

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARENTAL OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNİN OLAPARİB YANITINDA MUM1 PROTEİNİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM KİŞEÇOK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU

BİNGÖL - 2023

**PARENTAL OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNİN OLAPARİB YANITINDA MUM1 PROTEİNİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU danışmanlığında, Çiğdem KIŞEÇOK tarafından hazırlanan bu çalışma 23/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği (3/0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan :	Prof. Dr. Abdullah ASLAN	İmza :
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU	İmza :
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN	İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma **TÜBİTAK 1002** programı kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: **218S877**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik hayatıma çok kıymetli katkılar sunan, tez çalışmamın planlaması aşamasında, yürütülme sürecinde engin bilgi ve birikimi ile tezimin ilerlemesine katkı sağlayan, araştırmamın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen değerli danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU hocama minnettarlığımı sunuyorum. Dr. Öğr. Mehmet Kadir ERDOĞAN' a Kanser Laboratuvarı çalışan arkadaşlarımdan Yusuf TOY' a, Ronahi AŞKAN'a teşekkür ederim. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) tarafından **218S877** no'lu proje numarasıyla desteklenmiştir. Bu değerli destek için Kurum'a teşekkürü borç bilirim. Her zaman bana güvenen her zorlukta bana destek olan canım aileme, hayatıma anlam katan ve benimle beraber tüm sıkıntılara eşlik eden canım eşim yol arkadaşım Mustafa KİŞEÇOK 'a çok teşekkür ederim .

Çiğdem KİŞEÇOK

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. DNA Hasar Yanıt (DDR) Mekanizması.....	5
2.2.1. DDR Sinyalizasyonu.....	6
2.2.2. Homolog rekombinasyon (HR) DNA tamiri.....	9
2.2.3 Homolog olmayan uçların birleşmesi (NHEJ) tamiri.....	11
2.3. Sentetik letalite - PARP inhibitörü.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	26
3.2.2. Gerçek zamanlı PCR analizi	26
3.2.3. Agaroz jel elektroforez.....	27
3.2.4. Western blot.....	28
3.2.5. İn vitro MTT analizi.....	28
3.2.6. Koloni sağ - kalım analizi.....	29
3.2.7. PARP inhibitörü olaparibe dirençli (PIR) hücre kolonlarının geliş tirilmesi.....	29
3.2.8. İstatiksel analiz.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Azalan MUM1 ekspresyonunun hücre canlılığı ve koloni sağ – kalımın	

olan etkisi.....	31
4.2. PARP inhibisyonunun MUM1 ekspresyonuna olan etkisi.....	43
4.3. MUM1 - defektif MDA - MB - 231 meme kanseri hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesinin belirlenmesi.....	45
4.4. MUM1 - PARP inaktivasyonunun BRCA2 - defektif MDA - MB - 231 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi.....	48
4.5. Olaparibe karşı dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7 / PIR) MUM1 protein seviyesinin belirlenmesi.....	50
4.6. Olaparibe karşı dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7 / PIR) MUM1 ve PARP1 / 2 ikili inhibisyonunun in vitro sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	52
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

MUM1	: Mutated melanoma associated antigen 1
DDR	: DNA hasar yanıt
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz enzimi
PWWP	: Kromatin metilleyici okuyucusu
MDA-MB-231	: Üçlü negatif meme kanseri hücre dizisi
BRCA1\2	: Meme kanseri 1\2
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SSB	: DNA tek zincir kırıkları
BER	: Baz ekzisyon tamiri
qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
HRR	: Homolog rekombinasyon tamiri
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
Wild-type	: Tedavi edilmemiş normal hücre
FDA	: Amerikan Gıda ve ilaç dairesi
RPE1	: Retina pigment epiteli hücreleri
p53	: Tümör protein 53
p21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
NHEJ	: DNA çift zincir kırıkları homolog olmayan uç birleşimi
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
FBS	: Fetal bovin serum
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
MCF7	: Meme hücrelerinin luminal epiteryal fenotipi işaretleyicisi
NaCl	: Sodyum klorür
IR	: İyonlaştırıcı radyasyon

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1.	Agaroz jel elektroforezde kullanılan çözeltiler.....	20
Tablo 3.2.	Western blot analizinde kullanılan çözeltiler.....	20
Tablo 3.3.	Western blot analizinde kullanılan antikorlar.....	22
Tablo 3.4.	RNA interferans analizinde kullanılan siRNA kompleksleri.....	22
Tablo 3.5.	qRT-PCR analizinde kullanılan primerler.....	22
Tablo 3.6.	Hücre canlılık analizinde kullanılan reaktifler.....	23
Tablo 3.7.	Koloni sağ-kalım analizinde kullanılan solüsyonlar.....	23
Tablo 3.8.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar.....	23
Tablo 3.9.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan temel plastik gereçler...	25
Tablo 3.10.	Genel laboratuvar çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler...	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Neoplastik hücrelerin transformasyon sürecinde kazandığı özellikler....	5
Şekil 2.2.	DNA hasar yanıt sistemi.....	8
Şekil 2.3.	Homolog rekombinasyon (HR) DNA çift zincir kırık onarım mekanizması.....	11
Şekil 2.4.	DNA çift zincir kırık onarımı NHEJ tamir mekanizması.....	13
Şekil 2.5.	DNA hasar yanıt bağlamında sentetik letalite konsepti.....	16
Şekil 2.6.	BRCA1/2 ve PARP enzimleri arasındaki tanımlanan sentetik letalite...	18
Şekil 4.1.	Normal ve kanser hücre hatlarında MUM1 ekspresyon profili.....	32
Şekil 4.2.	MDA-MB-231 ve RPE1 hücrelerinde MUM1 mRNA'sını hedefleyen siRNA komplekslerinin optimizasyonu.....	34
Şekil 4.3.	MDA-MB-231 hücrelerinde BRCA2 mRNA sını hedefleyen siRNA komplekslerinin optimizasyonu.....	36
Şekil 4.4.	Azalan MUM1 ekspresyonunun MDA-MB-231 ve RPE1 hücre canlılığına olan etkisi.....	37
Şekil 4.5.	Azalan MUM1 ekspresyonunun MDA-MB-231 koloni sağ-kalımına etkisi.....	39
Şekil 4.6.	Azalan MUM1 miktarının p53 ve p21 protein ekspresyonuna olan etkisi	41
Şekil 4.7.	Azalan MUM1 ekspresyonunun p53 ve p21 transkripsiyon profiline olan etkisi.....	42
Şekil 4.8.	PARP inhibisyonunun MUM1 protein ekspresyonuna etkisi.....	44
Şekil 4.9.	MUM1 defektif MDA-MB-231 kanser hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesinin belirlenmesi.....	46

Şekil 4.10.	PARP inhibitör tedavisinin MUM1 defektif hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	47
Şekil 4.11.	MUM1-PARP ikili inhibisyonunun BRCA2 defektif meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi.....	49
Şekil 4.12.	PARP inhibitörü olaparibe karşı dirençli MCF7 kolnlarının (MCF7/PIR) oluşturulması.....	50
Şekil 4.13.	MCF7 parental ve PIR hücrelerindeki MUM1 ekspresyonunun belirlenmesi.....	51
Şekil 4.14.	Olaparibe dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7/PIR) MUM1 ve PARP1/2 ikili inhibisyonunun kanser koloni sağ-kalımına etkisinin belirlenmesi....	52

PARENTAL OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN OLAPARİB YANITINDA MUM1 PROTEİNİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

MUM1 (EXPAND1) proteininin DNA hasarına karşı hücre sağ-kalımını desteklediği gösterilmiştir. DNA hasarı durumunda, MUM1 proteininin tümör süppressör 53BP1 proteiniyle etkileşime girdiği ve neticede hasarlı kromatin bölgesinde toplanarak kromatin relaksasyonunu desteklediği bildirilmiştir. DNA hasarına uğrayan MUM1-inaktif hücrelerde ise defektif kromatin dekonkonsansasyonu nedeniyle oluşan lezyonların biriktiği ve bu nedenle söz konusu hücrelerin genotoksik saldırılara daha hassas hale geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, MUM1 protein seviyesinin klinikte başarılı sonuçlar sağlayan PARP inhibitör tedavi yanıtının tahmininde kullanılabilir bir biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür.

Projemizin amacı, PARP inhibitör tedavi yanıtının tahmin edilebilmesi için MUM1 ekspresyon seviyesinin parental ve olaparib dirençli kanser hücrelerinde prediktif bir biyobelirteç olarak kullanılabilir olup olmadığının araştırılmasıdır. Memeli hücre kültürü teknikleri ve MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılarak gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, MUM1 biyolojisinin normal şartlar altında ve eksojen DNA hasarı durumundaki fonksiyonel etkisi araştırıldı. Endojen olarak eksprese edilen hedef genlerin mRNA'ları RNA interferans teknolojisi kullanılarak susturuldu. Western blot analizleri gerçekleştirilerek siRNA manipölasyonları teyit edildi ve farklı protein ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Kantitatif PCR tekniği kullanılarak MUM1-efektif ve defektif hücrelerdeki p53 ve p21 mRNA miktarları karşılaştırıldı. MUM1'in tekli veya PARP ile birlikte ikili inaktivasyonunun BRCA2-efektif veya defektif arka planlarda hücre canlılığına veya koloni sağ-kalımına olan etkileri in vitro sitotoksisite analizleriyle belirlendi. Sürekli seleksiyon tekniğiyle kullanılarak olaparib-dirençli MCF7 meme kanseri hücreleri geliştirildi ve MUM1 proteininin olaparib tedavisine olan katkısı değerlendirildi. Elde ettiğimiz sonuçlar, MUM1'in baskılandığı hücrelerde p53 ve p21 aktivelerinin geçici olarak arttığını ancak bu durumun hücre canlılığına ve koloni sağ-kalımına etki etmediğini gösterdi. MUM1 proteininin PARP inhibitör tedavisine karşı MDA-MB-231 meme kanseri hücre sağ-kalımını desteklediği, dolayısıyla MUM1 ekspresyonunun PARP inhibitör yanıtının tahmininde kullanılabilir bir biyobelirteç olabileceği belirlendi.

Sonuç olarak projemiz, önemli bir DNA hasar yanıt faktörü olma potansiyeli taşıyan MUM1 proteininin daha kapsamlı araştırmaların yapılmasıyla prediktif bir biyogösterge olarak klinikte hasta stratifikasyonunda kullanılabilir olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: MUM1, kromatin düzenlenmesi, sentetik letalite, PARP inhibisyon

PARENTAL OLAPARIB-RESISTANT MCF7 BREAST CANCER INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MUM1 PROTEIN ON THE CELLS RESPONSE TO OLAPARIB

ABSTRACT

MUM1 (EXPAND1) protein was revealed to support cell survival against DNA damage. Upon DNA damage, MUM1 interacts with the tumour suppressor 53BP1 and consequently become recruited towards the damaged chromatin to support the chromatin relaxation. In response to DNA damage, the chromatin decondensation becomes defective in MUM1-deficient cells, which are therefore sensitised to genotoxic insults. In addition, a genome-wide screen identified MUM1 levels as a potential biomarker to predict the treatment response of PARP inhibitors that provide successful outcomes in the clinic.

Our project aimed to investigate whether MUM1 levels can be used as a predictive biomarker of PARP inhibitor treatment. Mammalian cell culture was used to uncover the functionaleffect of MUM1 biology in cells with/without exogenous DNA damage. The RNA interference was utilised to knockdown the mRNA expression of target genes. siRNA manipulations were confirmed and different expression profiles were studied by Western blotting analysis. p53 and p21 mRNA levels in MUM1-effective and defective cells were analysed by quantitative PCR analysis. In vitro cytotoxicity analyses were conducted to assess the effect of inactivation of MUM1 alone or together with PARP on the cell viability and colony survival of BRCA-effective or defective cells. The results showed that p53 and p21 activations temporarily increased in cells with MUM1-knockdown, however, MUM1 deficiency did not affect the viability and clonogenic survival of cells compared to controls. Our experiments revealed that MUM1 supports MDA-MB-231 cell survival against PARP inhibition, suggestingMUM1 expression as a biomarker that can be used to predict PARP inhibitor response. As a result, our findings suggested that MUM1 protein might deserve future research to become a potential PARP inhibitor biomarker for patient stratification in the clinic.

Keywords: MUM1, chromatin remodeling, synthetic lethality, PARP inhibition

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerin bölünmesi, büyümesi veya programlı bir şekilde ölmesi gibi hayati süreçlerinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mutasyona uğraması, normal bir hücrenin karsinogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır (Weinberg, 2007). Son zamanlarda basılan raporlar, daha önce belirlenmiş kanser özelliklerine (Hanahan ve Weinberg, 2000) ek olarak genomik dengesizlikler kanserin oluşması sırasında önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. (Hanahan ve Weinberg, 2011). Genel olarak bakıldığında genomda oluşan mutasyon birikimleri tümör baskılayıcı genleri durdurarak onkogenik genleri aktifleştirir ve hücrelerin kontrolünü kaybedip durmadan çoğalmasına ve neoplastik transformasyona sebep olur. (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Hoeijmakers, 2009). Genomik replikasyon ve kromozomal segregasyon süreçlerinde oluşan endojen DNA hasarlarına (replikasyon stresi, telomer kısalması, serbest oksijen radikalleri vb. nedenlerle) ilaveten, hücre DNA'sı sürekli olarak bütünlüğünü tehdit eden eksojen kaynaklı kimyasal (kemoterapötik vb.) veya fiziksel (UV ve iyonlaştırıcı radyasyon vb.) saldırılara da maruz kalmaktadır (Nicola J. Curtin, 2012; Goldstein ve Kastan, 2015). Memeli hücrelerinin genomik dengeyi sağlamak için DNA'da oluşan olası hasarları hemen tespit, tamir ve iletimini sağlayan kompleks DNA hasar yanıt mekanizmasına sahiptir. (Ciccio vd., 2010; Gundogdu, Hergovich, vd., 2021; Jackson ve Bartek, 2009). Hasar neticesinde oluşan kimyasal etkiye ilk tepki hücre bölünmesinin anında durdurulmasıdır. Oluşan DNA hasarının tamiri bazen mümkün olmayabilir böyle olduğunda hücre ya programlı olarak ortadan kaldırılır ya da senesans evresine alınır. Hücresel mekanizmaların düzenli çalışmaması ve işlevini yerine getirememesi genomda birçok mutasyonların birikerek kanser gibi hastalıkları oluşturur. (Jackson, 2002; Jackson ve Bartek, 2009; Khanna ve Jackson, 2001; T Lindahl ve Barnes, 2000).

Son yıllarda yayımlanan raporlar moleküler seviyede heterojen davranış sergileyen meme kanserinin en fazla kadınlarda görülen bir kanser çeşidi olduğunu bildirmektedir. (Bray vd., 2018; Harbeck vd., 2019; Sung vd., 2021). Özellikle 40-55 yaş aralığındaki kadınların

ölüm sebeplerine bakıldığında ilk sıralarda bulunan meme kanserinden, yaşam boyu ölüm riskinin %3'den fazla olduğu ve yaklaşık her sekiz kadından birine meme kanseri teşhisinin konulduğu belirtilmektedir (Bray vd., 2018; Libson ve Lippman, 2014; Sung vd., 2021). Son yıllarda gerçekleştirilen önemli çalışmalarla BRCA1 ve BRCA2) genlerinin genetik klonlanması dahil birçok ilerleme sağlanarak meme kanserinin genetik nedenlerinin anlaşılmasında gelişme katedilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 ürünlerinin DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumlu olan homolog rekombinasyon tamir mekanizmasındaki rolleri detaylı çalışılmıştır. BRCA1/2 proteinlerinin işlev kaybının genomik kararsızlığa ve dolayısıyla tümörjenik transformasyona neden olduğu gösterilmiştir (Imyanitov, 2021; Patel vd., 2021). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, tüm meme kanseri vakalarının %10'unda, kalıtsal meme kanseri vakalarının ise %30'unda rapor edilmiştir (Zimmer vd., 2018). Konvansiyonel kanser terapilerine kıyasla genomik ve proteomik profillemenin sunduğu imkanlarla, hastanın ilgili kimyasal /radyolojik tedaviye veya kişiye özel tedavilere vereceği cevabın tahmin edilebilmesi klinik başarının artmasını sağlamıştır. (Byrum vd., 2019; Imyanitov, 2021; Lord ve Ashworth 2013; Patel vd., 2021). Bu kapsamda meme kanseri biyolojisinin daha iyi anlaşılması, farklı farmakolojik hedeflerin tanımlanması ve ayrıca prognostik ve prediktif biyobelirteçlerin karakterize edilmesi, meme kanseri hastalarının daha iyi tedavi edilmesine imkan verecektir.

PARP (poli(ADP-riboz) polimeraz) enzimleri bir çok yolda rol oynar bunların başında DNA tek zincirlerinin onarım mekanizması gelmektedir. 2005 yılında yayımlanan raporlar, PARP inhibisyonunun BRCA1/2-efektif meme kanseri hücrelerine kıyasla defektif hücrelerde sitotoksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005). Klinik öncesi ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlayan çeşitli küçük molekül PARP inhibitörleri olaparib, rucaparib, niraparib ve talazoparib meme ve yumurtalık başta olmak üzere farklı kanser hastalarının tedavilerinde kullanılmak üzere FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) EMA (Avrupa İlaç Ajansı) tarafından onay almıştır. 2014 ve 2016 yıllarında olaparib ve rucaparib BRCA1/2-mutant yumurtalık kanseri hastalarının tedavisi için onay almıştır. 2017 ve 2018 yıllarında ise olaparib, rucaparib ve niraparib BRCA statüsünden bağımsız olarak yumurtalık kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Ayrıca 2018 yılında, olaparib ve talazoparib HER2-negatif BRCA1/2-mutant ileri evre meme kanseri meme kanseri hastala

rının tedavisi için onay almıştır (Slade, 2020). Meme ve yumurtalık kanseri tedavilerine ek olarak, PARP inhibitörleri oluparib ve rucaparib HR-defektif ileri evre pankreas ve prostat kanseri tedavilerinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (The Food and Drug Administration (FDA), 2019, 2020). Ayrıca, hasta stratifikasyonu için BRCA ve HR'da rol oynayan farklı genlerin statülerinin analinizi sağlayan çeşitli prediktif tanı kitleri de (FoundationOne CDx, BRACAnalysis CD x test vd.) FDA tarafından onaylanmıştır (The Food and DrugAdministration (FDA), 2018, 2020). PARP inhibitörlerinin BRCA-efektif kanser tedavilerinde de başarıları sonuçlar sağlaması, DDR'da rol oynayan farklı bileşenlerin de PARP inhibitör yanıtında belirleyici bir faktör olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle DDR regülatörü olma potansiyeli taşıyan proteinlerin in vitro ve in vivo çalışmalarla fonksiyonlarının karakterize edilmesi ve tanımlanması klinikte tedavi başarısı için önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kanser

Hücre büyümesi, bölünmesi, farklılaşması ve programlı ölümünde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin endojen faktörler ve/veya genotoksik saldırılar neticesinde mutasyona uğramasıyla sağlıklı hücreler neoplastik transformasyona uğramakta ve kontrolsüz bir şekilde bölünme yeteneği kazanmaktadır (Weinberg, 2007). Kronik proliferasyon eğilimi kanser hücrelerinin en belirgin özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Sağlıklı hücreler büyümeyi teşvik eden makromoleküler sinyallerin üretilmesini ve salınımını dikkatli bir şekilde regüle ederek hücrel homeostaziyi sağlamakta ve dolayısıyla doku bütünlüğü ve işlevselliğini korumaktadırlar (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bununla birlikte, büyüme baskılayıcı moleküler mekanizmalardan kaçınma veya söz konusu mekanizmalara karşı duyarsızlık da yine kanser hücrelerinin sahip olduğu temel kazanımlardan biridir (Hanahan ve Weinberg, 2000). RB (retinoblastoma) ve p53 gibi çok sayıda tümör baskılayıcı protein farklı şekillerde işlevler yürüterek kontrolsüz büyümeyi engeller. Genotoksik saldırılar neticesinde oluşan DNA hasarı nedeniyle ilgili DDR mekanizmalarının upstream regülatörleri (ör. ATM, CHK2) tarafından aktive edilen p53 proteini, hücre döngüsünün progresyonu, DNA tamiri, hücrel metabolizma ve programlı hücre ölüm yollarında rol oynayan çok sayıda proteinin transkripsiyonel ve post-translasyonel regülasyonunu kontrol ederek oluşan hasara münhasır hücrel bir yanıt oluşturur (Kulaberoglu vd., 2016; Levine, 2020). Özetle, oluşan genetik lezyonlar dolayısıyla hücre döngüsünün işleyişi ilgili kontrol noktalarında (İng. cell cycle checkpoint) durdurularak söz konusu hasarın sorumlu tamir mekanizmaları vasıtasıyla onarılmasına veya hücrenin apoptosis gibi programlı hücre ölüm yolları vasıtasıyla proliferasyon havuzundan elimine edilmesine imkan tanınmış olur (Gundogdu, Hergovich, vd., 2021). Bahsi geçen kanser özelliklerinin yanı sıra, hücrel ölüme karşı gelişen direnç, invazyon ve metastas mekanizmalarının aktivasyonu, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kaçınma ve hücrel enerji yollarının de-regülasyonu transformasyona uğramış hücrelerin diğer önemli özellikleridir (Şekil 2.1)

(Hanahan ve Weinberg, 2011). Tümör oluşumunu destekleyen inflamasyon ve genomik kararsızlık ise yukarıda sıralanan neoplastik transformasyon karakterlerinin gelişmesini sağlayan hususiyetlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.1. Neoplastik hücrelerin transformasyon sürecinde kazandığı özellikler (Hanahan, 2022; Hanahan ve Weinberg, 2000, 2011)

2.2 DNA Hasar Yanıt (DDR) Mekanizması

Memeli bir organizmanın hayatta kalabilmesi ve fonksiyonel olabilmesi için genomik bütünlüğünün korunması ve hücre bölünmesi esnasında genetik bilginin yavru hücrelere iletiminin sağlıklı bir şekilde sağlanması çok önemlidir. Memeli hücreleri genomlarının bütünlüğünü ve işlevselliğini korumak amacıyla hücre döngüsünün S fazında DNA replikasyonunu ve M fazı esnasında genetik bilgilerin eşit dağılımını sağlamak amacıyla kompleks moleküler mekanizmalar kullanır. Söz konusu mekanizmalar, hücrenin DNA replikasyonu öncesinde M evresine geçmesini veya kardeş kromatitlerin ayrılması öncesinde DNA'nın tekrar replikasyona uğramasını engelleyen sistemlerdir (Gundogdu, Hergovich, vd., 2021). Hatalı genom replikasyonu ve/veya segregasyonunun yanı sıra, memeli genomlarının insicamı spontane gelişen (endojen) veya eksojen endüksiyonlu DNA lezyonları tarafından da tehdit edilir. Bu nedenle hücreler, DNA hasarının saptanması

sinyalleştirilmesi ve onarılması için kompleks ve kapsamlı DDR sistemlerini kullanır. DNA bütünlüğünün korunmasını sağlayan moleküler mekanizmaların DNA'daki kusurları algılama ve çözümleme konusundaki olağanüstü yeteneği, hücre bölünmesi esnasında spontane oluşan mutasyon oranlarının genellikle çok düşük olmasını sağlar.

Kanser hücrelerinde ise transformasyon sürecinin gerçekleşebilmesi için mutasyon oluşum/birikim oranı artmıştır. Söz konusu mutasyona uğrayabilme yeteneği çeşitli mutajenik ajanlara karşı artan hassasiyetle kazanılmaktadır. İlgili mutasyonların genomda birikmesinin, normal şartlarda genomik bütünlüğü gözlemleyen ve genetik olarak hasar görmüş hücrelerin senesens ve apoptosis yoluyla proliferasyon havuzundan eliminasyonunu mümkün kılan gözetim sistemlerinden ödün verilmesiyle sağlandığı bilinmektedir (Ciccio vd., 2010; Hanahan ve Weinberg, 2011; Jackson ve Bartek, 2009; Kastan ve Bartek, 2004).

