiştiğini belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre TWIST1 İntegrin yolağını desteklemektedir. Özellikle nöral migrasyonda görevli İntegrin-A3 (ITGA3) ekstraselüler matriks komponentlerinden laminin, kollajen ve fibronektin gibi yapıların reseptörüdür (Subbaram, S., ve ark., 2011). Bu bağlamda deneysel olarak, hücrelerimizi major komponenti laminin olan ve kollajen IV içeren bir matrijel (Corning) ile kaplı yüzeylerde kültüre edildi. Kullandığımız bu matrijel; Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomasından elde edilmiş ekstraselüler matriks komponentlerini içermektedir. Matrigel, çoğunlukla laminin ve kollajen IV yanı sıra heparan sülfat proteoglikanlar, entaktin/nodogen ve birçok büyüme faktörünü içermektedir. Matrijel kaplı yüzeyde 72 saat boyunca kültüre edilmiş kontrol MDA-MB-231 hücrelerine baktığımızda net bir şekilde invadopodların oluşumları, sayı ve uzunlukları dikkat çekici düzeydedir. Bunun aksine, TWIST1 baskılanmış hücrelerde kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde invadopod yapılarının oluşmadığı ve matrijel içermeyen ortamdaki hücelere benzer bir morfolojide oldukları anlaşılmıştır. Bu bulgulara göre TWIST1'in fonksiyonel olarak İntegrin-A3 ve İntegrin-B8 yollarını regüle edebildiği sonucuna varılabilir.



Şekil 12. Matrijel kaplı hücre kültür kaplarında kontrol ve TWIST1 ifadesi baskılanmış (TW-AS) MDA-MB-231 hücrelerinin *in vitro* morfolojileri.

4.2. Tartışma

Kanser gelişim süreci çok basamaklı bir süreçtir. Meme kanseri gelişiminde hücrel mekanizmaların farklılığına bağlı olarak, tedavide farklı yanıtlar gözlemlenebilmektedir. Dolayısıyla bu süreçte anahtar role sahip hedef moleküllerin belirlenmesine ve bunların hücre regülasyonlarındaki rolünün aydınlatılmasına halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasındaki amaç, kanser gelişimini ve metastazını tetikleyen temel faktörlerden biri olan TWIST1 transkripsiyon faktörünün agresif meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231 hücrelerinde hedef genlerini belirlemektir. Bunun için endojen olarak TWIST1 ifadesi yüksek olan bu hücrelerde antisense oligonükleotid teknolojisi ile TWIST1 ifadesi baskılandı. Kontrol olarak boş vektör aktarılan hücreler kullanıldı. Kontrol ve test hücrelerinin toplam RNA'ları izole edilerek transkriptom analizi gerçekleştirildi. Bu analiz neticesinde birçok gen verisinin içerisinden anlamlı olarak bazı integrin genlerinin ve integrin yolağında görev alan komponentleri kodlayan genlerin bir kısmının transkripsiyonel değişimlerini incelendi. Söz konusu genlerin ifade değişimleri qRT-PCR çalışması ile teyid edildi.

Bu çalışmada öncelikle antisense TWIST1 cDNA dizisi klonlanmış pcDNA3.1 (TWIST1-AS) vektörünü başarılı bir şekilde MDA-MB-231 hücrelerine lipofektamin ajanı aracılığıyla aktarıldı. Transfekte olan hücrelerin seçimini G418/Neomycin antibiyotiği varlığında gerçekleştirildi. Bu hücrelerden tek koloni eldesini sağlanarak hücreler izole ettik. Mikroskopik takip neticesinde TWIST1 ifadesi baskılanan MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojileri mezenkimal-benzer bir morfolojiden epitelyal-benzer bir morfolojiye dönüştüğünü gözlemlendi. TWIST1 literatürde epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) mekanizmasının temel faktörlerinden biri olarak bilinmektedir. Bu durumda, TWIST1 baskılanan hücrelerimizde mezenkimal-epitelyal transisyon (MET) sürecinin tetiklendiğini morfolojik olarak belirlendi. Bu hücrelerde, TWIST1'in protein düzeyinde baskılandığını Western blot deneyi ile gösterildi.

Yapılan çalışma sonucunda transfeksiyonu zor olan MDA-MB-231 hücrelerinde endojen TWIST1 ifadesini kontrole göre yaklaşık 2,5-kat azaldığı belirlendi. Bu sonuç ile hücrelerdeki morfolojik değişimlerin TWIST1 baskılanmasına bağlı olarak meydana geldiğini ileri sürebilir.

TWIST1 hedef genlerin belirlenmesi için deney setinde hücrelere ait RNA örnekleri kullanılarak transkriptom analizini gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ile anlamlı olduğunu düşünülen bazı genlerin ifade değişimleri dikkate değer olabileceklerini değerlendirdi. Bu genler; İntegrin- α 3 (ITGA3), İntegrin- β 8 (ITGB8), İntegrin bindin-1 protein1 (ITGB1BP1), Kollajen3A1 (COL3A1), Kollajen4A2 (COL4A2), Kollajen5A2 (COL5A2), Kollajen12A1 (COL12A1), Talin-1 (TLN1), Fibronectin-1 (FN1), Filamin β (FLNB), Actinin- α 1 (ACTN1) ve PAR6 genleridir. Bu genler, literatürde integrin yolakları ile ilişkili olduğu bilinen genlerdir.

