TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE HİPPO SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDE YER ALAN NOS1AP'IN EPİTELYAL - MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT) SÜRECİ İLE ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

BÜŞRA POLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Büşra POLAT

İmza

I. TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca bilimin temel taşının merak etmek ve soru sormak olduğuna inandım. Yüksek lisans eğitimimde ve tez sürecimde bu temel taşları oluşturan, aklıma takılan her soruda bana yol gösteren, ilgi duyduğum konuda araştırma yapmamda desteğini ve anlayışını hiç esirgemeyen, kendisiyle çalışmış olmaktan büyük bir mutluluk duyduğum tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve birikimlerini her daim paylaşan ve bir konunun öncelikle temelini ve mantığını incelemenin ne kadar önemli olduğunu gösteren Sayın Prof. Dr. Ayşe ÖZER'e, Sayın Prof. Dr. Fatih EREN'e, Sayın Prof. Dr. İlter Güney'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Can Erzik'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve tecrübesini hiç esirgemeyen, bu süreçte her sorumu sabırla dinleyen ve hoşgörüyle yol gösteren, hastaların derdini kendine dert edinip onların yükünü hafifletmek isteğiyle çalışmalar yapan ve mesleğimizin bu manada ne kadar kıymetli olduğunu varlığıyla hatırlatan, kendisiyle çalışmaktan büyük bir gurur ve mutluluk duyduğum, bana bu yolda hem öğretmen hem abla olan Sayın Arş. Gör. Gökçe Güllü AMURAN'a çok ama çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden bugüne kadar aklıma takılan her soruda ve her prosedürde şimdi ne yapacağım dediğim anda hoşgörüsüyle hep yanımda olan, kendisini tanımaktan büyük bir mutluluk duyduğum arkadaşım Sayın Uzm. Biyolog Demet YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Aynı çalışma ortamını paylaştığım, bilgi birikimlerini, desteklerini ve güler yüzlerini hiç eksik etmeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi İrem PEKER EYÜPOĞLU'na, Sayın Arş. Gör. Duygu BİRCAN KADIOĞLU'na ve Uzm. Biyolog Serap ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca okuldan geldiğim gibi o günümü hiç sıkılmadan dinleyen ve bana yol gösteren, beni her zaman destekleyen, karşılaştığım her zorluğun üstesinden gelmemde hep yanımda olan, kardeşlerim ve bana hep ‘’okuyun , okuyun’’ diyen ve beni eğitim hayatımın ilk gününden bugüne dek destekleyen, üzerimdeki emeğini ve hakkını asla ama asla ödeyemeyeceğim canım anneme bu tez sürecimde ve tüm eğitim hayatım boyunca sarf ettiği tüm çabalar ve her şey için çok ama çok teşekkür ederim.

Benim ve kardeşlerimin okuması için senelerce en ağır işlerde çalışan, bir isteğimiz olduğunda asla hayır diyemeyen, bu tez sürecinde ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen canım babama çok ama çok teşekkür ederim.

Birlikte büyüdüğüm, birlikte yol aldığım, birlikte eğlendiğim, birlikte güldüğüm, birlikte ağladığım, hem birlikte ders çalışıp hem birlikte ders çalışırken uyuyakaldığım, bu tez sürecinde ve eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan hem sırdaşım hem arkadaşım hem canım kardeşim Rümeysa’ya çok ama çok teşekkür ederim.

Benim biriciğim, moral kaynağım, varlığına hep şükrettiğim, yüzümü hep güldüren, güzel kalpli kardeşim Hatice Erva şu an bunları okuyacak yaşta değilsin ama ileride okuyacağını umarak sana da çok ama çok ama çok teşekkür ederim.

Bu tezi, Türkiye Cumhuriyeti’ni canı pahasına koruyan ve bu uğurda hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aziz şehitlerimize, gazilerimize ve aileme ithaf ediyorum.

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TYL-2021-10165 numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR ..... **i**

II. İÇİNDEKİLER ..... **iii**

III. ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**

1. ÖZET **1**

2. SUMMARY **2**

4. GENEL BİLGİLER **8**

4.1. Meme Kanseri 8

4.1.1. Meme kanserinde moleküler sınıflandırma 9

4.1.1.1. ER-Negatif Grup: Bazal-benzeri ve HER2-zenginleştirilmiş alt tipler 9

4.1.1.2. ER-pozitif grup: Luminal A ve B alt tipleri 10

4.2. NOS1AP 11

4.2.2. Beyinde NOS1AP 12

4.2.3 NOS1AP ve hastalık 13

4.2.3.1. NOS1AP ile nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar arasındaki ilişki 13

4.2.3.2. NOS1AP ve kanser 15

4.2.4. NOS1AP ve Hippo sinyal yolağı 17

4.3. Hippo Sinyal Yolağı 19

4.3.1. Hippo sinyal yolağı komponentleri: YAP/TAZ ve TEAD 21

4.3.2.1. Meme ve çeşitli kanser türlerinde Hippo sinyal yolağı 24

4.3.2.1.1. Meme ve çeşitli kanser türlerinde Hippo sinyal yolağı üzerine terapötik yaklaşım 28

4.3.3. Hippo sinyal yolağını düzenleyen yukarı yöndeki sinyaller 30

4.3.3.1. Hücre polaritesi ve hücre adezyonu Hippo sinyalini düzenler 31

4.3.3.2. Hücre teması ve mekanik durumlar Hippo sinyalini düzenler 33

4.3.4. Hippo sinyal yolağının diğer sinyalizasyon yolakları ile entegrasyonu 35

4.3.5. Hippo sinyal yolağının aşağı yönünde yer alan hedef genler: CTGF ve PAI-1 39

4.3.5.1. CTGF 39

4.3.5.2. PAI-1 40

4.4. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) 42

4.4.1. Kanser ve EMT ilişkisi: Tip 3 EMT 45

4.4.1.1 Kanser metastazı ve EMT 45

4.4.1.2. Hibrid/Kısmi/Ara EMT 46

4.4.2. Hippo sinyal yolağı ve EMT 49

4.4.3. EMT belirteçleri 50

4.4.3.1. Tez çalışmasında yer alan EMT belirteçleri 52

4.4.3.1.1. Epitelyal belirteç E-kaderin /CDH1 52

4.4.3.1.2. VIMENTİN 55

5. GEREÇ VE YÖNTEM 60

5.1. Hasta ve Kontrol Örnekleri 60

5.2. Kullanılan Aletler 61

5.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 61

5.4. mRNA'lardan cDNA Sentezi 62

5.5. RT-PCR 64

5.6. İstatiksel analiz 66

6.1. Ekspresyon Bulguları 67

6.1.1 Sağlıklı-Kanser gruplarda gen ekspresyon analizi 67

6.1.1.1. Bazal Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi 68

6.1.1.2. HER2 Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi 70

6.1.1.3. Luminal A Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi 71

6.1.1.4. Luminal B Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi 73

6.2. Korelasyon Bulguları 75

6.2.1. Sağlıklı-Kanser gruplarda korelasyon analizi 75

6.2.2. NOS1AP grafikleri 76

6.2.2.1. Sağlıklı- Bazal alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi 76

6.2.2.2. Sağlıklı- HER2 alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi 78

6.2.2.3. Sağlıklı- Luminal A alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi 79

6.2.3. NOS1AP korelasyon şeması 84

7.TARTIŞMA ve SONUÇ 86

8. KAYNAKLAR..... 100

9. EKLER..... 113

Ek 1: Sağlıklı-Meme kanseri alt tip gruplarında korelasyon analizi..... 113

III. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanseri mevcut alt tipleri arasındaki karşılaştırılmaya ait şematik çizim 11

Şekil 2: NOS1AP ve bu gene komşu olan genlerin lokalizasyonlarına dair şematik çizim.. 12

Şekil 3:NOS1AP'nin yapısı ve etkileştiği proteinlere dair şematik çizim. 13

Şekil 4: NOS1AP'nin etkileştiği proteinler ile edindiği potansiyel rollerine dair şematik çizim. 15

Şekil 5: Hippo sinyal yolağının adını nereden aldığını anlatan görsel. 19

Şekil 6:Drosophila ve Memelilerde Hippo sinyal yolağının şematik çizimi 21

Şekil 7:YAP/TAZ proteinlerinin yapısına dair şematik çizim. 22

Şekil 8:Hippo sinyal yolağının düzenlediği hücresel mekanizmalara dair şematik çizim 23

Şekil 9: Normal ve kanser hücrelerde, Hippo sinyal yolağının işleyişine dair şematik çizim 25

Şekil 10: Hippo yolağı hedefli inhibitörlere ait şematik çizim……..…..29

Şekil 11: Memelilerde Hippo sinyal yolağının düzenlenmesine dair şematik çizim.. 31

Şekil 12: Memelilerde Hippo sinyal yolağının hücre polaritesi ve adezyonu tarafından düzenlediğine dair şematik çizim..... 33

Şekil 13:Farklı hücre bağlantı tiplerine ait şematik çizim 43

Şekil 14: Kanserde epitelyal-mezenkimal geçiş için geçmişe ve günümüze dair perspektifler..... 44

Şekil 15:Farklı EMT tiplerine ait şematik çizim..... 45

Şekil 16: Metastatik kaskad için EMT-MET modeline ait şematik çizim..... 46

Şekil 17: Hibrid EMT'ye dair şematik çizim…….. 47

Şekil 18:EMT'nin diğer bir spekturumu olan hibrit EMT'ye dair şematik çizim. 49

Şekil 19:Hippo sinyal yolağı ve EMT ilişkisine dair şematik çizim……. 50

Şekil 20: Kanserde EMT'ye dair belirteçlere dair şematik çizim……..52

Şekil 21:E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyounun kaybedilmesi ile birlikte gelişen metastaza dair şematik çizim. 54

Şekil 22:Normal embriyo (sol) ve homozigot mutant Drosophila melanogaster embriyolarının kütikül preparatlarının karanlık alan fotoğrafları 57

Şekil 23: Sağlıklı ve meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik..... 67

Şekil 24: Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik 69

Şekil 25:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik 70

Şekil 26:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik 72

Şekil 27: Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik 73

Şekil 28: Sağlıklı ve meme kanseri dokularında NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik..... 75

Şekil 29:Sağlıklı ve meme kanseri dokularında TWIST1-VIMENTİN gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik..... 76

Şekil 30:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….77

Şekil 31:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…… 77

Şekil 32:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….78

Şekil 33:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik……..…78

Şekil 34:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….79

Şekil 35:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik……79

Şekil 36:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….80

Şekil 37:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….80

Şekil 38:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….....81

Şekil 39:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik……...81

Şekil 40:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….82

Şekil 41:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….82

Şekil 42:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik…….83

Şekil 43:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik..... 83

Şekil 44: Sağlıklı ve bazal alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim. 84

Şekil 45: Sağlıklı ve HER2 alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim 84

Şekil 46: Sağlıklı ve luminal A alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim 85

Şekil 47: Sağlıklı ve luminal B alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim.. 85

Resim 1:cDNA sentezi için gerekli bileşenler..... 63

Resim 2:Isısal döngü cihazı 64

IV.TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Meme kanserinde moleküler sınıflandırmaya dair tablo. 9

Tablo 2: Hippo yolağı bileşenleri ve başlıca işlevleri 20

Tablo 3: Kullanılan primer dizileri..... 62

Tablo 4: cDNA sentezi için kullanılan 1x reaksiyon karışımı 63

Tablo 5: cDNA sentezi için üretici firma tarafından ısısal döngü cihazına yönelik tavsiye edilen program ayarı 64

Tablo 6: qPCR reaksiyon bileşenleri..... 65

Tablo 7:qPCR sıcaklık döngüsü..... 65

Tablo 8: Şekil 23'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler..... 68

Tablo 9: Şekil 24'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler..... 69

Tablo 10: Şekil 25'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler..... 71

Tablo 11:Şekil 26'da belirtilen grafiğe ait istatistik değerler..... 72

Tablo 12: Şekil 27'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler..... 74

Tablo 13:Sağlıklı dokulara kıyasla meme kanseri alt tiplerinde ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde farklılık gösteren genlerin belirtildiği tablo. 74

Tablo 14:Spearman korelasyon kat sayısı (rs) aralığı 75

Ek Tablo 1: Sağlıklı-Bazal alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi .. 113

Ek Tablo 2: Sağlıklı-HER2 alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi**...** 113

Ek Tablo 3: Sağlıklı-Luminal A alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi 114

Ek Tablo 4: Sağlıklı-Luminal B alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi 114

V. KISALTMALAR VE SİMGELER

AH: Alzheimer hastalığı

AMOT: Anjiyomotin

AMPK : AMP-aktive edici protein kinaz

ANGPTL4: Anjiyopoietin ile ilgili protein 4

bHLH: Temel heliks-ilmek-heliks

BLBC: Bazal benzeri meme kanseri

BRCA1: Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini

β-TrCP: Beta transdusin tekrarı içeren protein

Bv: Kan damarı

CagA: Sitoksinle ilişkili gen A

CAM-DR: Hücre adezyon aracılı ilaç direnci

CapZb: F-aktin kaplayıcı protein beta alt birimi

CC: Sarmal-sarmal alan

CD1: Vasküler hücre yapışma molekülü

CDH1: Kaderin 1/ E- kaderin

CDK1: Siklin bağımlı kinaz 1

cDNA: Tamamlayıcı DNA

Cdx2: Kaudal tip homeotik gen 2

CK: Sitokeratin

CLDN7: Claudin 7 psödogen

CMS: Kronik hafif stres

Col24a1: Kollajen tip 24a1

COX2: Sitokrom C oksidaz birleşim faktörü 2

CPE: Karboksipeptidaz E

CRB1: Crumbs

CSC: Kanser kök hücresi

Ct: Döngü eşik değeri

CT: Sistein düğümü içeren karboksil alan

CTC: Dolaşımdaki tümör hücreleri

CTGF/CCN2: Hücresel iletişim ağı faktörü 2 /bağ dokusu büyüme faktörü

Cyr61: Sistein bakımından zengin anjiyojenik indükleyici 61

DEXRAS1: Deksametazonla indüklenen Ras ilişkili protein 1

DVL: Dishevelled segment polarite proteini 1

ECM: Ekstraselüler matris

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

EPCAM: Epitel hücre yapışma molekülü

EphA2: Eritropoietin üreten hepatoselüler reseptör A2

ER: Östrojen reseptörü

EREG: Epiregulin

FAP: Familyal adenomatozis polipozis

FGF1: Fibroblast büyüme faktörü

FN1: Fibronektin 1

FOXA: Hepatosit nükleer faktör 3-alfa

FRMD: FERM domaini içeren protein 1

FRMD6: FERM alanı içeren protein 6

FU: Fluorouracil

GAS5: Büyüme durdurmaya özgü 5 geni

GDP: Guanozin difosfat

GPCR: G-protein-bağlı reseptör

GSK-3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta

GTP: Guanozin trifosfat

H. pylori: Helicobacter pylori

HDGC: Kalıtsal yaygın mide kanseri

HER2/ ERBB2 : İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

hESC: İnsan embriyonik kök hücresi

HIPK : Homeodomain etkileşimli protein kinaz 1

HMEC: İnsan meme epitel hücreleri

HNSCC: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom

Hpo: Hippo

HPV: İnsan papilloma virüsü

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri

IARC: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı

ICM: İç hücre kütlesi

IGFBP: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein

IKBKE : Nükleer faktör kappa B kinaz alt birimi epsilon inhibitörü

ILC: İnvaziv lobüler karsinom

KDHAK: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

KLF4: Kruppel benzeri faktör 4

Krt: Keratin

LAP: Karaciğerden zenginleştirilmiş transkripsiyonel aktivatör proteini

LATS1/ 2: Büyük tümör baskılayıcı homolog 1/2

lncRNA: Uzun kodlanmayan RNA

LNM: Lenf nodu metastazı

LOXL1: Lisil oksidaz homolog 1

LPA: Lizofosfatidik asit

Lv: Lenf damarları

MAP4K: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz 4

MDCK: Madin-Darby köpek böbrek hücreleri

MET: Mezenkimal- epitelyal geçiş

miRNA: mikro RNA

MLC: Miyozin hafif zincir

MM: Multipl miyelom

Mmp19: Matriks metalloproteinaz-19

MOB1: MOB kinaz aktivatörü 1

MST1/2: Memeli steril 20-benzeri 1/2

mTOR: Rapamisin kinazın mekanik hedefi

MÜK: Mesane ürotelyal karsinomu

NBR2: BRCA1 LncRNA 2'nin komşusu

NEGR1: Nöronal büyüme düzenleyici 1

NF2: Nörofibromin 2/ Merlin

NMDAR: N-metil-d-aspartat reseptörü

NO: Nitrik oksit

NOS1: Nitrik oksit sentaz 1

NOS1AP/CAPON: Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini/ Nöronal nitrik oksit karboksil-Terminal PDZ Ligandı

OS: Genel sağkalım süresi

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDGFRA: Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü A,

PDK1: Fosfoinositide bağımlı kinaz

pEMT: Kısmi EMT

PI3K: Fosfoinositif-3 kinaz

PKD: Polikistik böbrek hastalığı

PP: Protein fosfataz

PP1: Protein fosfataz 1

PR: Progestojen reseptörü

Prrx1: Eşleştirilmiş ilgili homeobox 1

PSD-95: Postsinaptik yoğunluk proteini 95

PT: Primer tümör

PTB: Fosfotirozin bağlayıcı alan

PTPN14: Tirozin-protein fosfataz reseptör olmayan tip 14

qRT-PCR: Kantitatif eş zamanlı *polimeraz zincir reaksiyonu*

RTK: Reseptör tirozin kinaz

S1P: Sfingosin-1-fosfat

SALL1: Spalt benzeri transkripsiyon faktörü 1

SAV1: Salvador 1

SBMS: Spektrin bazlı membran iskeleti

Sd: Scalloped

SH3: SRC homoloji 3 alanı

shRNA: Kısa firkete RNA

siRNA: Susturucu RNA

SLUG/ SNAI2: Snail ailesi transkripsiyonel baskılayıcı 2

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

SOX: SRY (cinsiyet belirleyen bölge Y) kutusu

SPTA1: Spektrin alfa zinciri 1

SWH: Salvador-Warts-Hippo

t-PA: Doku tipi plazminojen aktivatörü

T4SS: Tip 4 salgılama sistemi

TAZ/WWTR1: PDZ bağlama motifli transkripsiyonel koaktivatör/ WW domaini içeren transkripsiyon regülatörü 1

TB: TEAD-bağlama bölgesi

TE: Trofektoderm

TEADs: TEA transkripsiyon faktörleri

TGFβ: Dönüştürücü büyüme faktörü-β

TP53: Tümör Proteini 53

TSP1/TSR: Trombospondin 1/ Trombospondin tip-1 tekrarı

TUSC7: Tümör bastırıcı aday 7

u-PA: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü

u-PAR: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü

UCA1: Ürotelyal Kanser İlişkili 1

Vangl1: Vang-benzeri 1 (Van Gogh)

VGLL4: Vestigial benzeri aile üyesi 4

VM: Vaskülojenik taklit

VP: Verteporfin

VWC: von Willebrand faktör C tipi tekrarı

WBP2: WW alan bağlayıcı protein 2

Wts: Warts

YAP: Yes ilişkili protein

Yki: Yorkie

ZEB1: Çinko parmak E-kutu bağlayıcı homeobox 1

ZO: Zonula occludens

1. ÖZET

Tez Başlığı: Meme Kanserinde Hippo Sinyal Yolağı Üzerinde Yer Alan NOS1AP'ın Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) Süreci ile Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi
Öğrencinin Adı: Büşra POLAT
Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Amaç: Meme kanserinde, NOS1AP'nin Hippo sinyal yolağı ve EMT ile arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 67 meme kanseri hastasının eşleştirilmiş sağlıklı ve primer kanser dokularında (13 bazal, 15 HER2, 20 luminal A ve 19 luminal B alt tiplerde) NOS1AP, YAP1, TAZ, TEAD2, SCRİBBLE, CTGF, PAI1, CDH1, TWIST1 ve VIMENTIN genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT- PCR ile incelendi.