2.2.1 DDR sinyalizasyonu

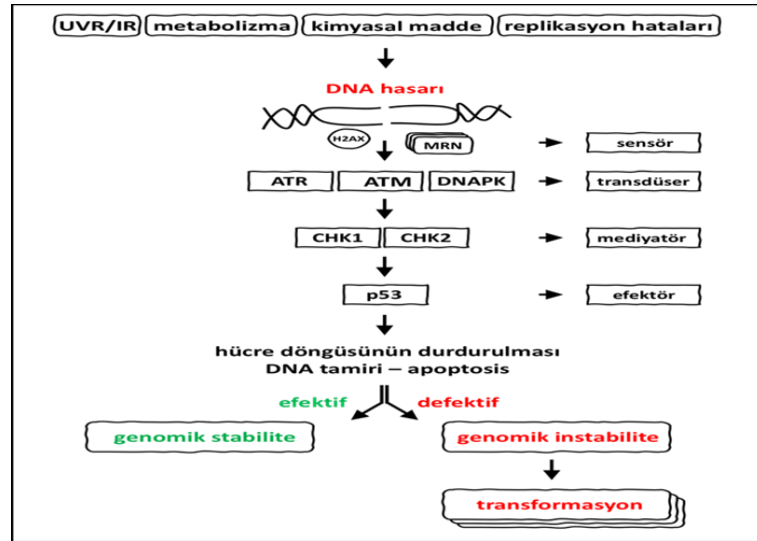
DNA 'da oluşan genomik eşlenme ve kromozomal ayrılma boyunca telomerde kısalma oksidatif stres , replikasyon stresi ve yanlış baz eşleşmesi (ör. insersiyon, delesyon) ya da bazlarda oluşan kayıplar (ör. depürinasyon, depirimidasyon) bundan dolayı endojen hasarlara maruz kalınmaktadır. Bunun yanı sıra DNA insicamını tehdit eden diğer sebepler de dış etkenli (eksojen) kimyasal (ör; kimyasal karsinojenler) ya da fiziksel (ör; UV ışınları) en son olarak iyonlaştırıcı radyasyon (IR) gibi durumlar sebep olmaktadır. (T Lindahl ve Barnes, 2000; Tomas Lindahl ve Nyberg, 1972; Loeb ve Harris, 2008). DNA hasarı sonucunda oluşan ilk kimyasal tepki, kontrol noktaları olarak adlandırılan G1/S, intra-S ve G2/M aktifleşerek ve hücredeki döngünün hemen durdurulmasıdır.

Tek baz değişimleri(deaminasyon, depürinasyon, nükleotid kazanımı/kaybı), çift olarak görülen zincirde (“intrastrand crosslinks, ICL”) benzer zincir arasında (“interstrand crosslinks”) öteki ise nükleotid-protein arasında kurulan çapraz bağlar, DNA zincir kırıklarının oluşma sebepleri DNA'da görülen doku bozukluklarıdır. (Bartek vd., 2007; Deckbar vd., 2011; Wahl vd., 1997). DNA çift zincir kırığı neticesinde aktive olan DDR sinyal yolağı; (1) MRN (MRE11-RAD50- NBS1) ve Ku70/80 gibi hasar sensör proteinleri tarafından DNA hasarının anında tespiti (2) γ -H2AX ve MDC1 gibi sinyal mediatör protein

lerinin hasarlı kromatin bölgesinde toplanması, (3) ATM ve ATR kinazlar gibi hasar sinyal transdüserlerinin aktivasyonu ve (4) p53 başta olmak üzere çeşitli efektör proteinlerin aktivasyonu olmak üzere 4 aşamaya ayrılır (Şekil 2.2).

DNA hasarının anında tespitini sağlayan MRN, PARP1 ve Ku70/80 proteinleri hasarlı kromatin bölgesine bağlanarak DDR aktivasyonunu gerçekleştirmiş olurlar (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Jackson ve Bartek, 2009). Çift zincir kırıklarının oluşumu neticesinde öncelikle ATM-CHK2 sinyal yolağı aktive olurken ATR-CHK1 yolağı ise daha çok tek zincir kırıkları, durmuş replikasyon çatalları, büyük DNA baz eklentileri gibi faktörler sonucu. (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Jackson, 2002; Jackson ve Bartek, 2009; Khanna ve Jackson, 2001). Öte yandan, yayımlanan raporlar ATR kinazın da DNA çift zincir kırıklarına karşı aktive olduğunu göstermektedir. ATM kinaz tarafından S ve G2 evrelerindeki koordine edilen DSB uç-kesim işlemi (3' uç reseksiyonu) neticesinde oluşan tek zincirli DNA (İng. single-stranded DNA, ssDNA) fragmentleri ATR/CHK1 kaskadını aktive edebilmektedir (Ciccio vd., 2010; Jazayeri vd., 2006; Trenner ve Sartori, 2019).

Bu nedenle normal şartlar altında inaktif homodimer halde bulunan ATM kinaz, DNA hasarı durumunda hücre döngüsünden bağımsız olarak hızlı bir şekilde oto-fosforilasyona uğrayarak aktif monomerler halinde hasar sinyalini downstream bileşenlere iletir. CDK-bağımlı DNA uç kesim işlemi neticesinde oluşan tek zincirli DNA fragmentleri vasıtasıyla aktif hale gelen ATR yanıtı ise sadece S-G2 evrelerinde aktif olup ATM yanıtına göre nispeten daha yavaştır. CHK1 ve CHK2 (İng. checkpoint kinase 1 and 2) kinazlar ise sırasıyla ATR ve ATM kinazların önemli mediyatör proteinleri olarak işlev yürütürler. DNA hasarı durumunda, CHK2 proteini ATM kinaz tarafından hücre döngüsünden bağımsız olarak aktif hale getirilir, CHK1 ise ATM ve MRN-bağımlı DNA uç reseksiyonu sonrasında hücre döngüsüne bağlı bir şekilde ATR kinaz tarafından aktif hale getirilir (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Khanna ve Jackson, 2001; Shibata, 2021).



Şekil 2.2. DNA hasar yanıt sistemi (Toy vd., 2022)

Heterotrimerik MRN (MRE11-RAD50-NBS1) kompleksi endojen veya eksojen nedenlerle oluşan DNA çift zincir kırıklarının anında tespit eder. RAD50 kırık DNA uçlarını bir arada tutarken NBS1 ise ATM ile etkileşime girerek aktif ATM moleküllerinin kırık kromatin bölgesine toplanmasını sağlar (Ciccio vd., 2010; Rupnik vd., 2010; Stewart vd., 1999; Syed ve Tainer, 2018). Oto-fosforilasyon ile aktif hale gelen ATM kinaz çok sayıda substratın aktivasyonunu yöneterek oluşan hasara münhasır biyokimyasal bir yanıtı düzenler. Busubstratlardan biri olan NBS1'in ATM tarafından fosforilasyonu daha fazla ATM'nin hasarlı bölgede toplanmasını sağlar (Matsuoka vd., 2007). ATM kinaz tarafından fosforilasyona uğrayarak aktif hale gelen H2AX proteini (İng. H2A histone family member X) de hasarlı kromatin bölgesinde toplanır (γ H2AX) ve MDC1 (İng. Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) gibi diğer DNA hasar yanıt bileşenlerinin bölgeye transfer edilmesini koordine eder. p53 tümör baskılayıcı proteini de ATM tarafından fosforilasyona uğrar ve transkripsiyonel olarak aktif hale gelir.

DNA hasarı durumunda ATM tarafından fosforile edilen p53 proteini, CDK inhibitörü p21 proteininin transkripsiyonel upregülasyonunu sağlayarak hücre döngüsünün kontrol noktalarında durdurulmasını sağlar. Böylece DNA tamirinin başarılı bir şekilde tamir edilmesine zaman sağlanmış olur.

Öte yandan eğer DNA hasarı tamiri mümkün olmayacak şekilde oluşmuş ise p53 proteini içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) yollar üzerinden programlı bir şekilde hücre ölümünü tetikler (Gartel ve Tyner, 2002; Georgakilas vd., 2017; Levine, 2020; Loughery vd., 2014). Bu nedenle, ATM yolağının en önemli downstream efektörü olan p53 proteini DNA hasar kontrol noktasının regülatörü olarak işlev görür. ATM kinaz tarafından aktive edilen bir diğer kontrol noktası regülatörü CHK2 proteini ise CDC25, p53 ve BRCA1 gibi downstream bileşenlerin aktivasyonunu yönetir. MDC1 tarafından hasarlı kromatin bölgesine toplanan 53BP1 (İng. Tumor suppressor p53 binding protein 1) proteini ile CHK2 tarafından aktive edilen BRCA1 proteinleri oluşan çift zincir kırığının hangi mekanizma ile onarılacağını belirler (Goodarzi ve Jeggo, 2013). Spesifik bir heterokromatin bölgenin geçici relaksasyonunu sağlayan KAP1 (İng. Krüppel-associated box (KRAB)- associated protein) proteini de ATM kinaz tarafından fosforilasyona uğrar. Söz konusu fosforilasyon işlemi özellikle heterokromatin bölgelerinde oluşan hasarların tamiri için önem arz etmektedir (Gundogdu, Hergovich, vd., 2021; White vd., 2016). Özetle, hasar neticesinde NBS1 tarafından aktivasyonu sağlanan ATM kinaz çok sayıda bileşenin aktivasyonunu ve DNA tamir yollarıyla onarılmasını koordine eder.

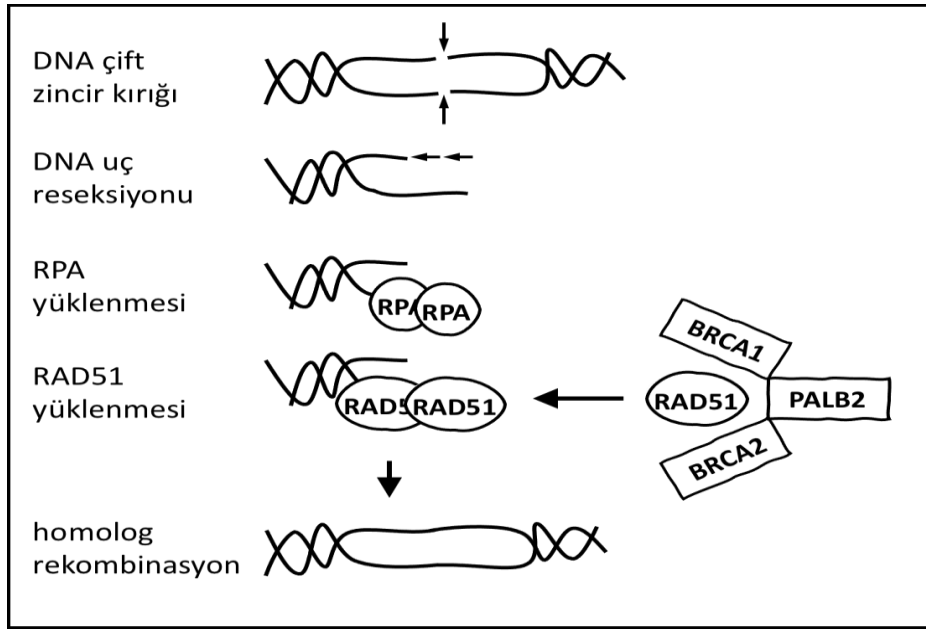
Endojen ve/veya eksojen nedenlerle oluşan katastrofik DNA çift zincir kırıkları genel olarak 2 mekanizma tarafından onarılır; homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleşmesi (NHEJ).

2.2.2 Homolog rekombinasyon (HR) DNA tamiri

Normal hücrelerde DNA tek zincir kırıklarının günde binlerce DNA çift zincir kırıklarının ise yaklaşık 50 olduğu tahmin edilmektedir. (Vilenchik ve Knudson, 2003). DNA çift zincir kırıkları; programlı DNA rekombinasyonu (V(D)J vd.), DNA'nın metabolik olayları sonucunda (örnek olarak aracı topoizomeraaz 1/2), DNA kırıklarından olan tek zincir kırıkları ise DNA eşlenme çatallarının çöküp hücredeki eksojen saldırılarının tehlikesi altında kalması (ör. UV) nedenleriyle oluşabilir. (Khanna ve Jackson, 2001; T Lindahl ve Barnes, 2000). Olan DNA çift zincir kırıkları genel olarak HR ve NHEJ mekanizmalarıyla onarılır (Goldstein ve Kastan, 2015).

NHEJ onarımı tüm hücre döngüsü boyunca aktif bir şekilde çalışır Homolog rekombinasyon tamir yolağı ise sentezlenen kardeş kromatitin tamamlayıcısı olarak kullanılmasından ötürü bir tek S evresinin sonunda ve G2/M evrelerinde DNA hasar tamirini yerine getirmektedir. Öncelikle MRN kompleksi DNA'nın kırık uçlarını tespit eder. RAD50 kırık DNA uçlarını ile stabil hale getirir, MRE11 ilk olarak kırılan uçlara çentik açılması için CtIP endonükleazı kullanır. Daha sonra MRE11 proteini (ekzonükleaz 1) ve DNA2 ekzonükleazlarını kusurlu olan kromatin bölgesine yükler zincir kesimini 5' 3' yönünde gerçekleşmesini sağlar. Bu olay sonucunda oluşan 3' tek zincirli DNA çıkıntıları, RPA (Replication Protein A) protein kompleksi ile kaplanır. Heterotrimerik RPA kompleksi (RPA70-RPA32-RPA14) kesime uğrayarak uzayan tek zincirli DNA'nın stabilizesini sağlayarak uçlarınükleaz aktivitesinden korur. Diğer aşamada, BRCA2 ve PALB2 kombinasyonu aracılığıyla RAD51 nükleoprotein RPA proteinleri ssDNA üzerine yüklenmesi sonucunda uzaklaştırılır. Oluşan RAD51 nükleoprotein filament kardeş kromatit zincirde işgali sağlayarak DNA 'da olan bütün bilgilerin kopyalanmasına imkan tanır. Evre Holliday ve D-loop birleşmelerinin oluşturulması, onarılacak bölgenin kalıp zincir üzerine taşınması ve son olarak Holliday kesişimlerinin çözünmesi şeklinde tamamlanır (Şekil 2.3) (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Goodarzi ve Jeggo, 2013; Jasin ve Rothstein, 2013; Krejci vd., 2012) .

Onarılamayan DNA tek zincir kırıkları ,S fazında yoğun olarak görülen DNA eşlenme çatalı çökerek DNA'daki çift olarak kırılmalara dönüşür. Çift zincir kırıkları DNA' da bir tek Homolog Rekombinasyon mekanizmasıyla onarılabilir. Bundan dolayı, Homolog Rekombinasyonu hasarlı kanser hücrelerinde DNA tek zincir kırık onarımının içeriklerinin (ör. Poli-ADP nükleaz enzimi) molekülü küçük inhibitörlerle (ör.rucabarip) baskılamak, bu durumda kanserli hücrelerde özgün olarak programlı hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır ("sentetik letalite") (Cleary vd., 2020; Nicola J. Curtin, 2012; Helleday vd., 2008; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; O'Connor, 2015;Rose vd., 2020). Bireyselleştirilmiş kanser tedavisinde yer verilen yöntemler klinikteki hastalara daha iyi tedavi imkânları sunmasından ötürü Homolog Rekombinasyon mekanizmalarında etkili olarak görev alan moleküler ve biyolojik etkileşimleri yoğun olarak araştıran çalışmalar yapılmaktadır.



Şekil 2.3. Homolog rekombinasyon (HR) DNA çift zincir kırık onarım mekanizması (Toy vd., 2022)

2.2.3 Homolog olmayan uçların birleşmesi (NHEJ) tamiri

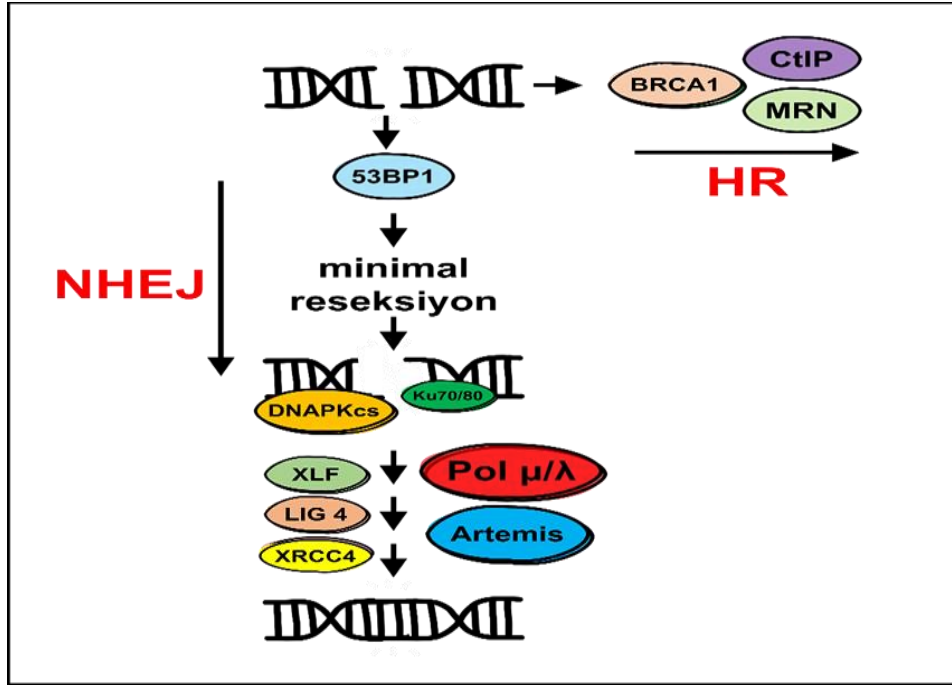
NHEJ yolağında ise kırık DNA uçları Ku70/80 protein kompleksi tarafından tespit edilmektedir. Kırık DNA uçlarına karşı yüksek afiniteye sahip heterodimerik Ku kompleksinin lokalizasyonunun ardından downstream NHEJ regülatörleri ilgili alanda toplanarak onarım sürecini başlatır. DNA bağımlı protein kinaz katalitik subünitinin Ku80 proteininin C-terminali ile etkileşime girmesi, DNA-PKcs yapısında konformasyonel değişimlere yol açarak DNA'ya bağlanma stabilitesini artırır vesonuç olarak kırık uçların sinapsisi sağlanmış olur. ATM tarafından fosforilasyona uğrayan DNA-PK, Artemis proteinini aktive ederek DNA mikroçevresinin onarım işlemine hazırlık süreci koordine eder. Bu süreç esnasında gerçekleşmesi muhtemel (erken) ligasyon işlemide yine aktive olmuş Artemis tarafından engellenir. Downstream NHEJ regülatörleri XLF, XRCC4 ve Ligaz4, DNA üzerinde çeşitli konformasyonel değişimleri oluşturarak kırık DNA uçlarının sinapsisini artırır. Sonuç olarak hasarlı bölgenin ligasyon işlemi tamamlanarak hasar onarılmış olur (Şekil 2.4) (Frock vd., 2021; Lees-miller ve Meek, 2003; Shrivastav vd., 2008).

Hücre döngüsünün G0/G1 evrelerinde oluşan DSB hasarları hızlı ve etkin ancak hata oranı yüksek NHEJ tarafından onarılırken, geç S ve G2/M evrelerinde oluşan benzer bir hasarın hangi mekanizma ile onarılacağına DNA uçlarının reseksiyona uğrayıp uğramayacağı neticesinde karar verildiği belirtilmiştir (Frock vd., 2021; Shrivastav vd., 2008; Zhang ve Gong, 2021). Çift zincir kırıklarının anında tespitini sağlayan MRN kompleksinin önemli bir bileşeni olan MRE11 ve ATM tarafından aktive edilen CtIP proteinleri DNA uçlarında ilk aşama çentiklerini oluşturarak ileri reseksiyon için zemin oluşturmuş olurlar (Jasin ve Rothstein, 2013). Bu noktada, BRCA1 proteininin DNA uç reseksiyonunu dolayısıyla HR sistemini teşvik ettiği, öte yandan, ATM tarafından fosforilasyona uğrayarak aktif hale gelen 53BP1 proteininin ise kırık uçları 53BP1-RIF1-Shieldin-CST kompleksi ile stabil hale getirerek uç reseksiyonunu engellediği dolayısıyla NHEJ sistemini teşvik ettiği bildirilmiştir. (Zhang ve Gong, 2021). BRCA1 proteininin DNA uç reseksiyonunun blokasyonunu nasıl engellediğini araştıran çalışmalar, BRCA1'in PP4C fosfataz aracılığıyla 53BP1'i de-fosforile ettiğini dolayısıyla reseksiyonu engelleyen RIF1'in bölgeden uzaklaştığını göstermiştir. Her ne kadar 53BP1 proteininin enzimatik aktivitesinin olduğuna dair herhangi bir kanıt olmasa da, downstream NHEJ faktörlerinin hasarlı alana translokizasyonuna katkı sunduğu bilinmektedir (Collis vd., 2008; Frock vd., 2021; Zhang ve Gong, 2021).

Moleküler düzeyde, DNA hasarı neticesinde aktive olan ATM kinaz tarafından fosforilasyona uğrayan H2AX kinaz direk olarak MCD1 ile etkileşime girer. Söz konusu etkileşim neticesinde aktive olan RNF8-RNF168 (İng. RING finger 8/168) protein kompleksi 53BP1 proteininin hasarlı kromatin bölgesinde toplanmasını sağlar (Zhang ve Gong, 2021). Çok sayıda DSB onarım bileşeni ile etkileşim yapabilme yapısına sahip olan 1972 amino asit uzunluğundaki 53BP1 proteinin moleküler yapısını araştıran çalışmalar, Tudor ve BRCT (İng. BRCA1- carboxyl-terminal) domainlerine sahip olduğu ortaya çıkarmıştır (Zhang ve Gong, 2021).

Şuana kadar yapılan çalışmalar, 3 farklı proteinin 53BP1'e bağımlı bir şekilde hasarlı kromatin bölgesine toplanabildiğini göstermiştir. Bunlardan MUM1 (ing. Melanoma associated antigen (mutated) 1; ayrıca EXPAND1 olarak da bilinmektedir).

53BP1 fosforilasyonundan bağımsız olarak BRCT domainine bağlanmaktadır (Huen vd., 2010). RIF1 (Replikasyon düzenleme faktörü 1) ve PTIP proteinleri ise 53BP1'in ATM fosforilasyonuna bağlı bir şekilde 53BP1'in N-terminalindeki Ser/Thr-Gln bölgesiyle etkileşim halindedir (Chapman vd., 2013; Munoz vd., 2007).



Şekil 2.4. DNA çift zincir kırıklarının NHEJ mekanizması ile onarılması . (Frock vd., 2021; Jasin ve Rothstein, 2013; Lees-miller ve Meek, 2003)

53BP1 biyolojisinin araştırılması ve fonksiyonlarının tam olarak ortaya çıkarılması klinikte kanser tedavisi açısından önem arz etmektedir. BRCA1 ve/veya BRCA2 defektif kanser hücreleri, HR mekanizmasının işlevsizliği nedeniyle PARP baskılanması sonucunda aşırı hassasiyet oluşmaktadır .(Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005). BRCA ve PARP enzimleri ile birlikte tanımlanan bu durum sentetik letalite konseptinin klinikteki başarılı uygulamaları BRCA1/2 gibi çok sayıda DDR faktörünün prediktif bir biyobelirteç olabileceğini ve PARP gibi çok sayıda DDR faktörünün ise farmakolojik bir hedef olabileceğini göstermiştir (Cleary vd.,2020; Huang vd., 2020; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; O'Connor, 2015). Öte yandan, PARP inhibisyonuna karşı zamanla gelişen ilaç direnci uzun süreli tedavi başarısını engellemektedir.

PARP inhibitör direnç mekanizmaları arasında defektif 53BP1 aktivitesi dolayısıyla tekrar fonksiyonel hale gelen HR mekanizması dikkat çekmektedir (Byrum vd., 2019; Hong vd., 2016; Jaspers vd., 2013; Li vd., 2020; Noordermeer ve van Attikum, 2019; Sachdev vd., 2019).