Literatürde transmembran protein ailesinin ailesi olarak bilinen integrinler, hücre membranında heterodimer yapıda bulunurlar. Bu yapılar hem patolojide hem de gelişim sürecinin kritik rollere sahiptirler. Toplamda 24 farklı (16 α ve 8 β) altbirimi içerirler (Kumar, V., ve ark., 2015; Wang, W., ve ark., 2015). Bu alt birimlerin etkileşime girdiği ligandları birbirinden farklıdır. İntegrinler, büyüme faktörleri, sitokinler, ekstraselüler matriks (ECM) degradasyon proteazları, fibronektin, laminin, vitronektin ve kollajen gibi ECM proteinleri ile etkileşim içinde olduklarından dolayı sınıflandırması zordur. Meme dokusunda bütünlüğün korunması ve meme epitelinde bazal membranda luminal kısmına nispeten daha fazla bulunur. Yapılan *in vitro* deneylerde β 1-integrinlerin meme gelişiminde hormonal kontrollünde rolle sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca β 1-integrinlerin tümör hücrelerinin proliferasyonu, sağkalımı ve invazif sürecinde önemli bir fonksiyona sahip oldukları görülmüştür. İntegrinlerin farklı ligandlara bağlanma özelliğiyle birlikte bir ligand birden fazla integrin ile etkileşime girebilir. Bu özellik hücreler arası etkileşimler için önemlidir. Aynı zamanda integrinler hücre-hücre ya da hücre-ekstraselüler matriks etkileşimini sağlamaktadır (Kumar, V., ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda ITGB8 seviyesinin kanser türlerine göre değiştiği saptanmıştır. Literatürde genel olarak ITGB8 seviyesindeki artış kanser gelişimini desteklediği vurgulansada aksini belirten çalışmalar da mevcuttur. Denoyelle, C. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MDA-MD-231 hücrelerinde ITGB8 ifadesinin artması kanser gelişimini negatif yönde düzenlediğine dair verilere yer verilmiştir (Denoyelle, C., ve ark., 2003). Bu çalışma neticesinde ifade değişimini belirlenen ITGB8, TWIST1 ifadesi baskılanmış MDA-MD-231 hücrelerinde, ifadesi yaklaşık olarak 8 kat artmış olduğu saptandı. Buna göre, TWIST1'in ITGB8 ifadesini baskılayabildiği söylenebilir. Ancak, TWIST1'in ITGB8 transkripsiyonel düzenlenmesindeki rolünün aydınlatılması için detaylı fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

İntegrinler, hücrelerin tutunmasında da rol oynayan önemli yapılardır. İntegrin 1-binding protein (ITGB1BP1) integrinlerin fonksiyonel bir üyesidir. ITGB1BP1, kemik gelişimi ve anjiyogenezde önemli rolleri vardır (Naik, M. U., ve ark., 2011; Puhl, A. C., ve ark., 2020). Bu süreçte ITGB1BP1, KRIT1 ve RAP1A komplekslerine dâhil olmaktadır (Naik, M. U., ve ark., 2011). Hücresel proliferasyonu fibronektine bağımlı bir şekilde uyarır. ITGB1BP1 anjiyogenezde, AKT ve Notch sinyal yollarının aktivasyonu ile endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu, lümen oluşumunu ve anjiyogenezi azaltarak anjiyogenezin negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (Naik, M. U., ve ark., 2011; Puhl, A. C., ve ark., 2020). Bu çalışmada, TWIST1 ifadesi baskılanan hücrelerde ITGB1BP1'in ekspresyon seviyesinde kontrole göre 1.98-kat azalma gözlemlendi. Bu sonuca göre TWIST1 ifade düzeyi ile ITGB1BP1 ifadesi arasında pozitif bir regülasyonun olduğunu söyleyebilir.

TWIST1 ifadesine bağılı olarak transkripsiyonel aktivasyonu değişen bir başka gen de İntegrin alfa-3 (ITGA3) genidir. İntegrin alfa-3/beta-1 heterodimeri, ekstraselüler matrikste yer alan kollajen moleküllerine bağlanır ve hücre göçünü tetikler. İntegrin alfa-3/beta-1 eksikliği durumunda kanser hücre migrasyonunun azaldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Subbaram, S., ve ark., 2011). Bu çalışmada TWIST1 baskılanmış MDA-MD-231 hücrelerinde ITGA3 mRNA ekspresyon seviyesinin MDA-MD-231 hücrelerine göre 8 kat azaldığı belirlendi. Bu sayede, TWIST1 ifadesi baskılanmış olan MDA-MD-231 hücrelerinde migrasyon kabiliyetinin azalabileceği ileri sürülebilir.

TWIST1 eksikliğine bağılı olarak ifadesi değişen bir diğer gen de Talin-1 (TLN1)'dir. Bu gen, 270 kDa ağırlığında bir sitoskeletal proteini kodlar. TLN1, integrin aktivitesinin düzenlenmesinde görev yapar. TLN1, integrin beta alt birimlerinin sitoplazmik kuyruklarına spesifik olarak bağlanır. Bu şekilde reseptörün ligandlarına bağlanmasını destekleyen konformasyonel yeniden düzenlenmesini sağladığı biliniyor (Fang, K. P., ve ark., 2016). TLN1'in prostat kanserinde yüksek düzeyde ifade edildiği ve bunun sonucunda hücrelerin migrasyonu, adezyonu ve invazyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Fang, K. P., ve ark., 2016). TLN1 geni bazı kanser türlerinde biyolojik marker olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu genin susturulması ile üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin (östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve human epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) bulundurmeyen meme kanseri) progresyonunu negatif yönde etkilediği belirlenmiştir (Fang, K. P., ve ark., 2016). Bu çalışmada, TWIST1 baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde TLN1'in ekspresyon

seviyesinde kontrole göre iki kat azalma olduğu görüldü. Bu sonuca göre TWIST1 ile TLN1 ifadesi arasında pozitif bir korelasyonun olduğu söylenebilir.