Bulgular: Sağlıklı dokulara kıyasla meme kanseri dokularında TWIST1, VIMENTİN, YAP1 ve TAZ ekspresyonunun düşük ($p<0,05$), CDH1 ekspresyonunun yüksek ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Luminal B alt tipinde NOS1AP ve CDH1 ekspresyonunun yüksek ($p<0,05$) ve HER2 alt tipinde ise NOS1AP ekspresyonunun sağlıklı dokulara göre düşük ($p<0,05$) olduğu gözlendi. Ayrıca NOS1AP'nin sağlıklı dokularda ve belirli tümör alt tiplerinde Hippo yolağı üyeleri ve CDH1 ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: Ekspresyon verileri, NOS1AP'nin HER2 alt tipinde tümör baskılayıcı, NOS1AP ve CDH1'in luminal B alt tipinde onkogen rolünün olabileceğine işaret eder. Bu, NOS1AP ve CDH1'in alt tipe özel aday biyobelirteç olabileceğini düşündürür. Düşük TWIST1, VIMENTİN ve yüksek CDH1 ekspresyon seviyesi primer meme kanseri dokularında epitelyal karakterin baskın olduğunu ve EMT'nin başlamadığını gösterdi. Bu nedenle NOS1AP ve EMT arasında bir ilişki saptanamadı. Ayrıca, Hippo bileşenleri YAP1 ve TAZ'nin düşük ekspresyon seviyeleri de bu dokularda EMT'nin başlamadığına yönelik değerlendirmemizi destekledi. Korelasyon bulgularımız da meme kanserinde de NOS1AP ve Hippo yolağı üyeleri arasında bir ilişki olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Nos1ap, meme kanseri, moleküler alt tipler, hippo sinyal yolağı, epitelyal-mezenkimal geçiş

2. SUMMARY

Title of Thesis: Evaluation of the relationship between NOS1AP on the Hippo signaling pathway and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process in breast cancer
Student Name, Surname: Büşra POLAT
Supervisor Name: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK
Program Name: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Objective: The aim of this study was to elucidate the relationship of NOS1AP between Hippo signaling pathway and EMT process in breast cancer.

Material and Methods: Expression levels of NOS1AP, YAP1, TAZ, TEAD2, SCRİBBLE, CTGF, PAI1, CDH1, TWIST1 and VIMENTIN genes in matched healthy and primary cancer tissues of 67 breast cancer patients were examined by qRT-PCR.

Results: TWIST1, VIMENTIN, YAP1 and TAZ expression were lower ($p<0.05$) but CDH1 expression was higher in tumor tissues compared to healthy tissues ($p<0.05$). NOS1AP and CDH1 expressions were higher in luminal B subtype ($p<0.05$) and NOS1AP expression was lower in HER2 subtype ($p<0.05$) compared to healthy tissues. In addition, NOS1AP was positively correlated with Hippo pathway related genes and CDH1 in healthy tissues and certain tumor subtypes.

Conclusion: Expression data indicate that NOS1AP may have a tumor suppressor role in the HER2 subtype and NOS1AP, CDH1 may have an oncogenic role in the luminal B subtype. This suggest that NOS1AP and CDH1 may be subtype-specific candidate biomarkers. Low TWIST1 and VIMENTIN expression and high CDH1 expression showed that epithelial character was predominant and EMT had not yet started in primary breast cancer tissues. Therefore, no association was found between NOS1AP and EMT. In addition, the low expression of the Hippo components YAP1 and TAZ supported our assessment that EMT was not initiated in cancer tissues. Our correlation findings also support a relationship between NOS1AP and Hippo pathway members in breast cancer.

Keywords: Nos1ap, breast cancer, molecular subtypes, hippo signaling pathway, epithelial-mesenchymal transition

3. GİRİŞ VE AMAÇ

2020 Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) verilerine göre, meme kanseri ilk kez, dünyada en sık teşhis edilen kanser türü oldu. Dünya genelinde, meme kanseri, kansere bağlı ölümlerin en yaygın beşinci nedenidir. Türkiye genelinde en sık gözlenen üçüncü kanser türü içerisinde yer alan meme kanseri, kadınlar özelinde ise en sık gözlenen birinci kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır (https://gco.iarc.fr/, Erişim tarihi:29.09.2022). Primer meme kanseri, memenin veya koltuk altındaki lenf bezlerinin ötesine yayılmamış meme kanseridir. Non-invaziv meme kanseri, ne meme içine ne de vücudun başka bir bölümüne yayılma yeteneğini henüz geliştirmemiştir. Erken teşhis ve tedavi gerçekleşmez ise primer meme kanseri hücrelerinde yayılma ve invaziv kanser olma yeteneği gelişebilir (https://breastcancernow.org/information-support/publications/download-order, Erişim tarihi:24.10.2022).

Klinik biyobelirteçler, meme kanserinin tanısında ve tedavisinde kritik öneme sahiptir. Meme kanserinde biyobelirteçler, yüksek riskli ailelerde malignite geliştirme riski yüksek olan bireylerin, ilk tanı anında prognozun ve en uygun sistemik tedavinin belirlenmesinde, postoperatif gözetimde ve ilerlemiş hastalıkta tedavinin izlenmesinde fayda sağlamaktadır (Duffy ve ark., 2005). Bugüne kadar östrojen reseptörü (ER), progestojen reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) tedavi kararlarına yardımcı olmak için rutin klinik uygulamada halihazırda kullanılan moleküler biyobelirteçleri temsil etmektedir. Bu bağlamada, erken kanser tespiti ve risk değerlendirmesi adına yeni biyobelirteçlerin ortaya çıkarılması, literatüre önemli katkılar sunacaktır (James ve ark., 2007).

Moleküler Sınıflandırma terminolojisi, ilk kez meme kanserinde Perou ve Sorlie tarafından önerilmiştir. Meme kanseri alt tipleri, çeşitli gen ekspresyonlarına göre; luminal gruplar (luminal A ve B olmak üzere iki gruba ayrılır; ER düzenleyici genleri ve normal lümen epitel hücrelerinde ifade edilen genlerin ekspresyonunu yansıtır), HER2 pozitif (ErbB2 / HER2 amplifikasyonunu ve aşırı ekspresyonunu yansıtır) ve bazal (ER, PR ve HER2 negatif; normal meme bazalı ve/miyoepitelyal hücrelerde eksprese edilen genlerin ekspresyonunu yansıtır) olmak üzere dört farklı alt gruba ayrılır (https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_42232/ejbh-11-59-En.pdf, Erişim tarihi:24.10.2022).

Sırasıyla, ER pozitif luminal A ve luminal B gruplardan ER negatif HER2 ve bazal gruplara doğru tümör agresivitesi artmaktadır (Dai ve ark., 2017). Bununla birlikte, klinik uygulamada moleküler alt tipleme uygulaması, hastaya özel prognoz, nüks riski ve patolojik tam yanıt olasılığı hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır (https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_42232/ejbh-11-59-En.pdf,Erişim tarihi:24.10.2022; Malhatro ve ark., 2010).

Sinyal iletim yolakları, kanserin başlaması, ilerlemesi ve yayılmasında kilit rol oynar. Kanser ile birlikte sinyal yolaklarında değişiklik gösteren molekülerinin tanımlanması, bu molekülleri, ‘’kanser biyobelirteci’’olarak nitelendirmede aday yapar ve bu yolağa hedef inhibitörlerinin geliştirilmesi, kanser terapötisine büyük katkı sağlar (Sahasrabuddhe ve ark., 2015; Juliano, 2020).

1995 yılında, ilk olarak Drosophila'da keşfedilen Hippo sinyal yolağı, hücre çoğalması, organ büyümesi ve yenilenmesi, doku homeostazı gibi birçok prosesi düzenlemede kilit rol oynayan evrimsel olarak korunmuş bir ağdır (Ansari ve ark., 2019). Hippo yolağı, özel hücre dışı ligand-reseptör komplekslere sahip değildir. Fakat Hippo yolağı bunun yerine hücre yoğunluğu, hücre polaritesi, hücre adezyonu ve mekanik durumlar gibi çeşitli yukarı yönündeki sinyaller tarafından aktive edilir ve ayrıca Wnt, TGFβ ve AMPK gibi birçok sinyal yolağı ile etkileşim halindedir (Kim ve Jho, 2018). Hippo sinyal yolağı düzensizliği (aşırı aktivasyonu veya delesyonu) anormal hücre büyümesine ve doku ve organ homeostazının düzensizliğine yol açarak anormal doku ve organ gelişimine ve bozulmuş rejenerasyon veya tümör oluşumu, ilerlemesi ve Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gibi kanser süreçleriyle ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2021; Dehghanian ve ark., 2022). Hippo yolağı komponenti MST1/2 (memeli steril 20-benzeri 1/2) , LATS1/ 2 (büyük tümör baskılayıcı homolog 1/2) kinazları fosforile etmek ve aktive etmek için SAV1 (salvador) ile birlikte çalışır. Daha sonra, LATS1/ 2 kinazlar, MOB1 (MOB kinaz aktivatörü 1) ile birleşir ve Hippo transdüserleri YAP (Yes ile ilişkili protein) ve TAZ (PDZ bağlama motifli transkripsiyonel koaktivatör)’ı fosforile eder. Fosforilasyon ile, YAP ve TAZ'nin nükleer birikimi ve TEA transkripsiyon faktörleri (TEAD1, TEAD2, TEAD3 ve TEAD4 gibi transkripsiyon faktörleri) ile etkileşimi önlenir (Ansari ve ark., 2019). YAP ve TAZ sitoplazmada tutulmazlarsa, kanser gelişimi ve ilerlemesinde yer

alan Hippo hedef genlerinin ekspresyonunu indükleyen çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek çekirdeğe transloke olur (https://www.biorbyt.com/hippo-signaling-pathway, Erişim tarihi: 24.10.2022). YAP/TAZ hiperaktivasyonu veya Hippo yolağındaki tümör baskılayıcıların fonksiyon kaybı kanser progresyonu ile ilişkilidir ve Verteporfin, Dobutamin ve Forskolin gibi farmakolojik ajanlar aracılığıyla YAP/TAZ deplesyonu veya inhibisyonu veya Hippo yolundaki tümör baskılayıcıların yeniden ekspresyonu ve ilaç duyarlılığı geri döndürülür. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar, YAP/TAZ aktivitesine yönelik müdahalelerin, kanser hücrelerinin geliştirdiği ilaç direncine karşı bir tedavi stratejisi olduğunu gösterir (Zeng ve Dong, 2021). Son zamanlarda bu yolağa dair artan bulgular, Hippo yolağı komponentlerinin prognostik biyobelirteç olarak nitelendirmelerini desteklemektedir (Sebio ve Lenz, 2015).

EMT, epitel hücrelerin mezenkimal fenotipe dönüşebildiği oldukça dinamik bir süreçtir ve bu süreçte, hücre-hücre adezyonu ve hücresel polarite bozulur, hücre iskeletini yeniden şekillenir ve hücre-matris adezyonunda değişiklikler meydana gelir. Ayrıca EMT'ye CDH1 ve Occludin gibi epitelyal belirteçlerin kaybı ve VIMENTİN, Fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin kazanımı eşlik eder. EMT, üç ana tipte sınıflandırılır ve normal embriyonik gelişim (tip1 EMT), doku rejenerasyonu ve organ fibrozu (tip2 EMT) ve kanser progresyonu (tip3 EMT) sırasında meydana gelir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Mezenkimal epitelyal geçiş (MET), çok kutuplu veya iğ şeklindeki mezenkimal hücrelerden polarize epitel hücrelerine geçişi içeren geri dönüşümlü bir biyolojik süreçtir (Sipos ve Galamb, 2012). Gün geçtikçe artan kanıtlar, EMT kavramını sadece bu ikili geçiş durumu (EMT ve MET) ile sınırlandırılamayacağını ortaya koydu ve literatüre, hem epitelyal hem de mezenkimal fenotiplerin bir arada sergilenmiş olduğu ''hibrit/ara/ kısmi EMT''spektrumunu kazandırdı. Hibrit EMT, artan hücresel plastisite, toplu göç ve yüksek metastatik potansiyel ile ilişkilidir. Bununla birlikte, EMT için yapılan kapsamlı çalışmalara nispeten hibrit EMT'ye dair çalışmalar sınırlıdır. Oldukça esnek ve dinamik popülasyonlara sahip olan hibrit EMT fenotipinin biyolojik önemini ve düzenleyici mekanizmalarını anlamak ve bu popülasyonları hedefleyerek terapötik stratejiler geliştirmek literatüre önemli katkılar sunacaktır (Liao ve Yang, 2020).

Bununla birlikte, son yıllarda artan çalışmalar, kanserde Hippo sinyal yolağı ve EMT arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinde artan YAP/TAZ ekspresyonu veya aktivasyonu ile hücre-hücre bağlantıları bozulur, mezenkimal gen ekspresyonu desteklenir ve EMT ile ilişkili morfolojik değişiklikler gelişir (Warren ve ark., 2018). Literatürde yaygın olarak, Hippo yolağının EMT'nin önemli bir indükleyicisi olduğu yer almaktadır fakat Hippo yolağının EMT'nin bir indükleyicisi mi yoksa EMT'nin aşağı yönüde mi yoksa her ikisi mi olduğu tam olarak açığa kavuşturulamamıştır (Akrida ve ark., 2022).

NOS1AP (Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini; CAPON olarak da adlandırılır) geni, çoğunlukla Alzheimer, Huntington, travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon, şizofreni ve otizm başta olmak üzere nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar ile ve ani kardiyak ölüm ve uzun QT sendromları gibi kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Courtney ve ark., 2014). Fakat NOS1AP, son yıllarda kanser çalışmalarının da ilgi odağı olmaya başlamıştır. Literatürde, meme kanserinde NOS1AP'nin rolüne ilişkin yer alan tek çalışma, NOS1AP'nin SCRİBBLE ve Vangl1 proteinleri ile aynı komplekste yer aldığını, metastatik meme kanser hücre protrüzyonlarında bu proteinler ile beraber lokalize olduğunu ve meme kanserinde NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolü ile birlikte bu role paradoks bir rolünün de var olabileceğini göstermektedir (Anastas ve ark., 2012). İnsan gliomaları ve multipl myelom üzerinde gerçekleştirilen birkaç çalışmada NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolü desteklenmektedir (Gao ve arkadaşları, 2016; Shen ve ark., 2017 Liang ve arkadaşları., 2019).

NOS1AP ve Hippo sinyal yolağı ilişkisinin ilk kez incelendiği bir çalışmada, sıçan beyni cDNA'sından amplifiye edilen ve PTB domaini içeren NOS1AP izoformlarının SCRİBBLE ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NOS1AP'nin SCRIBBLE aracılığıyla Hippo sinyal yolağı kompenenti olan YAP ile aynı komplekste olabileceği de saptanmıştır. NOS1AP aşırı ekspresyonu, çekirdeğe lokalize YAP miktarında azalmaya ve YAP'nin TEAD'i aktive etme yeteneğinde bir azalmaya yol açar ve buna paralel olarak NOS1AP'nin proliferasyonu etkileyip etkilemediği test edildiğinde ise NOS1APa izoformunu eksprese eden hücrelerde, serum yokluğunda ve varlığında proliferasyonda bir azalma gözlemlenir. Bu bağlamda, bu veriler, NOS1AP'nin Hippo

sinyalini düzenlenmede önemli bir rolü olduğunu ve NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir (Clattenburg ve ark., 2015).

Literatürde, meme kanserinde tümör baskılayıcı rolüne ve nöronal sinyal ağında Hippo yolağı kompenenetleri ile ilişkili olduğuna işaret edilen NOS1AP'nin, meme kanserinde ve meme kanseri alt tiplerinde Hippo sinyal yolağı ve kanserde bu yolağın indüklediği biyolojik süreçlerden birisi olan EMT ile ilişkisine dair çalışma yer almamaktadır. Bu tez çalışmasında amacımız ise literatürdeki bu eksikliği gidermektir. Ayrıca elde ettiğimiz bulgular, NOS1AP'nin alt tip özelinde biyobelirteç olma potansiyelini ortaya koyarak literatüre önemli bir katkı sunacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

Kanser, vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin, kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve normal sınırlarını aşarak vücudun diğer bölgelerine yayılabilen, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan geniş bir hastalık grubudur. 2020 verilerine göre kanser, dünya çapında yaklaşık 10 milyon insanın, başka bir ifade ile altı ölümden birine neden olan önde gelen bir ölüm nedenidir. Bununla birlikte, akciğer kanseri 1,80 milyon, karaciğer kanseri 830 bin, mide kanseri 769 bin ve meme kanseri 685 bin insanın ölüme yol açmıştır. Ayrıca meme, akciğer, prostat, kolon ve rektum kanserleri en sık rastlanan kanser tipleridir (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, Erişim tarihi:07.09.2022).

Meme, lobüller, kanallar (duktal) ve bağ dokusu olmak üzere üç ana bölümden oluşur. Lobüller süt üreten bezlerdir, kanallar sütü meme ucuna taşıyan tüplerdir ve bağ dokusu (lifli ve yağlı dokudan oluşur) her şeyi çevreler ve bir arada tutar. Çoğu meme kanseri, kanallarda veya lobüllerde başlar ve duktal karsinom veya lobüler karsinom olarak adlandırılır. Meme kanseri, kan damarları ve lenf damarları yoluyla metastaz yapar(https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm#:~:text=The%20ducts%20are%20tubes%20that,blood%20vessels%20and%20lymph%20vessels, Erişim tarihi:22.09.2022).

Metastatik meme kanseri en sık kemiklere, karaciğere, akciğerlere ve beyne yayılır (https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/introduction,Erişim tarihi:08.09.2022). Meme kanseri tedavisi genellikle cerrahi işlem, radyasyon tedavisi ve ilaç (hormonal tedavi, kemoterapi ve/veya hedefe yönelik biyolojik tedavi) kombinasyonundan oluşur. Kanserin büyümesini ve yayılmasını önleyebilen bu tür tedaviler hayat kurtarır (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, Erişim tarihi:22.09.2022).

4.1.1. Meme kanserinde moleküler sınıflandırma

Perou ve arkadaşları tarafından yapılan moleküler sınıflandırmada, luminal A, luminal B, HER-2 ve bazal olmak üzere dört farklı alt tip tanımlanmıştır (Perou ve ark., 2000). Luminal A ve luminal B alt tipleri, büyük ölçüde östrojen reseptörü (ER) pozitif tümörlerden, bazal ve HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipler ise büyük ölçüde ER negatif kanserlerden türetilmiştir. Luminal A grubunun en iyi prognozu taşıdığı bildirilirken, HER2 ile zenginleştirilmiş ve bazal benzeri grupların kemoterapiye daha iyi yanıt vermesine rağmen en kötü prognozu taşıdığı bildirilmektedir (Jones ve ark., 2012).

Tablo 1: Meme kanserinde moleküler sınıflandırmaya dair tablo. (https://www.abbviescience.com/oncology/tumor-types/breast-cancer, Erişim tarihi:08.09.2022, web sitesinden değiştirilerek kullanılmıştır).