Kromatin lokalizasyonu için gerekli bir PWWP domaini içeren MUM1 proteini, sitolitik Tlenfositleri tarafından tanınan antijenik bir peptit olarak insan melanoma hücrelerinde tanımlanmıştır. 2010 yılında Huen ve arkadaşları yayımladığı çalışmada, MUM1 proteinin 53BP1 proteini ile etkileşim içerisinde olduğu ve diğer birçok 53BP1 etkileşimli protein gibi iyonlaştırıcı radyasyon ile tetiklenen DNA hasarı neticesinde hasarlı kromatin bölgesinde yoğunlaştığı gösterilmiştir (Huen vd., 2010). Söz konusu reaksiyonunun 53BP1'in yokluğunda başarısız olması, MUM1 translokasyonunun direk olarak 53BP1 etkileşimi ile sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, MUM1 proteininin radyasyon tedavisine karşı kanser hücre sağ-kalımını desteklediği gösterilmiştir (Huen vd., 2010). Söz konusu çalışmada, MUM1'in DNA tamirinin onarılmasındaki mekanistik rolü çeşitli biyokimyasal metotlarla izah edilmeye çalışılsa da MUM1 biyolojisinin fonksiyonel rolleri tam olarak sorgulanmamıştır. Diğer yandan Bajrami ve arkadaşlarının yapmış olduğu PARP inhibisyonu ile potansiyel olarak sentetik letalite etkisi gösteren etkileşimleri değerlendiren genomik düzeydeki çalışma, birçok protein ile birlikte MUM1 proteininin de potansiyel olarak prediktif PARP inhibitör biyobelirteci olabileceğini ileri sürmektedir (Bajrami vd., 2014). Ancak, bu bağlamda da şu ana kadar MUM1 proteininin PARP inhibitör tedavisinde kanser hücre sağ-kalımına doğrudan olan katkısını değerlendiren herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

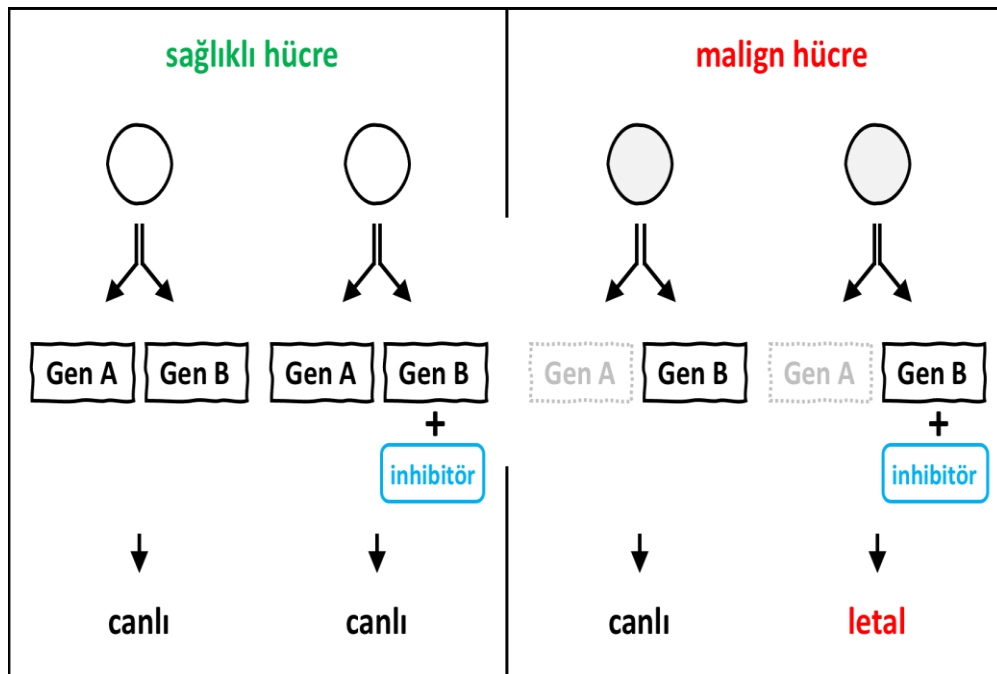
2.3 Sentetik letalite - PARP inhibitörleri

Genomik bütünlüğü gözetimini sağlayarak DDR regülasyonunda rol oynayan faktörler genellikle "genom gözetleyicileri" (İng. care-takers) olarak adlandırılır. Bu sınıftaki proteinler genellikle tümör baskılayıcı olarak görev alır ve (a) DNA hasarının anında tespitini ve ilgili onarım mekanizmasının aktive edilmesinden, (b) hasarlı kromatin bölgesinin tamirinden, ve (c) mutajenik moleküllerin DNA'da lezyon oluşturmada önce inaktivasyonundan sorumludur.

Hücrel transformasyon esnasından ilgili bakıcı proteinlerin fonksiyonları inaktivasyon (İng. loss-of-function mutations) mutasyonları veya epigenetik baskılama (İng. epigenetic repression) yoluyla kaybolabilmektedir (Baylin ve Jones, 2016; Hanahan ve Weinberg, 2011).

Şu ana kadar yapılan bu çalışmalar görevini eksik olarak yerine getiren DNA hasar yanıt regülasyonunun 1-Kansere sebep olabileceğini 2-Kanser tedavileri sonucunda oluşan ilaç direncinin olası yan etkilerde rol oynayabileceğini 3-Tedavi yanıtının araştırılmasında prognostik olarak kullanılabileceğini 4-Kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde de kullanılabileceğini göstermiştir. Kanserli hücreler özgün olarak hedeflenmediğinde artan yan etkiler konvaksiyonel kanser tedavilerinin en önemli terapötik dezavantajıdır. Bunun için kanser hücrelerinde bulunan DNA hasar yanıt elementlerinin işlev bozukluğu sentetik letalite etkileşimini ortaya çıkarır ve yeni oluşan hücrel bileşenlerin tanımlanması, farmakolojik hedeflenmesi son zamanlarda istenilen bir amaç olarak belirlenmiştir. (Cleary vd., 2020; Huang vd., 2020; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; O'Connor, 2015). DDR tedavileri bağlamında sentetik letalite; DNA hasar yanıt yollarında etkili olarak görev alan bu iki eksikliğin birleşimi DNA hasarlarının birikmesinden dolayı hücrede ölüme sebep olur bu eksiklerde birinin bile hücrel olarak tolere edilmesi hücrenin ölümüyle sonuçlanmaması olarakta açıklanabilir (Şekil 2.5). (Bhattacharjee ve Nandi, 2017; Giovannini vd., 2019; Helleday, 2011; Huang vd., 2020; Lord vd., 2015). Buna örnek olarak kanser hücreleri genetik mutasyondan dolayı aktifliğini kaybeden tümör supresör genlerin sebep olmasından ötürü hücre sağ kalımı için alternatif genin aktifliğini artırarak bağımlı hale getirir. (Onkogen bağımlılığı) (Luo vd., 2009; Pagliarini vd., 2015; Settleman, 2012; Sharma ve Settleman, 2007; I. B. Weinstein vd., 2008). Farmakolojik olarak gen ürününün engellenmesi kanserli hücrenin spesifik olarak elimine edilmesine neden olmaktadır. (Ashworth ve Lord, 2018; Ashworth vd., 2011; Huang vd., 2020; Lord vd., 2015; I. Bernard Weinstein ve Joe, 2006). Sentetik letalite küçük-molekül inhibitör kapsamı olarak bazıları APE1 ya da PARP protein aktifliğini engelleyen bazı ekzisyon tamir mekanizması; DNA-PK aktifliğini baskılayarak NHEJ tamir mekanizmasını BRCA1/2, RAD51, MRE1 aktifliğini baskılayarak herhangi bir sorun olduğunda Homolog Rekombinasyon mekanizmasını CHK1/2, WEE1, ATM, ATR, protein aktifliğini baskılar.

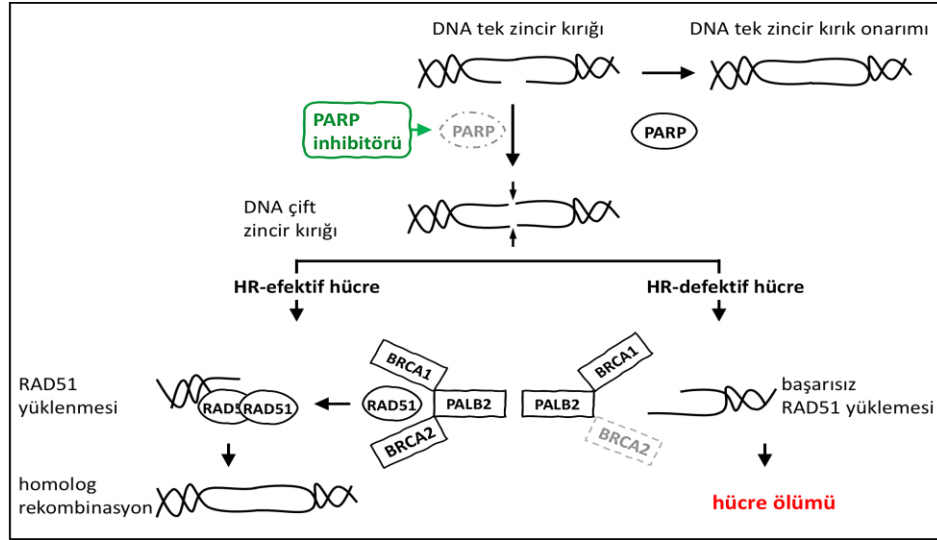
Hücre kontrol noktalarını aktivitesini ve görev mekanizmasını bozar (Nicola J. Curtin, 2012). Bundan ötürü kanserleşmiş hücreler her türlü terapötik olan saldırılara maruz kalmamak için olası yolları baskılayarak spesifik ve seçici eliminasyon yaparak normal hücrede zarar görmemiş duruma gelir.(Nicola J. Curtin, 2012; Dietlein vd., 2014; Lord vd,2015)'' Bireyselleştirilmiş kanser tedavisi '' olarak bilinen bu kavramlar gelecekte hedef potansiyeli sayesinde geleneksel kanser tedavilerine göre en az yan etkiye neden olacağı yüksek oranda başarı sağlayacağı belirlenmiştir.



Şekil 2.5. DNA hasar yanıt bağlamında sentetik letalite konsepti (Toy vd., 2022)

PARP enzimleri, DNA hasar yanıt mekanizması, tamiri, kromatin işlevleri ve hücre ölümü gibi birçok hücresel olayda etkilidir. (Hu vd., 2014; Krishnakumar ve Kraus,2010; Pines vd., 2012; Zhao vd., 2019). PARP protein ailesi, 17 adet enzimden oluşur bu protein grubuna ART (ADP-ribosil transferaz)denilmektedir. ART enzimlerinin diğer adı, "PARilasyon" olarak bilinmektedir. PAR (poli-ADP-riboz)öğelerinin oluşturulmasıyla özgün aminoasit bölgeleri aracılığıyla proteinlere akseptör olarak eklenerek kovalent bağ oluşturur. (beta nikotinamid adenin dinükleotid)'den yani β -NAD⁺ Adenozin difosfat riboz moleküllerini aktarabilme işlevini kullanabilmektedir.

(Krishnakumar ve Kraus, 2010; Pines vd., 2012). Poli -ADP ribozlar enzimi proteinin hedef substratlarını değiştirmeyerek DNA tek zincir kırıklarını hemen bulur ve sinyallerle ilgili alt yollara iletir. Bunun sonucunda DNA tamirinde rol oynayan proteinler hasarlı bölgelere toplanır. DNA onarımında görev alan anahtar proteinlerin kusurlu kromatin bölgesinde toplanması Poli-ADP riboz enzimlerinin gerçekleştirdiği post-translasyonel modifikasyon aracılığıyla gerçekleştirilir. Daha sonra, PARP enzimi PARilasyonunu sağlayarak bölgeden uzaklaşır (Lord vd., 2015; Morales vd., 2014; Murai vd., 2012; Pines vd., 2012). Hücredeki döngünün S/G2 evresinde çift zincir kırıklarının DNA onarımından sorumlu olan Homolog Rekombinasyon işlevinin tam olarak işlevini yerine getiremediği hücreler Poli-ADP riboz enzimi daha çok hassasiyet gösterir. (Ciccia vd., 2010; Goodarzi ve Jeggo, 2013) (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005) BRCA1 ve BRCA2 gen ürünleri Homolog Rekombinasyon işlevinde önemli rol oynar. (Buisson vd., 2010; Deans ve West, 2011; Densham vd., 2016; Jasin ve Rothstein, 2013; Simhadri vd., 2019; Sy vd., 2009). BRCA1/2 homozigot mutasyonu sonucunda disfonksiyonel Homolog Rekombinasyon işlevine sahip tümör hücreleri, olağan BRCA1/2 ve allelleri heterozigot olan hücrelere göre Poli-ADP riboz baskılanmasına çok yüksek duyarlılık gösterir. (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005). Genel olarak, farmakolojik olarak enzimatik aktifliğinin engellenmesi Poli-ADP riboz enzimi etkisiyle DNA’da tekli zincir kırıkları birikir eşlenme esnasında çiftli zincir kırıklarına dönüşür. İşlevsel olarak Homolog Rekombinasyona sahip dińç hücreler bu durumu onarabilirken ,HR-hasarlı tümör hücreleri ise artarak devam eden çiftli zincirlerde yoğunluk sebebiyle ölümü selektif olmaktadır (Şekil 2.6) (Arena vd., 2020; Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005; Jelinic ve Levine, 2014; Lord ve Ashworth, 2016, 2017; Lord vd., 2015). Kısaca sentetik letalite, Poli-ADP riboz inhibitörlerinin ilk tahmin edilen işlevidir. (Helleday, 2011). Poli-ADP riboz aktifliği kimyasal baskılanmanın genetik baskılanmasının (RNA interferans) daha sitotoksik etki göstermesi (Murai vd., 2012) İnhibitörlerin farklı işlevlerde etkili olacağı düşünülmektedir. Bu düşünce kapsamında yapılan araştırmalar, PARP enzimlerinin otoPARilasyonunun bloke edilmesiyle enzimin kromatin üzerinde durması inhibitör sitotoksitesini arttırdığını göstermektedir (Murai vd., 2012). Bunun sonucu olarak duran PARP enzimlerinin rutin DNA metabolizması (replikasyon, transkripsiyon vd.) sırasında DNA hasarına direk neden olabileceği de ileri sürölmektedir.



Şekil 2.6. BRCA 1/2 ve PARP enzimleri arasındaki tanımlanan sentetik letal etkileşim (Toy vd., 2022)

PARP inhibitör tedavisi prelinik ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlamış olmasına rağmen zamanla gelişen ilaç direnci uzun vadeli başarıyı engellemektedir (Barber vd., 2013; Bitler vd., 2017; Konstantinopoulos vd., 2015; Lord ve Ashworth, 2013; Stover vd., 2016; Topatana vd., 2020). Homolog Rekombinasyon aktifliğinin tekrar kazanılması için kullanılan PARP inhibitörünün direnç mekanizması olduğu aktarılmıştır. Bunun BRCA1/2'nin aktif hale getiren ikincil mutasyonların sonucunda (Barber vd., 2013; Norquist vd., 2011) ya da NHEJ aktifliğinin inhibe edilmesi sonucu (ör. yetmeyen 53BP1 ekspresyonu veya 53BP1 inaktivasyonu) gerçekleştiği düşünülmektedir. (Bouwman vd., 2010; Noordermeer ve van Attikum, 2019). Daha sonra tekrar efektifleşen Homolog Rekombinasyon işlevi, PARP baskılanması sebebiyle meydana gelen DNA çift zincir kırıklarının düzgün şekilde onarılması, ve sonucunda tümör oluşmasına sebep olan kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlamaktır. Bir diğeri ise, Poli-ADP riboz enzimlerinin DNA bağlandığı bölgelerde meydana gelen mutasyonların (Pettitt vd., 2018) veya PARP sebebiyle görev almakta olan PARilasyon aktifliğinin yükselişi (ör. yeterli olmayan PARG ekspresyonu neticesinde) örnek olarak Poli-ADP riboz-tuzaklama kapasitesini azaltınca PARP inhibitör direncine neden olduğu bildirilmiştir (Gogolavd., 2018). Bunların tümü değerlendirildiğinde, PARP inhibitörlerinin sitotoksik aktivitelerinin artırılması için daha fazla prediktif biyobelirtecini ifade edilmesi, karşıt-kanser ajanları veya farklı küçük DDR

yanıt inhibitörleriyle birleşim çalışmaları her geçen gün önemli olmaktadır. (Cleary vd., 2020; Dréan vd., 2016; Huang vd., 2020).

Gerçekleştirdiğimiz proje ile önemli bir DDR regülatörü (Huen vd., 2010) ve PARP inhibitör yanıt biyobelirteci (Bajrami vd., 2014) olma potansiyeli taşıyan MUM1 proteininin azalan ekspresyonunun normal hücre ve meme kanseri hücre canlılığı ve koloni sağ-kalımına olan etkisi araştırıldı. Ayrıca, BRCA2-efektif ve defektif arka planlarına sahip MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, MUM1 inaktivasyonunun PARP inhibitör sitotoksitesi üzerine olan etkisi incelendi. Son olarak, MUM1 ve PARP1/2 ikili inhibisyonunun PARP inhibitörü olaparibe dirençli MCF7 (MCF7/PIR) meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tablo 3.1. Agaroz jel elektroforezde kullanılan çözeltiler

DNA yükleme tamponu (6X)		
%40 w/v	Sucrose	Sigma, 84097
%10 w/v	Bromophenol blue	Sigma, B0126
TBE tampon (Tris-Borate-EDTA)		
1 M	Tris base	Sigma, T1503
1 M	Boric acid	Sigma, B6768
0.02 M	0.5 M EDTA, pH 8.0	

Tablo 3.2. Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

Standart lizis tampon (150 mM)		
20 mM	1 M Tris-HCl, pH 8.0	Sigma, T1503
150 mM	NaCl	Sigma, S9888
%10	Glycerol	Sigma, G5516
%1	NP-40	Sigma, 74385
5 mM	0.5 EDTA, pH 8.0	Sigma, 31064
0.5 mM	0.5 EGTA, pH 8.0	Sigma, E3889
50 mM	0.5 NaF	Sigma, S7920
20 mM	beta-glycerophosphate	Sigma, G9422
1 mM	Na ₃ VO ₄	Sigma, S6508
1 mM	DTT	Enzo, ALX-280-001-G005
1 mM	Benzamidine	Sigma, 12072
0.5 mM	PMSF	Sigma, P7626

Tablo 3.2. (Devam): Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

1 mM	Leupeptin	Enzo, ALX-260-009-M025
Laemmli (SDS) yükleme tamponu		
1 M	Tris-HCl, pH 6.8	Sigma, T1503
%0.05 w/v	SDS	Fisher, 10552785
%5	beta-mercaptoethanol	Sigma, M3148
%10 w/v	Bromophenol blue	Sigma, B0126
SDS koşturma tamponu		
190 mM	Glycine	Sigma, G7126
25 mM	Tris base	Sigma, T1503
%1 w/v	SDS	Fisher, 10552785
Transfer tamponu		
190 mM	Glycine	Sigma, G7126
25 mM	Tris base	Sigma, T1503
%20	Methanol	Fisher, M-4056-17
TBS-T yıkama tamponu		
0.3 M	NaCl	Sigma, S9888
0.1 M	Tris base	Sigma, T1503
%0.5	Tween-20	Sigma, P7949
Membran bloklama tamponu		
	TBS-T	
%5	Skim milk powder	Sigma, 70166
ECL stok solüsyonları (enhanced chemiluminescent substrates)		
250 mM	Luminol	Sigma, 123072
90 mM	pCoumaric acid	Sigma, C9008
%30	H ₂ O ₂	Sigma, H1009
Luminol ve pCoumaric asit solüsyonları DMSO içerisinde hazırlandıktan sonra 4°C'de muhafaza edildi.		

Tablo 3.3. Western blot analizinde kullanılan antikorlar

Primer antikorlar		
anti-MUM1	Cell Signaling Technology, #13437	1:1000
anti-p53	Santa Cruz, #sc126	1:1000
anti-p21	Santa Cruz, #sc6246	1:1000
anti-actin	Santa Cruz, #sc1616	1:1000
anti-tubulin	homemade	1:1000
anti-GAPDH	Santa Cruz, #sc47724	1:1000
anti-cPARP	Cell Signaling Technology, #9532S	1:1000
Sekonder antikorlar		
anti-rabbit	ThermoFisher, #31460	1:5000
anti-mouse	ThermoFisher, #32430	1:5000
anti-rat	ThermoFisher, #31470	1:5000

Tablo 3.4. RNA interferans analizinde kullanılan siRNA kompleksleri

Ürün Adı	Marka - Katalog No	Hedef Sekans
siCTRL	Qiagen, #1022076	5' - aacgtacgcggaataacttcga - 3'
siMUM1#4	Qiagen, #SI00651980	5' - ctgggsgtacgttgccaaa - 3'
siMUM1#5	Qiagen, #SI04138141	5' - gacgtgcacatcgatctcgta - 3'
siBRCA2#6	Qiagen, #SI02653434	5' - caggacacaattacaactaaa - 3'

Tablo 3.5. qRT-PCR analizinde kullanılan primerler

Ürün Adı	F-R Sekans
18S	F- ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA R- GCCTCACTAAACCATCCAATCGG
CDKN1A	F- AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG R- TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG

Tablo 3.5.(Devam): qRT-PCR analizinde kullanılan primerler

TP53	F- CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG R- TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
MUM1 (PWWP3A)	F- TGTGTCTCCCTCATCACCGACT R- GCTGGATGGATTTTCGGACAGG

Tablo 3.6. Hücre canlılık analizinde kullanılan reaktifler

Cell Proliferation And Cytotoxicity Assay Kit	Boster, AR1156
---	----------------

Tablo 3.7. Koloni sağ-kalım analizinde kullanılan solüsyonlar

Fiksasyon solüsyonu		
3x	Methanol	Sigma, 322415
1x	Acetic acid	Sigma, 27218
Kristal viyole boyama solüsyonu (metanol içerisinde hazırlandı)		
%0.5	Crystal violet	Sigma, C3886

Tablo 3.8. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

PARP inhibitörleri, -20°C		
10 mM	Olaparib (AZD2281, KU0059436)	MedChemEx, HY-10162
10 mM	Rucaparib (AG014699, PF-01367338)	MedChemEx, HY-10617A
Stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözünün inhibitörler -20°C'de muhafaza edildi.		

Tablo 3.8. (Devam): Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Penisilin/Streptomisin Stok Kokteyli (%1), -20°C		
8 mg/mL	Penicillin G (64 µg/mL son konsantrasyon)	Sigma, P3032
12.5 mg/mL	Streptomycin (100 µg/mL sonkonsantrasyon)	Sigma, S9137
Steril koşullar altında ddH ₂ O'da çözünerek hazırlanan stok konsantrasyon filtre edildikten sonra alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.		
Hücre kültürü besiyeri (standart), 4°C		
	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)	Sigma, D6429
%10	FBS (foetal bovine serum)	Sigma, F7524
%1	Pen/Strep	
PBS, 4°C		
	dPBS without Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	Gibco, 14190144
Trypsin, 4°C		
	Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Gibco, 25200056
Hücre dondurma besiyeri, -20°C		
%10	DMSO	Sigma, D8418
%90	FBS	Sigma, F7524
Transfeksiyon ajanı, 4°C		
	Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, 13778150
OptiMEM, 4°C		
	OptiMEM	Gibco, 31985-047
Canlı hücre analizi		
%0.4	Trypan blue solution	Gibco, 15250061

Tablo 3.9. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan temel plastik gereçler

Cell freezing cryovials	Nest, 606001
96-well cell culture plates	Nest, 701001
6-well cell culture plates	Nest, 606001
60-mm cell culture dishes	Isolab, 120.13.060
100-mm cell culture dishes	Corning, CLS430167
25-cm cell culture flasks	Nest, 707003
75-cm cell culture flasks	Nest, 708003
175-cm cell culture flasks	Nest, 709003

Tablo 3.10. Genel laboratuvar çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler

PBS (%37 HCl çözeltisi kullanılarak pH 7.4 olarak ayarlanmıştır)		
137 mM	NaCl	
8 mM	Na2HPO4	
2.7 mM	KCl	
1.4 mM	KH2PO4	
Diğer stok çözeltiler		
0.5 M	EDTA	
10 N NaOH kullanılarak pH 8 olarak ayarlanmıştır.		
0.5 M	EGTA	
10 N NaOH kullanılarak pH 8 olarak ayarlanmıştır.		
1 M	Tris-HCl, pH 6.8	
%37 HCl kullanılarak pH 6.8 olarak ayarlanmıştır.		
1 M	Tris-HCl, pH 8.5	
10 N NaOH kullanılarak pH 8.5 olarak ayarlanmıştır.		
1.5 M	Tris-HCl, pH 6.8	Sigma, T1503

Tablo 3.10. (Devam): Genel laboratuvar çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler

%37 HCl kullanılarak pH 6.8 olarak ayarlanmıştır.		
1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8	Sigma, T1503
10 N NaOH kullanılarak pH 8.5 olarak ayarlanmıştır.		
0.5 M	NaF	Sigma, S7920
%10, w/v	APS	Sigma, A3678

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

Bu çalışmada, Dr. Alexander Hergovich (UCL Kanser Enstitüsü, Londra, İngiltere) tarafından temin edilen normal (hTERT RPE1) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe çoğaltıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları GCCP (Good Cell Culture Practice) standartlarında gerçekleştirildi. siRNA transfeksiyonu ile MUM1 ve/veya BRCA2 protein ekspresyonunun susturulması: Çalışmalarımızda MUM1 ve/ya BRCA2 proteinlerinin sentezinden sorumlu ORF bölgesi hedeflenerek tasarlanmış olan siRNA kompleksleri kullanıldı. Liyofilize halde temin edilen siRNA komplekslerine ilgili firma protokolü uyarından nükleaz-free su eklenerek hazırlanan 10 µL stok siRNA konsantrasyon -20°C'de muhafaza edildi. MUM1 veya BRCA2 siRNA komplekslerinin hedef mRNA'yı susturma kapasitesi, herhangi bir mRNA'yı baskılama etkisine sahip olmayan (non-silencing) siRNA kompleksi ile karşılaştırıldı. siRNA ve transfeksiyon ajanı konsantrasyonlarının ve transfeksiyon süresinin optimizasyonu için pilot deneyler gerçekleştirildi. Tüm RNA interferans çalışmaları Western blot analizi ile teyit edildi.