Filamin beta (FLNB), hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve migrasyonunu düzenleyen reseptörler ve hücre içi proteinlerle etkileşime giren aktin bağlayıcı bir proteindir (Zieba, J., ve ark., 2022). Hücre bütünlüğünün sağlanmasını integrinlerle etkileşime girerek gerçekleştirir. Yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde eksprese olması pankreas kanseri, prostat kanseri, metastatik meme kanseri ve hepatite dâhil olmak üzere birçok hastalıkla klinik olarak ilişkilendirilmiştir (Zhou, A. X., ve ark., 2010). FLNB'nın kanserle ilişkisini açıklamak için yapılan çalışmalarda bazı kanser türlerinde artış gösterirken bazı kanser türlerinde de FLNB'nın ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Akciğer kanserinde FLNB'nın ekspresyon seviyesinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Bandaru, S., ve ark., 2014, Zieba, J., ve ark., 2022). Akciğer kanseri hücrelerinde FLNB geni susturulduğu zaman hücrelerin fizyolojinin değiştiği ve hücrelerin invazyon yeteneğinin azaldığı gözlemlenmiştir (Bandaru, S., ve ark., 2014, Zieba, J., ve ark., 2022; Zhou, A. X., ve ark., 2010). Bu çalışmada, TWIST1 baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde FLNB'nın ekspresyonunun, kontrol hücrelere göre 4,87-kat azaldığını saptandı. Bu sonuç TWIST1'in FLNB'nın ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediğini gösterir. MDA-MD-231 hücrelerinde FLNB'nın ekspresyon seviyesi TWIST1 geni ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Literatür ile uyumlu olarak, FLNB MDA-MD-231 hücrelerinde morfolojik değişikliklere yol açmaktadır. TWIST1 geni aktif olarak eksprese olduğu kontrol MDA-MD-231 hücrelerinin morfolojisi ile TWIST1 baskılanan hücreler arasındaki morfolojik farklılıkların meydana gelmesinde FLNB'nın da rolü olduğu düşünülebilir.

Hücreler arası bağlantılar kanser invazyon düzeyi açısından belirleyici olmaktadır. Bu bağlantılardan biri olan sıkı bağlantı (tight junction) yapıları PAR6 polarite kompleksi ile sıkı bağlantılar kurar. Bu multiprotein kompleksi; morfolojik değişikliklerin düzenlenmesinde görev yaparlar. Bu düzenleme kompleksi korunmuş üç temel yapı içerir; PAR6, PAR3 ve aPKC(atypical protein kinase) (Aranda, V., ve ark., 2006; Vilorio-Petit, A., ve ark., 2009). Düzenleyici kompleks yapıda ilk tanımlanan bileşen PAR6'dır. PAR6, asimetrik hücre bölünmesini sağlayan temel yapıdır. PAR6'nın ekspresyonun bazı kanser türlerinde arttığı gösterilmiştir (Vilorio-Petit, A., ve ark., 2009). PAR6'nın ilişkili olduğu kanser türlerinden biri meme kanseridir (Ren, X. 2000). Günümüzde kanserleşme sürecindeki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. PAR6'nın dâhil olduğu ErbB2-Par6-aPKC kompleksinin anti-apoptotik özelliği olduğu ve bu özelliğin,

ErbB2–Par6–aPKC'nin apikal-bazal polariteyi bozma yeteneği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Viloria-Petit, A., ve ark., 2009; Ren, X. 2000). Bu tez çalışmasında, TWIST1'in baskılanması sonucunda PAR6 ekspresyonunda azalma (1,86-kat) olduğu saptandı. TWIST1 ile PAR6 ekspresyonu arasında doğru orantı olduğu bu çalışmada hem genom analizi hem de qPCR ile doğrulanmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında TWIST1 ile PAR6 arasındaki ilişkinin daha detaylı araştırılması meme kanserinde PAR6'nın apoptoz sürecindeki rollünün aydınlatılması için faydalı olacağını söylenebilir.

Tez çalışmamız temelde TWIST1'in ifadesinin eksikliğine bağlı olarak MDA-MD-231 hücrelerinin gen ifade profilindeki değişimlerin saptanmasına dayanmaktadır. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, TWIST1'in baskılanmasına bağlı olarak ifadesi azalan bir diğer gen Fibronektin 1 (FN1) genidir. FN1, hücre-matriks ve hücre-hücre adezyonu, hücre mobilitesi, opsonizasyon, yara iyileşmesi ve hücre şeklinin korunması gibi hücre canlılığına etki eden süreçlerde görev almaktadır (Bae, Y. K., ve ark., 2013; Lin, T. C., ve ark., 2019; Ruoslahti, E., 1999). Ayrıca, hücre farklılaşması ve onkojenik dönüşümde de önemli roller oynar (Lin, T. C., ve ark., 2019; Ruoslahti, E. ve ark., 1999). Literatürde, FN1 yüksek ifadesi kanser metastazını başlatıcı etkiye sahip olduğu ve bazı kanser türleri için biyobelirteç olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir (Lin, T. C., ve ark., 2019). Meme kanseri, yumurtalık kanseri ve prostat kanserlerinde FN1 ekspresyonu ile hücre invazyonu arasında pozitif etkileşim olduğu gösterilmiştir (Sponziello, M., ve ark., 2016). Bu çalışma sonucunda MDA-MD-231 hücrelerinde FN1 ekspresyon seviyesinin TWIST1 baskılanmasına bağlı olarak 3-kat azaldığını saptadı. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda TWIST1 ile FN1'in meme kanseri hücrelerinde ilişkili olduğunu ve doğru orantılı olarak eksprese olduğu gözlemlendi.