Meme kanseri alt tipi	ER PR HER2	Üçlü tayin
Luminal A	+ ± -	ER+ PR ± HER2-
Luminal B	+ ± +	ER+ PR ± HER2+
HER2+	- - +	ER- PR - HER2+
Bazal benzeri	- - -	ER- PR - HER2-

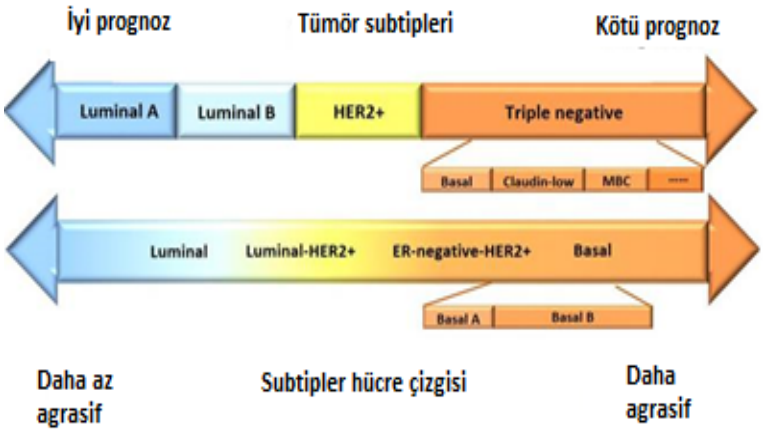
4.1.1.1. ER-Negatif Grup: Bazal-benzeri ve HER2-zenginleştirilmiş alt tipler

Bazal tip meme kanseri (üçlü tip meme kanseri olarak da anılır), tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur ve ER, PR ve HER2 yokluğu, bazal belirteçlerin yüksek ekspresyon seviyeleri (CK5/6CK, CK14 ve CK17) ve TP53 mutasyonu ile karakterizedir (Basu ve ark., 2019). Bazal benzeri tümörler özellikle genç hastaları etkiler ve Afrikalı-Amerikalı kadınlarda daha yaygındır (Badve ve ark., 2010). Bazal benzeri tümörlerin morfolojik ve immünohistokimyasal özellikleri, BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan tümörlere benzer ve ayrıca üçlü negatif meme kanserleri BRCA1 gen mutasyonu olan kişilerde teşhis edilen en yaygın meme kanseri türüdür. Bu veri, üçlü negatif meme kanseri teşhisi konulan bireylerin BRCA1 gen mutasyonuna sahip olma olasılığının daha yüksek olabileceği anlamına gelir (https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/introduction,Erişim tarihi:22.09.2022; Jones ve ark., 2012).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2), tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. HER2 reseptörü, kromozom 17q21'de konumlanmış HER2 onkogeni tarafından kodlanır. Normal hücrelerde, HER2 hücre büyümesinin kontrolüne yardımcı olur. Yüksek HER2 seviyesine sahip kanser hücreleri daha hızlı büyür ve vücudun diğer bölgelerine yayılma olasılığı daha yüksektir. HER2 pozitif kanserler arasında meme, yumurtalık, mesane, pankreas ve mide kanserleri bulunur. HER2 proteini olmayan veya düşük düzeyde olan ve/veya HER2 geninin birkaç kopyası olan kanserlere "HER2-negatif" adı verilir. HER2 pozitif meme kanserleri, HER2-negatif meme kanserlerine kıyasla daha agresif biyolojik ve klinik davranış sağlar (Yersal ve Barutca, 2014; https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/human-epidermal-growth-factor-receptor-2-positive, Erişim tarihi: 23.09.2022).

4.1.1.2. ER-pozitif grup: Luminal A ve B alt tipleri

Luminal-A, en yaygın alt tiptir ve tüm meme kanserlerinin %50-60'ını temsil eder ve çoğunlukla düşük histolojik dereceli ER pozitif tümörlere karşılık gelir. Bu tümörler sıklıkla düşük dereceli nükleer pleomorfizme, düşük mitotik aktiviteye sahiptir ve iyi prognoza sahip özel histolojik tipleri (müsinöz, tübüler ve lobüler) içerir. Luminal B, genellikle yüksek histolojik dereceli ER pozitif tümörlerden oluşur ve sürekli olarak proliferasyonla ilişkili genlerin yüksek ekspresyon seviyelerini gösterir. Luminal-B tümörler meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. Luminal A alt tipine kıyasla luminal B tümörleri daha yüksek derecelidir ve daha kötü prognoza sahiptir. İki alt tip arasındaki bir diğer farklılık ise kemoterapiye verdikleri yanıttır. Her iki luminal alt tip için genellikle zayıf olmasına rağmen, luminal B kanserlerinde kemoterapiye klinik ve patolojik yanıt daha yüksek görünmektedir (Jones ve ark., 2012; Yersal ve Barutca, 2014).



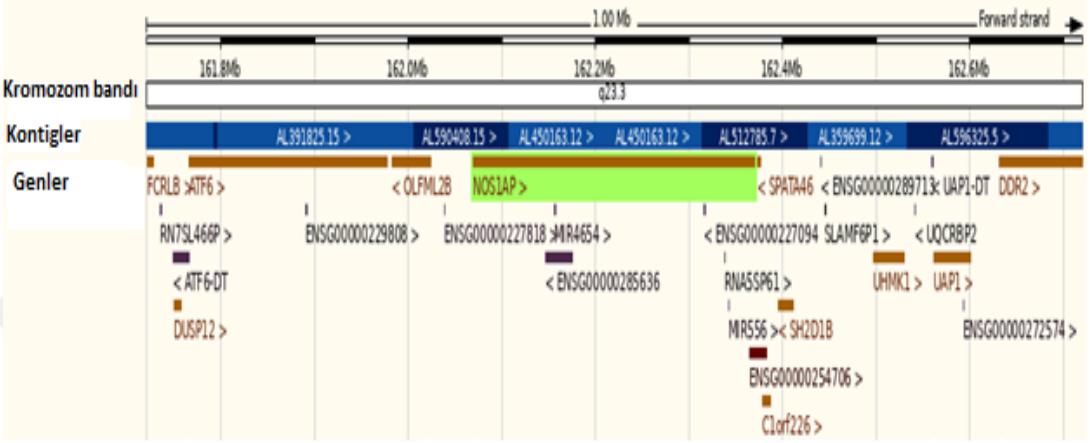
Şekil 1: Meme kanseri mevcut alt tipleri arasındaki karşılaştırılmaya ait şematik çizim (Dai ve ark., 2017'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.2. NOS1AP

Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini (CAPON olarak da adlandırılır) ilk olarak 1998 yılında, sıçan beyninde tanımlanmıştır (Jaffrey ve ark., 2018). NOS1AP geni 1. kromozomun uzun kolunun 23. pozisyonunda (1q23.3) konumlanmaktadır (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS1AP, Erişim tarihi: 03.09.2022). NOS1AP proteini, N-terminalinde bir fosfotirozin bağlayıcı (PTB) alandan ve C-terminalinde bir PDZ ligand motifden oluşur. NOS1AP'nin PDZ ligandı motifi, sinir sisteminde nitrik oksit sentezinden sorumlu enzim olan NOS1'in (nNOS; nöronal nitrik oksit sentaz olarak da bilinir) PDZ alanına bağlanır (Jaffrey ve ark., 2018). NOS1AP, PTB domaini aracılığıyla Dexras1, SCRİBBLE ve sinapsinler ile etkileşime girer (Wang ve ark., 2016).

NOS1AP, genellikle nörolojik, psikiyatrik ve kardiyovasküler hastalıkların moleküler mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda, NOS1AP'nin birçok hastalık ve sinyal yolağı üzerindeki varlığı üzerine araştırmaların arttığı göze çarpmaktadır. Anastas ve arkadaşları, meme kanserinde NOS1AP'nin varlığını gösteren ilk çalışmayı yaparak, NOS1AP'nin meme kanserindeki fonksiyonu üzerine soru işaretlerini aydınlatmaya çalışmıştır (Anastas ve ark., 2012).

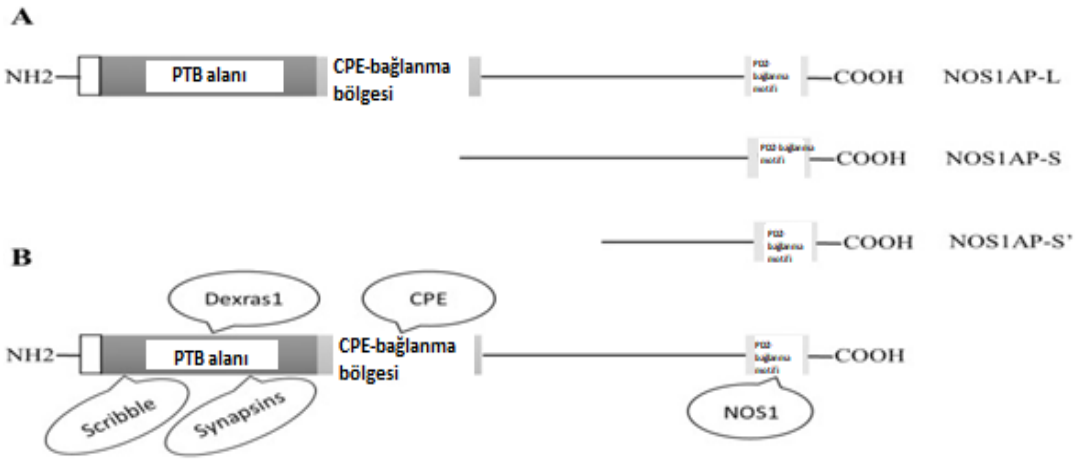
Clattenburg ve arkadaşları sıçan beyninde yaptıkları bir çalışmada ise NOS1AP'nin ilk kez Hippo sinyal yolağı üzerindeki varlığını göstermiştir (Clattenburg ve ark., 2015). Birçok hastalık ve mekanizmada yer alan NOS1AP'ye dair gerçekleştirilecek kapsamlı çalışmalar literatüre önemli katkılar sunacaktır.



Şekil 2: NOS1AP ve bu gene komşu olan genlerin lokalizasyonlarına dair şematik çizim. NOS1AP,1.kromozom üzerinde,''1: 162,069,691-162,370,475 '' bölgeleri arasında lokalize olmaktadır(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000198929;r=1:162063676-162376490, Erişim tarihi:03.09.2022).

4.2.2. Beyinde NOS1AP

NOS1AP ilk olarak sıçan beyninde tanımlandı ve daha sonra NOS1AP'nin kalp, pankreas ve iskelet kasında da eksprese edildiği bulundu. (Wang ve ark., 2016). NOS1AP, sinir sisteminde, olfaktör bulbus, serebellum ve hipokampusta çok fazla eksprese edilir (Jaffrey ve ark., 1998). İnsan beyninde, uzun form NOS1AP (NOS1AP-L), kısa form NOS1AP (NOS1AP-S) ve NOS1AP-S' olmak üzere en az üç NOS1AP izoformu rapor edilmiştir (Jaffrey ve ark., 1998; Xu ve ark., 2005; Hadzimichalis ve ark., 2010). Ek olarak, sıçanlarda altı izoform (NOS1APa-f) tanımlandı (Clattenburg ve ark., 2015). Bu izoformlar arasındaki işlevsel benzerlikler ve farklılıklar şu anda büyük ölçüde bilinmemektedir ve gelecekte daha fazla çalışılmalıdır (Wang ve ark., 2016).



Şekil 3:NOS1AP'nin yapısı ve etkileştiği proteinlere dair şematik çizim. (a) NOS1AP izoformlarının ve yapısal bileşimlerinin şematik gösterimi. NOS1AP-L, NH2-terminalinde bir PTB domaini, COOH terminalinde bir PDZ bağlama motifi (PSD-95)ve ortada bir karboksipeptidaz E (CPE) bağlayıcı bölge içerir. NOS1AP-S ve NOS1AP-S', yalnızca PDZ bağlayıcı motif içerir. (b) NOS1AP-etkileşimli proteinlerin şematik diyagramı. Dexras1, SCRİBBLE ve sinapsin I, II ve III dahil olmak üzere sinapsinler PTB alanına, NOS1, PDZ-bağlama motifine ve CPE, NOS1AP'nin CPE bağlama bölgesine bağlanır (Wang ve ark., 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

4.2.3 NOS1AP ve hastalık

NOS1AP, şizofreni, alzheimer, diyabet, travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon, otizm, ani kardiyak ölüm, uzun QT sendromları ve kanser olmak üzere birçok hastalıkla bağlantılıdır (Courtney ve ark., 2014).

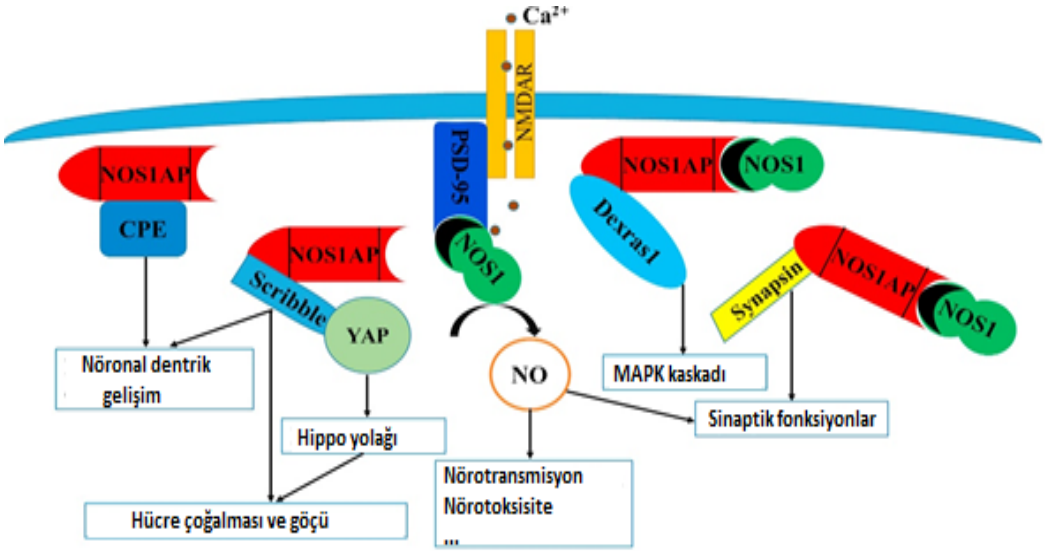
4.2.3.1. NOS1AP ile nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar arasındaki ilişki

Akut beyin ve omurilik yaralanması, yüksek sakatlık ve yüksek morbiditeye sahip yaygın bir travmatik hastalıktır. Uyarıcı amino asitler omurilik yaralanmasından sonra NMDAR'ları aktive etmek için salınır, hücre içi sinyalleşme başlar ve NO üretilir. Birkaç çalışma, omurilik yaralanması ve siyatik sinir yaralanması üzerine çalışılan sıçan modellerinde, NOS1AP'nin hem mRNA hem de protein seviyelerinin yükseldiğini ve NOS1AP'nin yüksek ekspresyonunun NOS1 ve/veya Dexras1'in yukarı regülasyonu ile paralel olduğunu gösterdi. Bu moleküller, NMDA-NO yolunun aracılık ettiği nöronal toksisite ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle NOS1AP, NMDA-NO aracılı eksitotoksisiteyi düzenleyerek hem merkezi hem de periferik sinir sistemi hasarında önemli roller oynayabilir (Wang ve ark., 2016).

NOS1AP-L'nin aşırı ekspresyonu, hipokampusta NOS1AP ve NOS1 arasındaki etkileşimi artırır ve anksiyete bozukluğuna yol açar. Bununla birlikte, NOS1AP-NOS1 etkileşiminin kesilmesi, kronik hafif stres (CMS) kaynaklı anksiyojenik benzeri davranışları tersine çevirir. Küçük moleküllü bileşikler **(**ZLc-002) tarafından NOS1-NOS1AP etkileşiminin bloke edilmesi duygu durum bozukluklarının tedavisi için yeni bir yol açabilir (Zhu ve ark., 2014).

Kanadalı ailelerde, NOS1AP'ye ait 15 tek nükleotid polimorfizminin (SNP) analiz edildiği bir çalışmada, şizofreni ile önemli ölçüde ilişkili olan üç SNP tanımlamıştır (Brzustowicz ve ark., 2004). Ayrıca şizofreni veya bipolar bozukluğu olan hastalarda CAPON-S mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Xu ve ark., 2005). Bu çalışmalar, NOS1AP'yi şizofreni duyarlılığı için ilgi çekici bir aday gen yapar (Brzustowicz ve ark., 2008).

Hashimoto ve ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma, CAPON ve Alzheimer arasındaki ilişkiye yönelik veriler sunar. Alzheimer hastalığı (AH), beyinde amiloid-β plakları ve tau patolojisi olarak da bilinen nörofibriler yumaklar ile karakterize karmaşık bir durumdur. Bu özellikler arasındaki ilişkiye yoğunlaşan çalışma grubu, tau'ya bağlanan bir protein olarak CAPON'u tanımlar. CAPON geni, diğer psikiyatrik bozukluklar için bilinen bir risktir ve AH'ye psikiyatrik semptomlar eşlik edebileceğinden, CAPON bu durumlar arasında bağlantı oluşturabilir. AH fare hipokampusunda CAPON birikir ve ayrıca amiloid-β patolojisi varlığında CAPON birikimi daha da fazladır. Hashimoto ve arkadaşları tarafından geliştirilen App/MAPT double knock-in fare beyinlerine CAPON DNA'sını yerleştirildiğinde, CAPON'un aşırı ekspresyonu ile birlikte, fare beyinlerinde önemli derecede nörodejenerasyon, yüksek tau seviyeleri ve hipokampal büzülme sergilenir. Bu durum, CAPON birikmesinin AH ile ilişkili patolojiyi arttırdığına işaret eder. CAPON baskılanmış AH fare modelinde, CAPON eksikliğinin daha az tau, daha az amiloid-β, daha az nörodejenerasyon ve daha az beyin atrofisine yol açar. Bu sonuçlar, CAPON'un amiloid-β, tau ve hücre ölümü arasında önemli bir aracı olduğuna ve çeşitli ajanlarla bu bağı kırmanın, AH tedavisi için umut verici bir yol olacağı görüşünü destekler (Hashimoto ve ve ark., 2019).



Şekil 4: NOS1AP'nin etkileştiği proteinler ile edindiği potansiyel rollerine dair şematik çizim. 1- PSD-95, N-metil-d-aspartat reseptörlerini (NMDAR'lar) NOS1 ile bağlar, böylece NMDAR'lar aracılığıyla Ca2+ akışı ile birlikte NOS1 aktivasyonuna izin verir. Hem NOS1AP hem de PSD-95, NOS1'in tek PDZ alanını bağlamak için rekabet eder. NOS1'den türetilen NO (nitrik oksit), nörotransmisyon ve nörotoksisite gibi birçok patofizyolojik sürece katıldığı bilinmektedir. 2- NOS1AP, PTB alanı aracılığıyla Sinapsin I'e bağlanır, böylece NOS1-NOS1AP-Sinapsin I'den oluşan bir kompleks oluşur ve NO aracılı sinaptik fonksiyonlara katkıda bulunulur. 3- NOS1 adaptör proteini olan NOS1AP , PTB alanı aracılığıyla Dexras1'e bağlanır, böylece bir NOS1-NOS1AP-Dexras1 kompleksi oluşur, bu da Dexras1'i NO aracılı S-nitrosilasyon ile aktive eder. Dexras1, RAS ailesinin bir üyesi olarak, MAPK kademesinin yukarı yönünde bulunur. 4- NOS1AP, PTB alanı aracılığıyla SCRİBBLE'ye ve CPE'ye bağlanır. Hem CPE hem de SCRİBBLE, nöronal dendritik gelişimde rol oynar. 5- SCRİBBLE, NOS1AP'ı Hippo sinyal yolunun önemli bir efektörü olan YAP'ye bağlar. Hem SCRİBBLE hem de Hippo yolu, hücresel çoğalma ve göçte rol oynar. *NOS1AP üzerindeki siyah şeritler yapısal bölgeleri ayırt eder (Wang ve ark., 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

4.2.3.2. NOS1AP ve kanser

Son zamanlarda yapılan çalışmalar NOS1AP'nin tümör gelişiminde de rol oynadığını göstermiştir.