3.2.2. Gerçek zamanlı PCR analizi (qRT-PCR)

Hücrelerdeki MUM1 ve ilgili proteinlerin genlerine ait mRNA düzeyleri, kantitatif real-time PCR tekniği kullanılarak (Gomez vd., 2015)'de belirtildiği gibi tespit edildi.

RNA'nın izolasyonu üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. TRIzol, Invitrogen, #15596026). Pelet halindeki total RNA 30 µL ddH₂O ile resüspense edilerek 55-60°C'de, 10- 15 dakika bekletildi. Pürifiye edilmiş olan total RNA'yı % 2'lik DNA agaroz jelde koşturarak total RNA'nın kalitesi test edildi. Ardından cDNA sentezinde kullanılacak miktarın belirlenmesi adına 260/280 nm'de Nanodrop spektrofotometre ile total RNA'nın miktarı ($A_{260/280} > 1.8-2.0$) belirlendi. cDNA sentezi üretici firmanın protokolü uyarınca gerçekleştirildi (Qiagen, QuantiTech Reverse Transcription Kit, #205311). 1 µg total RNA örneği 0.2 mL'lik mikrofij tüpüne aktarıldı ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca 5X cDNA sentez tamponu (Oligo[dT] primerler, hekzamerler buffer, MgCl₂, dNTPs, DTT ve RNase inhibitörü), enzim ve nükleaz-free ddH₂O eklendi. Termal siklus cihazında (PCR), örnekler önce 5 dakika 25°C, sonra 30 dakika 42°C, ve son olarak 5 dakika 85°C'de inkübe edildi. Gerçek zamanlı PCR analizi üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. (Qiagen, QuantiFast SYBR Green PCR Kit, #204054). Elde edilen cDNA örnekleri, SYBR green mastermix ve ilgili primerlerle karıştırıldıktan sonra qPCR cihazında (BIO-RAD CFX96) analiz edildi. qPCR cihazında önce 2 dakika 95°C'de ilk denatürasyon ve ilgili enzimlerin aktivasyonu sağlandı, sonra 10 saniye 95°C, 15 saniye 55°C, 20 saniye 68°C' de PCR programı (40 defa) uygulanarak ilgili mRNA'lara ait cDNA'ların çoğaltılması sağlandı. Programın sonunda erime eğrisi (melting curve) uygulanarak olası primer dimerizasyonu takip edildi. İlgili proteinin mRNA'sına ait Ct (Cycle at threshold) değerleri öncelikle 18S rRNA housekeeping gene (HKG) normalize edildi. Daha sonra sonuçlar siCTRL (non-silencing) kontrol grubuna ait Ct değerine normalize edildi. Elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla kantitatif olarak değerlendirildi.

3.2.3. Agaroz jel elektroforez

İzolasyonu gerçekleştirilen total RNA'nın bütünlüğü %2 agaroz jel elektroforezde analiz edildi. Mikrodalga fırında kaynatılarak TBE tampon çözeltisi içerisinde çözünen agaroz (Invitrogen, 16500500) solüsyonu bir süre soğutulduktan sonra içerisine nükleik asit boyası eklendi (RedSafe, #21141, 20.000X). İzole edilen RNA örnekleri yükleme tamponu ve ddH₂O ile karıştırıldı marker ile birlikte ilgili kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 80V'da yaklaşık 3 saat sürdükten sonra jeldeki RNA (BIO-RAD Gel Doc XR) incelendi.

3.2.4. Western blot

Hücrelerdeki proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin gösterilebilmesi için total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri Western blot tekniği ile tespit edildi (Gomez vd., 2015; Gundogdu, Erdogan, vd., 2021). Tripsinizasyon ve santrifüjleme işlemiyle toplanan hücreler, PBS tampon çözeltisiyle süspanse edildikten sonra oda sıcaklığında 1100 RPM'de 5 dakika süresince santrifüj edildi ve süpernatant kısmı aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet yeterli miktarda lizis tamponu ile yeniden süspanse edildi ve örnekler 60-90 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 4°C'de 15000 RPM'de ve 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Eşit yükleme işlemi için Bradford metodu kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları belirlendi. Protein örnekleri uygun konsantrasyonlarda SDS-PAGE jel ile ayrıldıktan sonra PVDF (poliviniliden florür) membranına transfer edildi. Transfer sonrası bloklama tamponunda inkübe edildi ve sonrasında membran gece boyunca ilgili primer antikoru (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 4°C'de inkübe edildi. Membran TBS-T kullanılarak yıkandıktan sonra HRP ile işaretli ilgili sekonder antikor (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak membran TBS-T tekrar yıkandıktan sonra görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. ve kemilüminesans görüntü X-ray görüntüleme sisteminin kullanılmasıyla filme aktarıldı. Bant yoğunluklarının dansitometrik analizi Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.5. In vitro MTT analizi

Hücre canlılığı testi üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca gerçekleştirildi (Erdogan vd., 2021). İlgili hücreler DMEM besiyerlerinde %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde çoğaltıldı VE pilot deneyler neticesinde belirlenen miktarda hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 48 saat inkübe edildi. Besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa MTT'nin ilk solüsyonundan 10 µL eklendi ve kuyucukta kullanılan besiyeri ile 100 µL'ye tamamlandı. Hücreler 4 saat oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde korundu. MTT'nin ikinci solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µL eklendi ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. ELISA plate reader ile 595 nm'de absorbans ve hücrelerin canlılığı belirlendi.

3.2.6. Koloni sağ-kalım analizi (klonojenik assay)

Hücre koloni formasyon deneyleri (Gomez vd., 2015; Gundogdu, vd., 2021)'de açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Ön çalışmalarla belirlenmiş yoğunluktaki hücreler ilgili siRNA ve transfeksiyon ajanıyla manipüle edildikten sonra 6-kuyucuklu veya 60-mm hücre kültür kaplarına pasajlandı. Optimize edilen sürenin sonunda hücreler çeşitli konsantrasyonlarda PARP inhibitörü ile yine ön çalışmalarla belirlenen süre boyunca tedavi edildi. Hücreler 7-15 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe koloni formasyonu için bekletildi ve her 3-4 günde bir besiyeri ortamı tazelenerek koloni oluşumları mikroskop altında incelendi. Her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney belirli bir sürede durduruldu. Kapların PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler 0.5% kristal violet boyası ile 15 dakika boyunca muamele edildi. Sonrasında kuyucuklar su ile dikkatlice yıkandı ve koloniler mikroskop altında sayıldı. En az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edildi ve sonuçlar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı.

3.2.7. PARP inhibitörü olaparibe dirençli (PIR) hücre klonlarının geliştirilmesi

MCF7 hücre canlılık deneyleriyle tespit edilen olaparib IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurularak olaparibe karşı direnç kazandırılmış MCF7 hücre klonları oluşturuldu (MCF7/PIR). İlgili işlem setleri Edwards ve arkadaşlarının yayımladıkları çalışmada belirttiği üzere sürekli seleksiyon tekniğiyle gerçekleştirildi (Edwards vd., 2008). Kısaca, 6-cm'lik kültür kaplarına ekilen 3x10⁵ MCF7 hücresi, IC₅₀ değerleri dikkate alınarak belirlenen dozlarda olaparib ile tedavi edildi. İlaçlı besiyeri her 3-4 günde bir tazelendi. Haftalık doz artırımı (x1,25) sağlandı ve %80-90 konfluente oluşan hücreler pasajlandı. Direnç kazanmaya başlayan hücreler belirli dozlarda pasajlanarak bir kısmı donduruldu ve kalan kısmıyla direnç oluşturma çalışması devam edildi. Belirlenen son noktada, dirençli hücre klonları ve wild-type formları kullanılarak gerçekleştirilen koloni sağ-kalım deneyleriyle oluşturulan direnç teyit edildi.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm çalışmalar en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) programı kullanılarak elde edildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi (means $\pm$ SEM). P-değeri 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) veya 0.0001 (****)'den küçük neticeler anlamlı kabul edilir.

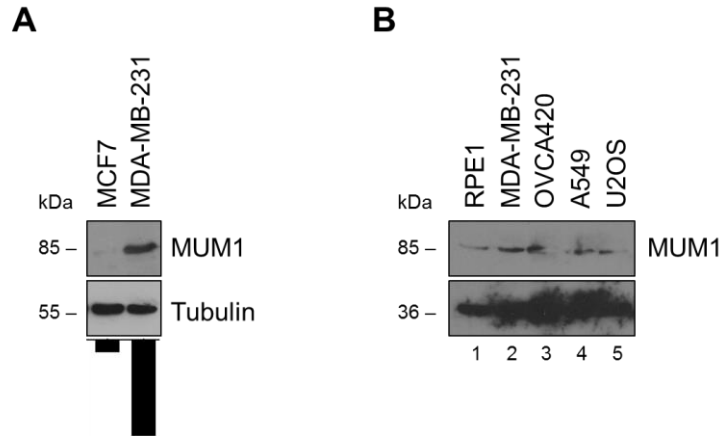
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda öncelikle normal (RPE1) ve çeşitli kanser hücre hatlarında (MCF7, MDA-MB-231, HCT116, OVCA420, U2OS, A549) MUM1 protein ekspresyon seviyesi Western blot tekniği ile belirlendi. Söz konusu analizlerle aynı zamanda ticari olarak temin edilen anti-MUM1 antikorunun aktivitesini de teyit edildi. Sonrasında gerçekleştirilen RNA interferans analizleriyle ticari olarak temin edilen ve MUM1 veya BRCA2 mRNA'sını hedefleyen siRNA komplekslerinin etkinliği test edilerek optimum siRNA konsantrasyonu ve transfeksiyon süresi belirlendi. MUM1 ekspresyonu iki farklı siRNA'nın kullanılmasıyla susturularak azalan MUM1 aktivitesinin hücre canlılığına ve koloni sağ- kalımına olan etkisi in vitro sitotoksosite analizleriyle belirlendi. Gerçekleştirilen Western blot ve qPCR analizleriyle azalan MUM1 ekspresyonunun hücre döngüsü regülatörleri p53 ve p21 proteinlerinin transkripsiyon ve post-transkripsiyonel düzeyleri üzerine olan etkisi incelendi. Sonrasında, PARP inhibitörleri oluparib ve rucaparib tedavisinin MUM1 ekspresyon profiline olan etkisi Western blot analiziyle araştırıldı. Gerçekleştirilen hücre canlılık ve koloni sağ-kalım analizleriyle MUM1 aktivitesi azalan kanser hücrelerindeki oluparib sitotoksitesisi araştırıldı. Son olarak, siRNA transfeksiyonu kullanılarak MUM1 ve/veya BRCA2 mRNA'larının bastırıldığı kanser hücrelerinin oluparib tedavisine karşı koloni sağ-kalımı MUM1 ve/veya BRCA2 efektif hücrelerle kıyaslanarak BRCA2-defektif kanser hücrelerinin oluparib hassasiyetine MUM1 protein ekspresyonunun etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar, MUM1 ekspresyon profilinin PARP inhibitör tedavisi için potansiyel bir biyogösterge olabileceğini dolayısıyla DDR kapsamında MUM1 biyolojisinin anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermiştir.

4.1. Azalan MUM1 ekspresyonunun hücre canlılığı ve koloni sağ-kalımına olan etkisi

In vitro sitotoksosite analizlerinde başarılı bir şekilde kullanılan insan hücre hatları kullanılarak MUM1 ekspresyon profili incelendi. Bu kapsamda, hTERT RPE1 retina pigment epitel hücre hattı, MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları, HCT116 kolorektal kanser hücre hattı, OVCA420 yumurtalık kanseri hücre hattı, U2OS hücre hattı

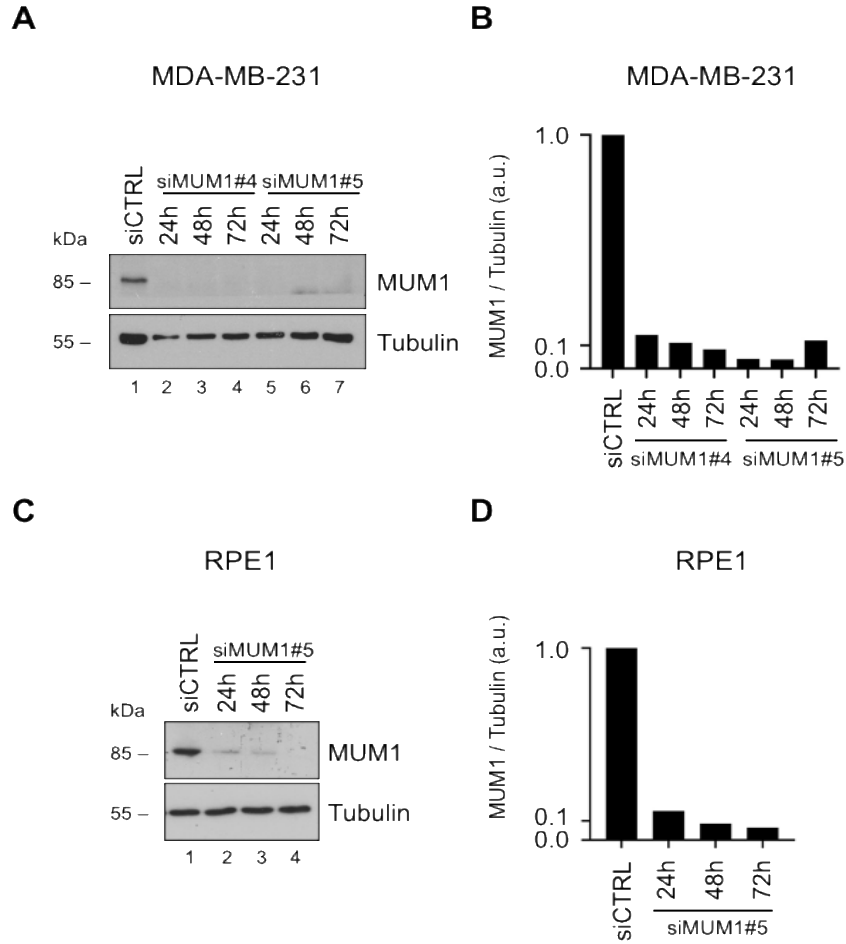
ve A549 akciğer kanser hattı kültüre alındı. 60-mm steril hücre kültürü ekim kaplarına ekimi gerçek leştirilen hücreler (5×10^5 - 1×10^6 hücre) 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra tripsinizasyon yöntemiyle toplandı ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi. Son olarak, enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak farklı hücrelerdeki MUM1 ekspresyon profili incelendi. MCF7 meme kanseri hücrelerine kıyasla, MDA-MB-231 hücrelerinde MUM1 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1, A).



Şekil 4.1. Normal ve kanser hücre hatlarında MUM1 ekspresyon profili(A-B). Hücreler kültüre alındıktan 48 saat sonra tripsinize edildi ve yaklaşık 5×10^5 - 6×10^6 hücre 60- mm kültür ekim kabına ekildi. 48 saat süren inkübasyonun ardından eksponansiyel büyüme eğrisine sahip hücreler tripsinize edildikten sonra total protein izolasyon işlemi gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (n=1) Taranan filmlerin densitometrik analizleri İmage J programı (NIH) ile gerçekleştirildi

RNA interferans, küçük inhibe edici gen ekspresyonunun baskılanmasını sağlayan moleküler biyolojik bir yöntemdir dizayn edilmiş siRNA'ların kullanılmasıyla spesifik gene ait mRNA molekülünün küçük mRNA fragmentlerine parçalanması ve ribonükleaz

aktivitesiyle ortadan kaldırılması neticesinde gen susturma işlemi gerçekleşmektedir (Agrawal vd., 2003; Gündoğdu vd., 2009; Han, 2018). Proje kapsamında, MUM1 mRNA'sını farklı bölgelerden hedefleyen 2 farklı siRNA kompleksi ticari olarak temin edildi (siMUM1#4 ve siMUM1#5, Qiagen). Fonksiyonel analizlerde kullanılmadan önce konsantrasyon ve süre optimizasyonunun sağlanması amacıyla pilot deneyler gerçekleştirildi. Transfeksiyon ajanı olarak, yüksek transfeksiyon verimliliği sunan Lipofectamine RNAiMAX reaktifi kullanıldı. MUM1 siRNA komplekslerinin hedef mRNA'yı susturma kapasitesi, herhangi bir mRNA'yı baskılama etkisine sahip olmayan (non-silencing) siRNA kompleksi ile (siCTRL, Qiagen) karşılaştırıldı. Son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılan siRNA kompleksleri 5x10E5 MDA-MB-231 veya 750x10E5 RPE1 hücresiyle birlikte 60-mm hücre ekim kabına ekildi (ters transfeksiyon). Transfeksiyon işleminden 24, 48 ve 72 saat sonra tripsinizasyon işlemiyle toplanan hücrelerdeki total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak MUM1 downregülasyon profili incelendi. Kontrol hücreleriyle (siCTRL) karşılaştırıldığında, her iki siRNA kompleksiyle (siMUM1#4 ve siMUM1#5) transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki MUM1 ekspresyonunun transfeksiyon işleminden 24 saat sonra baskılandığını belirlendi (Şekil 4-2, A). Aynı şekilde, kontrol hücreleriyle kıyaslandığında (siCTRL), siMUM1#5 kompleksiyle transfekte edilen RPE1 hücrelerindeki MUM1 ekspresyonunun transfeksiyon işleminden 24 saat sonra baskılandığını gözlemlendi (Şekil 4.2, C). Elde edilen sonuçların densitometrik analizi yapıldığında, kontrol hücrelerine kıyasla siMUM1 ile muamele edilen MDA-MB-231 ve RPE1 hücrelerindeki MUM1 ekspresyonunun transfeksiyon işleminden 24 saat sonra gibi kısa bir süre içerisinde yaklaşık 10 kat azaldığı ve söz konusu susturma aktivitesinin 72 saat süreyle devam ettiği belirlendi (Şekil 4.2, B ve D). Dolayısıyla devam eden fonksiyonel analizlerde siRNA son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde uygulandı ters transfeksiyon işleminin ardından 24 saat sonra tedavi protokolü uygulandı.

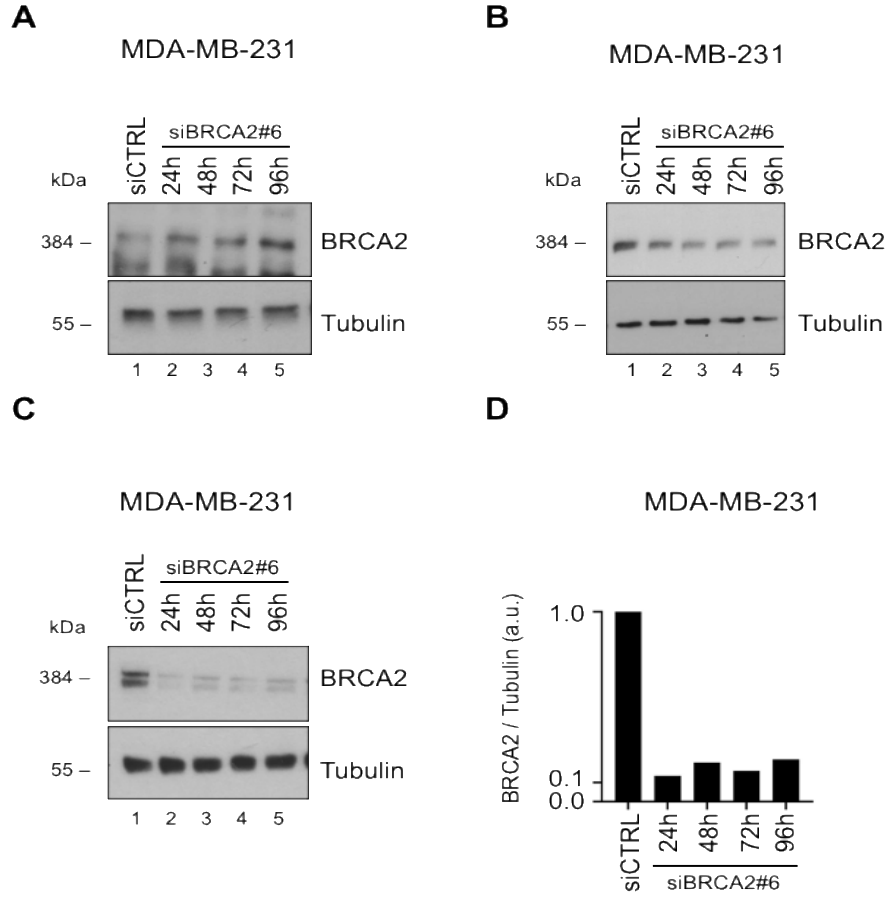


Şekil 4.2. MDA-MB-231 ve RPE1 hücrelerinde MUM1 mRNA'sını hedefleyen siRNA komplekslerinin optimizasyonu. (A) siRNA (siCTRL, siMUM1#4 ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kültüre alındıktan 48 saat sonra tripsinize edilen 5×10^5 MDA-MB-231 hücresi, transfeksiyon ajanı/siRNA süspansiyonu ile karıştırılarak 60-mm kültür ekim kabına ekildi. Ertesi gün 24 saat grubundaki hücreler toplandı ve diğer gruptaki hücrelerin besiyeri transfeksiyon ajanının sitotoksik etkisini minimize etmek amacıyla tazelendi. 48 ve 72 saat süren transfeksiyon işlemlerinden sonra da hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (n=1). (B) Panel A'da elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. (C) RPE1 hücrelerinin siCTRL ve siMUM1#5 siRNA kompleksleriyle transfeksiyonu Panel A'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi (n=1). (D) Panel C'de elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Densitometrik analizlerde, MUM1 bant yoğunlukları ilgili gruptaki tubulin yoğunluğuna normalize edildi.

Proje kapsamında BRCA2-defektif meme kanseri hücrelerindeki MUM1 ve PARP arasındaki sentetik letal veya sentetik canlılık ilişkisinin araştırılması için BRCA2 mRNA'sını hedefleyen siRNA kompleksi (siBRCA2#6) kullanıldı .

(Lekomtsev vd., 2010). BRCA2 protein ekspresyonunun Western blot tekniğiyle tespit edilebilmesi ve sonrasında transfeksiyon işleminin optimizasyonu için pilot deneyler gerçekleştirildi. Ticari olarak satın alınan anti-BRCA2 antikorunun aktivitesi (Merck, OP95) çeşitli kanser hücrelerinde (MDA- MB-231, U2OS) teyit edildi. Yaklaşık 390 kDa ağırlığındaki BRCA2 proteininin Western blot ile belirlenmesi için standart Western blot protokolümüz ilgili pilot deneylerden alınan neticelere ve literatüre göre optimize edildi (Moro vd., 2015). Sonuç olarak, en az 30-35 µg protein örneğinin yüklendiği %6'luk SDS poliakrilamit jel yaklaşık 5-6 saat koşuruldu (120 V). Jeldeki protein örneklerinin PVDF membrana transferi için %10 metanol içeren transfertamponunun içerisine %0.1 Tween-20 eklendi ve transfer işlemi 3-4 saat (400 mA) boyunca devam etti. Gece boyunca 1:1000 dilüsyonda anti-BRCA2 antikoruyla inkübe edilen membran ertesi gün görüntülendiğinde hücrelerdeki BRCA2 protein ekspresyonu teyit edildi.