Moleküler bazlı çalışmalar ve tekniklerdeki gelişmeler sayesinde kanserleşme sürecinin temelde ne kadar kompleks bir süreç olduğu anlaşılmaktadır. Bu süreçte gen ifade regülasyonların birden fazla parametreden etkilenmesi söz konusudur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, TWIST1 transkripsiyon faktörünün gen ifadesini etkilediği diğer bir gen Aktinin alfa-1 (ACTN1)'dir. 891 amino asitten oluşan ACTN1, 104 kD ağırlığa sahip bir hücre iskeleti proteindir. ACTN1 hücre içinde bağlayıcı proteinlerin oluşumu, organizasyonu ve özelleştirilmesi için gereklidir (Craig, D. H., ve ark., 2007). Hücre iskeleti organizasyonu ve kas kasılmasında yapısal ve düzenleyici rolleri vardır. ACTN1 çok fonsiyonlu bir proteindir. ACTN1, kolon kanseri hücrelerinde fokal adezyon kompleksi ve hücre iskeletinde sinyal iletiminde görev yapmaktadır (Craig, D. H., ve ark., 2007). ACTN1'in meme kanseri hücrelerinde CLP36 proteini ile etkileşime girdiği

saptanmıştır. Bu etkileşim sayesinde meme kanserinde hücre migrasyonunun tetiklendiği gösterilmiştir (Liu, Z., ve ark., 2015). Çalışma sonuçlarımıza göre, TWIST1 baskılanmasına bağlı olarak ACTN1 ekspresyon seviyesinde 2,44-kat azalma olduğu görüldü. Bu azalmanın ACTN1-CLP36 etkileşimini negatif yönde etkileyebileceğinden dolayı TWIST1 hedefli tedavilerin hücre metastazını azaltıcı yönde etkilerinin olacağı ileri sürülebilir. Bu hipotezin desteklenmesi için ileri deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilebilir.

Bu tez çalışması kapsamında TWIST1 baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde COL5A1, COL4A2, COL12 ve COL3A1'in ekspresyon seviyelerinde meydana gelen ifade değişimlerini mRNA düzeyinde incelendi. Kollajenler toplamda 28 adet alt birimden meydana gelir ve bu genler kendi aralarında dört sınıfa ayrılır. Tüm kollajenlerin fonksiyonları ve özellikleri birbirinden farklıdır. Hücre içerisindeki kollajenlerin organizasyonu ve miktarları farklı mekanizmaları etkileyerek kanserleşme sürecine dâhil olurlar (Asokan, R., ve ark., 1993). Fibriler yapı oluşturan kollajenlerin bir üyesi olan kollajen 5A2, neredeyse her hücrede bulunan küçük bir bağ dokusu bileşenidir. Tip V kollajen, dokuya özgü ekstraselüler matris oluşumunda anahtar role sahiptir (Asokan, R., ve ark., 1993). Bazı patolojik durumlarda da COL5A1'in ekspresyonunda artış saptanmıştır. Literatürde, COL5A1'in bazı malign tümörlerin oluşumunu desteklediği gösterilmiştir. Örneğin, gastrit ve yumurtalık kanserlerinde COL5A1'in ekspresyon seviyesi yüksek düzeydedir (Ren, W., ve ark., 2018). Meme kanseri ve COL5A1 arasındaki ilişkiye yönelik yapılan son araştırmalar gösteriyor ki COL5A1, inflamatuvar olan ve olmayan meme tümörü örneklerinde anlamlı olarak farklı düzeyde olduğu belirlenmiştir (Ren, W., ve ark., 2018; Liu, W., ve ark., 2018). Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz COL5A1'a ifade düzeyine ait veriler, literatür bilgileri ile uyumaktadır. TWIST1 baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde COL5A1'in ekspresyon seviyesinin kontrole kıyasla 5-kat azaldığını saptandı. COL5A1'in ekspresyon seviyesinin artması meme kanserinin ilerlemesine yol açtığı biliniyor (Ren, W., ve ark., 2018). Dolayısıyla COL5A1 baskılanması kanser progresyonunu olumsuz yönde etkileceği öngörülebilir.

TWIST1'e bağlı olarak ekspresyon seviyesi azalan bir diğer gen COL4A2'dir. Yapılan araştırmalarda COL4A2'nin akciğer ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde patogenezi desteklediğine yönelik sonuçlar elde edilmiştir. (JingSong, H., ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında elde edilen COL4A2 genine ait veri bu grubun önerisini destekler niteliktedir. TWIST1 baskılanan MDA-MD-231 hücrelerinde yapılan qPCR analizi

sonucunda COL4A2'nin ekspresyon seviyesinin kontrole göre 1,98-kat azaldığını gözlemlendi.

TWIST1'in baskılandığı hücrelerde ifade düzeyi incelenen bir başka kolajen COL12A1'dir. COL12A1, COL6A3, COL8A1, COL1A2, COL5A2, COL10A1, COL11A1 ve COL2A1 ile birlikte ekstrasellüler matriks proteinlerinin yapısına dâhil olmaktadır (Duan, S., ve ark., 2018). COL12A1, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve kolon kanseri başta olmak üzere birçok kanser türü ile ilişkili olan bir gendir (Wu, Y., ve ark., 2020). Literatürde COL12A1'in kanser biyobelirteci olarak kullanılabilmesine yönelik sonuçlar elde edilmiştir (Wu, Y., ve ark., 2020). COL12A1 birçok kanser türüyle ilişkilendirilmesine rağmen kanser hücrelerindeki fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamıştır. COL12A1'in TWIST1 ile olan ilişkisi incelediği bu çalışmada, TWIST1 yokluğunda COL12A1'in ekspresyonu azaldığını saptandı. Bu azalmanın kontrol hücrelere göre 10,32-kat olduğunu belirledi. COL12A1'in ekspresyon seviyesinde meydana gelen bu azalışın hücrede ne gibi değişikliklere yol açabileceğini tespit etmek için COL12A1'e yönelik fonksiyonel araştırmaların yapılması gerektiğini öngörülebilir.