SCRIBBLE, LAP (LRR ve PDZ) protein ailesinin üyesi olan multidomain bir scaffold proteinidir. N-terminal LRR alanı ve dört PDZ alanı SCRIBBLE'nin epitel hücrelerinin bazolateral membranına uygun bir şekilde lokalizasyonuna ve çok çeşitli hücre içi proteinlerle etkileşime girmesine yardımcı olur (Stephens ve ark., 2018). Bazı çalışmalar, SCRIBBLE'nin meme kanseri modellerinde tümör büyümesinin bir baskılayıcısı olarak haraket ettiğini savunsada birkaç çalışmada SCRIBBLE'ye dair bazı çelişkili sonuçlar yer alır. Düzlemsel hücre proteini olan SCRIBBLE proteini, NOS1AP ve VANGL1 ile kompleks oluşturur ve bu kompleks, meme kanseri

hücrelerinin göçünü, polaritesini ve büyümesini modüle eder. SCRIBBLE ve VANGL1 artan transkript seviyeleri, artan hasta nüksü riski ile koreledir ve SCRIBBLE ekspresyonunun azaltılması, insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini engeller. NOS1AP, metastatik meme kanseri hücre protrüzyonları boyunca hem SCRIBBLE hem de VANGL1 ile birlikte lokalizedir fakat normal meme hücre bağlantılarında SCRIBBLE veya VANGL1 ile birlikte değildir. NOS1AP ve SCRIBBLE'nin azaltılması, metastaz baskılayıcıların tipik özelliği gibi meme kanseri hücre göçünü yavaşlatır ve öncü- sondaki (leading- trailing) polaritenin kurulmasını engeller. Bu sonuca paradoksal olarak, NOS1AP shRNA eksprese eden hücrelerin yumuşak agarda kontrollere kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla koloni oluşturduğu gözlenmiştir. Hem normal hem de tümör dokusunda NOS1AP sitoplazmada lokalizedir ve meme kanseri alt tipi, ER/PR/HER2 durumu veya lenf nodu metastazlarının varlığından bağımsız olarak her iki dokuda da yaklaşık olarak aynı seviyede eksprese edilir. Primer tümörler ve normal meme örnekleri ile karşılaştırıldığında lenf nodu metastazlarında NOS1AP'de bir azalma gözlenir. Hücreler birincil tümörü terk edip lenfatik sisteme saldırırken, NOS1AP'nin kaybolup kaybolmadığı veya lenf düğümündeki farklı çevresel koşulların bir sonucu olarak NOS1AP kaybının meydana gelip gelmediği açık değildir. Bu çalışma, NOS1AP'nin insan meme kanserindeki rolü üzerine ilk veriyi sunar (Anastas ve ark., 2012).

Gao ve arkadaşları, insan gliomalarında CAPON ekspresyon seviyelerinin, proliferasyonundaki rolünü ve tümörijenez ile ilişkili hedeflenen sinyal yolağındaki etkisini ortaya çıkarmaya çalıştılar. Non tümör dokularına kıyasla, glioma dokularında, CAPON-L'nin aksine CAPON-S ekspresyonu önemli ölçüde azalır. CAPON-S'nin aşırı ekspresyonu, glioma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken CAPON'un baskılanması, glioma hücrelerinin proliferasyonunu destekler. CAPON-S aşırı ekspresyonu, glioma hücrelerinde Akt ve S6 ribozomal proteinin fosforilasyonunda dikkate değer bir azalmaya yol açar ve Akt sinyal yolunu inaktive eder. Ayrıca CAPON'un düşük ekspresyon seviyesi, glioblastoma hastalarının zayıf sağ kalımıyla ilişkilendirilir. Bu bulgular, CAPON'un potansiyel bir tümör baskılayıcı gen ve gliomada bir biyobelirteç olarak rol alabileceğine işaret eder (Gao ve arkadaşları, 2016).

Liang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile birlikteMhem CAPON-L hem de CAPON-S'nin AKT/mTOR sinyal yoluyla glioma hücre proliferasyonunda engelleyici bir rol oynadığı desteklenmiştir. Bu iki çalışma glioma tedavisinde CAPON'un hedeflenmesi için sağlam bir temel oluşturur (Liang ve arkadaşları., 2019). Bu çalışmalar, gliomalarda ve meme kanseri hücrelerinde CAPON'un düşük ekspresyonunun tümör hücresi proliferasyonunu desteklediğini ortaya çıkarır (Shen ve ark., 2017).

Multipl miyelom (MM), yaygın ve tedavi edilemez bir malign kan hastalığıdır. Şu anda MM tedavisi için kullanılan bortezomib ve doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlar, "hücre adezyon aracılı ilaç direnci" (CAM-DR) nedeniyle sıklıkla hastalığın tekrarlamasına yol açar. MM hücre adezyonu ve CAPON arasındaki ilişkiye dair hücre adezyon kültürünün kullanıldığı bir çalışmada miyelom hücrelerinin kemik iliği stromal hücrelerine veya miyelom hücrelerinin proliferasyonu ile azalan Fibronektin'e yapışmasından sonra CAPON ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca CAPON'un düşük ekspresyonu AKT sinyal yolunu aktive eder, hücre döngüsünün G1 fazında durmasını ve hücrenin kemoterapi ilaçlarına duyarlılığını azaltır. Bununla birlikte, CAPON'un gliomalarda AKT'yi düzenlediği gibi MM'deki AKT sinyal yolunu düzenleyebileceği de ortaya çıkmıştır (Shen ve ark., 2017).

4.2.4. NOS1AP ve Hippo sinyal yolağı

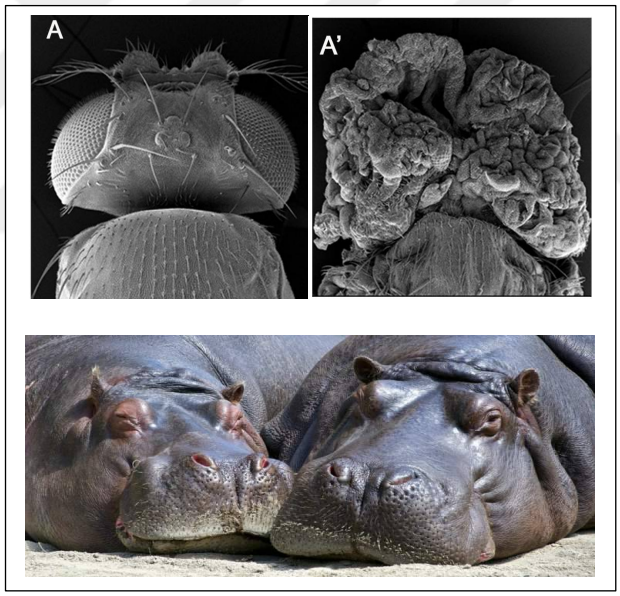
NOS1AP PTB bölgesi ile SCRIBBLE'nin dördüncü PDZ bölgesi arasında doğrudan bir etkileşim mevcuttur ve bu proteinler dendritlerde birlikte lokalize olurlar (Richier ve ark., 2010). SCRIBBLE, YAP/TAZ, MST1/2 ve LATS1/2 proteinlerini LKB1 ve PAR-1 kinazlarının aşağı yönünde tutan büyük bir iskele proteinidir (Mohseni ve ark., 2014). İlginç bir şekilde, SCRIBBLE genellikle Hippo bileşenlerinin iskelesi olduğu bildirildi fakat son zamanlarda NOS1AP ve SCRIBBLE'nin meme kanseri regülasyonu üzerindeki rollerine odaklanılmaktadır (Cordenonsi ve ark., 2011; Mohseni ve ark., 2014; Anastas ve ark., 2012). NOS1AP ve SCRIBBLE, meme kanseri gelişimini düzenlemek için düzlemsel hücre polarite proteini Vangl1 ile kompleks oluşturur (Anastas ve ark., 2012).

Clattenburg ve arkadaşları, NOS1AP'nin Hippo yolağı komponentleri ile bir kompleks oluşturup oluşturmadığını araştırdıkları çalışmalarında, NOS1AP izoformlarını sıçan beyni cDNA'sından amplifiye ettiler ve yeni bağlayıcı proteinleri tanımlamaya çalıştılar. PTB domaini içeren tüm NOS1AP izoformları SCRIBBLE ile ilişkilidir ancak tüm izoformlar özgün doku ve hücre altı lokalizasyonlarına sahiptir. Ayrıca YAP ile etkileşime girebilen birden fazla NOS1AP izoformu vardır. NOS1AP aşırı ekspresyonu, azaltılmış TEAD aktivitesi ve sınırlı hücre proliferasyonu ile ilişkili olan YAP ve Lats1 fosforilasyonunu destekler. Bu da NOS1AP'nin hem Lats1 hem de YAP'nin yukarı yönünde hareket ettiğini göstermiştir. NOS1APa, YAP'ye bağlı TEAD aktivitesini baskılamada tek başına PTB alanından daha az etkilidir. Ek olarak NOS1AP'nin, SCRIBBLE aracılığıyla YAP ile aynı komplekste olabileceği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu veriler, NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir (Clattenburg ve ark., 2015).

İnsan papilloma virüsü (HPV) pozitif orofaringeal skuamöz hücreli karsinomunda da SCRIBBLE bağlayıcı protein NOS1AP, YAP ile ilişkilendirilir. Bu çalışmada da bir önceki çalışma gibi NOS1AP izoformları, sıçan beyni cDNA'sından amplifiye edilmiştir. Çalışmada yer alan iki NOS1AP izoformu (NOS1APa,NOS1APc), tercihen fosforile edilmemiş YAP veya fosforile edilmiş YAP ile ilişkilidir, oysa SCRIBBLE her iki YAP formu ile de birleşir. Ayrıca YAP1'in artan nükleer birikimi gözlenir. Her iki NOS1AP izoformu hücresel proliferasyonu etkiler ve bu veriler, NOS1AP'nin tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği fikrini destekler (Alzahrani ve ark., 2017). Sonuç olarak, farklı dokularda alternatif kırpılmanın daha fazla karakterize edilmesi, NOS1AP'nin hastalık süreçlerindeki rolünü incelemeye yardımcı olacaktır (Clattenburg vd., 2015).

4.3. Hippo Sinyal Yolağı

Hippo sinyal yolağı, 1995 yılında, büyüme kontrolünde rol oynayan genleri tanımlamak adına Drosophila melanogaster hayali diskinde yapılan mozaik bazlı bir taramada, Warts (Wts) tümör baskılayıcı gen delesyonunun, çoklu dokuların dramatik şekilde aşırı büyümesiyle sonuçlandığı birkaç çalışmayla keşfedildi (Justice ve ark., 1995; Xu ve ark., 1995) ve daha sonra, iskele proteini Salvador (Sav), Hippo (Hpo) ve Mats dahil olmak üzere diğer birçok Hippo sinyal yolağı komponenti ortaya çıktı (Guo ve Teng, 2015). Bu dört protein, Drosophila Hippo sinyal yolağının merkez kısmını oluşturur ve bu nedenle Hippo sinyal yolağı, Salvador-Warts-Hippo (SWH) yolağı olarak da adlandırılmaktadır (Udan ve ark., 2003). Hippo sinyal yolağı adını, Hpo, Sav, Wts ve Mats gen mutasyonlarının ortaya çıkardığı aşırı büyümüş kafa fenotipinin, Hipopotoma benzerliğinden almaktadır (Yu ve ark., 2015).



Şekil 5: Hippo sinyal yolağının adını nereden aldığını anlatan görsel. Yabanıl tip (A) ile karşılaştırıldığında, Hippo sinyal yolağı genlerinden wts'nin fonksiyon kaybı, Drosophila melanogaster başının önemli ölçüde aşırı büyümesine neden olur (A') ve alt görselde görüldüğü üzere Hipopotam ile benzerlik göstermektedir (Snigdha ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır). (Hipopotam görseli: https://www.amoreaquattrozampe.it/altri-animali/ippopotamo-pericoloso-uomo-cause/74987/, Erişim tarihi:08.08.2022).

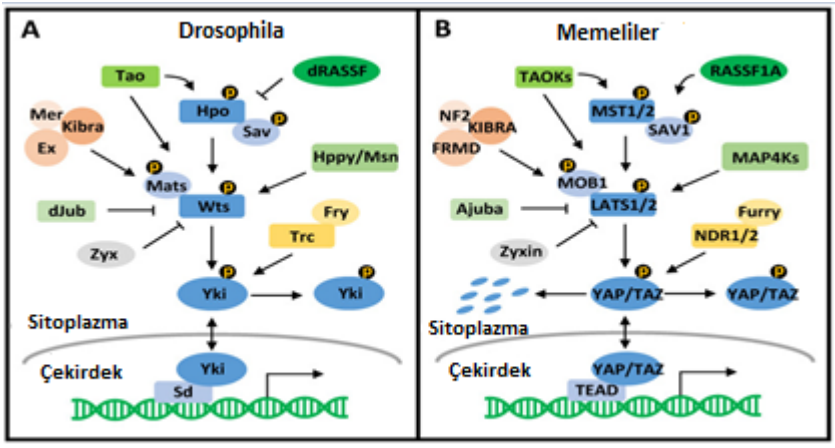
Hippo sinyal yolağı, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur ve bu nedenle, Drosophila Hippo sinyal yolağının çoğu bileşeni memeli homologlarına sahiptir. Hpo, Sav, Wts, Mats, Yki ve Scalloped (Sd) memeli ortologları sırasıyla; Memeli steril 20-benzeri 1/2 (MST1/2, STK4/3 olarak da adlandırılır), SAV1, Büyük tümör baskılayıcı

homolog 1/2 (LATS1/ 2), MOB kinaz aktivatörü 1A/B (MOB1a/b) ,Yes ile ilişkili protein (YAP)/PDZ bağlama motifli transkripsiyonel ko-aktivatör (TAZ, WWTR1 olarak da adlandırılır) ve TEA domain trankripsiyon faktörü (TEAD) komponentlerinden oluşmaktadır (Yu ve ark., 2015).

Tablo 2: Hippo yolağı bileşenleri ve başlıca işlevleri (Yu ve ark., 2015'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Drosophila	**Memeliler**	**Hippo Pathway'deki Başlıca Fonksiyonlar**
Hippo (Hpo)	MST1/2	LATS1/2 aktivasyonuna yol açan LATS1/2, MOB1 ve SAV1'i fosforile eder
Salvador (Sav)	SAV1	MST1/2 ile etkileşime girer, MST1/2 aracılığıyla LATS1/2'nin fosforilasyonunu destekler
Warts (Wts)	LAT1/2	YAP/TAZ'yi fosforile eder ve inaktive eder
Mats	MOB1A/B	LATS1 / 2'nin iskele proteini
Yorkie (Yki)	YAP/TAZ	Transkripsiyon yardımcı aktivatörü, Hippo yolunun ana efektörü
Scalloped (Sd)	TEAD1-4	YAP/TAZ etkisine aracılık eden transkripsiyon faktörleri

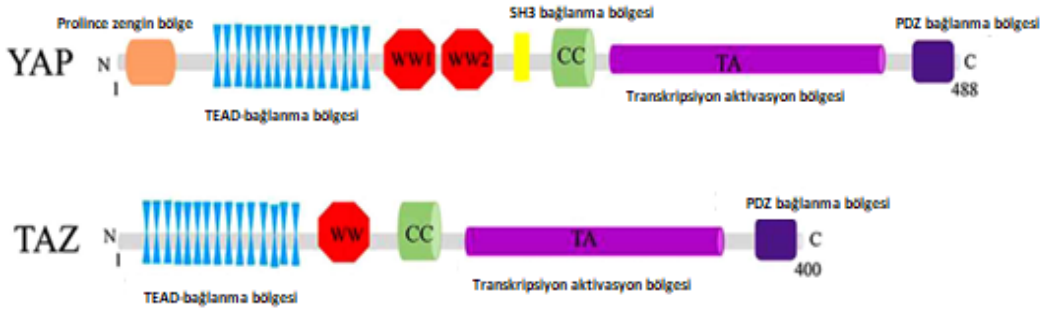
Drosophila melanogaster ve memeli Hippo sinyal yolaklarının merkez kısımları protein kinaz kaskadından oluşmaktadır. Yukarı yöndeki aktivasyon sinyalleri alındıktan sonra aşağı yönde de yer alan Mst1/2 kinaz, SAV1 aracılığıyla Lats1/2 kinazları ve MOB1 kofaktörünü fosforile edererek bu proteinlerin aktivasyonuna yardımcı olur. Hippo yolağı açık durumda iken, aktive olmuş olan Lats1/2 kinazlar, YAP/TAZ transkripsiyon ko-aktivatörlerinin sitoplazmik lokalizasyonlarını ve degradasyonlarını teşvik ederek bu ikiliyi fosforile edip inaktive olmalarına neden olur. Aksine Hippo yolağı aktif olmadığında veya baskılandığında, fosforile olmamış YAP/TAZ, nükleusa yer değiştirip birikerek TEAD gibi transkripsiyon faktörleri ile kompleksler oluşturur ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), sistein bakımından zengin anjiyojenik indükleyici 61 (Cyr61) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF1) gibi hedeflenen genlerin ekspresyonlarını indükler (Guo ve Teng, 2015).



Şekil 6:Drosophila ve Memelilerde Hippo sinyal yolağının şematik çizimi. (A) Drosophila Hippo sinyal yolağı. Drosophila Hippo yolağının çekirdek kinaz kaskadı Hpo, Sav, Wts, Mats ve Yki proteinlerini barındırır. Hippo yolağı aktive edildiğinde, Yki fosforile olur ve sitoplazmada sekestre edilir. Tersine, Yki çekirdeğe yerleşir ve gen transkripsiyonunu uyarmak adına Sd'ye bağlanır. Tao, dRASSF, Kibra–Ex–Mer kompleksi, dJub, Zyx, Hppy/Msn ve Fry–Trc kompleksi dahil olmak üzere, Drosophila Hippo yolağını düzenlemek için çekirdek bileşenlerle doğrudan etkileşime giren birçok faktör yer alır. (B) Memeli Hippo sinyal yolağı. Memeli Hippo yolağının çekirdeği MST1/2, SAV1, LATS1/2, MOB1 ve YAP/TAZ proteinlerinden meydana gelir. Memeli Hippo yolağı açık olduğunda YAP/TAZ fosforile olur ve bu durumda ya sitozolde tutulur ya da degradasyona uğrar. Memelilerin Hippo yolağı kapalı olduğunda YAP/TAZ, gen transkripsiyonu için TEAD'yi aktive etmek üzere çekirdeğe yerleşir. Memeli Hippo yolağında ise RASSF1A TAOK'lar, KIBRA–FRMD–NF2 kompleksi, Zyxin Ajuba, MAP4K'ler ve Furry-NDR1/2 kompleksi gibi unsurlar çekirdek bileşenleriyle etkileşime girer (Xiao ve Dong, 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.1. Hippo sinyal yolağı komponentleri: YAP/TAZ ve TEAD

YAP geni, 11. kromozomun uzun kolunun 22. pozisyonunda (11q22.1), TAZ geni ise kromozom 3q25.1'te konumlanır. TAZ aynı zamanda, WWTR1 olarak da bilinir. YAP ve TAZ proteinleri yapısal olarak çok benzer topolojiye sahiptir. YAP, bir TEAD-bağlama bölgesine (TB), iki WW alanına, bir SH3-bağlama motifine, bir sarmal-sarmal alanına (CC), bir transkripsiyon aktivasyon alanına, bir N-terminal prolin açısından zengin alana ve bir C-terminal PDZ-bağlama motifine sahip 488 amino asitten oluşan bir proteindir. 400 amino asitten oluşan TAZ proteini ise YAP ile hemen hemen organizasyonuna sahiptir, fakat ikinci bir WW domainden, SH3 bağlama motifinden ve prolin açısından zengin domainden yoksundur (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YAP1& https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WWTR1, Erişim tarihi:17.08.2022, Liu ve ark., 2018).