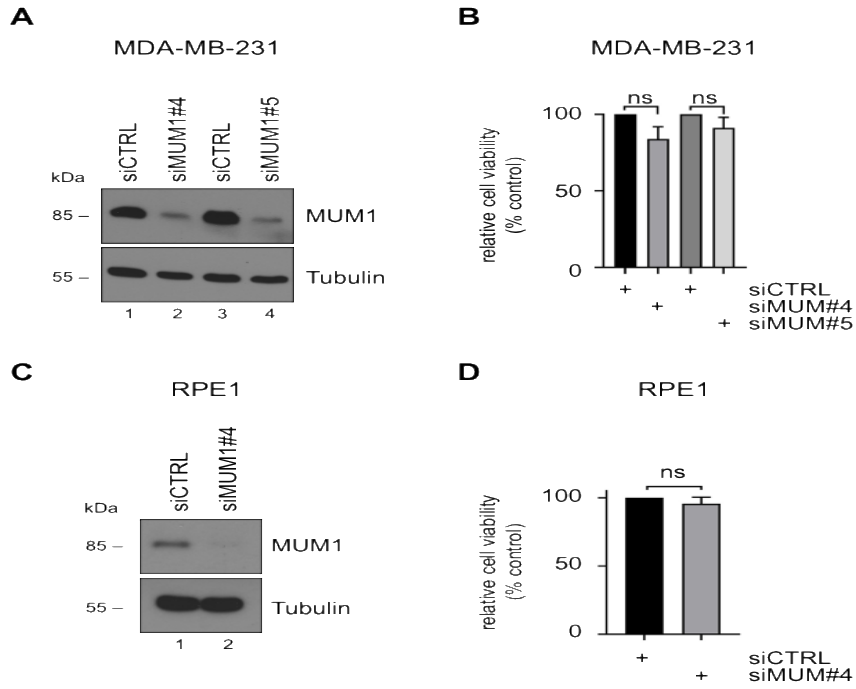
BRCA2 siRNA kompleksinin (siBRCA2#6, Qiagen) hedef mRNA'yı susturma kapasitesi, herhangi bir mRNA'yı baskılama etkisine sahip olmayan (non-silencing) siRNA kompleksi ile karşılaştırıldı. Son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde (Lekomtsev vd., 2010) iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılan siRNA kompleksleri 5x10⁵ MDA-MB-231 hücresiyle birlikte 60-mm hücre ekim kabına ekildi. Transfeksiyon işleminden 24, 48, 72 ve 96 saat sonra tripsinizasyon işlemiyle toplanan hücrelerdeki total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile SDS-PAGE jelde koşturulup PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktararak BRCA2 downregülasyon profili incelendi. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 10 nM siBRCA2#6 kompleksiyle transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki BRCA2 ekspresyonunun transfeksiyon işleminden 96 saat dahi yeterli oranda baskılanmadığını gözlemlendi (Şekil 4.3, A). Transfeksiyon işlemi siRNA son konsantrasyonu 20 nM olacak şekilde optimize edildiğinde de yeterli mRNA susturma aktivitesinin gerçekleşmediği belirlendi (Şekil 4.3, B). siRNA son konsantrasyonu 40 nM olacak şekilde transfeksiyon protokolü modifiye edilerek MDA-MB-231 transfekte edildi, transfeksiyon işleminden 24 saat sonra BRCA2 mRNA'sının başarılı bir şekilde engellendiği protein ekspresyonunun baskılandığını gözlemlendi (Şekil 4.3, C). Western blot yöntemiyle elde edilen bantların densitometrik analizi, transfeksiyon işleminin 96 saat süreyle %80 baskılama oranıyla devam ettiğini gösterdi. (Şekil 4.3, D).



Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde BRCA2 mRNA'sını hedefleyen %6'lık SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri modifiye edilmiş Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-BRCA2 antikoruyla (1:1000, anti- BRCA2, Merck, #OP95) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (n=1). (D) Panel C'de elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. BRCA2 bant yoğunlukları ilgili gruplardaki tubulin yoğunluğuna normalize edildi

Azalan MUM1 ekspresyonunun normal ve kanser hücrelerinin hücre canlılığına olan etkisini araştırmak üzere gerçekleştirilen hücre canlılık analizlerinde yukarıda optimize edilen transfeksiyon protokolleri uygulandı. Kısaca, son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılarak 1ml OPTIMEM içerisinde dilüte edilen siRNA kompleksleri 1mL besiyeri içerisinde dilüte edilen 2x10E5 MDA-MB-231 hücresiyle karıştırıldı ve 100 µL siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonunun 96-kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirildi (1x10E4 hücre/kuyucuk). 48 saatlik inkübasyon işleminden sonra ilgili firmanın protokolü uyarınca gerçekleştirilen canlılık analizi sonucu

MUM1 ekspresyonunun 48 saatlik down-regülasyonunun (Şekil 4.4, A) hücre canlılığına önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.4, B). Benzer transfeksiyon ve canlılık analiz protokolü uygulanarak gerçekleştirilen çalışmalarda, azalan MUM1 ekspresyonunun (Şekil 4.4, C) normal RPE1 hücrelerinin canlılığına da önemli bir etkisinin olmadığını gösterdi (Şekil 4.4,D).

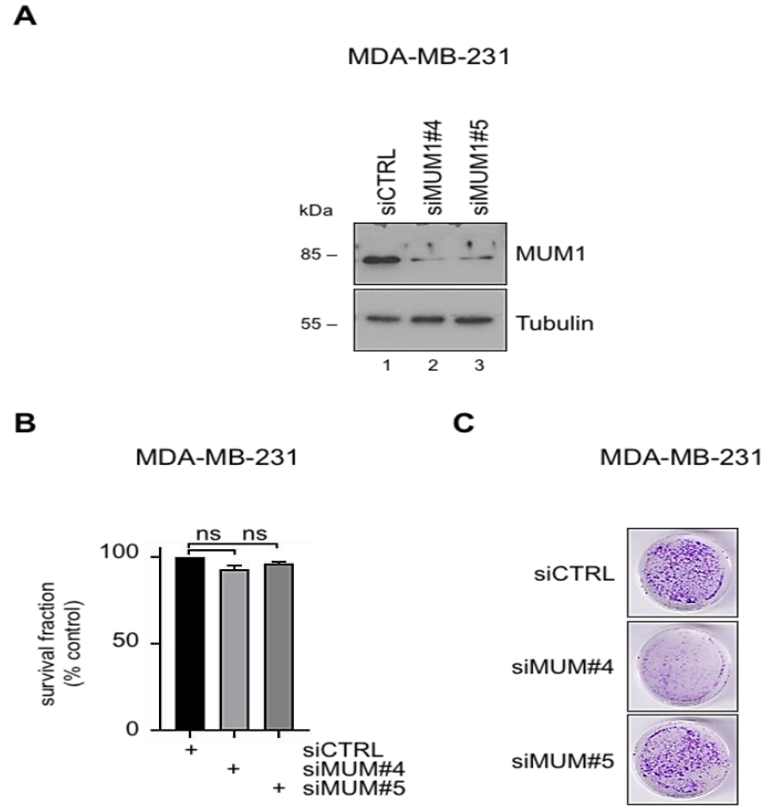


Şekil 4.4. Azalan MUM1 ekspresyonunun MDA-MB-231 ve RPE1 hücre canlılığına olan etkisi. (A) siRNA (siCTRL, siMUM1#4 ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B) Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edilen hücrelerin (10.000) 96-kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirildikten 48 saat sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa MTT'nin ilk solüsyonundan 10 µL eklendi ve kuyucukta kullanılan besiyeri ile 100 µL'ye tamamlandı. Hücreler 4 saat oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde muhafaza edildi. Sonrasında MTT'nin ikinci solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µL eklendi ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Akabinde ELISA plate reader ile 595 nm'de absorbansı ölçülerek hücrelerin canlılığı belirlendi (n=3). (C) siCTRL ve siMUM1#5 kompleksleri kullanılarak RPE1 hücreleri Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edildi ve netice Western blot analiziyle teyit edildi. (D) Azalan MUM1 seviyesinin RPE1 hücre canlılığına olan etkisi Panel B'de anlatıldığı üzere belirlendi (n=3)

Konvansiyonel anti-kanser ajanların veya hücre için bileşenlerin genetik veya kimyasal inhibisyonlarının kanser hücre koloni sağ-kalımına olan etkilerinin belirlenebilmesi için uygulanan koloni sağ-kalım analizi in vitro sitotoksisite analizi olarak kanser araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Franken vd., 2006). siRNA transfeksiyonuyla ekspresyonu baskılanan MUM1 proteininin MDA-MB-231 kanser koloni sağ-kalımına olan etkisini belirlemek amacıyla koloni sağ-kalım testleri gerçekleştirildi.

Kısaca, son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılarak 1 mL OPTIMEM içerisinde dilüte edilen siRNA kompleksleri, 1 mL besiyeri içerisinde dilüte edilen 1×10^4 MDA-MB-231 hücresiyle karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından seyreltilen siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonundan 1500 μ L 60-mm ekim plakasına ekildi (1500 hücre/plaka). Ertesi gün hücre besiyeri tazelenerek transfeksiyon ajanının sitotoksitesi minimize edildi. Koloni oluşumu 8-12 gün süreyle takip edildi ve her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney belirli bir süre sonra durdurularak fiksasyon ve boyama işlemleri gerçekleştirildi.

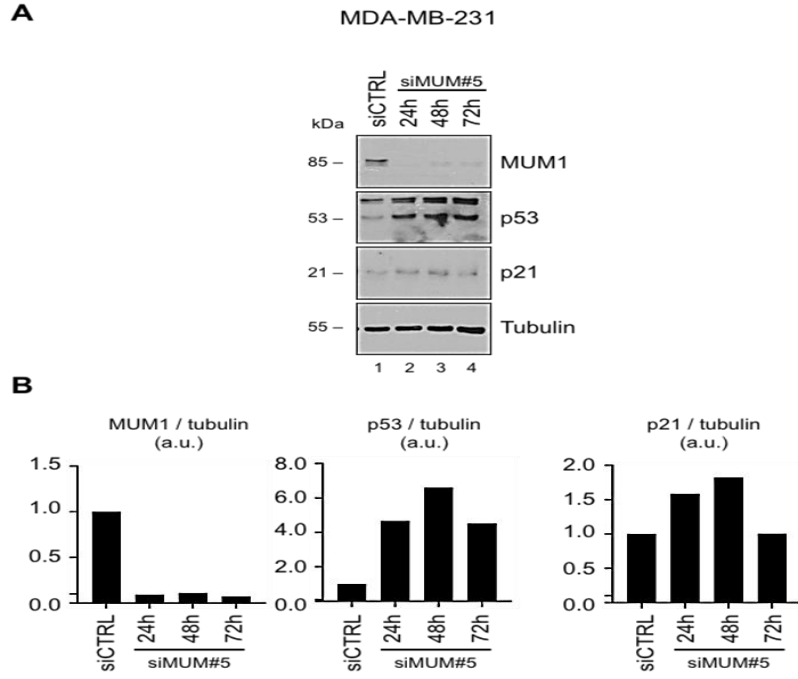
Elde edilen sonuçlarda, azalan MUM1 ekspresyonunun (Şekil 4.5, A), MDA-MB-231 kanser koloni sağ-kalımına önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.5, B ve C). Her ne kadar siMUM1#4 kompleksiyle transfekte edilen grubun oluşturduğu kolonilerin, kontrol ve siMUM1#5 transfeksiyon gruplarının oluşturduğu kolonilere oranla daha az sayıda hücre içerdiği gözlemlense de kolonisayısı bakımından önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, elde edilen neticeler azalan MUM1 ekspresyonunun RPE1 ve MDA-MB-231 hücre canlılığına ve koloni sağ- kalımına önemli bir etkisinin olmadığını gösterdi.



Şekil 4.5. Azalan MUM1 ekspresyonunun MDA-MB-231 koloni sağ-kalımına etkisi. (A) siRNA (siCTRL, siMUM1#4 ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B) Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edilen hücreler (1500) 60-mm hücre kültür plakasına ekildi. Ertesi gün besiyeri tazelendikten sonra 8-12 gün süreyle inkübatörde koloni oluşumu izlendi. Her bir koloninin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerintemas etmemesi dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Fiksasyon ve kristal viyole boyama işlemlerinin ardından yıkanan plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlandı. Herplakadaki koloni sayımı gerçekleştirilerek kontrol grubuna normalize edildi (n=3). (C) Boyaması gerçekleştirilen örnek koloni oluşumları

Tümör süppressör p53 proteini, DNA hasar yanıtlarının regülasyonunda rol oynayan merkezi bir transkripsiyon faktörüdür. Endojen stres faktörleri ve/veya genotoksik saldırılar neticesinde oluşan genomik lezyonlar dolayısıyla aktif hale gelen p53 proteini hücre döngüsünün durdurulması, DNA hasar yanıtının düzenlenmesi, ilgili DNA onarım yollarının aktivasyonu, hücrenin senesans evresine alınması veya apoptotik mekanizmalar vasıtasıyla proliferasyon havuzundan elimine edilmesi dahil çok sayıda hücresel yolağın regülasyonunusağlayan transkripsiyonal bir programı yönetir.

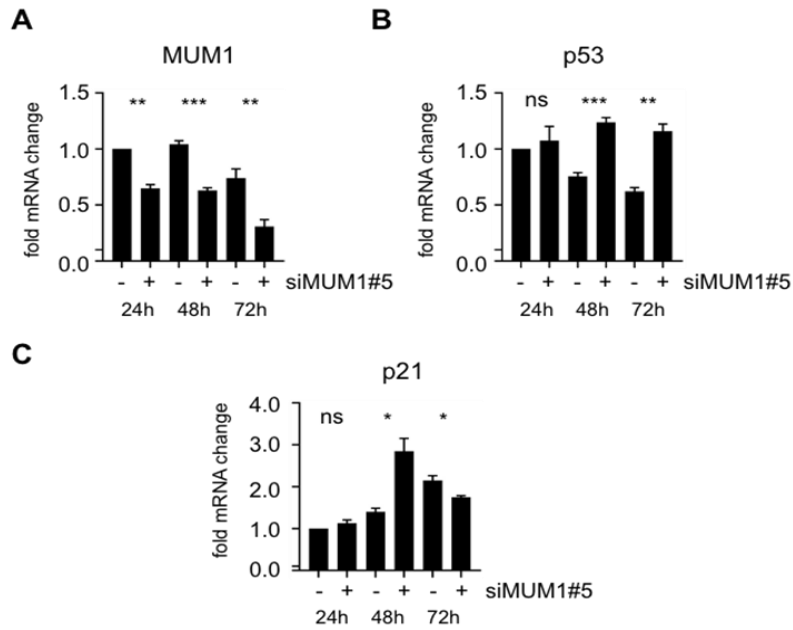
(Kulaberoglu vd., 2016; Speidel, 2015). DNA hasarı neticesinde aktif hale gelen p53 proteini, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü (İng. cyclin- dependent kinase [CDK] inhibitörü, CKI) p21 (WAF1/CIP1) proteininin geçici ekspresyonunu sağlayarak hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulmasını veya apoptosis ile programlı bir şekilde ölümünü sağlar (Georgakilas vd., 2017; Kulaberoglu vd., 2016). Farklı fizyolojik şartlara bağlı olarak p21 ekspresyonunun p53'den bağımsız olarak artabileceği de gösterilmiştir (Macleod vd., 1995). MDA-MB-231 hücrelerinde, azalan MUM1 ekspresyonunun p53 ve p21 protein düzeyleri üzerine olan etkisi gerçekleştirilen Western blot deneyleriyle araştırıldı. Son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılan siRNA kompleksleri 5x10E5 MDA-MB-231 hücresiyle birlikte 60-mm hücre ekim kabına ekildi (ters transfeksiyon). Transfeksiyon işleminden 24, 48 ve 72 saat sonra tripsinizasyon işlemiyle toplanan hücrelerde total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturulup PVDFmembrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak MUM1, p53 ve p21 protein ekspresyon profilleri incelendi. Kontrol hücreleriyle (siCTRL) karşılaştırıldığında, MUM1 ekspresyonunun baskılandığı hücrelerde p53 protein miktarının önemli oranda arttığı belirlendi (Şekil 4-6, A). Bantların densitometrik analizi, özellikle transfeksiyon işleminden 48saat sonra kontrol hücrelerine kıyasla 6 kat artan p53 protein miktar artışının transfeksiyondan itibaren 72 saat süreyle devam ettiğini gösterdi (Şekil 4-6, B, Grafik-2). MUM1 ekspresyonu baskılanan hücrelerdeki p21 protein miktarı incelendiğinde, azalan MUM1 seviyesine karşı p21 ekspresyonunda önemli bir artışın olduğu ve transfeksiyon işleminden 48 saat sonra en yüksek seviyeye ulaşan p21 miktarının, p53 ekspresyon profilinin aksine, 72. saatten itibaren normalleşmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 4.6, Grafik-3).



Şekil 4.6. Azalan MUM1 miktarının p53 ve p21 protein ekspresyonuna olan etkisi. (A) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437), anti-p53 (1:1000, Santa Cruz, #sc126) veya anti-p21 (1:1000, Santa Cruz, #sc6246) antikorlarıyla inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460 veya anti-mouse, ThermoFisher, #32430) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (n=2). (B) Panel A'da elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Belirtilen proteinlerin bant yoğunlukları ilgili gruplardaki tubulin yoğunluğuna normalize edildi

MUM1 protein miktarının p53 ve p21 transkripsiyon profiline olan etkisinin belirlenmesi için gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) gerçekleştirildi. Son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılan siRNA kompleksleri 5×10^5 MDA-MB-231 hücresiyle birlikte 60-mm hücre ekim kabına ekildi. Transfeksiyon işleminden 24, 48 ve 72 saat sonra steril kazıyıcı yardımıyla toplanan hücrelerde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen total RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlendikten sonra bütünlüğü agaroz jelde teyit edildi. Daha sonra ticari olarak temin edilen cDNA sentez kiti ilgili firmanın direktifleri doğrultusunda kullanılarak ters transkripsiyon işlemiyle izole edilen RNA'ya komplementer cDNA sentezi gerçekleştirildi. Son olarak,

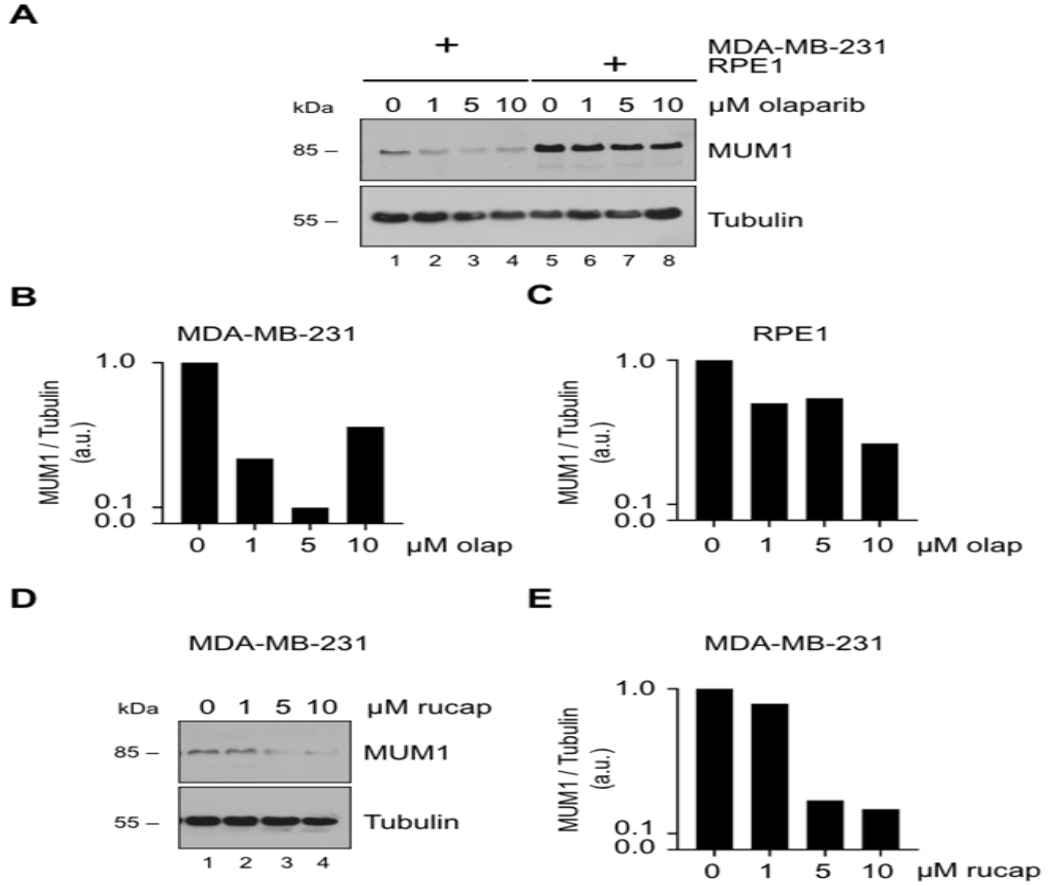
SYBR Green mastermiks ve primer dizileri kullanılarak ilgili firmanın protokolü uyarınca hedef genlerin mRNA profilleri qRT-PCR tespit sisteminde incelendi. Elde edilen sonuçlar, ilgili siRNA transfeksiyonuyla MDA-MB-231 hücrelerinde MUM1 mRNA'sının başarılı bir şekilde susturulduğunu (Şekil 4.7, A) söz konusu hücrelerde p53 mRNA'sının transfeksiyon işleminden 48 saat sonra arttığını gösterdi (Şekil 4.7, B). Azalan MUM1 ekspresyonuna karşı, p53 mRNA'sının transfeksiyon işleminden 72 saat sonra dahi artış gösterdiği ancak p21 mRNA'sının yalnızca 48. saatte anlamlı bir şekilde arttığı sonrasında ise azaldığı tespit edildi (Şekil 4.7, C).



Şekil 4.7. Azalan MUM1 ekspresyonunun p53 ve p21 transkripsiyon profiline olan etkisi. (A-C) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler steril plastik kazıyıcı ile toplandı ve total RNA izolasyonu firmanın protokolü uyarınca gerçekleştirildi. İzole edilen total RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede belirlendikten sonra RNA bütünlüğünün tespiti için 2 µg RNA agaroz jelde koşturularak 28S ve 18S rRNA bant bütünlüğü incelendi. Konsantrasyonu, saflığı ve bütünlüğü belirlenen total RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra SYBR Green mastermiks ve ilgili primerler kullanılarak MUM1- defektif MDA-MB-231 kanser hücrelerindeki MUM1, p53 ve p21 genlerinin transkripsiyon profilleri kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Tüm deney gruplarında elde edilen Ct değerleri ilgili 18S rRNA'ya (HKG) normalize edildikten sonra referans (kalibratör) grup olarak siCTRL, 24h grubuna normalize edildi (n=3)

4.2. PARP inhibisyonunun MUM1 ekspresyonuna olan etkisi

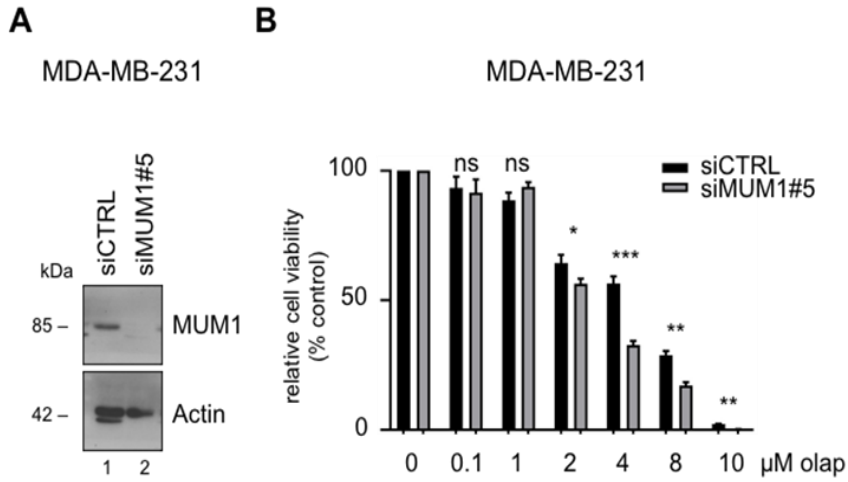
PARP enzimleri, DNA tek zincir kırıklarının onarımı dahil olmak üzere çeşitli hücresel yollarda rol oynamaktadır (Sonnenblick vd., 2015). Bugüne dek yapılan çok sayıda çalışma, PARP ile farklı DDR yollarında rol oynayan genler arasında muhtemel sentetik letal veya canlılık etkileşimlerini tanımlamıştır. Özellikle BRCA1/2 ve PARP arasındaki karakterize edilen sentetik letal ilişki (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005) bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve çok sayıda araştırma farklı DDR regülatörleri arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılmasını amaçlamıştır (Huang vd., 2020; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; O'Connor, 2015). PARP inhibitörleri, PARP enziminin katalitik aktivitesini inhibe ederek endojen olarak gelişen DNA tek zincir kırıklarının birikmesine yol açar ve söz konusu lezyonlar hücre döngüsünün S evresinde gerçekleşen DNA replikasyonu esnasında HR ile onarılan katastrofik DNA çift zincir kırıklarına dönüşür. Gerçekleştirilen Western blot analizleriyle, artan dozlarda küçük molekül PARP inhibitörleri ile tedavi edilen RPE1 veya MDA-MB-231 hücrelerindeki MUM1 ekspresyon düzeyi kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Öncelikle 5x10E5 MDA-MB-231 hücresi ve 7x10E5 RPE1 hücresi 60-mm kültür ekim kaplarına ekildi ve ertesi gün artan dozlarda olaparib ile (0 - 1 - 5 - 10 μ M) tedavi edildi. 72 saat süreyle tedavi edilen hücreler tripsinizasyon işlemiyle toplandı ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgiliprimer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak MUM1 protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. DMSO ile tedavi edilen kontrol hücreleriyle (0 μ M) karşılaştırıldığında, artan dozlarda olaparib ile tedavi edilen MDA-MB-231 ve RPE1 hücrelerinde MUM1 protein miktarının önemli oranda azaldığı belirlendi (Şekil 4.8, A). Bantların densitometrik analizi yapıldığında, olaparib ile tedavi edilen RPE1 hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde MUM1 protein miktarındaki azalmanın daha fazla olduğu dikkat çekti (Şekil 4.8, B ve C). Aynı şekilde, rucaparib ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde de kontrol hücrelerine kıyasla MUM1 protein miktarında anlamlı ölçüde bir azalma belirlendi (Şekil 4.8, D-E).