Bu çalışmada tip III kollajenin MDA-MD-231 hücrelerinde TWIST1'in ifade seviyesiyle ters orantılı olarak ifade edildiğini gözlemledi. COL3A1, ekstrasellüler matriksin bütünlüğünün korunmasında rol alır. Ayrıca COL3A1, COL5A1 ile birlikte onkogenin düzenlenmesine katılır (Han, S., ve ark., 2021). COL3A1'in fazla eksprese olması üçlü negatif meme kanserinin tetiklenmesine neden olmaktadır. COL3A1 katıldığı bir başka kanser türü de kötü prognoza sahip mesane kanseridir (Han, S., ve ark., 2021). COL3A1'in COL5A1 ile birlikte oluşturduğu yapının kanser hücrelerinin büyümesini desteklemektedir (Han, S., ve ark., 2021). Tez çalışması sonucunda COL3A1'in ekspresyon seviyesinin arttığını gözlemlendi. Literatürde, COL3A1'in artması sonucunda kanser gelişiminin desteklediği gösterilmiştir. Fakat çalışmamızda meme kanseri hücrelerinde TWIST1'in baskılanması ile COL3A1'in 7 kat arttığını gözlemlendi. Dolayısıyla hücrelerde COL3A1 ifadesinin TWIST1 ile ters orantılı olarak değiştiğini gösterilmiş oldu. COL3A1'in ekspresyon değişikliğinin etkilerini tam olarak açıklamak için TWIST1 varlığında ve yokluğunda COL3A1'in katıldığı yolların incelenmesi literatür için faydalı olacaktır.

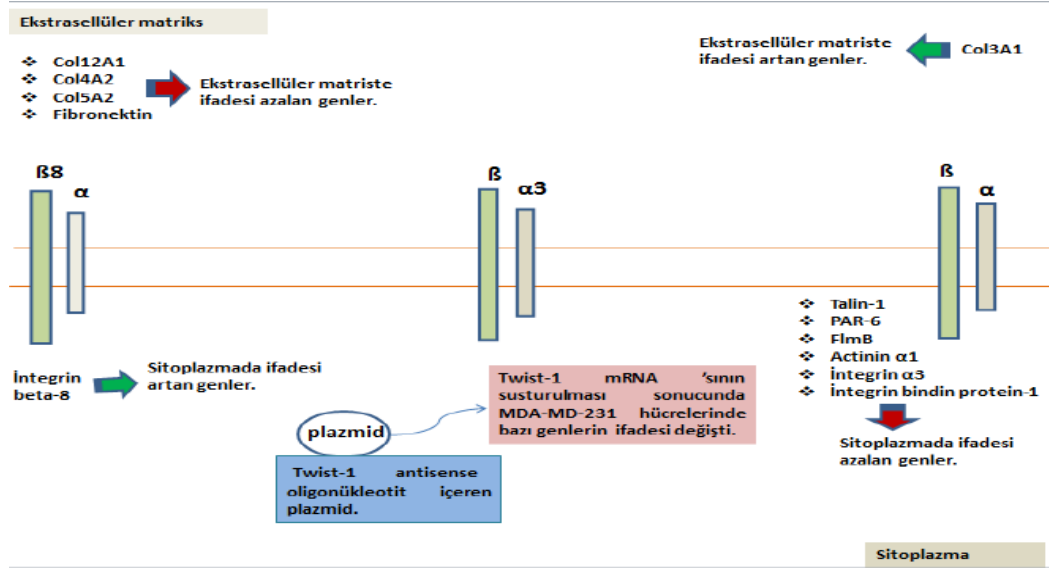
Sonuç olarak bu çalışmada, TWIST1 hedefi olduğunu belirlediğimiz 12 genin hücre morfolijisine, fokal adezyonlara ve kanser gelişimine doğrudan ya da dolaylı bir şekilde etki edebileceğini gösterildi. Bu bağlamda temel regülatör molekül olarak TWIST1 transkripsiyon faktörünün kanser tedavilerinde terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği konusunda katkı sağladığımıza inanıyoruz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında MDA-MD-231 meme kanseri hücrelerinde TWIST1 transkripsiyon faktörünün regüle ettiği genleri saptanması amaçlandı. Bunun için endojen olarak TWIST1 ifade eden MDA-MD-231 hücrelerinde TWIST1 ifadesi antisense oligonükleotit dizileri kullanılarak susturuldu. TWIST1'in baskılanması Western blot deneyi ile doğrulandı. Antisense TWIST1 cDNA dizisi transfekte edilen ve edilmeyen kontrol MDA-MD-231 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Bu örnekler kullanılarak transkriptom analizi yapıldı. Bu analizde anlamlı olduğunu düşündüğümüz bazı genlerin ifade değişimleri qRT-PCR yöntemi ile doğrulandı.

Transkriptom analiz sonuçlarına göre TWIST1 tarafından regüle edildiğini düşündüğümüz integrin yolağında görevli 12 genin ifade düzeylerini incelendi. TWIST1 hedefi olarak belirlenen genler: İntegrin beta-8, İntegrin-1 binding protein, İntegrin alfa-3, Talin-1, Filamin-beta, PAR6-Beta, Fibronectin, Actinin alfa-1, Kolajen-5A2, Kolajen-4A2, Kolejen-3A1 ve Kolajen-12A1'dir. Bu çalışmada saptanan TWIST1 ile doğrudan ilişkili olan integrin reseptörleri; İntegrin beta-8, integrin-3 alfa ve ayrıca integrin binding protein-1'dir. Kontrol MDA-MD-231 hücreleri ile TWIST1 baskılanan test MDA-MD-231 hücrelerinin değişen gen ifadelerinin kıyaslandığı zaman hem sitoplazmada hem de ekstrasellüler matrikste değişen genler olduğu gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. TWİST1'in MD-MD-231 hücrelerinde transkripsiyonunu etkilediği genlerin şematik gösterilmesi.

Sitoplazmada ifadesi artan genler;

- 1) İntegrin Beta-8, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 8.14 kat artı.