Şekil 7:YAP/TAZ proteinlerinin yapısına dair şematik çizim. TAZ proteini YAP ile karşılaştırıldığında benzer bir toplajiye sahip oldukları görülmektedir. TEAD, YAP/TAZ'nin TEA domainine bağlanır (Liu ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

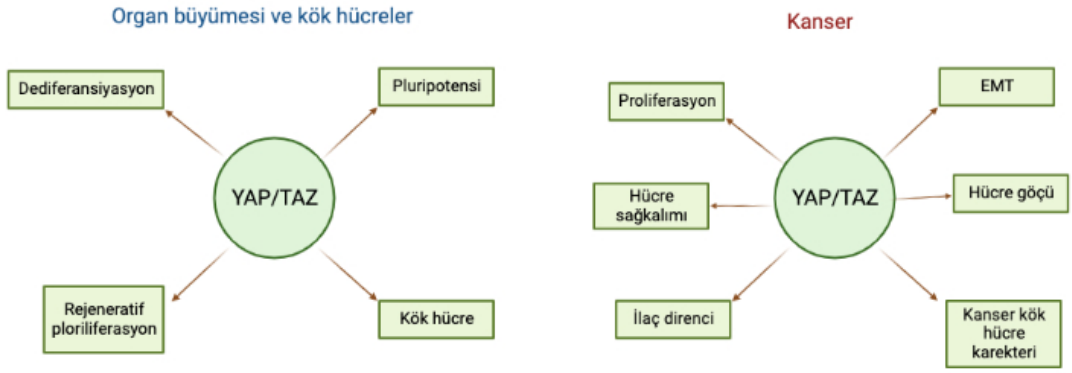
Hem YAP hem de TAZ transkripsiyonel koaktivatörlerdir ve TEAD 1-4, RUNX1/2, SMAD gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerleriyle etkileşime girer. Hippo yolağının ana bileşenlerinden biri olan LATS, YAP/TAZ'yi fosforile eder ve 14-3-3 proteinin YAP/TAZ'ye bağlanmasını destekler. 14-3-3 proteini, YAP'yi S127 ve TAZ'yi S89 fosforilasyon bölgeleri aracılığıyla bağlar, bu da fosforillenmiş ve inaktif durumdaki YAP/TAZ'nin sitoplazmada tutulmasını sağlar. Aktif kinaz kaskadı yokluğunda ise nükleer YAP/TAZ, TEAD 1-4 transkripsiyon faktörleri ailesini tanır ve CCN2 ve PAI-1 gibi hedef genlerin ekspresyonunu indükler (Chen ve ark., 2019). Bu süreç, hücre proliferasyonu, hücre göçü , apoptozdan kaçınma ve organ boyutunun desteklenmesi için progenitör/kök hücrelerin amplifikasyonu ile sonuçlanır (Liu ve ark., 2018).

4.3.2. Hippo sinyal yolağı ve çeşitli fonksiyonları

Hippo sinyal yolağı, embriyogenez, organ büyüme kontrolü, doku homeostazı ve rejenerasyonu, kök hücre fonksiyonu, hücre proliferasyonu gibi süreçlerde önemli roller üstlenmiş tümör baskılayıcı bir yolaktır (Cherrett ve ark., 2012).

Hippo sinyal yolağı, erken embriyonik gelişim aşamasında kritik bir öneme sahiptir. Embriyogenez sırasında ilk hücre kaderi spesifikasyonu, trofektoderm (TE) ve iç hücre kütlesinin (ICM) oluşturulduğu preimplantasyon aşamasında meydana gelir. TE, blastosistin dış hücrelerinden oluşur ve ekstra embriyonik dokuları oluşturur. ICM ise blastosistin iç hücrelerini içerir ve uygun embriyo ve diğer dokuları oluşturur. TE hücreleri için TAZ/YAP çekirdeklerde birikir ancak ICM hücrelerinin sitoplazmasının tamamına dağılır. TAZ bastırılmış fareler canlı olmasına rağmen YAP bastırılmış

fareler E8.5'te ölür. Benzer şekilde, hem YAP hem de TAZ delesyonu, hücre kaderi spesifikasyon kusurları ile sonuçlanır ve bu da TE veya ICM spesifikasyonundan önce morula aşamasında embriyonun ölümüne yol açar. YAP/TAZ'nin TE ve ICM'deki farklı dağılımı nükleer TAZ/YAP kompleksinin TEAD transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek farklı gen ekspresyon imzalarına neden olur ve özellikle dış hücrelerde Cdx2 ve Gata3 gibi TE'ye özgü genlerin indüklenmesiyle sonuçlanır, bu da neticede hücre kaderi spesifikasyonunu yönlendirir. Örneğin, blastosist aşamasında, YAP/TAZ, dış TE hücrelerinde TEAD aktivitesini modüle ederek Cdx2 ve Gata3 transkripsiyonunu indükler. Örneğin, Tead4−/− embriyolarda, tüm hücreler ICM'ye dönüşerek TE hücreleri geliştirmediği bildirilmiştir. Bu veriler, Hippo yolağının, erken embriyonik gelişimde hayati rollere sahip olduğu görüşünü destekler niteliktedir (Chen ve ark., 2019; Yu ve ark., 2015).



Şekil 8:Hippo sinyal yolağının düzenlediği hücresel mekanizmalara dair şematik çizim. Hippo sinyal yolağı üzerinde yer alan YAP ve TAZ, kanser gelişimi, organ büyümesi ve kök hücre davranışı gibi çeşitli hücresel süreçleri yönlendirir (Johnson ve Halder, 2013'den değiştirilerek BioRender'da çizildi).

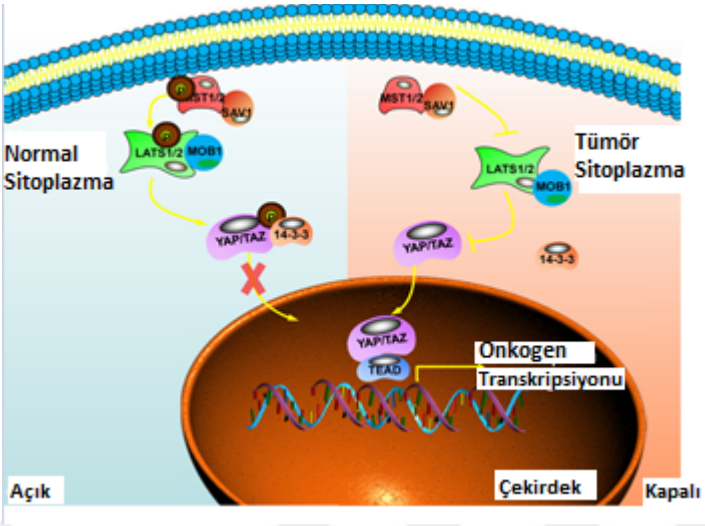
Doku onarımı ve rejenerasyonu genellikle kök hücre aktivasyonunu ve progenitör hücre yayılımı ile ilişkilidir (Johnson ve Halder, 2013). İn vivo YAP/TAZ aktivasyonu, bağırsakta, diş epitelinde, akciğerde ve deride mevcut kök hücre kompartmanlarının genişlemesine neden olur (Moya ve Halder, 2018). Ayrıca YAP'nin transgenik ekspresyonu veya yukarı yöndeki düzenleyicilerin delesyonuyla YAP aktivasyonu, genellikle progenitör hücrelerin genişlemesi, hücre farklılaşmasının bozulması ve cilt, bağırsak, karaciğer ve sinir sistemi gibi hedef dokuların hiperplazisi ile sonuçlanır (Yu ve ark., 2015). İnsan embriyolarında YAP, embriyonik kök

hücreleri içeren gelişmekte olan blastokistlerin iç hücre kütle hücrelerinin (ICM) çekirdeğinde lokalizedir. Bununla birlikte, YAP/TAZ, kök hücre için önemli olan SOX2, NANOG, OCT4 ve MYC gibi genlerin ekspresyonunu da indükler (Moya ve Halder, 2018).

Hippo yolağının en baskın işlevi ve bileşenlerinde gerçekleşen mutasyonlar sebebiyle adını aldığı bir diğer fonksiyonu, organ boyutunu regüle etmektir. Drosophila melanogaster'da, Hippo yolağı kinazlarının (Hippo ve Warts) ve yukarı yöndeki düzenleyicilerin (Ex, Mer, Kibra, Ft) mutasyonu veya Yorkie'nin (YAP ve TAZ, Yorkie'nin insandaki homoloğu) aşırı ekspresyonu, gelişim sırasında göz ve kanat gibi birçok organın aşırı büyümesine yol açar (Udan ve ark., 2003; Johnson ve Halder , 2013). Hippo yolağının organ boyutu üzerindeki etkisi memelilerde yüksek oranda korunmuştur. YAP1'in, transgenik yetişkin farelerde 35 gün süreyle aktivasyonu karaciğer boyutunda 4 kattan (4,1×) fazla bir artışla sonuçlanır fakat YAP1 ekspresyonu kapatıldığında karaciğer normal boyutuna döner. Bu sonuçlar, YAP1'in memelilerde organ boyutunu düzenlediğini ve bu aşırı büyüme biçiminin tamamen tersine çevrilebilir olmasının karaciğerin doğru boyutunu hatırladığını ve küçülmeyi tam olarak ne zaman durduracağını bildiğini gösterir (Camargo ve ark., 2007). YAP/TAZ'nin anormal aktivasyonu karaciğer, kalp, dalak ve mide gibi birçok organda anormal fenotiplere neden olurken YAP'nin dokuya özgü delesyonu meme ve bağırsakta defektlere neden olmaz. Bu bulgular, Hippo yolağının, organ boyutunun düzenlemesinde önemli bir rolü olduğuna işaret eder. Fakat organ boyutu düzenlenmesinde Hippo yolağının yukarı yöndeki fizyolojik sinyallerine dair soru işaretlerinin en kısa sürede aydınlatılması gerekmektedir (Chen ve ark., 2019).

4.3.2.1. Meme ve çeşitli kanser türlerinde Hippo sinyal yolağı

Hippo yolağının ana işlevi, YAP/TAZ'nin hücre proliferasyonu ve sağkalımı ile ilgili genlerin transkripsiyonunu indükledikleri çekirdeğe translokasyonunu önlemektir. Hippo sinyali bu sebeple karmaşık bir tümör baskılayıcıdır. Hippo yolağı, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde yer alan birçok sinyal yolağı ile de iletişim halindedir. Bu minvalde, Hippo sinyal yolağının aydınlatılmasına ve YAP/TAZ gibi yeni birçok biyobelirteçin keşfine dair çalışmalar kanserde yeni terapötik stratejiler geliştirmek adına önemli bir basamak oluşturur (Sebio ve Lenz, 2015;Yu ve ark., 2015).



Şekil 9: Normal ve kanser hücrelerde, Hippo sinyal yolağının işleyişine dair şematik çizim. Hippo sinyal yolağının, MST1/2, SAV1, LAST1/2, MOB1, YAP ve TAZ olmak üzere altı anahtar bileşeni vardır. Normal hücrelerde Hippo yolağı aktive edilir ve YAP/TAZ bazı kademeli reaksiyonlar yoluyla sitoplazmada tutulur. Tümör hücrelerinde bu yolak kapalıdır ve YAP/TAZ, çoklu onkogenlerin transkripsiyonunu desteklemek için çekirdeğe girer ve TEAD gibi transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturur. Sonuç olarak, tümörlerin oluşumunu teşvik edilir (Wang ve ark., 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır).

YAP ve TAZ Hippo efektörleri, sitoplazmada bulunduklarında tümör baskılayıcı olarak veya çekirdekte transkripsiyonel aktivasyonu kolaylaştıran onkogenler olarak hareket eder (Sebio ve Lenz, 2015). Hippo yolağı çekirdek kompenenetlerinin (MST1/2, LATS1/2, YAP ve TAZ) mutasyonları ve değişimiş ekspresyon seviyeleri, kanser hücrelerinin göçünü, invazyonunu ve malignitesini teşvik eder (Han,2019). YAP ve TAZ'nin aşırı ekspresyonunun veya nükleer lokalizasyonunun, meme, akciğer, karaciğer, deri, kolon ve yumurtalık başta olmak üzere birçok kanser türünde çoğunlukla kötü prognoz ve azalan sağkalım ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Warren ve ark., 2018).

Hippo yolağı bileşenleri, meme kanserinde kritik roller üstlenir. Meme kanseri hücrelerinde, TAZ/YAP, TEAD transkripsiyon faktörleri çekirdekte TGFβ ile indüklenen SMAD2/3 ile etkileşime girer. TAZ/YAP'nin siRNA kullanarak bastırılması, TGFβ ile indüklenen LM2-4 hücre göçünü ortadan kaldırır. TAZ/YAP, TEAD ve TGFβ koordinasyonuyla, CTGF ve bu çalışma ile yeni keşfedilen NEGR1 ve UCA1 transkripsiyonel hedef genleri, metastatik meme kanseri hücrelerinde tümörijenik aktiviteyi sürdürmek için gereklidir. NEGR1, UCA1 ve CTGF

ekspresyonu, TGFβ yokluğunda TAZ/YAP veya TEAD bastırılması ile ardından ortadan kalkar. Bu bulgular, metastatik meme kanseri hücrelerinde TGFβ ile indüklenen klonal ankrajdan bağımsız büyüme, hücre göçü ve invazyon gibi tümörijenik fenotiplerin transdüksiyonu için TAZ/YAP'nin gerekli olduğunu gösterir (Hiemer ve ark., 2014). YAP1 ekspresyonu ve çeşitli maligniteler arasındaki ilişkinin değerlendirildiği birleştirilmiş 2983 kanser hastasını içeren bir meta-analiz çalışmasında, YAP1 aşırı ekspresyonunun, kötü prognoz ve zayıf genel sağkalım süresi (OS) bağlantılı olduğu vurgulanmıştır (Sun ve ark., 2015). Literatürdeki birçok çalışma YAP/ TAZ ekspresyonunun kötü prognoz ve metastaz ile ilişkili olduğunu öne sürse de bazıları YAP'nin tümör baskılayıcı bir rolü olduğunu ve YAP ekspresyonunun metastaz ve prognoz ile ters orantılı olduğunu ileri sürmektedir.

YAP ekspresyonu meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık gösterir. YAP ekspresyonu luminal A meme kanserlerinde en yüksek, HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanserlerinde en düşüktür ve HER2 ve Ki67 seviyeleri ve lenf nodu metastazı ile ters orantılıdır. Bu rapor, YAP'nin tümör baskılayıcı rolünü destekler niteliktedir (Cao ve ark., 2017). YAP tarafından düzenlenen farklı transkripsiyonel programların entegrasyonu ve YAP kaybının veya aşırı ekspresyonunun spesifik etkisi yer aldığı yolaktaki sinyalizasyon ağına tutarlı olarak, doku ve tümör alt tiplerinde bir tümör baskılayıcı veya onkogen olarak rolünü belirleyecek olabilir. Bu nedenle, hücresel bağlamları dikkate almadan çeşitli tümör türlerinde YAP düzeylerini düşürmeye yönelik terapötik çalışmalar, terapötik tedavi yerine artan tümör büyümesine neden olabileceğinden dolayı dikkatli olmayı gerektirir (Yuan ve ark., 2008; Jho, 2018; Warren ve ark., 2018 ; Guo ve Teng, 2015).

İnsan kolon kanserlerinde YAP1 aşırı ekspresyonunun yüksek prevalansı dikkat çekicidir. Normal kolonik epitelyal hücrelere kıyasla kolon kanseri hücre hatlarının çoğunda YAP polipeptit ekspresyonu, büyük ölçüde artmıştır. HCT116, SW480, SW837 ile birlikte 10 insan kolorektal kanser hücre hattında, lentiviral shRNA tarafından sağlanan YAP deplesyonu, hücre proliferasyonunu inhibe eder ve YAP1'in bu kanser türünde de önemli bir itici güç olduğunu destekler (Zhou ve ark., 2011). Ayrıca YAP1/TAZ mRNA ekspresyonları, aşağı yöndeki hedef genleri olan AXL ve CTGF ile pozitif koreledir. TAZ, AXL veya CTGF'nin yüksek mRNA ekspresyon

seviyeleri, daha kısa sağkalım ile de önemli ölçüde koreledir. Bununla birlikte,TAZ-AXL-CTGF birlikte aşırı ekspresyonu, kolon kanseri progresyonu için yeni bir prognostik gösterge olabilir (Yuen ve ark., 2013).

Mide kanseri hücrelerinde, reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan eritropoietin üreten hepatoselüler reseptör A2 (EphA2), YAP proteini ile etkileşir ve bu proteini fosforile eder. Bu etkileşim, mide kanseri hücrelerinde YAP'nin nükleer translokasyonuna ve aktivasyonuna yol açarak kemoterapi direncini indükler. Hem 5-FU (5-fluorouracil) hem de VP (verteporfin) ile muamele edilen hücrelerde, nükleer YAP proteininin ekspresyonunu ise önemli ölçüde azalır. Bu sonuçlar, EphA2-YAP yolunun mide kanseri kemoterapi direncini tetiklediğini ve tedavide bu yolu hedeflemenin (örneğin, 5-FU ve VP kombinasyonuyla tedavi) etkili olabileceğine işaret eder (Huang ve ark., 2019).

Helicobacter pylori (H. pylori), onkoprotein CagA'yı T4SS yoluyla mide epitel hücrelerine iletir ve çoklu onkojenik sinyal yollarının aktivasyonunu sağlar. CagA+ H. pylori, CagA'yı T4SS yoluyla gastrik epitelyal hücrelere iletir, burada CagA onkogen YAP ekspresyonunu indükler, aşağı yöndeki genlerin ekspresyonunun yükselmesini sebep olan YAP nükleer translokasyonunu arttırır. YAP'nin H. pylori CagA aracılı aktivasyonu EMT'ye yol açar ve böylece gastrik tümör oluşumu teşvik edilir. 7.13 ve PMSS1 suşlarında CagA'nın susturulması, H. pylori enfeksiyonu ile YAP ekspresyonunu azaltır ve H. pylori enfeksiyonunun neden olduğu EMT'yi bastırır (Li ve ark., 2018).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KDHAK) YAP ve TAZ'nin aşırı ekspresyonu, hastalıkların gelişimi, ilerlemesi ve kötü prognozu ile ilişkilidir (Han, 2019). Düşük LATS1 mRNA ekspresyon seviyelerine sahip olan KHDAK hastaları ise genel kısa sağkalım ile ilişkilendirilir ve LATS1, KHDAK'lı hastalarda doğrudan bir terapötik hedefi temsil edebilir (Malik ve ark., 2019).