Şekil 4.8. PARP inhibisyonunun MUM1 protein ekspresyonuna etkisi. (A) 5x10E5 MDA-MB-231 veya 7x10E5 hTERT RPE1 hücreleri 60-mm kültür ekim kabına ekildi. Ertesi gün hücreler besiyeri içerisinde dilüte edilen 0 - 1 - 5 - 10 μM olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Hücreler tripsinize edildikten sonra total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B,C) Panel A'da elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Belirtilen proteinlerin bant yoğunlukları ilgili gruplardaki tubulin yoğunluğuna normalize edildi (n=3). (D) 5x10E5 MDA-MB-231 hücreleri 60-mm kültür ekim kabına ekildi. Ertesi gün hücreler besiyeri içerisinde dilüte edilen 0 - 1 - 5 - 10 μM rucaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Hücreler tripsinize edildikten sonra total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (E) Panel D'de elde edilen bantların densitometrik analizi Image-J (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Belirtilen proteinlerin bant yoğunlukları ilgili gruplardaki tubulin yoğunluğuna normalize edildi (n=1). Kontrol grubundaki hücreler DMSO ile tedavi edildi.

4.3. MUM1-defektif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesinin belirlenmesi

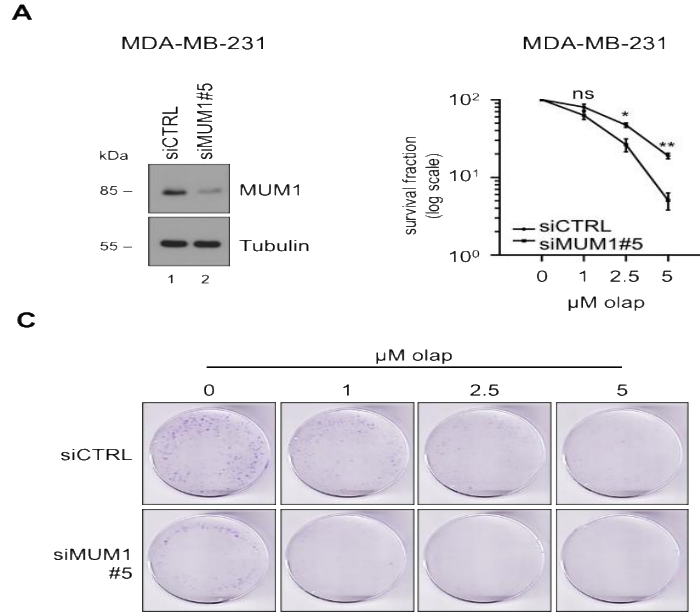
Huen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma (2010), MUM1 proteininin iyonize radyasyon tedavisine karşı kanser hücre sağ-kalımını desteklediğini gösterdi(Huen vd., 2010).Ayrıca PARP inhibisyonu potansiyel olarak sentetik letalite etkisi gösteren etkileşimlerideğerlendiren genomik düzeydeki bir tarama, MUM1 proteininin prediktif bir biyobelirteç olarak dikkate alınmasını önermektedir (Bajrami vd., 2014). Şu ana kadar, MUM1'in PARP inhibitörü tedavisinde hücre canlılığına ve sağ-kalımına doğrudan katkısını değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirdiğimiz hücre canlılık ve koloni sağ-kalım analizleriyle MUM1 ve PARP ikili inaktivasyonunun MDA-MB-231 hücrelerindeki sitotoksitesi araştırıldı. Son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılarak 1 mL OPTIMEM içerisinde dilüte edilen siRNA kompleksleri 1 mL besiyeri içerisinde dilüte edilen 2×10^5 MDA-MB-231 hücresiyle karıştırıldı ve 100 μ L siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonunun 96-kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirildi (1×10^4 hücre/kuyucuk). Ertesi gün hücreler artan dozlarda olaparib ile (0 0.1 - 1 - 2 - 4 - 8- 10 μ M) 72 saat süreyle tedavi edildi. Daha sonra, ilgili firmanın protokolü uyarınca gerçekleştirilen canlılık analizi neticesinde, olaparib tedavisinin kontrol hücrelerine kıyasla MUM1-defektif hücre canlılığını doza-bağımlı bir şekilde azalttığı belirlendi (Şekil 4.9, A-B).



Şekil 4.9. MUM1 defektif MDA-MB-231 kanser hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesinin belirlenmesi. (A) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B) Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edilen hücrelerin (10.000) 96-kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirildi ve ertesi gün artan dozlarda (0 - 0.1 - 1 - 2 - 4 - 8 - 10 µM) olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Daha sonra, besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa MTT'nin ilk solüsyonundan 10 µL eklendi ve kuyucukta kullanılan besiyeri ile 100 µL'ye tamamlandı. Hücreler 4 saat oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde muhafaza edildi. Sonrasında MTT'nin ikinci solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µL eklendi ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Akabinde ELISA plate reader ile 595 nm'de absorbansı ölçülerek hücrelerin canlılığı belirlendi (n=3)

Olaparib tedavisinin MUM1-defektif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ- kalımına olan etkisi koloni sağ-kalım analizleriyle belirlendi. Kısaca, son konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılarak 1 mL OPTIMEM içerisinde dilüte edilen siRNA kompleksleri, 1 mL besiyeri içerisinde dilüte edilen 1x10E4 MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından seyreltilen siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonundan 1500 µL 60-mm ekim plakasına ekildi (1500 hücre/plaka). Ertesi gün hücreler artan dozlarda (0 - 1 - 2.5 - 5 µM) olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Tedavi sonunda besiyeri tazelenerek koloni oluşumu 8-12 gün süreyle takip edildi ve her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney belirli bir süre sonra durduruldu, fiksasyon ve boyama işlemleri yapıldı.

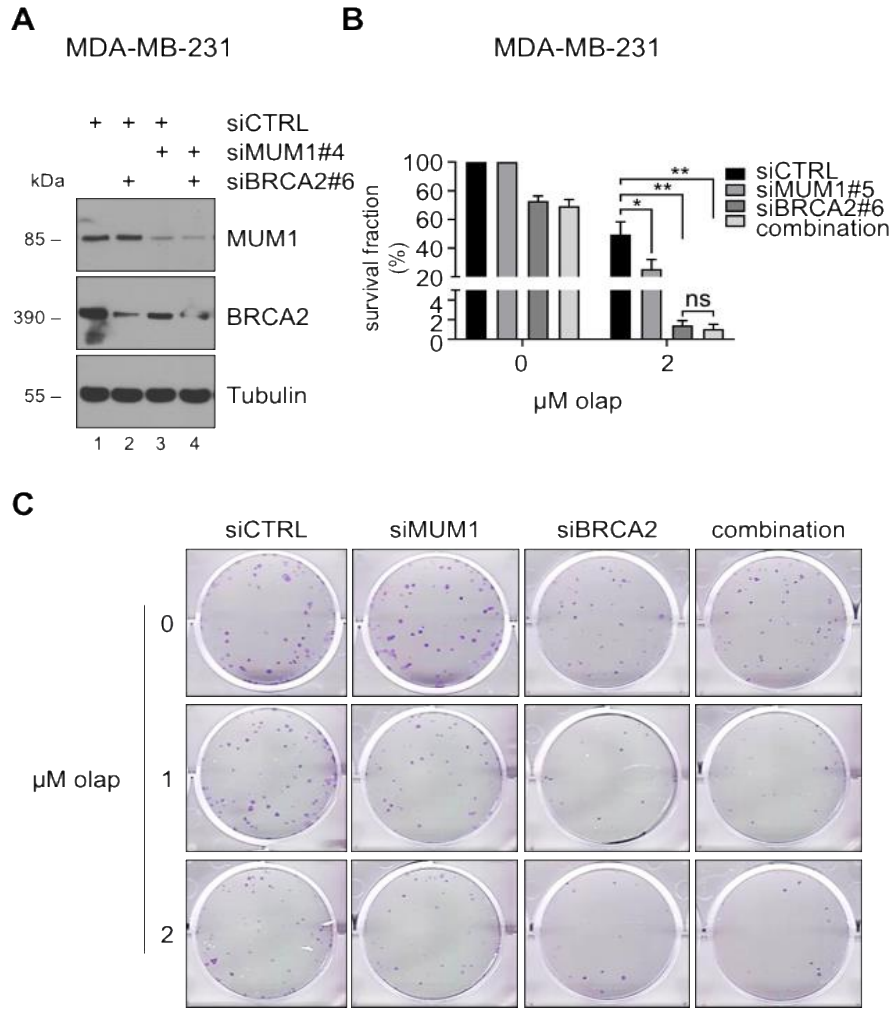
Elde edilen sonuçlarda, azalan MUM1 ekspresyonunun (Şekil 4.10, A), MDA-MB-231 kanserini olaparib tedavisine karşı hassas hale getirdiği gözlemlendi (Şekil 4.10, B ve C). Sonuç olarak, MUM1 proteininin PARP inhibitör tedavisine karşı kanser hücre sağkalımını desteklediği belirlendi.



Şekil 4.10. PARP inhibitör tedavisinin MUM1 defektif hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi. (A) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B) Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edilen hücreler (1500) 60-mm hücre kültür plakasına ekildi. Ertesi gün besiyeri tazelandikten sonra 8-12 gün süreyle inkübatörde koloni oluşumu izlendi. Her bir koloninin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin temas etmemesi dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Fiksasyon ve kristal viyole boyama işlemlerinin ardından yıkanan plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlandı. Her plakadaki koloni sayımı gerçekleştirilerek kontrol grubuna normalize edildi (n=4). (C) Boyaması gerçekleştirilen örnek koloni oluşumları

4.4. MUM1-PARP inaktivasyonunun BRCA2-defektif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi

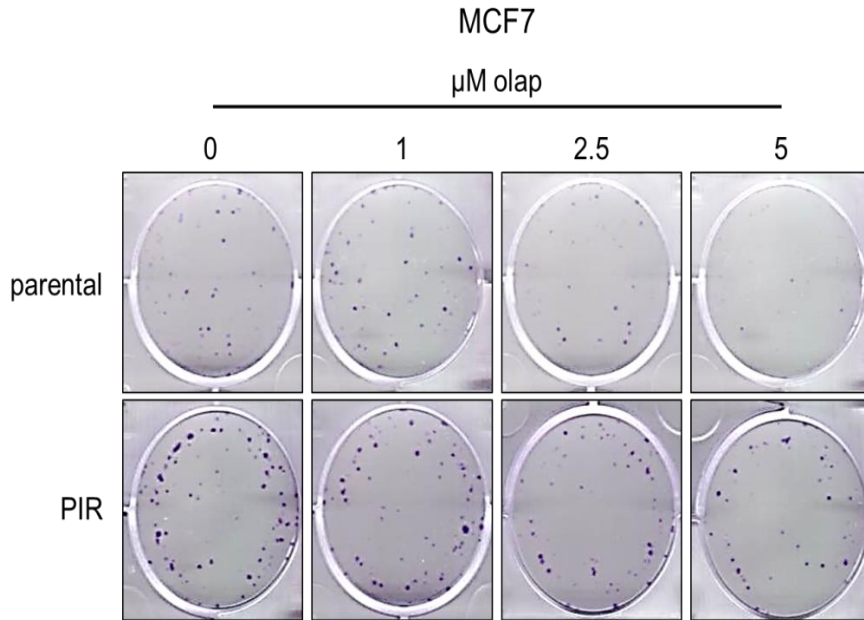
Daha önce yapılan araştırmalar, DNA hasarına yanıt olarak MUM1'in 53BP1 proteini ile direkt olarak etkileşime girmesi neticesinde DNA kırıklarının bulunduğu bölgeye doğru taşındığını ve kromatin relaksasyonu başta olmak üzere birçok kromatin düzenleme süreçlerine müdahil olarak kromatin biyokimyasını DNA hasar tamir sürecine hazır hale getirdiğini göstermiştir (Huen vd., 2010). 53BP1 proteininin PARP inhibitör tedavisindeki önemini dikkate alarak (Bunting vd., 2010; Hong vd., 2016) gerçekleştirdiğimiz koloni sağ- kalım analizlerinde, BRCA2-defektif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde azalan MUM1 ekspresyonunun olaparib tedavi yanıtına olan katkısı araştırıldı. Daha önce gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinde belirlenen dozda siRNA kompleksleri kullanılarak belirlenen süre sonunda olaparib tedavileri gerçekleştirildi. Kısaca, iki katı transfeksiyon ajanıyla karıştırılarak 1 mL OPTIMEM içerisinde dilüte edilen ilgili siRNA kompleksleri (siMUM1#5 için son konsantrasyon 10 nM ve/veya siBRCA2#6 için son konsantrasyon 40 nM), 1 mL besiyeri içerisinde dilüte edilen 2x10E3 MDA-MB-231 hücresiyle karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından seyreltilen siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonundan 500 µL 6-kuyucuklu ekim plakasına ekildi (500 hücre/kuyucuk). Ertesi gün hücreler artan dozlarda (0 - 1 - 2 µM) olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Tedavi sonunda besiyeri tazelenerek koloni oluşumu 8-12 gün süreyle takip edildi ve her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney belirli bir süre sonra durduruldu, fiksasyon ve boyama işlemleri gerçekleştirildi. MUM1 ve/veya BRCA2 ekspresyonlarının başarılı bir şekilde baskılandığı hücrelerin (Şekil 4.11, A) olaparib yanıtları incelendiğinde, her ne kadar MUM1 ve BRCA2 tekli inaktivasyonları neticesinde artan olaparib hassasiyeti teyit edilmiş olsa da MUM1/BRCA2 ikili inhibisyonunun söz konusu olaparib hassasiyetinde sinerjik bir etki göstermediği gözlemlendi (Şekil 4.11, B ve C).



Şekil 4.11. MUM1-PARP ikili inhibisyonunun BRCA2 defektif meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi. (A) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, daha sonra MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. (B) Panel A'da anlatıldığı üzere transfekte edilen hücreler (1500) 60-mm hücre kültür plakasına ekildi. Ertesi gün besiyeri tazelandikten sonra 8-12 gün süreyle inkübatörde koloni oluşumu izlendi. Her bir koloninin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin temas etmemesi dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Fiksasyon ve kristal viyole boyama işlemlerinin ardından yıkanan plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlandı. Her plakadaki koloni sayımı gerçekleştirilerek kontrol grubuna normalize edildi (n=3). (C) Boyaması gerçekleştirilen örnek koloni oluşumları

4.5. Olaparibe karşı dirençli MCF7 meme kanser hücrelerinde (MCF7/PIR) MUM1 protein seviyesinin belirlenmesi

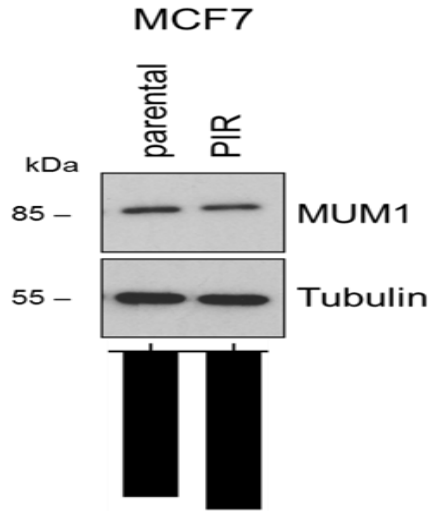
PARP inhibitörleri pre-klinik ve klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar sağlasa da, çeşitli nedenlerle (ör. BRCA1/2 ORF bölgelerinin çeşitli mutasyonlarla tekrar aktive olması, azalan 53BP1 regülasyonu) söz konusu tedavilere karşı zaman içerisinde direnç gelişmektedir (Bitler vd., 2017; D'Andrea, 2018; Davar vd., 2012; Edwards vd., 2008; Jaspers vd., 2013; Li vd., 2020; Noordermeer ve van Attikum, 2019). MUM1 protein seviyesinin kanser hücrelerinin PARP inhibitör duyarlılığını belirlediği dikkate alınarak, küçük molekül PARP inhibitörü olaparibe karşı direnç kazanan hücrelerde azalan MUM1 ifadesinin duyarlılık mekanizmasının tekrar kurulmasında belirleyici bir faktör olup olmadığı araştırıldı. Bu nedenle öncelikle artan dozlarda sürekli seleksiyon ile olaparibe dirençli MCF7 klonları (MCF7/PIR) oluşturuldu ve oluşturulan direnç koloni sağkalım analizleriyle teyit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. PARP inhibitörü olaparibe karşı dirençli MCF7 kolnlarının (MCF7/PIR) oluşturulması. 6-cm'lik kültür kaplarına ekilen 3×10^5 MCF7 hücresi, IC50 değerleri dikkate alınarak belirlenen dozlarda olaparib ile tedavi edildi. İlaçlı besiyeri her 3-4 günde bir tazelandı. Haftalık doz artırımını (x1,25) sağlandı ve %80-90 konflüente oluşan hücreler pasajlandı. Direnç kazanmaya başlayan hücreler belirli dozlarda pasajlanarak bir kısmı donduruldu ve kalan kısmıyla direnç oluşturma çalışması devam edildi. Oluşturulan direncin teyit edilmesi için gerçekleştirilen koloni sağkalım analizi kapsamında, 500 adet MCF7 parental veya PIR hücresi 60-mm hücre kültür plakasına ekildi. Ertesi gün besiyeri tazelandikten sonra 8-12 gün süre

inkübatörde koloni oluşumu izlendi. Her bir koloninin en az elli hücreye ulaşması ve koloni durumları temas etmemesi dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Fiksasyon ve kristal viyole boyama işlemlerinin ardından yıkanan plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlandı

Daha sonra, olaparibe dirençli MCF7 PIR hücrelerindeki MUM1 protein miktarı kontrol (MCF7/parental) hücreleriyle karşılaştırıldı. 6-cm petri kabına ekilen hücreler ertesi gün toplandı ve ilgili protokol doğrultusunda oluşturulan protein lizatları Western deneyleriyle incelendi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, parental ve olaparib-dirençli MCF7 kanser hücrelerinde MUM1 protein ifadesinde anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi (Şekil 4.13)

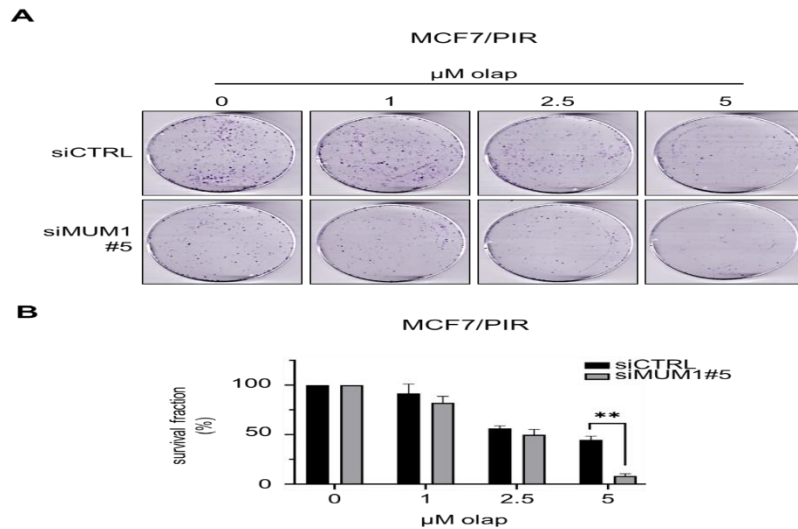


Şekil 4.13. MCF7 parental ve PIR hücrelerindeki MUM1 ekspresyonunun belirlenmesi. Hücreler kültüre alındıktan 48 saat sonra tripsinize edildi ve yaklaşık 1×10^6 hücre 60-mm kültür ekim kabına ekildi. 48 saat süren inkübasyonun ardından eksponansiyel büyüme eğrisine sahip hücreler tripsinize edildikten sonra total protein izolasyon işlemi gerçekleştirildi. %12'lik SDS poliakrilamid jelde ayrılan protein örnekleri Western blot tekniğiyle PVDF membrana transfer edildi. Gece boyunca anti-MUM1 antikoruyla (1:1000, anti-MUM1, CST, #13437) inkübe edilen membran ertesi gün 2 saat süreyle sekonder antikorla (1:5000, anti-rabbit, ThermoFisher, #31460) muamele edildi. HRP-konjuge sekonder antikorların ECL (enhanced chemiluminescence) solüsyonuyla muamelesinin ardından kemilüminesans görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (n=1) Taranan filmlerin densitometrik analizleri İmage J programı (NIH) ile gerçekleştirildi

4.6. Olaparibe karşı dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7/PIR) MUM1 ve PARP1/2 ikili inhibisyonunun in vitro sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Sürekli seleksiyon metoduyla geliştirilen olaparib dirençli MCF7 kanser hücrelerinde MUM1 ve PARP1/2 ikili inhibisyonunun sitotoksik etkisi in vitro koloni sağkalım deneyleriyle araştırıldı. Lipofectamine RNAMAX ajanıyla gerçekleştirdiğimiz siRNA transfeksiyonuyla araştırıldı.

MUM1 ifadesi baskılanan MCF7/PIR-siMUM1 ve kontrol MCF7/PIR-siCTRL hücreleri 60- mm'lik petri kutularına ekildi ve ertesi gün artan dozlarda olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi. İlaçlı besiyeri tazelandikten sonra, standart hücre kültürü besiyerinde 10-12 gün süreyle inkübe edilen hücrelerin oluşturduğu koloniler kristal viyola ile boyandı. Elde edilen sonuçlar, MUM1 inhibisyonunun olaparib dirençli hücrelerde olaparib sitotoksitite yoğunlaştırdığını ve dolayısıyla kanser koloni sağkalımını engellediğini gösterdi. (Şekil 4.14, A ve B).



Şekil 4.14. Olaparibe dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7/PIR) MUM1 ve PARP1/2 ikili inhibisyonunun kanser koloni sağ-kalımına etkisinin belirlenmesi. (A-B) siRNA (siCTRL ve siMUM1#5) ve Lipofectamine RNAiMAX reaktifi OPTIMEM içerisinde dilüte edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi, MDA-MB-231 hücreleriyle karıştırılarak ters transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler (1500) 60-mm hücre kültür plakasına ekildi. Besiyeri tazelandı sonra 8-12 gün süreyle inkübatörde koloni oluşumu izlendi. Her bir koloninin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin temas etmemesi için deney sonlandırıldı. Fiksasyon ve kristal viyole boyama işlemlerin yikanıp plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlandı. Koloni sayımı kontrol grubuna normalize edildi(n=3)

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirdiğimiz araştırmalar daha önce yayımlanan çalışmalarda DNA hasar yanıt (DDR) regülatörü (Huen vd., 2010) ve PARP inhibitör tedavi yanıtının potansiyel bir biyobelirteci olabileceği (Bajrami vd., 2014) ileri sürülen MUM1 (EXPAND1) proteininin, PARP inhibitör tedavisine karşı kanser hücre sağkalımını desteklediğini, dolayısıyla PARP inhibitör tedavisinde MUM1 ekspresyon seviyesinin yeni bir prediktif biyobelirteç olabileceğini önermektedir.