Sitoplazmada ifadesi azalan genler;

- 1) İntegrin binding protein-1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 1.91 kat azaldı.
- 2) İntegrin Alfa-3, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 1.91 kat azaldı.
- 3) Aktinin Alfa-1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 2.5 kat azaldı.
- 4) Filamin Beta, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 4.9 kat azaldı.
- 5) PAR-6, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 1.8 kat azaldı.
- 6) Talin-1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 2 kat azaldı.

Ekstrasellüler matriste ifadesi artan genler;

- 1) Kollajen 3A1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 7.5 kat artı.

Sitoplazmada ifadesi azalan genler;

- 1) Kollajen 12A1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 10.1 kat azaldı.
- 2) Kollajen 4A2, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 2.1 kat azaldı.
- 3) Kollajen 5A2, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 5.2 kat azaldı.
- 4) Fibronektin 1, TWİST1'in baskılanmasına bağlı olarak 3.1 kat azaldı.

5.2. Öneriler

- 1) Bu tez çalışmasında TWIST1 ile integrin yolağı arasında bir etkileşim olduğu belirledik. Fakat bu ilişkinin tam olarak açıklanabilmesi için bu alanda fonksiyonel çalışmaların yapılmasını öneriyoruz.
- 2) TWIST1 ile COL3A1 arasında pozitif ilişki olduğunu saptadık. COL3A1 ve TWIST1'in kanser oluşumunu desteklediği biliniyor fakat iki faktörün birbirini etkileme şekillerinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği bilinmediğinden dolayı bu alanda yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç vardır.
- 3) TWIST1 ile İntegrin alfa-3 arasındaki ilişkiyi açıklığa kavuşturulması kanser progresyonunun anlaşılmasına katkı sağlayabilecek potansiyeli söz konusudur.
- 4) Kanser oluşumunun gözlendiği hücrelerde hücre adezyonun arttığı bilenen bir gerçektir. TWIST1'in hücre adezyonu üzerindeki etkisini hangi genleri düzenleyerek yaptığını açıklamak için detaylı araştırmaya yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz.
- 5) TWIST1'in meme kanseri mekanizmasında rol aldığı biliniyor fakat İntegrin sinyalleri ile ilgili literatür sınırlıdır. Bu bağlamda TWIST1'in İntegrin yolaklarındaki rolünün aydınlatılması kanser tedavisi açısından yararlı olacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

Apaydın, E. 2019. Hücre içi Mekanizöalara Dayalı Intraselüler Kalsiyum Artışının Apoptoz Üzerine Etkileri (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

Aranda, V., Haire, T., Nolan, M. E., Calarco, J. P., Rosenberg, A. Z., Fawcett, J. P., ... & Muthuswamy, S. K. 2006. Par6–aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nature cell biology*, 8(11), 1235-1245.

Asokan, R., Reddy, G. K., & Dhar, S. C. 1993. Neoplastic association of enhanced type V collagen production in rat fibrosarcoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 120(1), 25-32.

Bae, Y. K., Kim, A., Kim, M. K., Choi, J. E., Kang, S. H., & Lee, S. J. 2013. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer. *Human pathology*, 44(10), 2028-2037.

Bandaru, S., Zhou, A. X., Rouhi, P., Zhang, Y., Bergo, M. O., Cao, Y., & Akyürek, L. M. (2014). Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis*, 3(9), e119-e119.

Biancolella, M., Testa, B., Salehi, L. B., D'Apice, M. R., & Novelli, G. (2020, April). Genetics and Genomics of Breast Cancer: update and translational perspectives. In *Seminars in cancer biology*. Academic Press.

Bora Başara, B., Soyutun Çağlar, İ., Aygün, A., Özdemir, T. A., Kulali, B., & Uzun, S. B. (2018). TC Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2017. Ankara: TC Sağlık Bakanlığı.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

Bulut, D. 2019. Otokrin büyüme hormonu (BH) sinyalinin curcumin'e karşı direnç mekanizmasındaki rolünün endoplazmik retikulum stres ve otofajik yollara bağlı olarak MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde irdelenmesi (Doctoral dissertation, İstanbul Kültür Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı).

Bügül Kılınçarslan, M. 2021. İmatinib dirençli K562R hücre hattında kemoterapötik ajanların oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin sığla yağı ile ortadan kaldırılması (Master's thesis, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 14(11), 911-915.

Craig, D. H., Haimovich, B., & Basson, M. D. 2007. α -Actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(6C1862-C1874).

Çakmak, G. K., Emiroğlu, S., Sezer, A., Canturk, N. Z., Yeniay, L., Kuru, B., ... & Ozmen, V. 2020. Surgical trends in breast cancer in Turkey: an increase in breast-conserving surgery. *JCO global oncology*, 6, 285-292.

Çapanoğlu, G., & Bakar, E. 2018. Meme Kanseri Ve Meme Kanseri Metastazında Rol Oynayan Moleküler Prognostik Faktörler. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 40-44.

Çelik, E. 2008. Hepatosellüler karsinoma hücre motilitesinde PKB/Akt/mTOR sinyal yolağının önemi (Doctoral dissertation, DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Dekkers, J. F., van Vliet, E. J., Sachs, N., Rosenbluth, J. M., Kopper, O., Rebel, H. G., ... & Rios, A. C. 2021. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nature Protocols*, 16(4), 1936-1965.

Dindaroğlu, G. 2019, Yeni sentezlenen 4-amino antipirin türevli bir Schiff bazı bakır (II) kompleksinin insana ait normal ve adenokarsinom meme hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Denoyelle, C., Albanese, P., Uzan, G., Hong, L., Vannier, J. P., Soria, J., & Soria, C. 2003. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cellular signalling*, 15(3), 327-338.

Duan, S., Gong, B., Wang, P., Huang, H., Luo, L., & Liu, F. 2018. Novel prognostic biomarkers of gastric cancer based on gene expression microarray: COL12A1, GSTA3, FGA and FGG. *Molecular medicine reports*, 18(4), 3727-3736.