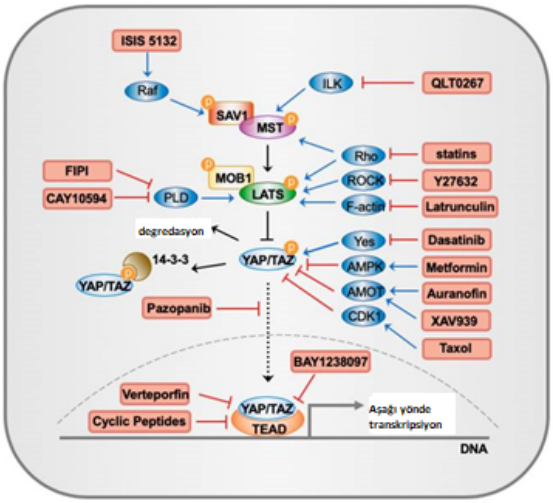
4.3.2.1.1. Meme ve çeşitli kanser türlerinde Hippo sinyal yolağı üzerine terapötik yaklaşım

Hippo yolağı komponentleri, kanser tedavisi ve yönetimi için öngörücü biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak hizmet eder (Wei ve ark., 2018). YAP/TAZ aktivasyonun pro-tümörojenik ve pro-metastatik etkisi, araştırmacıları YAP/TAZ-TEAD kompleksinin oluşumunu engellemeye yönelik stratejiler geliştirerek antikanser tedaviler için hedef modeller sunmaya itmiştir. Bu amaçla, küçük moleküller kitaplığının taranmasıyla, birkaç porfirin bileşiğinin YAP'ye bağlandığı ve daha sonra YAP ve TEAD etkileşimini engellediği bildirilmiştir (Guo ve Teng, 2015). Bu porfirin bileşiklerden, YAP'ye özgü bir inhibitör olan, Verteporfin (VP), YAP'nin işlevini bastırmak için YAP ve TEAD arasındaki etkileşimi engeller (Wu ve Yang, 2018). MDA-MB-231 ve BT-549 meme kanseri hücrelerinin Verteporfin ile muamelesi TAZ/YAP'nin nükleer translokasyonunu , protein ekspresyonunu ve ayrıca TAZ/YAP güdümlü sinyalleşmeyi (örn. EMT sinyali) inhibe eder. Verteporfin, hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder ve meme kanseri hücrelerinde %90'a kadar apoptotik hücre ölümünü indükler. Ayrıca Verteporfin, meme kanseri metastazına aracılık eden genlerin (örneğin ANGPTL4, COX2, EREG ve MMP1) ekspresyonunu bastırır (Sun ve Ying, 2015).

Verteporfinin yanı sıra, protoporfirin IX ve hematoporfirin gibi diğer porfirin üyeleri ksenograft fare modellerinde YAP-TEAD etkileşiminin bozucuları olarak tanımlanır ve birçok kanserin tedavisinde aday olabilir (Wu ve Yang, 2018). VGLL4, mide kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcı ve YAP'nin doğal bir antagonistidir çünkü TDU bölgesi YAP'nin TB alanlarına benzer bir yapıya sahiptir. Bu nedenle,VGLL4, TEAD bağlanması için YAP/TAZ ile rekabet ederekYAP-TEAD'in etkileşimini rekabetçi bir şekilde engeller (Jiao ve ark., 2014). Meme kanseri hücrelerinde lovastatin, dasatinib, thiazovivin, cucurbitacin I ve pazopanib'in YAP'nin nükleer lokalizasyonunu değiştirerek YAP-TEAD etkileşimini inhibe eder. Ayrıca dasatinib, statinler ve pazopanib klinik olarak kullanılan ilaçlar olarak onaylanmıştır (Wu ve Yang, 2018).

IKBKE bir onkojenik bir proteindir ve birçok kanserde upregüle olur. Glioblastoma hücrelerinde IKBKE, LATS1 / 2'nin degredasyonunu indükler ve böylece Hippo yolağının aktivitesini inhibe eder. Amlexanox, IKBKE'yi baskılayarak Hippo yolunun protein ekspresyonunu değiştirir. DMSO ile muamele edilen gruba göre Amlexanox ile muamele edilen grupta LATS2 ve p-YAP1(Ser127) ekspresyonu artarken YAP1, Axl, c-Myc, Cyr61, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon seviyeleri aynı anda azalır. Bu sonuçlar, IKBKE'nin seçici bir inhibitörü olan Amlexanox'un potansiyel bir LATS1/2 hedefli ilaç olabileceğine işaret eder (Liu ve ark., 2017).

Lai ve arkadaşları, TAZ'nin ilaç direncinden sorumlu yeni bir gen hedefi olduğunu bildirdiler. İnsan meme kanseri hücrelerinde, TAZ'nin TEAD transkripsiyon faktörleri ailesi ile olan etkileşimi, TAZ'nin Cyr61/CTGF promotörlerini aktive etmesi ve kemoterapötik ilaç olan Taksol direncini indüklemesi için gerekliyken TAZ-yüksek/ilaca dirençli MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinde TAZ'nin bastırılması bu hücreleri Taksol'e duyarlı hale getirir. Ayrıca hem Cyr61 hem de CTGF'nin shRNA aracılığıyla bastırılması, meme kanseri hücrelerinde TAZ kaynaklı Taksol direncini tersine çevirir. TAZ-TEAD-Cyr61/CTGF sinyal yolu, meme kanseri hücrelerinde Taksol yanıtının önemli bir değiştiricisi olarak ve ayrıca hastalığın ileri evrelerinde yaygın olarak ortaya çıkan ilaca dirençli meme kanserlerini tedavi etmek için yeni bir terapötik hedeftir (Lai ve ark., 2011).



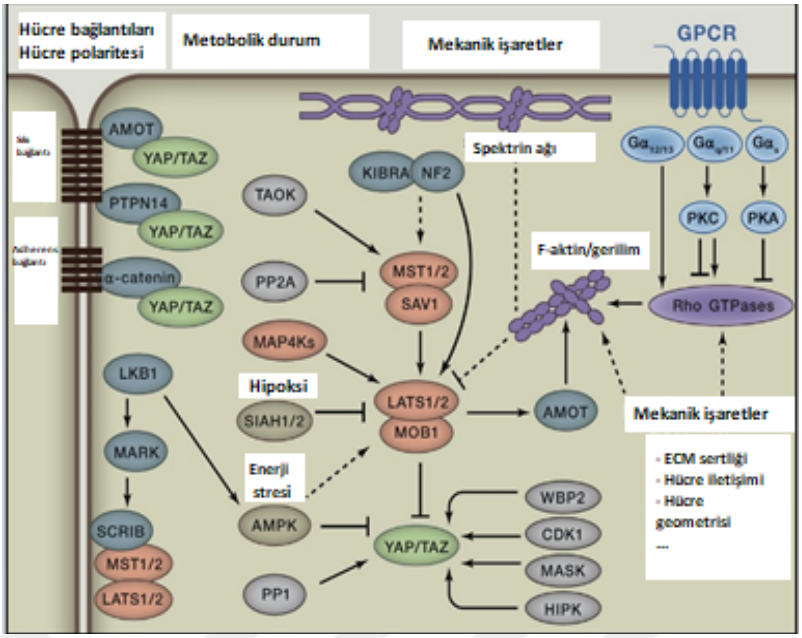
Şekil 10: Hippo yolağı hedefli inhibitörlere ait şematik çizim (Wu ve Yang, 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır.

Bu ilaçlar, gelecekte ilaca dirençli ve/veya metastatik kanserlerin daha etkili tedavisi için tek başına veya diğer terapötik ilaçlarla ile birlikte kullanılabilir (Wu ve Yang, 2018). Bununla birlikte, Hippo sinyal yolağında yer alıp hala açığa kavuşturulmamış birçok faktörün aydınlatılmasıyla bu yolu hedefleyen yeni ilaçların ortaya çıkması merakla beklenmektedir.

4.3.3. Hippo sinyal yolağını düzenleyen yukarı yöndeki sinyaller

Hippo sinyal yolağının aktivitesi, çoğunlukla plazma membranından gelen sinyalleri ileten çok sayıda yukarı yöndeki girdiler tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGFβ), epidermal büyüme faktörü (EGF) veya WNT gibi klasik sinyal yolaklarının aksine Hippo sinyal yolağı özel reseptörlere ve hücre dışı ligandlara sahip değildir. Daha doğrusu, Hippo sinyal yolağı, hücre morfolojisi, hücre adezyonu ve hücre polaritesinin kurulması gibi süreçlerde rolleri olan yukarı yöndeki komponentler ağı tarafından regüle edilir. Hippo yolağının aktivitesi, bu nedenle, mekanik zorlamalara, hücre-hücre ve hücre-hücre-ekstraselüler matris (ECM) adezyonundaki değişikliklere, besin mevcudiyetine ve diğer hücresel streslere yanıt olarak modüle edilir.

Bu sebeple Hippo yolağı, özel hücre dışı sinyal moleküllerine yanıt vermek yerine doku ve hücresel bütünlük için bir sensör işlevi görür (Moya ve Halder, 2018).



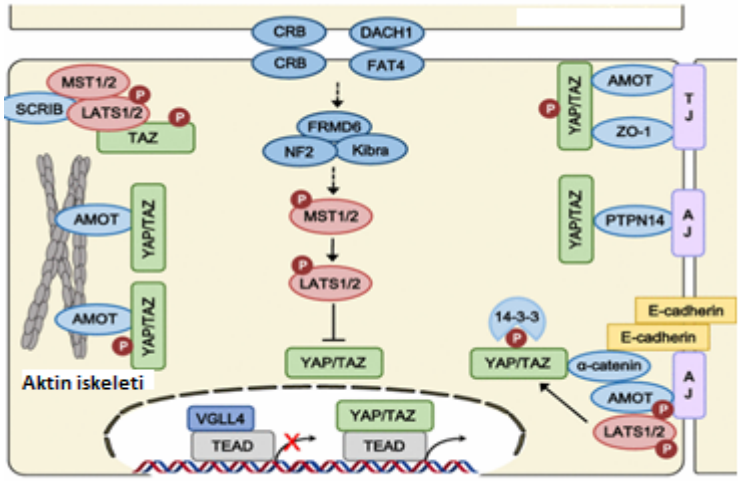
Şekil 11: Memelilerde Hippo sinyal yolağının düzenlenmesine dair şematik çizim. Hippo yolağı çeşitli sinyallerle düzenlenir: (1) MST1/2 ve LATS1/2 ile etkileşime giren SCRIB, AMOT, PTPN14 ve α-katenin gibi YAP/TAZ'yi hücre bağlantılarında tutabilen hücre polaritesinin ve hücre-hücre bağlantılarının belirleyicileri ile düzenlenir. (2) Rho GTPaz aktivitesini modüle ederek Hippo yolunu düzenleyen sertlik, hücre teması, hücre geometrisi ve hücre bağlanma durumu ve aktin hücre iskeletinin yeniden modellenmesi veya hücresel gerilimin değiştirilmesi gibi mekanik ipuçlarıdır ve ayrıca hem apikal hem de bazolateral spektrin ağları, Hippo yolağı düzenlemesinde mekanik ipuçları için sensörler olarak işlev görebilir. (3) Çözünür faktörler (özellikle GPCR'ler için ligandlar) muhtemelen Rho GTPazlar ve aktin dinamikleri yoluyla LATS1/2'yi düzenler. (4) Hücresel enerji ve oksijen stresi gibi metabolik durumlar da Hippo sinyalini düzenler. Protein fosfataz 2A (PP2A), protein fosfataz 1 (PP1), WBP2, CDK1, MASK ve HIPK gibi birçok başka protein de Hippo yolu bileşenlerinin aktivitelerini düzenleyebilir. * Oklar, kör uçlar ve kesikli çizgiler sırasıyla aktivasyonu, inhibisyonu ve dolaylı düzenlemeyi gösterir (Yu ve ark., 2015'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.3.1. Hücre polaritesi ve hücre adezyonu Hippo sinyalini düzenler

Hücreler çoğunlukla polarite göstermektedirler. Polarite, belirli işlevleri yerine getirmek için hücresel bileşenlerin asimetrik organizasyona denir. Apikal ve bazolateral hücre polaritesi ise polarite kompleksleri olarak adlandırılan yapı içerisindeki proteinlerin yardımıyla, yapışık bağlantılar (adherens juntions) ve sıkı bağlantılar (tight juntions) tarafından kurulur. Ayrıca bu bağlantılar Hippo sinyal yolağının düzenlemesinde merkezi bir rol üstlenir. Crumbs (CRB1), yalnızca apikal plazma zarında lokalize olan bir transmembran proteindir ve bir hücrenin apikal-bazal polaritesinin ispatında gereklidir.

Crumbs, FERM alanı içeren protein 6 (FRMD6), Kibra (WW domaini içeren protein) ve Merlin (Neurofibromin 2 veya Schwannomin olarak da adlandırılır) proteinleri ile ilişkilidir ve bu etkileşim sayesinde Hippo yolağını aktive eder . Anjiyomotin (Amot),

sarmal-sarmal domaini, WW bağlama motifi, aktin bağlama alanı ve PDZ bağlama alanlarından oluşur ve bu yapılar aracılığıyla sıkı bağlantı bölgelerine lokalize olur ve aktin hücre iskeletine, YAP/TAZ proteinlerine ve Rho-GTPazlara bağlanan bir iskele proteini görevi görür. Amot, YAP/TAZ'nin sitoplazmik translokasyonlarını teşvik ederek aktivasyonlarını inhibe eder ve ayrıca LATS kinaz aktivitesini desteklemek için hem LATS1/2 hem de MST1/2'yi bağlar ve bu sayede YAP/TAZ aktivitesini baskılar. Ayrıca Amot protein ailesi, β-katenin ve ZO-1 gibi yapışık bağlantılar ve sıkı bağlantıların çoklu bileşenleri ile de etkileşime girer. ZO-1, YAP'nin bir paralogu olan TAZ'nin aktivitesini bastırırken bir diğer sıkı bağlantı sitoplazmik iskele proteini olan Zonula occludens-2 (ZO-2) YAP/TAZ'nin C-terminal PDZ alanı ile etkileşime girer ve YAP/TAZ nükleer translokasyonunu destekler. SCRİBBLE gibi hücre polarite belirleyicilerinin kaybı, Hippo yolağının aktivitesinin azalmasına, YAP veya TAZ'nin aktivasyonuna, EMT'ye ve kanser kök hücrelerinin genişlemesine yol açar. Kaderinler, yapışık bağlantıların temel bileşenleridir. α-katenin, kaderinler ve aktin hücre iskeleti arasında bağlantı kurar. Ayrıca α-Catenin, 14-3-3 proteinleri ve fosforlanmış YAP ile bir kompleks oluşturur. Nihayetinde, YAP'yi sitoplazmada tutarak inaktivasyonuna sebebiyet verir ve YAP aktivitesi bastırılır destekler. E-kaderin/katenin kompleksi, memeli hücrelerinde Hippo sinyal yolağının yukarı yöndeki düzenleyicisi olarak işlev görür. Hatta, Kim ve ekibi (2011) E-kaderini memeli hücrelerinde Hippo sinyalini düzenleyen yukarı yöndeki hücre yüzeyi reseptörü olarak tanımlamaktadır. E-kaderin, iki hücre arasında homofilik bağlanarak çekirdekteki YAP aktivitesini inhibe eder ve proliferasyonu kontrol eden Hippo sinyal yolağını uyarır. Aksine Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin (Merlin, Lats ve Kibra) tükenmesi veya YAP'nin aşırı ekspresyonu, proliferasyonun E-kadherin aracılı temas inhibisyonunu bloke eder. Bu nedenle hücre-hücre adezyonunun bozulması, Hippo yolu aktivitesi üzerinde güçlü etkilere sahip olabilir ve YAP/TAZ'nin aktivasyonuna veya baskılanmasına yol açabilir (Moya ve Halder , 2018; Boopathy ve Hong, 2019; Moon ve ark. 2018; Kim ve ark., 2021; Cordenonsi ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011).



Şekil 12: Memelilerde Hippo sinyal yolağının hücre polaritesi ve adezyonu tarafından düzenlediğine dair şematik çizim. Hippo yolağı, hücre polaritesi (Crumbs, DACH1–FAT4) ve hücre-hücre bağlantıları tarafından düzenlenir. Hippo kaskad kinazlar kırmızı ile gösterilir ve YAP/TAZ aktivitesinin inhibitör düzenleyicileri mavi ile gösterilir. Sivri oklar aktivasyonu gösterir (Moon ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.3.2. Hücre teması ve mekanik durumlar Hippo sinyalini düzenler

Hücresel mekanik ortam, hücreyi ve çevresindeki ortamları etkileyebilecek çeşitli fiziksel kuvvetler içerir ve matriksin sertliğine, matriksin kompozisyonuna, mevcut alanın boyutuna ve hücre mikroçevresindeki birçok faktöre bağlı olarak hücrenin çoğalması, hayatta kalması ve farklılaşması, doku yenilenmesi ve yara onarımı gibi çeşitli süreçlerde önemli roller üstlenir. Anormal mekanik transdüksiyon, birçok sinyal yolağının aktivasyonuna yol açabilir ve potansiyel olarak kronik hastalıkların gelişimini etkileyen anormal hücresel davranışları tetikleyebilir (Wang ve ark., 2021). Ayrıca doku gerilmesi, hücre geometrisi, hücre yoğunluğu ve alanı, ekstraselüler ortamın sertliği ve hücre kontağı gibi mekanik kuvvetler YAP/TAZ'nin lokalizasyonunu ve aktivitesini düzenlemektedir (Boopathy ve Hong, 2019; Wang ve ark., 2021). Ekstraselüler matrix (ECM) sertliği, hücre büyümesini, hücre göçünü ve farklılaşmasını düzenler. YAP ve TAZ, ECM sertliği ve hücre şekli tarafından uygulanan mekanik sinyallerin nükleer röleleridir. Altta yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da, hücre yayılması ve substrat sertliği manipülasyonlarından kaynaklanan aktin hücre iskeleti gerilimi, ECM sertliği ve YAP/TAZ aktivasyonu arasındaki anahtar bağlantıyı oluşturur.

Yüksek ECM sertliği, hücre yayılmasını teşvik eder ve ardından aktin hücre iskeleti gerilimine yol açar ve bu da YAP/TAZ'nin nükleer translokasyonu ve hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin artışını destekler. RhoA GTPase ise YAP/TAZ'ye sertlik sinyallerini iletir, fokal adezyon yoluyla ECM sertliğini algılayabilir ve ardından aktin polimerizasyonunu ve stres lifi oluşumunu teşvik eder (Dupont ve ark., 2011; Cai ve ark., 2021). YAP/TAZ'nin çeşitli mekanik sinyal düzenleyicileri üzerine yapılan çalışmalarda çoğunlukla aktin hücre iskeleti üzerine yoğunlaşılmıştır (Wang ve ark., 2021). Aktin hücre iskeletinin, hücrenin yaşadığı mekanik streslere oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. Hippo yolağı ve YAP/TAZ aktin hücre iskeleti ile birlikte hücrenin mekanik ortamındaki değişiklikleri dolaylı olarak algılayabilir ve bunlara yanıt verebilir. Aktin hücre iskeletinin düzenleyicilerinin mutasyonu veya baskılanması yoluyla F-aktin seviyelerinde manipülasyon veya F-aktin-inhibitör ilaçlarıyla muamele, Hippo sinyali ve YAP/TAZ aktivitesi üzerinde çarpıcı etkilere sahiptir. Örneğin, aktin-kaplayıcı proteinin (CapZb) baskılanması, F-aktin, nükleer YAP/TAZ ve YAP/TAZ hedef gen ekspresyonunda bir artışa neden olur. Genel olarak, artan F-aktin seviyeleri YAP/TAZ nükleer lokalizasyonunu teşvik eder ve F-aktin kaybı YAP/TAZ'nin sitoplazmada birikmesine neden olur (Dasgupta ve McCollum, 2019). Spektrinler, plazma zarını stabilize eden ve hücre içi organelleri organize eden temel iskele proteinleri olarak işlev gören filamentli hücre iskelet proteinlerinin bir üyesidir. Spektrinler, karşılıklı tetramerler oluşturmak üzere birleşen alfa ve beta dimerlerinden oluşur. α spektrin alt birimi insanlarda eritrositlerde ekprese edilen SPTA1 ve spesifik olarak eritrositik olmayan hücrelerde eksprese edilen SPTAN1 geni olmak üzere iki gen tarafından kodlanır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6709, Erişim tarihi:13.08.2022). Spektrin hücre iskeleti, potansiyel bir mekanosensör olarak önerilmiştir (Ma ve ark., 2019). SPTAN1'in ekspresyonu, MCF10A hücrelerinde küçük engelleyici RNA (siRNA) yoluyla bastırıldığında birleşik kültürlerdeki kontrol hücrelerine kıyasla YAP'nin nükleer lokalizasyonu artar bununla beraber kontrol hücrelerine kıyasla Hippo'ya yanıt veren Ser 127 ve Ser 381 bölgelerinde YAP fosforilasyonunun azalır ve ayrıca kortikal p-MLC (myosin II light chain; miyozin hafif zincir) seviyesi artar. Bu sonuçlar, SBMS'nin (spektrin bazlı membran iskeleti), memeli hücrelerinde aktomiyosin aktivitesini ve Hippo sinyalini düzenlemede korunmuş bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Deng ve ark., 2015).