Ökaryotik DNA molekülleri histon proteinlerine sarılı olarak kompakt bir şekilde muhafaza edilir. Kromatin olarak adlandırılan söz konusu nükleoprotein kompleksinin önemli bir bölümü heterokromatin formunda bulunur. Rutin DNA metabolizması (replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon, vd.) esnasında histon modifikasyonları ve kromatin düzenleme faktörleri tarafından söz konusu fiziksel bariyer engellenir. Bu şekilde ökromatin formuna geçen spesifik kromatin fragmentine ilgili moleküler sürecin regülasyonundan sorumlu proteinlerin ulaşması sağlanır. Ayrıca endojen veya eksojen etkenler dolayısıyla oluşan DNA hasarının başarılı bir şekilde onarılması için de kromatin yapısı düzenlenerek DDR faktörlerinin hasarlı kromatin bölgesine ulaşması sağlanır (Clapier ve Cairns, 2009). DNA çift zincir kırıklarının onarımını sağlayan homolog rekombinasyon (HR) mekanizmasının işleyişi esnasında hasarsız kromatit üzerinde homoloji taramasının yapılması bu mekanizmanın kromatin düzenleyici faktörlerin işleyişine daha fazla ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (Clapier ve Cairns, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, genotoksik saldırılar karşısında hücre döngüsü kontrol noktalarının aktif hale gelebilmesi ve DNA onarımının sorunsuz bir şekilde gerçekleşebilmesi için kromatin yapısının düzenleyici faktörler tarafından hazırlanması gerektiği ortaya çıkarılmıştır (Ayoub vd., 2008; Murga vd., 2007). Fizyolojik şartlar altında inaktif homodimerik yapıda bulunan ATM kinaz molekülleri, katastrofik DNA çift kırıklarının oluşmasının ardından otofosforilasyona uğararak (Ser1981) aktif monomer statüsüne geçer. aktif monomer statüsüne geçer. Aktif ATM kinaz daha sonra tam fonksiyonel bir DDR yanıtının düzenlenmesi amacıyla çok sayıda substrat ile birlikte H2AX (Ser139) proteininin de fosforilasyonunu sağlayarak hasarlı kromatin bölgesindeki 1 Mb'lık domainin işaretlenmesini regüle eder (Bakkenist ve Kastan, 2003; Hamil ton vd.,

2011; Kuo ve Yang, 2008; Lee ve Paull, 2005; Paull, 2015). Bu durum neticesinde lezyon etrafında toplanan MDC1 proteini RNF8 ve RNF168 aktivitelerini motive ederek 53BP1 ve BRCA1 hasarının olduğu alanda toplanmasını sağlar (Chapman vd., 2012; Ciccio vd., 2010; Shrivastav vd., 2008). Ayrıca, kromatin yapısının organizasyonun da rol oynayan KAP1 ve HP1 proteinlerinin de hasarlı bölgede toplanarak lezyonun onarılması için kromatin yapısını ulaşılabilir hale getirdikleri bildirilmiştir (Hamilton vd., 2011). Azalan HP1 ekspresyonunun DNA çift zincir kırıklarına karşı hassasiyet kazandırdığı rapor edilmiştir (Luijsterburg vd., 2009). KAP1 proteini de DNA hasarı durumunda ATM tarafından fosforile edilerek (Ser824) heterokromatin halde bulunan bölgenin onarımını teşvik etmektedir (White vd., 2016).

Aktif hale gelen H2AX vasıtasıyla hasarlı kromatin bölgesinde toplanan MDC1/RNF8/RNF168 kompleksi oluşan DNA çift zincir kırığının onarımını kontrol eden 53BP1 ve BRCA1 proteinlerini lezyon çevresinde toplar. 53BP1, RIF1 ve Shieldin proteinleriyle birlikte çift zincir kırıklarının olduğu uçların reseksiyonunu engelleyerek onarımın NHEJ yolağıyla yapılmasını teşvik ederken (Frock vd., 2021; Gupta vd., 2018; Lees-miller ve Meek, 2003), BRCA1 proteini ise BARD1 ile birlikte 53BP1 aktivitesini engelleyerek DNA uç reseksiyonunu teşvik eder ve onarımın HR yolağıyla yapılmasını sağlar (Chapman vd., 2013; Jasin ve Rothstein, 2013; Syed ve Tainer, 2018). 53BP1 tümör süppressör proteininin kırık DNA uçlarındaki işlevinin mekanistik regülasyonunu açıklığa kavuşmak isteyen Huen ve arkadaşları tarafından, 53BP1 ile MUM1 proteininin etkileşim halinde olduğu ortaya çıkarılmıştır (Huen vd., 2010). Söz konusu çalışmada, kromatin metabolizmasında görev alan çok sayıda proteinin yapısında bulunan ve proteinlerin kromatinin bulunduğu alana toplanmasını sağlayan PWWP domainine (Pro-Trp-Trp-Pro) sahip MUM1 proteininin kromatin statüsünün korunmasına katkı sağladığı bildirilmiştir. Kütle spektrometresi ve immünopresipitasyon deneyleriyle 53BP1 ile etkileşimi teyit edilen kromatin faktörü MUM1 proteininin, eksojen DNA hasarı durumunda H2AX ile birlikte hasarlı kromatin bölgesinde toplandığı ve söz konusu MUM1 translokasyonunun 53BP1 etkileşimine bağlı olduğu gösterilmiştir. (Huen vd., 2010) Gerçekleştirilen iyonize radyasyon kaynaklı foci oluşum analizleri, MUM1 foci oluşumunun; H2AX, MDC1, RNF8 ve 53BP1 aktivitesine bağlı olduğunu örneğin, RAP80, BRCA1, NBS1 ve ATM aktivitesinden bağımsız geliştiğini göstermiştir.

Diğer bir ifadeyle aktivitesinden bağımsız geliştiğini göstermiştir ilgili sinyal yolağı içerisinde MUM1'in 53BP1 proteininin downstreaminde görev aldığı, ayrıca 53BP1'in hasarlı bölgeye toplanabilmesi için MUM1' e bağlı olmadığı ortaya çıkarılmıştır.(Huen vd., 2010) DNA hasarı durumunda, kromatin statüsünün düzenlenmesi için MUM1 proteininin gerekli olduğu, muhtemelen bu nedenle, kontrol hücrelerine kıyasla MUM1-defektif hücrelerde oluşan iyonize radyasyon kaynaklı DNA hasarının tamirinin yetersiz kaldığı da ayrıca bildirilmiştir. Son olarak, elde edilen mekanistik neticelerin biyolojik önemi araştırıldığında, Huen ve arkadaşları azalan MUM1 ekspresyonunun kanser hücrelerini iyonize radyasyon tedavisine karşı hassas hale getirdiğini göstermiştir (Huen vd., 2010).

BRCA1/2-mutant kanser hastalarına uygulanan PARP inhibitör tedavisi başarılı sonuçlar sağlamasına rağmen wild-type BRCA1/2 statüsünün de PARP inhibitör hassasiyeti sağlayabileceğini ortaya çıkaran prelinik ve klinik araştırmalar, farklı DDR regülatörlerinin de PARP inhibitör yanıt biyobelirteci olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Cleary vd., 2020; Huang vd., 2020; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; Pilié, Gay, vd., 2019; Pilié, Tang, vd., 2019). Bajrami ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada (2014), genome- wide sentetik letalite taraması uygulanarak potansiyel PARP inhibitör yanıt belirleyici genler araştırılmıştır. 16 binden fazla protein kodlayan gen mRNA'sını hedefleyen yaklaşık 60 binshRNA kompleksinin uygulandığı araştırmada, ekspresyonu baskılanan genlerin MCF7 hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesine olan katkıları incelenmiştir. Söz konusu araştırmada, MUM1 genin de PARP inhibitör prediktif biyobelirteci olma potansiyeli taşıyan genler arasında bulunduğunu ileri sürülmüş ancak bunu kanıtlayan herhangi bir çalışmanın olmadığı belirtilmiştir (Bajrami vd., 2014). Çok sayıda genin aktivitesini engelleyen shRNA havuzunun kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışma da yalnızca CDK12 geninin potansiyel biyobelirteç olma kapasitesi direk analizlerle teyit edilmiştir. Bahsi geçen diğer potansiyel genlerin MCF7 hücrelerindeki mevcut ekspresyonu ve shRNA muamelesi sonrasında baskılanan ekspresyonları konfirme edilmemiştir (Bajrami vd., 2014). Nitekim, araştırmalarımıza başlamadan önce gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalarda, diğer model hücre hatlarıyla kıyaslandığında laboratuvarımızda bulunan MCF7 hücrelerindeki MUM1 ifadesinin sınırlı olduğu belirlendi.

MUM1'in DNA çift zincir kırık onarımını ve iyonize radyasyon tedavisine karşı kanser hücre sağ-kalımını desteklediğini (Huen vd., 2010) ve potansiyel PARP inhibitör yanıt biyobelirteci olabileceğini (Bajrami vd., 2014) dikkate alarak gerçekleştirdiğimiz araştırmalarda MUM1 proteininin PARP inhibisyonuna karşı MDA-MB-231 meme kanseri hücre sağ-kalımını desteklediği gözlemlendi. siRNA kompleksleri kullanılarak MUM1 ekspresyonu baskılanmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin küçük molekül PARP inhibitörü oluparib tedavisine karşı hassasiyet kazandığı ortaya çıkarıldı. RPE1 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen canlılık analizleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında ,azalan MUM1 aktivitesinin hücre canlılığına bir etkisinin olmadığını gösterdi. Aynı şekilde, MUM1-defektif kanser hücrelerinin koloni formasyon kapasitelerinin kontrol hücreleriyle benzer olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, PARP inhibitör tedavisine karşı MUM1-defektif kanser hücrelerinin azalan klonojenik kapasitesinin hücre döngüsünün dolaylı etkisiyle oluşmadığını göstermektedir. MUM1 ekspresyonunun baskılanması karşısında DNA hasar yanıt efektörü p53'ün mRNA ve protein miktarında önemli ölçüde artış gözlemlendi. Öte yandan, p21 mRNA ve protein düzeylerinde gözlenen geçici artışın transfeksiyon işleminden 72 saat sonra normaleştiği tespit edildi. MUM1-efektif ve defektif hücrelerdeki H2AX (Ser139) ekspresyon miktarını karşılaştıran Huen ve arkadaşları, MUM1 baskılanmasının hücrelerde DNA hasarına yol açmadığını bildirmişlerdir (Huen vd., 2010). Her ne kadar MUM1 downregülasyonunun direk olarak DNA hasar oluşumuna neden olmadığı ileri sürülse de, MUM1 ekspresyonu baskılanmış hücrelerdeki DDR statüsünün detaylı incelenmesiyle neden azalan MUM1 ifadesi neticesinde p53 mRNA ve protein miktarının arttığı açıklığa kavuşturacaktır. Ayrıca önemli bir DNA hasar belirteci olan H2AX foci oluşumunun (Kuo ve Yang ,2008) kontrol ve MUM1-defektif hücrelerde immüno floresan tekniklerle araştırılması, MUM1 yokluğunun DNA hasar birikimine neden olup olmadığını ortaya çıkarılacaktır. DNA hasarı neticesinde aktif hale gelen ATM(Ser1981)-CHK2(Thr68)-p53(Ser15) kaskadının post-translasyonel modifikasyon statüsünün incelenmesiyle, MUM1 down-regülasyonu neticesinde artan p53 protein miktarının DNA hasar yanıtı neticesinde gelişip gelişmediği anlaşılabacaktır. Her ne kadar artan p53 ekspresyon düzeyine paralel olarak p21 mRNA'sında geçici bir artış gözlemlense de, azalan MUM1 ifadesi neticesinde artan p53'ün transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığının netleştirilmesi için daha fazla p53 hedef geninin transkripsiyonel profilinin incelenmesi değerlendirilmelidir.

MDA-MB-231 hücrelerinin mutant p53 statüsüne sahip olduğu dikkate alınarak elde edilen sonuçların farklı meme kanseri hücrelerinde veya farklı kanser hücre modellerinde test edilmesi söz konusu fenotipin p53 statüsüne bağlı gelişip gelişmediği anlaşılır.

PARP inhibitörleri olaparib ve rucaparib ile tedavi edilen hücrelerde MUM1 protein seviyesi incelendiğinde, MUM1 ifadesinde doza bağımlı bir şekilde azalma gerçekleştiği gözlemlendi. PARP inhibitör tedavisinin hücre döngüsü etkisi dikkate alındığında (Jelinic ve Levine, 2014) söz konusu fenotipin muhtemel bir hücre döngüsü etkisi neticesinde oluştuğu düşünülmektedir. Olaparib ile tedavi edilen hücre popülasyonu incelendiğinde, S fazındaki azalmaya paralel olarak G2 evresindeki hücre sayısında anlamlı bir artışın olduğu rapor edilmiştir (Jelinic ve Levine, 2014). Bu durum, kromatin düzenleme faktörü olma potansiyelini taşıyan MUM1'in hücre döngüsü-spesifik ekspresyon profiline sahip olduğu göstermektedir. Jelinic ve ark. tarafından yapılan çalışmada olaparibin hücre döngüsü etkisinin wild-type p53'e bağlı bir şekilde gerçekleştiği belirtilmiştir (Jelinic ve Levine 2014) ancak sırasıyla p53 wild-type ve mutant arka planlara sahip RPE1 ve MDA-MB-231 hücreleriyle yaptığımız deneylerde benzer sonuçları elde edildi. Bu nedenle, gelecekte yapılacak kapsamlı hücre döngüsü analizleri PARP inhibitör tedavisinin MUM1 ekspresyonu üzerine etkisinin hücre döngüsü dolayısıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya çıkaracaktır.

BRCA veya ATM defektif kanser hücrelerinin PARP inhibisyonuna karşı hassasiyet kazandığı belirlenmiş (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005; Saveria vd., 2013) ve BRCA veya ATM ile PARP enzimleri arasındaki solid sentetik letal etkileşim çok sayıda prelinik ve klinik çalışmayla gösterilmiştir. Öte yandan, son yıllarda yapılan çalışmalar BRCA veya ATM defektif kanser hücrelerinde azalan 53BP1 ifadesinin PARP inhibitör direncine neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. (Bunting vd., 2010, Hong vd., 2016) Aynı şekilde, diğer 53BP1 ilişkili faktörlerin azalan aktivitelerinin de PARP inhibitör direncine neden olduğu belirtilmiştir. (Aleksandrov vd., 2020). Gerçekleştirdiğimiz in vitro sitotoksite analizleri, azalan MUM1 ifadesinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini PARP inhibitörü olaparibe karşı hassas hale getirdiğini ve bu durumun BRCA2-defektif hücrelerde de gözlemlendiğini gösterdi. Her ne kadar DNA hasarı durumunda MUM1 ve 53BP1 arasında oluşan etkileşim dolayısıyla MUM1 hasarlı kromatin bölgesine yüklense

azalan MUM1 ekspresyonunun 53BP1 proteininin hasarlı bölgeye yüklenmesini engellememesinden dolayı (Huen vd., 2010), MUM1 defektinin PARP inhibitör direncine neden olmadığı değerlendirildi. Benzer şekilde, kromatin düzenleyici faktörler üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda kromatin düzenleme faktörlerinin azalan aktivitelerinin PARP inhibitör hassasiyetine sebep olduğu rapor edilmiştir.(Hewitt vd.,2021).

Klinikte başarılı bir şekilde kullanılmakta olan ve kullanımı yaygınlaşan PARP inhibitörlerine karşı hastaların de novo veya zamanla direnç kazandığı tespit edilmiştir.Bu sebeple PARP inhibitör tedavisine karşı gelişen direnç mekanizmalarının araştırılması, daha fazla hastanın uzun süreli PARP inhibitör tedavisinden faydalanması için önem arz etmektedir.

Gerçekleştirilen prelinik çalışmalar, PARP1 proteinin mutasyona uğraması neticesinde kanser hücrelerinin PARP inhibitör gerçekleştirilen prelinik çalışmalar, PARP1 proteinin mutasyona uğraması neticesinde kanser hücrelerinin PARP inhibitörlerine karşı direnç geliştirebileceğini göstermiştir. Bu durum, küçük molekül PARP inhibitörlerinin PARP enzimine bağlanmasını engelleyerek özellikle PARP1-tuzaklanmasını önemli ölçüde azaltmakta ve direnç sağlamaktadır (Pettitt veLord, 2019). Üçlü negatif meme kanseri hücreleriyle ("TNBC: triple negative breast cancer") gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, PARP1 proteininin post-translasyonel modifikasyonunun PARP1 aktivitesi üzerine muhtemel etkileri incelenmiş ve söz konusu durumun hücrelere PARP inhibitör direnci sağlayabileceği göstermiştir.

Bu çalışmada, oksidatif DNA hasarına karşı aktif hale gelen c-MET enzimi tarafından fosforilasyona uğarayan PARP1 proteinlerinin inhibitörlere bağlanma kapasitesinin azaldığı, enzimatik aktivitelerinin arttığı ve sonuç olarak hücreleri PARP inhibitör tedavisine karşı dirençli hale getirdiği rapor edilmiştir (Du vd., 2016). Dikkat çekici bir şekilde, söz konusu dirençli hücrelerin bir c-MET inhibitörü kullanılarak PARP inhibisyonuna karşı yeniden duyarlı hale getirildiği ve ikili c-MET ve PARP inhibisyonunun, meme ve akciğer kanseri xenograftlarında sinerjistik anti-tümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Du vd., 2016).

PARP mutasyonları veya muhtemel post- translasyonel modifikasyonlarının yanı sıra, kanser hücrelerindeki defektif HR regülasyonunun restorasyonu neticesinde de PARP inhibitörlerine karşı hücrelerin direnç kazanabileceği gösterilmiştir.

Somatik BRCA reversiyon mutasyonları neticesinde tamamen fonksiyonel hale gelen BRCA1/2 gen ürünleriyle işlevselliğini geri kazanan HR mekanizması nedeniyle oluşan PARP inhibitör direnci en iyi tanımlanmış ilgili direnç mekanizmalardan biridir. Buna ek olarak, BRCA1 promoter alterasyonu, hipomorfik BRCA proteinlerinin üretimi ve wild-type BRCA amplifikasyonu da kanser hücrelerine fonksiyonel HR aktivitesi kazandırarak PARP inhibitör direnci sağlayan muhtemel mekanizmalardır (Norquist vd., 2011). Yukarıda bahsedildiği üzere, HR onarım mekanizmasındaki en önemli aşamalardan biri, kırık DNA uçlarının MRE11 CtIP enzimleri tarafından başlatılan ve EXO1 ve DNA2 dahil olmak üzere ek nükleazlar tarafından genişletilen uç rezeksiyonudur.

Son rezeksiyonla ilişkili proteinlerdeki değişikliklerin, daha önce HR eksikliği olan kanser hücrelerine efektif HR kabiliyetini geri kazandırabileceği ve böylece PARP inhibitör direncine yol açabileceği gösterilmiştir. 53BP1 proteini DNA uç rezeksiyon işlevini baskılayarak DNA çift zincir kırıklarının NHEJ mekanizmasıyla onarılmasını sağlayan önemli bir proteindir. Yapılan araştırmalar , 53BP1 kaybının, in vitro olarak BRCA1 eksikliğine rağmen HR mekanizmasını kısmen restore ettiğini ve PARP inhibitör direnci sağladığını göstermiştir.(Belotserkoyskaya vd., 2020). Belotserkoyskaya ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada BRCA1 defektif kanser hücrelerinde 53BP1 eksikliğinin PALB2 proteininin hasarlı kromatin bölgesine yüklenmesini teşvik ettiği ve dolayısıyla hasarlı kromatin bölgesinde RAD51 nükleoprotein filament oluşumunun ve HR mekanizmasının restore edildiği bildirilmiştir.(Belotserkoyskaya vd., 2020). Bu kapsamda, MUM1 ve PARP ikili inhibisyonunun sitotoksik potansiyelini dikkate alarak gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, azalan MUM1 ekspresyonunun PARP inhibitörü olapari-b-dirençli kanser hücrelerini tekrar PARP inhibisyonuna karşı hassasiyet kazandıracağına yönelik hipotezimiz olapari-b karşı sürekli seleksiyon tekniğiyle direnç kazanmış olan MCF7 meme kanseri hücrelerinin kullanılmasıyla test edildi.Bulgular, MUM1 ifadesinin PARP inhibitörüne dirençli kanser hücrelerinin hedeflenmesinde potansiyel bir prediktif biyobelirteç veyahut farmakolojik bir hedef olabileceğini gösterdi.

Söz konusu bulguları farklı bir meme kanseri hücre hattıyla teyit etmek için gerçekleştirdiğimiz analizlerde MDA-MB-231 meme kanseri kullanıldı ancak ilgili hücrelerin olaparibe karşı sürekli seleksiyon tekniğiyle direnç kazanamadığı tespit edildi. Gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı meme kanseri hücre modelleri kullanılarak elde edilen bulguların teyit edilmesi, MUM1 ekspresyonunun PARP inhibitör yanıtındaki muhtemel rolünü destekleyecektir. DNA metabolizmasını düzenleyen kromatin faktörlerinin ve DDR regülatörlerinin, başta PARP inhibitör tedavisi olmak üzere çok sayıda DDR-hedefli kişiselleştirilmiş anti-kanser tedavi yanıtının tahmin edilmesindeki klinik önemi alındığında (Aleksandrov vd., 2020; N. J. Curtin, 2013; Nicola J. Curtin, 2012; Helleday vd., 2008; Huang vd., 2020; Jackson ve Helleday, 2016; Nickoloff vd., 2017; Pilié, Tang, vd., 2019), gerçekleştirdiğimiz çalışmalar MUM1 proteininin DDR biyolojisindeki mekanistik rolünün tam olarak aydınlatılmasının ve fonksiyonel işlevinin in vivo çalışmalarla kanıtlanmasının klinikte PARP inhibitör tedavisine karşı hasta stratifikasyonunda önem arz edeceğini göstermiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Projemiz kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar, MUM1'in PARP inhibitörü olarak tedavisine karşı meme kanseri hücrelerinin sağkalımını desteklediğine ve dolayısıyla MUM1 ekspresyonunun PARP inhibitör biyobelirteci olma potansiyelini taşıdığına dair in vitro kanıtlar sunmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, meme kanseri hücrelerinden farklı olarak MUM1 proteininin farklı kanser hücre modellerinde de (A549, HCT116, OVCA420, U2OS) eksprese edildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla gelecekte yapılacak daha kapsamlı araştırmalar, azalan MUM1 ekspresyonunun farklı kanser hücrelerinde de PARP inhibitör hassasiyeti sağlayıp sağlamayacağını gösterecektir. Aynı şekilde, PARP enzimatik aktivitesini engelleme veya PARP tuzaklama kapasiteleri farklı olan inhibitörlerin kullanılmasıyla MUM1 proteininin söz konusu etkisinin konfirme edilmesi, MUM1 ve PARP arasındaki sentetik letal ilişkiye dair hipotezi güçlendirmiş olacaktır. Projemizde siRNA kompleksleri kullanılarak MUM1 ifadesi geçici olarak susturuldu, elde edilen sonuçların MUM1 ifadesinin stable (kalıcı) olarak baskılandığı hücrelerde teyit edilmesi aynı şekilde sonuçlarımızı konfirme edecektir. Ayrıca, fenotip kurtarma deneyleriyle eksojen MUM1 ekspresyonunun sağlandığı hücrelerin PARP inhibitör direnci incelenmeli ve elde edilen fenotipin off-target etkilerden bağımsız olarak direk bir şekilde azalan MUM1 ifadesi neticesinde geliştiğinin teyit edilmesi önerilmektedir. Proje kapsamında elde edilen in vitro fonksiyonel neticelerin moleküler mekanizmasını araştırmayı amaçlayan gelecekteki çalışmalar; MUM1 inaktivasyonunun DNA tamir yollarının işlevselliğine etki edip etmediğini (ör. GFP reporter assay ile direk veya komet assay ile dolaylı olarak DNA tamir kinetiğinin test edilmesi), PARP ve MUM1 ikili inhibisyonunun hücrelerde DNA hasarının birikmesine neden olup olmadığını (ör. Çeşitli DDR markerlarının ekspresyon profillerinin karşılaştırılması veya immüno Floresan boyama tekniğiyle 53BP1/H2AX foci oluşumunun incelenmesi), MUM1 aktivitesi engellenmiş kanser hücrelerinin PARP inhibitörleriyle tedavi edilmesinin apoptosise neden olup olmadığını eksojen DNA hasarı durumunda MUM1'in çeşitli DDR markerlarıyla birlikte hasarlı kromatin üzerine toplanıp toplanmadığını, immüno Floresan teknikleriyle MUM1 foci oluşum ortaya çıkaracaktır.