Dükel, M. 2016. Kültüre edilmiş meme kanseri hücrelerinde ATM, TRIM29, TWIST1 ifadesini kontrol eden moleküler mekanizmaların araştırılması.

Dindaroğlu, G. Yeni sentezlenen 4-amino antipirin türevli bir Schiff bazı bakır (II) kompleksinin insana ait normal ve adenokarsinom meme hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Eroğlu Köksal, E. 2019. Meme Kanserinde Doğal Biyoaktif Bileşenlerin Antikanser Etkilerinin Karşılaştırmalı Araştırılması (Doctoral dissertation, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Fang, K. P., Dai, W., Ren, Y. H., Xu, Y. C., Zhang, S. M., & Qian, Y. B. 2016. Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell. *BMC cancer*, 16(1), 1-9.

Geiersbach, K. B., Chen, H., Emmadi, R., Haskell, G. T., Lu, X., Liu, Y. J., & Swisshelm, K. 2020. Current concepts in breast cancer genomics: an evidence based review by the CGC breast cancer working group. *Cancer Genetics*, 244, 11-20.

Gezici, S. Karşılaştırmalı Proteomiks Ve Biyoinformatik Analizler İle Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Protein Biyomarkırların Belirlenmesi.

Gökdeniz Yıldırım, A. 2019. Meme kanserinin prognozunu etkileyen mirna'lar

Gül, A., & Aygin, D. 2021. Çocukluk ve Adölesan Dönem Meme Kanseri.

Güneş, B. D., & Nilüfer, A. C. A. R. Meme Kanserinden Korunmada ve Meme Kanseri Tedavisinde Akdeniz Diyetinin Etkisi. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 5(2), 442-454.

Han, S., Wang, Z., Liu, J., Wang, H. M. D., & Yuan, Q. 2021. miR-29a-3p-dependent COL3A1 and COL5A1 expression reduction assists sulforaphane to inhibit gastric cancer progression. *Biochemical Pharmacology*, 188, 114539.

Holle, A. W., Young, J. L., & Spatz, J. P., 2016. In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 270-279.

Hu, Y., An, Q., Sheu, K., Trejo, B., Fan, S., & Guo, Y. 2018. Single cell multi-omics technology: methodology and application. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 28.

Hu, Y., An, Q., Sheu, K., Trejo, B., Fan, S., & Guo, Y. 2018. Single cell multi-omics technology: methodology and application. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 28.

Jagannathan, M., Cummings, R., & Yamashita, Y. M. 2018. A conserved function for pericentromeric satellite DNA. *Elife*, 7, e34122.

Jiang, D., Jia, Y., Zhou, Y., & Jarrett, H. W. (2009). Two-dimensional southwestern blotting and characterization of transcription factors on-blot. *Journal of proteome research*, 8(7), 3693-3701

JingSong, H., Hong, G., Yang, J., Duo, Z., Li, F., WeiCai, C., ... & Zou, C. 2017. siRNA-mediated suppression of collagen type iv alpha 2 (COL4A2) mRNA inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget*, 8(2), 2585.

Kandel E.S. and Hay N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine Kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*, 253(1): p. 210-29.

Kasurka, C. B. Moleküler Toksikoloji ve "Omik" Teknolojileri. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(1), 42-55.

Kaya, N. 2019. Yeni nesil dizileme yöntemi ile brca1 ve brca2 genlerinde tespit edilmiş varyantların biyoinformatik yöntemlerle analizleri: Retrospektif çalışma (Master's thesis, Bursa Uludağ Üniversitesi).

Kleer, C. G., van Golen, K. L., & Merajver, S. D. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Research*, 2(6), 1-7

Kumar, V., Maurya, V. K., Joshi, A., Meeran, S. M., & Jha, R. K. 2015. Integrin beta 8 (ITGB8) regulates embryo implantation potentially via controlling the activity of TGF-B1 in mice. *Biology of Reproduction*, 92(4), 109-1.

Kumar, C. C. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, 17(11), 1365-1373.

Kutlu, S., 2019. Meme Kanserinde Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Ldl) Ve Krill Yağının Olası Antiproliferatif Ve Apoptotik Etkileri (Doctoral dissertation, Marmara Üniversitesi (Turkey)).

Lin, T. C., Yang, C. H., Cheng, L. H., Chang, W. T., Lin, Y. R., & Cheng, H. C. 2019. Fibronectin in cancer: friend or foe. *Cells*, 9(1), 27.

Liu, W., Wei, H., Gao, Z., Chen, G., Liu, Y., Gao, X., ... & Xiao, J. 2018. COL5A1 may contribute the metastasis of lung adenocarcinoma. *Gene*, 665, 57-66.

Liu, L., Ke, M., Shang, C., Liu, Y., Wang, C., & Zheng, X. 2021. TEAD4 Induced Positive Feedback Activation of E2R/YAP1 Axis and Promoted Epithelial-mesenchymal Transition through Up-regulating TWIST1 Directly in HCC.

Liu, Z., Zhan, Y., Tu, Y., Chen, K., & Wu, C. 2015. PDZ and LIM domain protein 1 (PDLIM1)/CLP36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with α -actinin. *Oncogene*, 34(10), 1300-1311.

Lortet-Tieulent, J., Georges, D., Bray, F., & Vaccarella, S. 2020. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *International Journal of Cancer*, 147(11), 3029-3036.

Mater, Y. 2019. Effects of Fluorescent Marked Maackia Amurensis-Lectin-1 and Wheat Germ Agglutinin on the Cell Surface Glycan Profiles in Two Different Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 82(2), 89-95.

Mohammed S. Razzaque, Azeddine Atfi/ TGIF1-TWIST1 axis in pancreatic ductal adenocarcinoma/ Department of Pathology, Lake Erie College of Osteopathic Medicine, Erie, PA, USA/ <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.023>

Naik, M. U., & Naik, U. P. (2011). Calcium-and integrin-binding protein 1 regulates microtubule organization and centrosome segregation through polo like kinase 3 during cell cycle progression. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(1), 120-129.