YAP'nin nükleer birikimi için çekirdeğe doğrudan kuvvet uygulanması yeterlidir. Kuvvet iletimi çekirdeğin düzleşmesine neden olur ve nükleer por komplekslerini (NPC) gerer. Bu durum NPC boyunca moleküler taşınmaya karşı mekanik dirence neden olur ve YAP'nin nükleusa taşınmasına neden olur (Boopathy ve Hong, 2019).

Hücre-hücre teması, Hippo sinyal yolağını düzenleyen ilk sinyal olarak keşfedildi. Bir hücre onu çevreleyen hücrelerle fiziksel temastan sonra çoğalmayı durdurur. Hücre temas inhibisyonunun kaybı ise onkojenik dönüşümün bir göstergesidir. Seyrek bir kültürde YAP ve TAZ hedef gen transkripsiyonunu ve hücre çoğalmasını teşvik etmek için çekirdekte lokalizedir. Aksine, yüksek hücre yoğunluğunda YAP ve TAZ sitoplazmiktir ve bu durum da büyüme inhibisyonuna karşılık gelir. Bu nedenle YAP/TAZ'nin hücre yoğunluğu tarafından düzenlenmesi, Hippo yolağı için temas inhibisyonu, doku büyümesi ve tümör oluşumunda kritik bir rol olduğunu öne sürer. Hücre geometrisi, hücre yoğunluğu tarafından Hippo sinyal yolağı düzenlemesinin altında yatan bir mekanizma olarak bildirilmiştir. Düşük yoğunlukta hücreler düz geometriye sahiptir, yayılır ve YAP aktivasyonuna yol açar fakat yüksek yoğunlukta hücreler YAP inaktivasyonu ile sonuçlanan yuvarlak ve kompakt bir geometriye sahiptir (Yu ve ark., 2015).

4.3.4. Hippo sinyal yolağının diğer sinyalizasyon yolakları ile entegrasyonu

Hippo sinyal yolağı, Wnt, TGFβ ve AMPK gibi birçok sinyal yolağı ile hücresel yanıtı, gelişimi ve patogenezi sıkı bir şekilde düzenlemek için birleşir ve bütünleşir (Han, 2019).

Wnt sinyal yolağı, hücre kaderinin belirlenmesinde, hücre polaritesinde, hücre göçü ve embriyonik gelişimde, yetişkin doku homeostazında ve çeşitli doku ve organların rejenerasyonunda çok sayıda biyolojik olayları kontrol eden, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal transdüksiyon kaskadıdır (Azbazdar ve ark., 2021). WNT sinyal yolağı, kanonik WNT (veya β-katenin bağımlı) ve kanonik olmayan WNT (veya β-katenin bağımsız) olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Kanonik WNT/β-katenin sinyal yolağı genellikle hücre kaderini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlemede çok önemli rollere sahipken, kanonik olmayan WNT sinyali daha çok farklılaşma, hücre polaritesi ve göç ile ilişkilidir (Yang ve ark., 2015).

Wnt stimülasyonu yokluğunda, transkripsiyonel aktivatör β-katenin, Axin, APC ve GSK-3β'yi içeren bir yıkım kompleksi tarafından degrede olur ve böylece sitoplazmada düşük bir β-katenin seviyesi korunur. Wnt stimülasyonu varlığında ise sitoplazmik β-katenin birikirek Wnt'ye yanıt veren transkripsiyonel programı aktive etmek için çekirdeğe girer (Kim ve Jho, 2018).

Hippo ve Wnt/β-katenin sinyal yolakları arasındaki ilk moleküler bağlantı, TAZ'nin DVL aracılığıyla Wnt sinyalini engellediğine dair raporla bildirilmiştir. Hippo yolağının ana komponenti olan TAZ, DVL'ye bağlanır ve Wnt yolağını negatif olarak düzenler. TAZ, DVL'nin CK1δ/ε aracılı fosforilasyonunu engelleyerek Wnt/β-Catenin sinyalini inhibe eder. TAZ seviyelerinin veya Hippo sinyalinin kaldırılması, Wnt3A ile uyarılan DVL fosforilasyonunu, nükleer β-Catenin ve Wnt hedef gen ekspresyonunu geliştirir ve bu durum TAZ-null farelerin böbreklerinde sitoplazmik ve nükleer β-Catenin birikiminin artmasına neden olur ve sonuç olarak polikistik böbrekler (PKD) gelişir (Varelas ve ark., 2010).

İlerleyen çalışmalarda Wnt sinyal yolağı aktif olduğu durumda β-kateninin APC, Axin ve GSK3 tarafından oluşturulan yıkım kompleksinden ayrıldığı ve YAP/TAZ'nin de aktive olmasıyla hedef genlerin ekspresyonunu arttırmak için nükleusa girdiği bildirilmiştir (Guo ve Teng, 2015). Wnt sinyali yokluğunda ise YAP/TAZ, β-TrCP'nin de yer aldığı yıkım kompleksine alınarak β-katenin aktivitesini de inhibe eder ve sitoplazmada yer alır (Kim ve Jho, 2018; Jang ve ark., 2020).

TGF-β sinyal yolağı, ekstraselüler matriks üretimi, embriyogenez, doku homeostazı hücre apoptozu, hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması, hücre plastisitesi ve göçü gibi süreçlerin birçok yönünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. TGF- β, TGF- β tip I reseptörü, TGF- β tip II reseptörü ve SMAD ailesi üyeleri SMAD2, SMAD3, SMAD4 proteinleri TGF- β sinyal yolağının ana komponentleridir. TGF-β ligandları önce tip II reseptörlere bağlanır, daha sonra tip I reseptörlerle bir ligand-reseptör kompleksi oluşturur. TGF-β tip I reseptörü, intraselüler SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonları yoluyla doğrudan bu yolağı aktive eder ve daha sonra TGF-β sinyallerine aracılık eder.

SMAD2 ve SMAD3 proteinleri ayrıca ortak bir aracı olan SMAD4 proteinini hedef alarak daha sonra hücre çekirdeğine transloke olan bir heteromerik SMAD kompleksi oluşturur (Hata ve Chen, 2016; Lin ve ark., 2017; Huang ve Chen, 2012).

Hippo ve TGF-β arasındaki etkileşimler, insan embriyonik kök hücrelerinin kendi kendine yenileme potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir. TAZ, TGF-β tarafından düzenlenen heteromerik Smad2/3-Smad4 kompleksleri ile etkileşime girer ve TGF-β aracılı insan embriyonik kök hücrelerinin (hESCs) kendi kendine yenilenme yeteneğinin ortaya çıkmasına neden olur. TAZ kaybında ise Smad2/3–4 komplekslerinin çekirdekte birikmekde ve transkripsiyonu aktive etmekde başarısız olması ile birlikte nöroektoderm farklılaşmasının yok olduğu görülür. Bu çalışma neticesinde TAZ, heteromerik Smad2/3–4 komplekslerinin nükleer birikimini kontrol eden kilit transkripsiyonel düzenleyici faktör olarak nitelendirilir (Varelas ve ark., 2008).

NCI-H290 malign mezotelyoma hücrelerde CTGF promotörü üzerinde oluşan YAP–TEAD4–Smad3–p300 kompleksi, CTGF ekspresyonunu indükler. Bu hücrelerde CTGF ekspresyonunun baskılanması ise ksenograftlı farelerin hayatta kalma süresini uzatır. Sonuç olarak, TGF-β sinyalinin bloke edilmesi ve CTGF protein ekspresyonunun baskılanması, malign mezotelyoma tümör büyümesini bozar (Fujii ve ark.,2012).

DeRan ve arkadaşları hücresel enerji seviyesinin Hippo sinyal yolağının yukarı yöndeki düzenleyicisi olduğunu bildirdiler. Enerji stresi AMPK'yi aktive eder ve bu protein de LATS'nin aktivitesini teşvik edebilen ,YAP aktivitesini inhibe edebilen ve buna paralel olarak YAP fosforilasyonunu indükleyebilen AMOTL1'i dolaylı olarak fosforile eder (DeRan ve ark., 2014).

G-protein-bağlı reseptörler (GPCR'ler), ökaryotlardaki en büyük membran reseptörleri ailesidir ve plazma zarında guanin nükleotidini bağlayan Gα, Gβ ve Gy alt birimleri ile etkileşim içindedir. G proteinleri, guanozin trifosfat (GTP) ve guanozin difosfat (GDP) nükleotidlerini bağlama yeteneğine sahip özel proteinlerdir. GPCR sinyal ağı inaktif iken GPCR, heterotrimerik G proteini kompleksine bağlı konumdadır.

Bu kompeks içinde yer alan Gα alt birimi de Gβ ve Gy alt birimlerine ve GDP'ye sıkıca bağlıdır. Bir ligand veya başka bir sinyal sinyal molekülü GPCR'ye bağlandığında , GPCR'de konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Aktif hale gelmiş olan GPCR reseptörü, Gα alt birimine bağlanır ve inaktif durumda Gα alt birimine bağlı olan GDP ayrılır ve yerine GTP bağlanır. Bu esnada Gα ve Gβγ dimeri arasındaki etkileşimde sona erer (https://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471/, Erişim tarihi:15.08.2022).

Yu ve ekibi, GPCR'leri Hippo sinyal yolağının yukarı yöndeki düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Sfingosin-1-fosfat (S1P) ve lizofosfatidik asit (LPA) YAP'nin küçük moleküllü aktivatörleridir (Miller ve ark., 2012). GPCR, LPA ve S1P tarafından aktive edildikten sonra G-proteinleri (Gα12/13, Gq/11 ve Gi/o) aracılığıyla LATS1/LATS2'yi inhibe ederek YAP/TAZ'yi aktive eder. Ayrıca LPA hücre çoğalmasını teşvik eder, hücre göçünü uyarır ve tümör metastazıyla ilişkilidir (van Corven ve ark., 1989; Shida ve ark., 2003). MCF10A ve HEK293A hücre hatlarında, YAP/TAZ'nin bastırılması, LPA'nın neden olduğu hücre göçü ve proliferasyonunu bloke eder. Bu veriler, YAP ve TAZ'nin LPA ile indüklenen gen ekspresyonu, hücre göçü ve proliferasyonu için gerekli olduğu sonucunu doğurur. Buna karşılık, Gs-bağlı reseptörlerin glukagon veya epinefrin tarafından uyarılması, Lats1/2 kinaz aktivitesini aktive ederek YAP fonksiyonunu inhibe eder. Bu nedenle, GPCR sinyali, G proteinlerine bağlı olarak Hippo yolağını aktive edebilir veya inhibe edebilir (Yu ve ark., 2012). Ayrıca GPCR'ler ve heterotrimerik G protein sinyalleri, Rho GTPazlar aracılığıyla da Hippo yolağının aktivitesini düzenler (Johnson ve Halder, 2013). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) , reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir. EGF reseptörü, PI3-kinaz (PI3K) ve fosfoinositide bağımlı kinaz (PDK1) aktivasyonu yoluyla AKT aktivitesinden bağımsız olarak Hippo yolağını inhibe eder. EGFR'nin yanı sıra serum ve LPA varlığı, Lats'nin inaktivasyonuna, YAP'nin fosforilasyonuna ve YAP nükleer birikimine ve hedef gen CTGF'nin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar. Bu bulgular, mitojenik büyüme faktörleri tarafından Hippo sinyal yolağını inaktive edildiğini ortaya çıkarır (Fan ve ark., 2013).

4.3.5. Hippo sinyal yolağının aşağı yönünde yer alan hedef genler: CTGF ve PAI-1

4.3.5.1. CTGF

Kemik gelişimi sırasında yüksek oranda eksprese edilen bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF veya CCN2 olarak da bilinir), ilk olarak trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile ilgili bir büyüme faktörü olarak insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC'ler) izole edildi. Bu proteinin *in vitro* olarak fibroblast benzeri hücreler için hem mitojenik hem de kemotaktik etkisi olduğu bulunduğundan dolayı bu proteine "bağ dokusu büyüme faktörü" adı verildi (Bradham ve ark.,1991). CTGF geni, 6.kromozomun uzun kolunda (6q23.1) yer alır ve proteini insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP), von Willebrand faktör C tipi tekrarı (VWC), trombospondin tip-1 tekrarı (TSP1 veya TSR) ve sistein düğümü içeren karboksil alan (CT) olmak üzere 4 temel modülden oluşur. Her alan spesifik olarak çeşitli proteinler ile etkileşime girer ve bu etkileşimler, CTGF'nin hücre adezyonu, yara iyileşmesi, anjiyogenez, tümörigenez ve kondrojenez gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde çoklu sinyal yolaklarını ve düzenler (Arnott ve ark., 2012).

Bununla birlikte, CTGF, fibrotik hastalıklar, çeşitli kanserler ve inflamatuar hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, 30 tip insan kanseri, CTGF'nin düzensiz anormal ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kanser çalışmalarında CTGF'nin rolü, tümör gelişimi, tümör baskılanması ve her ikisi olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (Chen ve ark., 2020). CTGF, kanser hücresi proliferasyonu, göçünü, invazyonunu, metastazını ve EMT'yi destekleyerek tümör oluşumu ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Shen ve ark., 2021). CTGF ve bağlayıcı proteinleri TGFβ, EMT sürecinin ana başlatıcılarıdır ve meme kanseri gibi tümörlerde tümör progresyonuna katkıda bulunur. CTGF'nin tümör gelişimindeki diğer bir anahtar rolü de anjiyogenezdir. CTGF'nin yüksek ekspresyon seviyesi, integrin αvβ3 ile birlikte hareket ederek meme kanseri ve osteosarkomda anjiyogenezi arttırır (Chen ve ark., 2020). CTGF ekspresyonu, yumurtalık kanseri hücre dizilerinde normal yumurtalık hücrelerine kıyasla daha düşüktür. CTGF ekspresyonu, ileri aşamalarda (evre III ve IV) daha önceki aşamalardan (evre I ve II) daha yüksek bir ekspresyona sahiptir (Kikuchi ve ark.,2007). CTGF ekspresyonu, normal safra kesesi

dokusu ile karşılaştırıldığında, primer safra kesesi kanserinde daha yüksektir ancak ilerlemiş safra kesesi kanserinde CTGF ekspresyonu, normal safra kesesi epiteli seviyelerine indirgenir. Yüksek CTGF ekspresyonu, ilerlemiş safra kesesi kanserinde daha iyi bir hayatta kalma sonucu ile ilişkilidir (Alvarez ve ark., 2008). Bu nedenle, CTGF'nin tümör büyümesi ile pozitif veya negatif bir korelasyona sahip olup olmadığı, kanserin tipi ve evresi ile ilgilidir.

Apigen, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir. Apigenin'in TNBC hücrelerinde YAP/TAZ transkripsiyonel aktivitesini inhibe edip etmediğini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, Apigenin'in TNBC hücrelerinde YAP/TAZ aktivitesini ve dolayısıyla Hippo yolağının aşağı yönünde yer alan Cyr61 ve CTGF gibi hedef genlerin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Li ve ark., 2018). Yapılan bu çalışmalar, CTGF ve Hippo sinyal yolağı arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır.

4.3.5.2. PAI-1

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), serin proteinaz inhibitörleri (Serpin) süper ailesinin bir üyesidir. Serpinler, inhibitör ve inhibitör olmayan serpinler olmak üzere iki gruba ayrılır. PAI-1, inhibitör serpinler grubunda yer alır. PAI-1, normal kan pıhtılaşmasında önemli bir rol üstlenir. Bir yaralanmadan sonra pıhtılar, hasarlı kan damarlarını kapatarak ve daha fazla kan kaybını önleyerek vücudu korur. PAI-1, doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (u-PA) doğrudan fizyolojik inhibitörü ve fibrinolitik sistemin ana düzenleyicisidir (https://medlineplus.gov/genetics/gene/serpine1/#references, Erişim tarihi:06.08.2022 ve Yildiz ve ark., 2014). Plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1 (PAI-1) eksikliği, kan pıhtılarının çok erken parçalanması nedeniyle aşırı veya uzun süreli kanamaya neden olan nadir bir kanama bozukluğudur. Vücutta yeterli fonksiyonel PAI-1 olmadığında, vücudun kan pıhtılarını sağlam tutma yeteneği bozulur. PAI-1 eksikliğine Serpine-1 genindeki genetik değişiklikler sebep olur ve kalıtım tipik olarak otozomal resesiftir. Mevcut spesifik genetik değişiklikler, bir kişinin tam veya kısmi PAI-1 eksikliğine sahip olup olmadığını belirler. Tam PAI1 eksikliği olan kişiler bebeklik döneminde semptomlara sahip olabilirken kısmi PAI-1 eksikliği olanlar, bir yaralanma veya

ameliyattan sonra yaşamın ilerleyen zamanlarına kadar semptomlar göstermeyebilir. PAI-1 eksikliğinin belirtileri, bir yaralanmadan sonra veya tıbbi bir prosedüründen sonra aşırı veya uzun süreli kanama, yara iyileşmesinin gecikmesi, kolay morarma ve kadınlarda adet, hamilelik veya doğum sırasında aşırı kanama sayılabilir (https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/4381/plasminogen-activator-inhibitor-type-1-deficiency, Erişim tarihi:06.08.2022).

uPA'nın anjiyogenez, tümör invazyonu ve metastazdaki pro-tümorijenik rolü nedeniyle, PAI-1'in anti-tümörijenik bir fonksiyona sahip olması bekleniyordu fakat bazı çalışmalarda şaşırtıcı bir biçimde, kötü klinik sonuçlarla ilişkili olan ve kemoterapiye daha az yanıt veren tümörlerde yüksek düzeylerde PAI-1 bildirmiştir (Placencio ve DeClerck, 2015; Kubala ve DeClerck, 2019). Ayrıca kanser hücrelerinde PAI-1, EMT sırasında mezenkimal marker gen görevi görür. TNBC hücreleri TGF-β ile muamele edildikten sonra EMT indüklenir ve bu hücreler PAI-1 üretir. TNBC'li 165 hastanın doku mikrodizisi kullanıldığında PAI-1 ekspresyonunun TNBC'li hastaların dokusunda anjiyogenez, nüks ve uzak metastaz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Literatüdeki bazı çalışmalar bu şekilde PAI-1'in, tümör progresyonu ve anjiyogenez ile ilişkili olduğunu ve yüksek PAI-1 ekspresyonunun meme kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğunun altını çizmektedir (Zhang ve ark., 2017; Xu ve ark., 2018). İnsan yüksek karaciğer metastazına sahip pankreas kanseri hücre dizisi SW1990'ı kullanarak PAI-1 gen transfeksiyonunun karaciğer metastazı ve mekanizması üzerindeki etkisini aydınlatmaya çalışılan bir çalışmada, PAI-1 transfekte edilmiş SW1990 (SW/PAI-1) hücre hattının süpernatanında, parental hücrelerden önemli ölçüde daha yüksek bir PAI-1 seviyesi gözlemlendi. Hücresel invazyon, ksenogreftte in vivo tümör oluşumu ve karaciğer metastazı, parental hücrelere kıyasla SW/PAI-1 hücrelerinde önemli ölçüde bastırılmıştır. Bu sonuçlar, PAI-1 gen transfeksiyonunun, anjiyogenezi modüle ederek pankreas kanserinin karaciğer metastazını önleme yeteneğine sahip olabileceğini düşündürür (Inoue ve ark., 2005).