Çeşitli in silico veri tabanları MUM1 proteininin NHEJ faktörü DNA-PKcs tarafından fosforile edildiğini (Ser105 ve Ser73) tahmin etmektedir (Obenauer vd., 2003).

MUM1 proteininin potansiyel post-translasyonel modifikasyonlarının (PTM) biyolojik önemini araştırarak olan çalışmalar,söz konusu PTM'lerin ve onkojenik mutasyonların (Cerami vd., 2012) PARP inhibitör tedavisi açısından öneminin anlaşılmasına katkı sunacaktır. Son olarak, gelecekteki araştırmalar PARP ve MUM1 arasında tanımlanan in vitro sentetik letal etkileşimin in vivo modellerde doğrulanması (ör. subkütan tümör xenograft model), MUM1 proteininin klinik öneminin anlaşılmasına fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., Mukherjee, S. K. 2003. "RNA Interference : Biology , Mechanism , and Applications", 67(4), 657–685.

Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoyanov, S., Gospodinov, A. 2020. "The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair". *Cells*, 9(1853), 1–45.

Arena, S., Corti, G., Durnikova, E., Montone, M., Reilly, N. M., Russo, M., ... and Bardelli, A. 2020. "A subset of colorectal cancers with cross-sensitivity to olaparib and oxaliplatin". *Clinical Cancer Research*, 26(6), 1372–1384.

Ashworth, A., Lord, C. J. 2018. "Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?". *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(9), 564–576.

Ashworth, A., Lord, C. J., Reis-Filho, J. S. 2011. "Genetic interactions in cancer progression and treatment.". *Cell*, 145(1), 30–38.

Ayoub, N., Jeyasekharan, A. D., Bernal, J. A., Venkitaraman, A. R. 2008. "HP1- b mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response". *Nature*, 453(7195), 682–686.

Bajrami, I., Frankum, J. R., Konde, A., Miller, R. E., Rehman, F. L., Brough, R., ... and Ashworth, A. 2014. "Genome-wide Profiling of Genetic Synthetic Lethality Identifies CDK12 as a Novel Determinant of PARP1/2 Inhibitor Sensitivity". *Cancer Research*, 74(1), 287–297.

Bakkenist, C. J., Kastan, M. B. 2003. "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation". *Nature*, 421(6922), 499–506.

Barber, L. J., Sandhu, S., Chen, L., Campbell, J., Kozarewa, I., Fenwick, K., ... and Ashworth, A. 2013. "Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor". *Journal of Pathology*, 229(3), 422–429.

Bartek, J., Bartkova, J., Lukas, J. 2007. "DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression". *Oncogene*, 26(56), 7773–7779.

Baylin, S. B., Jones, P. A. 2016. "Epigenetic Determinants of Cancer". *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 8(9), 1–35.

Belotserkovskaya, R., Raga Gil, E., Lawrence, N., Butler, R., Clifford, G., Wilson, M. D., Jackson, S. P. 2020. "PALB2 chromatin recruitment restores homologous recombination in BRCA1-deficient cells depleted of 53BP1". *Nature Communications*, 11(1), 1–21.

Bhattacharjee, S., Nandi, S. 2017. "Synthetic lethality in DNA repair network: A novel avenue in targeted cancer therapy and combination therapeutics". *IUBMB Life*, 69(12), 929–937.

Bitler, B. G., Watson, Z. L., Wheeler, L. J., Behbakht, K. 2017. "PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance". *Gynecologic Oncology*, 147(3), 695–704.

Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J. M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., ... and Jonkers, J. 2010. "53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triplenegative and BRCA-mutated breast cancers". *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(6), 688–695.

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.

Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., ... and Helleday, T. 2005. "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase". *Nature*, 434(7035), 913–917.

Buisson, R., Dion-Côté, A.-M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A. A. Z., ... and Masson, J.-Y. 2010. "Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination". *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), 1247–1254.

Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., ... and Nussenzweig, A. 2010. "53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks". *Cell*, 141(2), 243–254.

Byrum, A. K., Vindigni, A., Mosammamarast, N. 2019. "Defining and Modulating 'BRCAness'". *Trends in Cell Biology*, 29(9), 740–751.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., ... and Schultz, N. 2012. "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data". *Cancer discovery*, 2(5), 401–404.

Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J., Borel, V., Steger, M., Tomas-loba, A., ... and Boulton, S.J. 2013. "RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection". *Molecular Cell*, 49(5), 858–871.

Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., Boulton, S. J. 2012. "Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice". *Molecular Cell*, 47(4), 497–510.

Ciccia, A., Elledge, S. J. S. J., Adamo, A., Collis, S. J., Adelman, C. A., Silva, N., ... and Elledge, S. J. S. J. 2010. "The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives". *Molecular Cell*, 40(2), 179–204.

- Clapier, C. R., Cairns, B. R. 2009. "The Biology of Chromatin Remodeling Complexes". *The Annual Review of Biochemistry*, 78, 273–304.
- Cleary, J. M., Aguirre, A. J., Shapiro, G. I., D'Andrea, A. D. 2020. "Biomarker-Guide Development of DNA Repair Inhibitors". *Molecular Cell*, 18(78), 1070–1085.
- Collis, S. J., Ciccia, A., Deans, A. J., Hořejší, Z., Martin, J. S., Maslen, S. L., ... and Boulton, S. J. 2008. "FANCM and FAAP24 Function in ATR-Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex". *Molecular Cell*, 32(3), 313–324.
- Curtin, N. J. 2013. "Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer". *British Journal of Pharmacology*, 169(8), 1745–1765.
- Curtin, Nicola J. 2012. "DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target". *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 801–817.
- D'Andrea, A. D. 2018. "Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance". *DNA Repair*.
- Davar, D., H. Beumer, J., Hamieh, L., Tawbi, H. 2012. "Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy". *Current Medicinal Chemistry*, 19(23), 3907–3921.
- Deans, A. J., West, S. C. 2011. "DNA interstrand crosslink repair and cancer.". *Nature reviews. Cancer*, 11(7), 467–480.
- Deckbar, D., Jeggo, P. A., Löbrich, M. 2011. "Understanding the limitations of radiationinduced cell cycle checkpoints". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(4), 271–283.
- Densham, R. M., Garvin, A. J., Stone, H. R., Strachan, J., Baldock, R. A., Daza-Martin, M., Morris, J. R. 2016. "Human BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection". *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(7), 647–655.
- Dietlein, F., Thelen, L., Reinhardt, H. C. 2014. "Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches". *Trends in Genetics*, 30(8), 326–339.
- Dréan, A., Lord, C. J., Ashworth, A. 2016. "PARP inhibitor combination therapy". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 108, 73–85.
- Du, Y., Yamaguchi, H., Wei, Y., Hsu, J. L., Wang, H. L., Hsu, Y. H., ... and Hung, M. C. 2016. "Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors". *Nature Medicine*, 22(2), 194–201.
- Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., ... and Ashworth, A. 2008. "Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2". *Nature*, 451(7182), 1111–1115.

- Erdogan, M. K., Gecibesler, I. H., Yapar, Y., Gundogdu, R., Kirici, M., Behcet, L., Taslimi, P. 2021. "Fatty acid composition, enzyme inhibitory effect, antioxidant and anticancer activity of extract from *Saponaria prostrata* WILLD. subsp. *anatolica* HEDGE". *Bioorganic Chemistry*, 113(January), 105032.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., ... and Ashworth, A. 2005. "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy". *Nature*, 434(7035), 917–921
- Franken, N. A. P. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. 2006. "Clonogenic assay of cells in vitro". *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Frock, R. L., Sadeghi, C., Meng, J., Wang, J. L. 2021. "DNA End Joining : G0-ing to the Core". *Biomolecules*, 11(10), 1487–1495.
- Gartel, A. L., Tyner, A. L. 2002. "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis". *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(8), 639–649.
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A., Bonner, W. M. 2017. "p21: A Two-Faced Genome Guardian". *Trends in Molecular Medicine*, 23(4), 310–319.
- Giovannini, S., Weller, M. C., Repmann, S., Moch, H., Jiricny, J. 2019. "Synthetic lethality between BRCA1 deficiency and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition is modulated by processing of endogenous oxidative DNA damage". *Nucleic acids research*, 47(17), 9132–9143.
- Gogola, E., Duarte, A. A., de Ruiter, J. R., Wiegant, W. W., Schmid, J. A., de Bruijn, R.,... and Rottenberg, S. 2018. "Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality". *Cancer Cell*, 33(6), 1078–1093.
- Goldstein, M., Kastan, M. B. 2015. "The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy". *Annual Review of Medicine*, 66(1), 129–143.
- Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M., Hergovich, A. 2015. "Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2". *Cellular Signalling*, 27(2), 326–339.
- Goodarzi, A. A., Jeggo, P. A. 2013. "The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks". *İçinde Advances in genetics (C. 82, ss. 1–45)*.
- Gündoğdu, R., Çelik, V., Üniversitesi, F., Fakültesi, F.-E., Bölümü, B., Biyoloji, M., Dalı, A. 2009. "RNA İNTERFERANS (RNAi)". *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 34–47.
- Gundogdu, R., Erdogan, M. K., Ditsiou, A., Spanswick, V., Garcia-gomez, J. J., Hartley, J. A. Gomez, V. 2021. "hMOB2 deficiency impairs homologous recombination-mediated DNA repair and sensitises cancer cells to PARP inhibitors". *Cellular Signalling*, 87(March), 110106.

Gundogdu, R., Hergovich, A., Gomez, V. 2021. "Cell cycle control and DNA damage signalling in mammals". İçinde I. Kovalchuk & O. Kovalchuk (Ed.), *Genome Stability* (2.baskı, ss. 237–255).

Academic Press Inc. Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., ... and Choudhary, C. 2018. "DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity". *Cell*, 173(4), 972–988.e23.

Hamilton, C., Hayward, R. L., Gilbert, N. 2011. "Global chromatin fibre compaction in response to DNA damage". *Biochemical and Biophysical Research Communication* 414(4), 820–825.

Han, H. 2018. "RNA Interference to Knock Down Gene Expression". *Methods Mol Biol*, 1706, 293–302.

Hanahan, D. 2022. "Hallmarks of Cancer : New Dimensions". *Cancer Discovery*, (January), 31–47.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. "The Hallmarks of Cancer". *Cell*, 100(1), 57–70.
Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*, 144(5), 646–674.

Harbeck, N., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., ... and Cardoso, F. 2019. "Breast cancer". Helleday, T. 2011. "The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings". *Molecular Oncology*, 5(4), 387–393.

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., Sharma, R. A. 2008. "DNA repair pathways as targets for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 193–204.

Hewitt, G., Borel, V., Segura-bayona, S., Chapman, J. R., Deindl, S., Boulton, S. J., ... and Fugger, K. 2021. "Article Defective ALC1 nucleosome remodeling confers PARPi sensitization and synthetic lethality with HRD II Defective ALC1 nucleosome remodeling confers PARPi sensitization and synthetic lethality with HRD". *Molecular Cell*, 81(4), 767–783.e11.

Hoeijmakers, J. H. J. 2009. "DNA Damage, Aging, and Cancer". *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485.

Hong, R., Ma, F., Zhang, W., Yu, X., Li, Q., Luo, Y., ... and Xu, B. 2016. "53BP1 depletion causes PARP inhibitor resistance in ATM-deficient breast cancer cells". *BMC Cancer*, 16(1), 725.

Hu, Y., Petit, S. A., Ficarro, S. B., Toomire, K. J., Xie, A., Lim, E., ... and Livingston, D. M. 2014. "PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair". *Cancer Discovery*, 4(12), 1430–1447.

Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A., Weber, B. 2020. "Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery". *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(1), 23–38.

Huen, M. S. Y., Huang, J., Leung, J. W. C., Sy, S. M.-H., Leung, K. M., Ching, Y.-P., ... and Chen, J. 2010. "Regulation of Chromatin Architecture by the PWWP Domain-Containing DNA Damage-Responsive Factor EXPAND1/MUM1". *Molecular Cell*, 37(6), 854–864.

Imyanitov, E. N. 2021. "Cytotoxic and targeted therapy for BRCA1 / 2 -driven cancers". *Hered Cancer Clin Pract*, 19(36), 1–8.

Jackson, S. P. 2002. "Sensing and repairing DNA double-strand breaks". *Carcinogenesis*, 23(5), 687–696.

Jackson, S. P., Bartek, J. 2009. "The DNA-damage response in human biology and disease". *Nature*, 461(7267), 1071–1078.

Jackson, S. P., Helleday, T. 2016. "Drugging DNA repair". *Science*, 352(6290), 1178–1179.

Jasin, M., Rothstein, R. 2013. "Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination" *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a012740–a012740.

Jaspers, J. E., Kersbergen, A., Boon, U., Sol, W., van Deemter, L., Zander, S. A., ... and Rottenberg, S. 2013. "Loss of 53BP1 Causes PARP Inhibitor Resistance in Brca1 - Mutated Mouse Mammary Tumors". *Cancer Discovery*, 3(1), 68–81.

Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C. M., Lukas, J., Jackson, S. P. 2006. "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks". *Nature Cell Biology*, 8(1), 37–45.

Jelinic, P., Levine, D. A. 2014. "New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair". *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(6), 1645–1654.

Kastan, M. B., Bartek, J. 2004. "Cell-cycle checkpoints and cancer". *Nature*, 432(7015), 316–323.

Khanna, K. K., Jackson, S. P. 2001. "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection". *Nature Genetics*, 27(3), 247–254.

Konstantinopoulos, P. A., Ceccaldi, R., Shapiro, G. I., D'Andrea, A. D. 2015. "Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer". *Cancer Discovery*, 5(11), 1137–1154.

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., Zhao, X. 2012. "Homologous recombination and its regulation". *Nucleic acids research*, 40(13), 5795–5818.

- Krishnakumar, R., Kraus, W. L. 2010. "The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets". *Molecular Cell*, 39(1), 8–24.
- Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., Hergovich, A. 2016. "The Role of p53/p21/p16 in DNADamage Signaling and DNA Repair". *İçinde Genome Stability* (ss. 243–253).
- Kuo, L. J., Yang, L. X. 2008. " γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks". *In Vivo*, 22(3), 305–309.
- Lee, J. H., Paull, T. T. 2005. "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex". *Science*, 308(5721), 551–554.
- Lees-miller, S. P., Meek, K. 2003. "Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining". *Biochimie*, 85(11), 1161–1173.
- Lekomtsev, S., Guizetti, J., Pozniakovsky, A., Gerlich, D. W., Petronczki, M. 2010. "Evidence that the tumor-suppressor protein BRCA2 does not regulate cytokinesis in human cells". *Journal of Cell Science*, 123(9), 1395–1400.
- Levine, A. J. 2020. "p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery". *Nature Reviews Cancer*, 20(August), 471–480.
- Li, H., Liu, Z. Y., Wu, N., Chen, Y. C., Cheng, Q., Wang, J. 2020. "PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications". *Molecular cancer*, 19(1), 107.
- Libson, S., Lippman, M. 2014. "A review of clinical aspects of breast cancer". *International Review of Psychiatry*, 26(1), 4–15.
- Lindahl, T., Barnes, D. E. 2000. "Repair of endogenous DNA damage.". *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 65, 127–133.
- Lindahl, Tomas, Nyberg, B. 1972. "Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid". *Biochemistry*, 11(19), 3610–3618.
- Loeb, L. A., Harris, C. C. 2008. "Advances in chemical carcinogenesis: A historical review and prospective". *Cancer Research*, 68(17), 6863–6872.
- Lord, C. J., Ashworth, A. 2013. "Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCAmutant cancers". *Nature Medicine*, 19(11), 1381–1388.
- Lord, C. J., Ashworth, A. 2017. "PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic". *Science*, 355(6330), 1152–1158.
- Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Ashworth, A. 2015. "Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors". *Annual Review of Medicine*, 66(1), 455–470

- Loughery, J., Cox, M., Smith, L. M., Meek, D. W. 2014. "Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters". *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7666–7680.
- Luijsterburg, M. S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., ... and Driel, R. Van. 2009. "Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage", 185(4), 577–586
- Luo, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J. 2009. "Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction". *Cell*, 136(5), 823–837.
- Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., ... and L, T. J. 1995. "p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage", 15, 935–944.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., ... and Elledge, S. J. 2007. "ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage". *Science*, 316(5828), 1160–1166.
- Morales, J. C., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., ... and Boothman, D. A. 2014. "Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases". *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 15–28.
- Moro, L., Guaragnella, N., Giannattasio, S. 2015. "Silencing of BRCA2 to identify novel BRCA2-regulated biological functions in cultured human cells". *Journal of Visualized Experiments*, 102.
- Munoz, I. M., Jowsey, P. A., Toth, R., Rouse, J. 2007. "Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage", 35(16), 5312–5322.
- Murai, J., Huang, S. -y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., ... and Pommier, Y. 2012. "Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors". *Cancer Research*, 72(21), 5588–5599.
- Murga, M., Jaco, I., Fan, Y., Soria, R., Martinez-pastor, B., Cuadrado, M., ... and Fernandezcapetillo, O. 2007. "Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response", 178(7), 1101–1108.
- Nickoloff, J. A., Jones, D., Lee, S. H., Williamson, E. A., Hromas, R. 2017. "Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair". *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11), 1–11.
- Noordermeer, S. M., van Attikum, H. 2019. "PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells". *Trends in Cell Biology*, 29(10), 820–834.

Norquist, B., Wurz, K. A., Pennil, C. C., Garcia, R., Gross, J., Sakai, W., ... and Swisher, E. M. 2011. "Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas". *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), 3008–3015.

Obenauer, J. C., Cantley, L. C., Yaffe, M. B. 2003. "Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs". *Nucleic acids research*, 31(13), 3635–3641.

Pagliarini, R., Shao, W., Sellers, W. R. 2015. "Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure". *EMBO reports*, 16(3), 280–296

Patel, P. S., Algouneh, A., Hakem, R. 2021. "Exploiting synthetic lethality to target BRCA1 /2-deficient tumors : where we stand". *Oncogene*, 40, 3001–3014. Paull, T. T. 2015. "Mechanisms of ATM activation". *Annual Review of Biochemistry*, 84, 711–738.

Pettitt, S. J., Krastev, D. B., Brandsma, I., Dréan, A., Song, F., Aleksandrov, R., ... and Lord, C.J. 2018. "Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance". *Nature Communications*, 9(1), 1849.

Pettitt, S. J., Lord, C. J. 2019. "Dissecting PARP inhibitor resistance with functional genomics". *Current Opinion in Genetics and Development*, 54, 55–63.

Pilié, P. G., Gay, C. M., Byers, L. A., O'Connor, M. J., Yap, T. A. 2019. "PARP inhibitors: Extending benefit beyond BRCA-mutant cancers". *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3759–3771

Pilié, P. G., Tang, C., Mills, G. B., Yap, T. A. 2019. "State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer". *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(2), 81–104.

Pines, A., Vrouwe, M. G., Marteijn, J. A., Typas, D., Luijsterburg, M. S., Cansoy, M., ... and Mullenders, L. 2012. "PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1". *Journal of Cell Biology*, 199(2), 235–249.

Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J., Bolderson, E. 2020. "PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(564601), 1–22.

Rupnik, A., Lowndes, N. F., Grenon, M. 2010. "MRN and the race to the break". *Chromosoma*, 119(2), 115–135.

Sachdev, E., Tabatabai, R., Roy, V., Rimel, B. J., Mita, M. M. 2019. "PARP Inhibition in Cancer: An Update on Clinical Development". *Targeted Oncology*, 14(6), 657–679.

Saveria, M., Montani, G., Prodosmo, A., Stagni, V., Merli, D., Monteonofrio, L., ... and Soddu, S. 2013. "ATM-depletion in breast cancer cells confers sensitivity to PARP inh Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 32(95), 1–10.

Settleman, J. 2012. "Oncogene addiction". *Current Biology*, 22(2), 43–44.

Sharma, S. V., Settleman, J. 2007. "Oncogene addiction: Setting the stage for molecularly targeted cancer therapy". *Genes and Development*, 21(24), 3214–3231.

Shibata, A. 2021. "ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks". *Genes*, 12(9), 1370–1375.

Shrivastav, M., De Haro, L. P., Nickoloff, J. A. 2008. "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice". *Cell Research*, 18(1), 134–147.

Simhadri, S., Vincelli, G., Huo, Y., Misenko, S., Foo, T. K., Ahlskog, J., ... and Xia, B. 2019. "PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response". *Oncogene*, 38(10), 1585–1595.

Slade, D. 2020. "PARP and PARG inhibitors in cancer treatment". *Genes & Development*, 34(5–6), 360–394.

Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H. A., Piccart, M. 2015. "An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting". *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(1), 27–41.

Speidel, D. 2015. "The role of DNA damage responses in p53 biology". *Archives of Toxicology*, 89(4), 501–517.

Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M. I., Jaspers, N. G. J., ... and Taylor, R. 1999. "The DNA Double-Strand Break Repair Gene hMRE11 Is Mutated in Individuals with an Ataxia-Telangiectasia-like Disorder". *Cell*, 99, 577–587.

Stover, E. H., Konstantinopoulos, P. A., Matulonis, U. A., Swisher, E. M. 2016. "Biomarkers of response and resistance to DNA repair targeted therapies". *Clinical Cancer Research*, 22(23), 5651–5660.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ... and Bray, F., 2021. "Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", 71(3), 209–249.

Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y., Chen, J. 2009. "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28(106), 7155–7160.

Syed, A., Tainer, J. A. 2018. "The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair". *Annual Review of Biochemistry*, 87, 263–294.

The Food and Drug Administration (FDA). 2018. "FDA approves olaparib for germlin BRCAmutated metastatic breast cancer". Tarihinde 01 Mayıs 2020, adresinden erişildi.

<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approvesolaparib-germline-brca-mutated-metastatic-breast-cancer>

The Food and Drug Administration (FDA). 2019. "FDA approves olaparib for gBRCAm metastatic pancreatic adenocarcinoma". Tarihinde 01 Eylül 2022, adresinden erişildi.

The Food and Drug Administration (FDA). 2020. "FDA approves olaparib for HRR genemutated metastatic castration-resistant prostate cancer". Tarihinde 01 Eylül 2022, adresinden erişildi.

[fda-approves-olaparib-hrr-gene-mutated-metastatic-castration-resistant-prostatecancer](#)

Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Cao, J., Hu, J., Lee, J., ... and Cai, X. 2020. "Advances in synthetic lethality for cancer therapy: Cellular mechanism and clinical translation". *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1–22.

Toy, Y., Gundogdu, R., Sever, A., Erdogan, M. K. 2022. "Defektif Homolog Rekombinasyon DNA Tamiri ve PARP İnhibisyonu Arasındaki Sentetik Letal Etkileşim". *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2459–2475.

Trenner, A., Sartori, A. A. 2019. "Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment". *Frontiers in Oncology*, 9(1388), 1–10.

Vilenchik, M. M., Knudson, A. G. 2003. "Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12871–12876.

Wahl, G. M., Linke, S. P., Paulson, T. G., Huang, L. C. 1997. "Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control.". *Cancer surveys*, 29, 183–219.

Weinberg, R. A. 2007. "The Biology of Cancer" (2nd baskı). New York: Garland Science. Weinstein, I. B., Joe, A., Felsner, D. 2008. "Oncogene Addiction". *Cancer Research*, 68(9), 3077–3080.

Weinstein, I. Bernard, Joe, A. K. 2006. "Mechanisms of Disease: Oncogene addiction - A rationale for molecular targeting in cancer therapy". *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(8), 448–457.

White, D. E., Ivanov, A. V., Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S. C. 2016. "The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin : Regulation by HP1 proteins and Serine 473 / 824 phosphorylation". *Molecular Cancer Research*, 10(3), 401–414.

Zhang, F., Gong, Z. 2021. "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice: anew focus on 53BP1", 22(1), 38–46.

Zhao, Q., Lan, T., Su, S., Rao, Y. 2019. "Induction of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by a PARP1-targeting PROTAC small molecule". *Chemical Communications* 55(3), 369–372.

Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S., Lee, J.-M. 2018. "Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer". *Options in Oncol* 19