Özdemir S. T. 2020. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Stromal Hücrelerinin Blastlarla Etkileşimi Sonrası Transkriptom Analizi (Doctoral dissertation, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Özkara, G., Öztürk, O., & AYDOĞAN, H. Y. 2020. Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed*, 10(1), 38-48.

Pehlivanoglu, S., & ACAR, Ç. A. 2020. PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(1), 107-116.

Pehlivanoglu, S. 2014. TWIST1 transkripsiyon faktörünün aktivasyon mekanizmasının ve doğal inhibitörlerinin araştırılması

Pilanci, K. N., Alço, G., Ordu, Ç., Çiftçi, R., Iyigün, Z. E., Çelebi, F., ... & Özmen, V. 2016. Metastatik Meme Kanserinde Zoledronik Asit Tedavisinin Önemli Bir Yan Etkisi: Renal Yetmezlik/Important side effect of zoledronic acid treatment in metastatic breast cancer: renal failure. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*, 50(3), 205.

Puhl, A. C., Bogart, J. W., Haberman, V. A., Larson, J. E., Godoy, A. S., Norris-Drouin, J. L., ... & Pearce, K. H. 2020. Discovery and characterization of peptide inhibitors for calcium and integrin binding protein 1. *ACS chemical biology*, 15(6), 1505-1516

Ren, W., Zhang, Y., Zhang, L., Lin, Q., Zhang, J., & Xu, G. 2018. Overexpression of collagen type V $\alpha 1$ chain in human breast invasive ductal carcinoma is mediated by TGF- $\beta 1$. *International Journal of Oncology*, 52(5), 1694-1704.

Ren, X. 2000. Isolation and characterization of PAR-1 and PAR-6 homologs in *Helobdella robusta*. University of California, Berkeley.

Rochfort, S. 2005. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of natural products*, 68(12), 1813-1820.

Ruoslahti, E. 1999. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Advances in cancer research*, 76, 1-20.

Sarıman, M., Ekmekci, S. S., Abacı, N., Çakiris, A., Paçal, F., Emrence, Z., ... & Öztürk, Ş. Yeni nesil dizileme teknolojisi ile transkriptom analizi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 5(10), 51-59

Sayitoğlu, M. 2020. Lösemi Modelinde Tüm Genom RNA Dizileme Analiz Algoritması Geliştirilmesi.

Subbaram, S., & DiPersio, C. M. 2011. Integrin $\alpha3\beta1$ as a breast cancer target. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(10), 1197-1210.

Sudhakar, A., 2009, History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.

Sponziello, M., Rosignolo, F., Celano, M., Maggisano, V., Pecce, V., De Rose, R. F., ... & Bulotta, S. 2016. Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 431, 123-132.

Şahin, H. H. K., Aslan, O., & Şahin, M. 2020. Evaluation of cancer-related deaths in Turkey between 2009-2018: An epidemiological study. *Journal of Surgery and Medicine*, 4(8), 674-677.

Tremblay, B. J., Lobb, B., & Doxey, A. C. 2021. PhyloCorrelate: inferring bacterial gene-gene functional associations through large-scale phylogenetic profiling. *Bioinformatics*.

Thisse, B., Messal, M. E., & Perrin-Schmitt, F. 1987. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic acids research*, 15(8), 3439-3453.

Ünal, U. 2020. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom'da RNA temelli biyobelirteçlerin biyoinformatik ve moleküler analiz yöntemleri ile araştırılması (Master's thesis, Bursa Uludağ Üniversitesi)

Viloria-Petit, A. M., David, L., Jia, J. Y., Erdemir, T., Bane, A. L., Pinnaduwege, D., ... & Wrana, J. L. 2009. A role for the TGF β -Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14028-14033.

Yang, W. H., Lan, H. Y., Huang, C. H., Tai, S. K., Tzeng, C. H., Kao, S. Y., ... & Yang, M. H. (2012). RAC1 activation mediates TWIST1-induced cancer cell migration. *Nature cell biology*, 14(4), 366-374.

Zerrin, I. Ş. I. K. 2018. Kanser alt-türlerinin sınıflandırılması için rna-sekanslama ve rppa verilerinin karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 20(59), 606-621.

Zhu, Q. Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y., & Lv, T. 2016. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumor Biology*, 37(1), 185-197.

Zhou, A. X., Hartwig, J. H., & Akyürek, L. M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in cell biology*, 20(2), 113-123

Zieba, J., Forlenza, K. N., Heard, K., Martin, J. H., Bosakova, M., Cohn, D. H., ... & Krakow, D. (2022). Intervertebral disc degeneration is rescued by TGF β /BMP signaling modulation in an ex vivo filamin B mouse model. *Bone research*, 10(1), 1-12.

Wang, D., & Bodovitz, S. 2010. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends in biotechnology*, 28(6), 281-290

Wang, T., & Huang, Y. 2021. Downregulation of hsa_circ_0001681 suppresses epithelial-mesenchymal transition in thyroid carcinoma via targeting to miR-942-5p/TWIST1 signaling pathway. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1-12

Wang, W. W., Wang, Y. B., Wang, D. Q., Lin, Z., & Sun, R. J. 2015. Integrin beta-8 (ITGB8) silencing reverses gefitinib resistance of human hepatic cancer HepG2/G cell line. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(2), 3063.

Wang, S. M., Coljee, V. W., Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O., Cristofalo, V. J., & Sierra, F., 1997. Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene*, 187(1), 83-92.

Weigelt, B., Peterse, J. L., & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*, 5(8), 591-602

Wu, Y., & Xu, Y. 2020. Integrated bioinformatics analysis of expression and gene regulation network of COL12A1 in colorectal cancer. *Cancer medicine*, 9(13), 4743-4755.