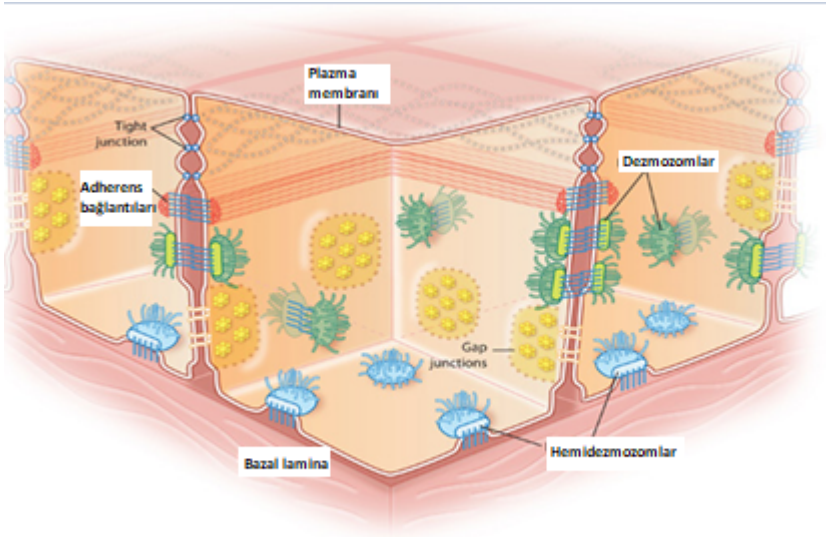
PAI-1 ayrıca YAP/TAZ'nin hedef genidir. (Liu ve ark., 2015). YAP, TEA domain transkripsiyon faktörü 4 (TEAD4) ile birlikte insan Sk-Hep1 ve murin Hepa1–6 murin karaciğer kanseri hücre dizilerinde PAI-1 ekspresyonunu transkripsiyonel olarak

düzenler. HCC dokusunda transkripsiyonel YAP aktivitesi, artan PAI-1 ekspresyonuyla ve potansiyel YAP hedef geni olan PAI-1'in aşırı ekspresyonu da HCC hastalarının kötü klinik sonuçlarıyla ile ilişkilidir. Ayrıca PAI-1 ve CTGF ve CYR61 gibi YAP'nin tipik aşağı yönünde yer alan hedef genleri arasında orta derecede fakat anlamlı bir ilişki gözlemlenmiştir (Marquard ve ark., 2020).

PAI-1 ekspresyonuna ilişkin ilk rapordan bu zamana kadar 30 yıldan fazla bir süre geçmiştir ve PAI-1'in pro-tümörijenik aktivitesini destekleyen kapsamlı bir literatür mevcuttur. Fakat literaratür de PAI-1'in metastaz üzerinde bir inhibitör etkisinin olduğu da öne sürülerek, yukarıda belirtilen çalışma örneğindeki gibi çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir (Kubala ve DeClerck, 2019).

4.4. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT)

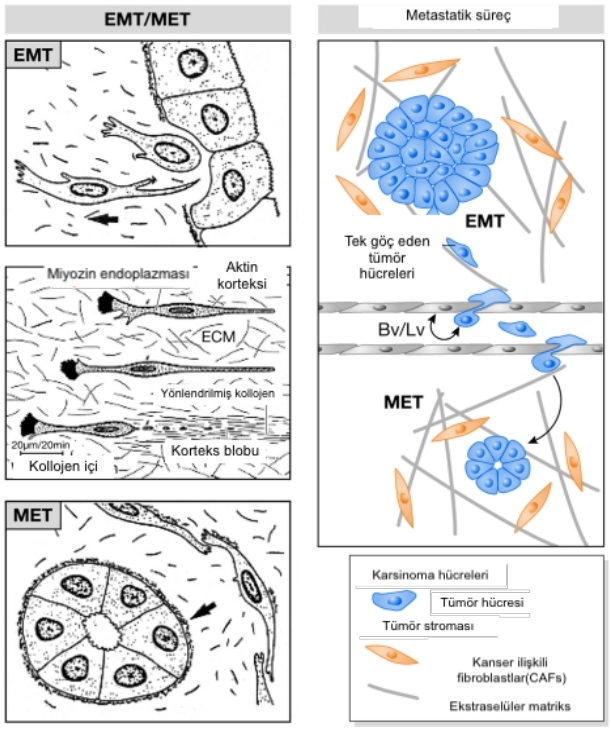
Epitel, hemen hemen tüm vücudu kaplayan, salgı bezlerinin işlevsel birimlerini oluşturan, kan ve lenf damarlarının iç yüzeyini kaplayan bir hücre tabakasıdır. Epitel hücreleri, hücre-hücre bağlantıları aracılığıyla bir arada tutulur. (http://medcell.med.yale.edu/lectures/epithelial_structure.php, Erişim tarihi: 25.08.2022). Hücreler arası bağlantılar, bitişik hücrelerin plazma membranları arasındaki özel temas bölgeleridir (Green, 1980) ve bu bağlantılar, çok hücreli organizmalarda hücrelerin ve dokuların polaritesini ve bütünlüğünü korumaya yardımcı olur (Green ve ark., 2010). Epitel hücreleri, hücre ve doku davranışını modüle etmek için plazma membranının altındaki kortikal hücre iskeletini organize eden yapışık bağlantılar (adherens juntions), epitel bariyerini oluşturmak için gerekli olan sıkı bağlantılar (tight juntions) ve hücreler arasında iyon, su ve diğer maddelerin taşınmasına izin veren komşu hücreler arası kanal kümelerinden oluşan boşluk bağlantıları (gap junctions) gibi aktin ve hücre iskeleti ile doğrudan ilişkili olan birçok hücre bağlantı yapıları aracılığıyla sıkı bir şekilde birbirine bağlanırlar (Christofori ve Semb,1999 ; Green ve ark., 2010).



Şekil 13:Farklı hücre bağlantı tiplerine ait şematik çizim. Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (tight juntions) (mavi noktalar), hücreleri birbirine bağlayan plazma membranının bağlantı alanlarıdır. Adherens bağlantıları (kırmızı noktalar) komşu hücrelerin aktin filamentlerini birleştirir. Dezmozomlar, komşu hücrelerin ara filamentlerini birleştiren daha da güçlü bağlantılardır. Hemidesmozomlar (açık mavi alanlar), bir hücrenin ara filamentlerini, diğer hücre yüzeylerindeki hücre dışı moleküllerin bir kombinasyonu olan bazal laminaya bağlar. Boşluk bağlantıları (gap junctions) (sarı alanlar), hücreler arasında su içerikli bağlantı tünelleri oluşturan kanal kümeleridir (https://www.nature.com/scitable/content/the-different-types-of-cell-junctions-14714296/, Erişim tarihi:29.07.2022, web sitesinden değiştirilerek kullanılmıştır).

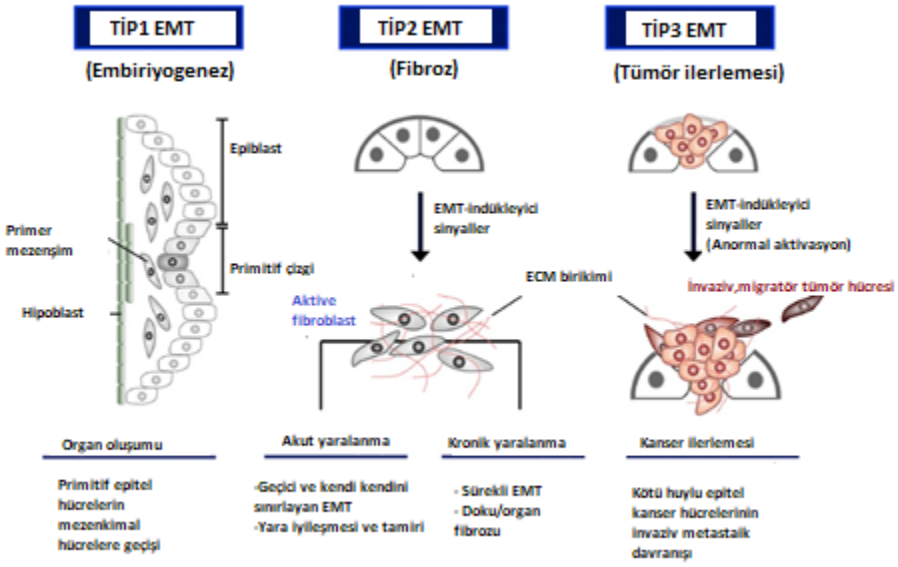
Aksine mezenkimal hücreler, düzenli bir hücre tabakası veya özel intraselüler adezyon kompleksleri oluşturmazlar ve şekil olarak epitel hücrelerine göre uzamış bir görünümdedir (Lee ve Nelson, 2012). Bu topolojiye paralel olarak, mezenkimal göç, epitelyal hareketten mekanik olarak farklıdır. Epitel hücreleri bir blok halinde hareket ederken, mezenkimal hücre göçü önemli ölçüde daha dinamiktir (Lee ve ark., 2006). Hücrelerin epitel ve mezenkimal hücre tipleri arasındaki geçişine ilişkisine dair ilk çalışmalar, embriyogenez bağlamında yapılmıştır (Owusu-Akyaw ve ark., 2019). Elizabeth Hay, civciv embriyolarında gerçekleştirdiği çalışmada, epitel hücrelerin, epitelyal özelliklerini baskılayabileceğini ve mezenkimal özellikler kazanabileceğini ortaya çıkararak, bu süreci "epitel-mezenkimal dönüşüm" olarak tanımladı (Hay,1995). Zaman içerisinde, "dönüşüm" terimi, bu sürecin tersine çevrilebilirliğinden ve neoplastik dönüşümden farkını ayırt etmek adına "geçiş" ile değiştirildi (Kalluri ve Weinberg, 2009). Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sırasında epitel hücreleri, hücre-hücre bağlantılarını ve apikal-bazal polaritelerini kaybederler, hücre iskeletlerini yeniden düzenlerler (Lamouille ve ark., 2014) ve bu sürece sitokeratin ve E-cadherin gibi epitelyal belirteçlerin kaybı ve fibronektin, N-kadherin,

VIMENTİN gibi mezenkimal belirteçlerin kazanımı eşlik eder (Ribatti ve ark., 2020). EMT, akciğer, prostat, pankreas, karaciğer ve meme kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde tümör oluşumunda görev alır (Ribatti ve ark., 2020). EMT'nin tersi bir süreç olarak adlandırılan mezenkimal-epitelyal geçiş (MET), gelişim, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin yeniden programlaması ve tümör metastazı sırasında belirgin rol oynar (Bakir ve ark., 2020).



Şekil 14: Kanserde epitelyal-mezenkimal geçiş için geçmişe ve günümüze dair perspektifler. Elizabeth Hay'ın, EMT sürecinin geçici doğasını ve mezenkimal hücrelerin epitel karaktere dönüşünü (MET) gösteren çizimleri. (Bv, kan damarları; ECM, hücre dışı matris; Lv, lenf damarları) (Hay,1995 ve Acloque ve ark., 2008'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Fizyolojik doku kaynağına bağlı olarak, EMT üç alt tipte sınıflandırılır. Tip 1 EMT, embriyogenez ve organ gelişiminde ortaya çıkar, tip 2 EMT, doku rejenerasyonu ve organ fibrozu için önemlidir ve tip 3 EMT, kanser progresyonu ve kanser kök hücre özellikleri ile ilişkilidir (Lamouille ve ark., 2014). Bu üç EMT sınıfı farklı biyolojik süreçleri temsil etse de, ortak bir uyaran seti, sinyal iletim yolları ve transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenebilir ve düzenlenebilir (Lee ve Nelson, 2012). İlerleyen çalışmalar ile, bu üç EMT sınıfı arasındaki benzerlikler ve farklılıklar üzerine oluşan soru işaretleri daha iyi aydınlatılacaktır (Kalluri ve Weinberg, 2009).



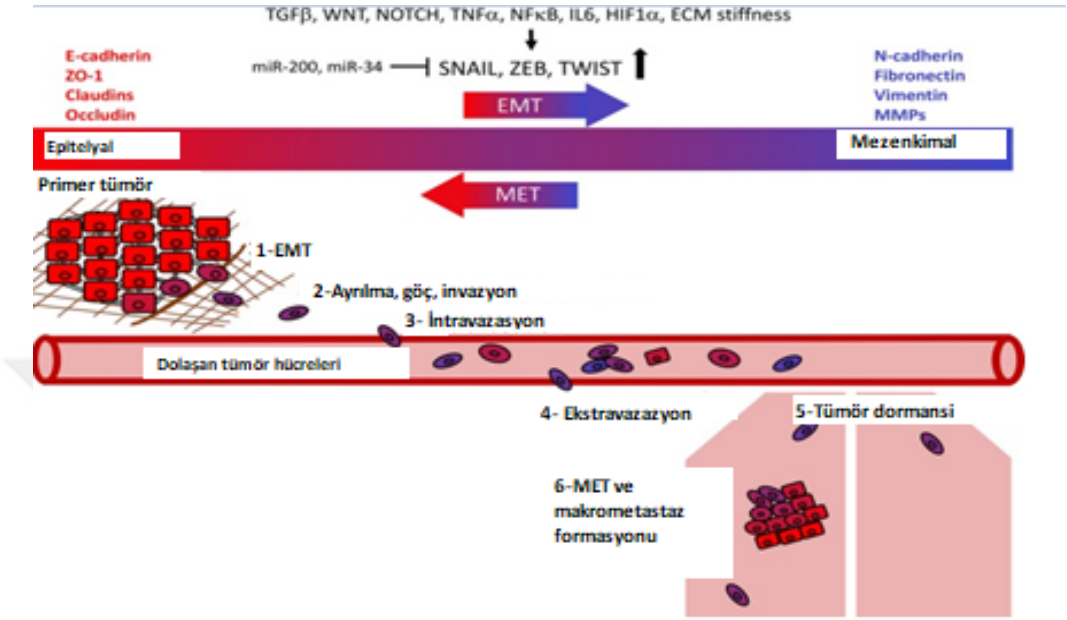
Şekil 15:Farklı EMT tiplerine ait şematik çizim. Tip 1 EMT gastrulasyon ve mezoderm, endoderm ve nöral krest oluşumu ile ilişkilidir. Tip 2 EMT, fibroblast üretmek için doku onarımının bir parçası olarak başlar. Tip 2 EMT, inflamasyon hakareti azalmazsa etkilenen bir organı yok edebilir. Tip 3 EMT, epitelyal kanser hücrelerinde meydana gelir, artan invazivlik ve göç ile sonuçlanmak üzere EMT proteomuyla birleşen onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri etkiler (Lee ve Nelson, 2012'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.4.1. Kanser ve EMT ilişkisi: Tip 3 EMT

4.4.1.1 Kanser metastazı ve EMT

Metastaz, kelime manasıyla "durgunluğun ötesinde" anlamına gelir. Kanser metastazı, kanser morbidite ve mortalitesinin başlıca nedenidir ve kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ından sorumludur. Kanser hücreleri, metastaz kaskadı ile birlikte, primer tümörün bulunduğu bölgeden vücuttaki uzak anatomik bölgelere yayılır. Bu süreçte, primer tümörlerdeki epitel hücreleri EMT'ye uğrar ve mezenkimal özellikler kazanır (Saxena ve Christofori, 2013). EMT ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, epitel bağlantı proteinlerini kodlayan genlerin baskılanmasına yol açar. Böylece yapışık bağlantılar, dezmozomlar ve sıkı bağlantılar parçalarına ayrılır ve apikal-bazal polarite kaybı teşvik edilir. Neticede, kanser hücreleri göçmen ve invaziv bir fenotip elde eder (Cominetti ve ark., 2019). Bu sayede primer tümör bölgesinden ayrılan kanser hücreleri, yakındaki kan ve lenf damarlarının içine girer (intravazasyon), dolaşım yoluyla yayılır ve daha sonra uzak bir organa ekstravazasyon yapar.

Ayrıca mikroçevresel sinyaller ikincil mikrometastazlar oluşturmak için mezenkimal-epitelyal geçişi (MET) indükler ve kanser hücreleri makroskopik lezyonlar oluşturmak için çoğalır (Saxena ve Christofori, 2013).

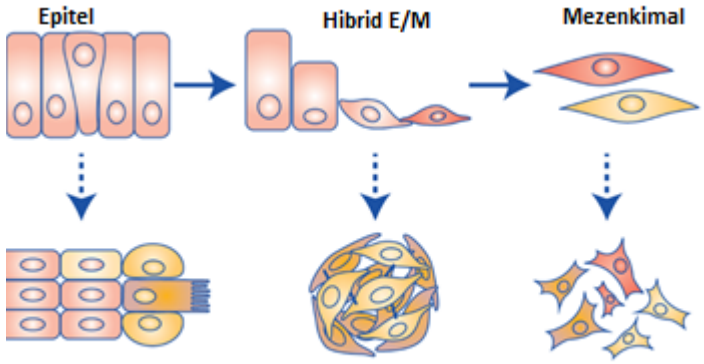


Şekil 16: Metastatik kaskad için EMT-MET modeline ait şematik çizim. Primer epitel kanser hücreleri, orijinal bölgeden ayrılma, çevredeki stromaya göç etme ve intravazasyon (kan damarına giriş) yeteneği kazanmak için EMT'ye uğrar. Az sayıda dolaşımdaki tümör hücreleri ve hücre kümeleri damar sisteminde hayatta kalır ve sonunda akciğer gibi uzak organlara ekstravazasyon (damardan organa geçiş) yapar. Yayılmış tümör hücreleri, çoğalmak ve makrometastazlar oluşturmak için mezenkimal-epitelyal geçişe (MET) geçmeden önce bir süre uykuda kalabilir. Karsinom hücreleri, MET yoluyla epitel durumuna geri döner (Yeung ve Yang, 2017'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.4.1.2. Hibrid/Kısmi/Ara EMT

Son zamanlarda, EMT, sadece epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere karşılıklı dönüşümü ile sınırlandırılmamıştır. Aksine, hibrit/ara/ kısmi EMT olarak adlandırılan E/M geçiş spektrumlarının dahil edildiği bir süreç aydınlatılmıştır ve EMT geçişine dair soruların cevaplandırılmasına katkıda bulunulmuştur (Sinha ve ark., 2020). Plastik, geçici bir durum olan hibrit EMT, hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçlerin birlikte eksprese edildiği, yüksek metastatik ve tümörijenik kapasiteye sahip olan ve kötü hasta prognozu ile ilişkili olan bir süreçtir (Sulaiman ve ark., 2018). Hibrit E/M durumu, farklı belirteçlerin kombinasyonuna dayalı olarak birden fazla evreye bölünebilir.

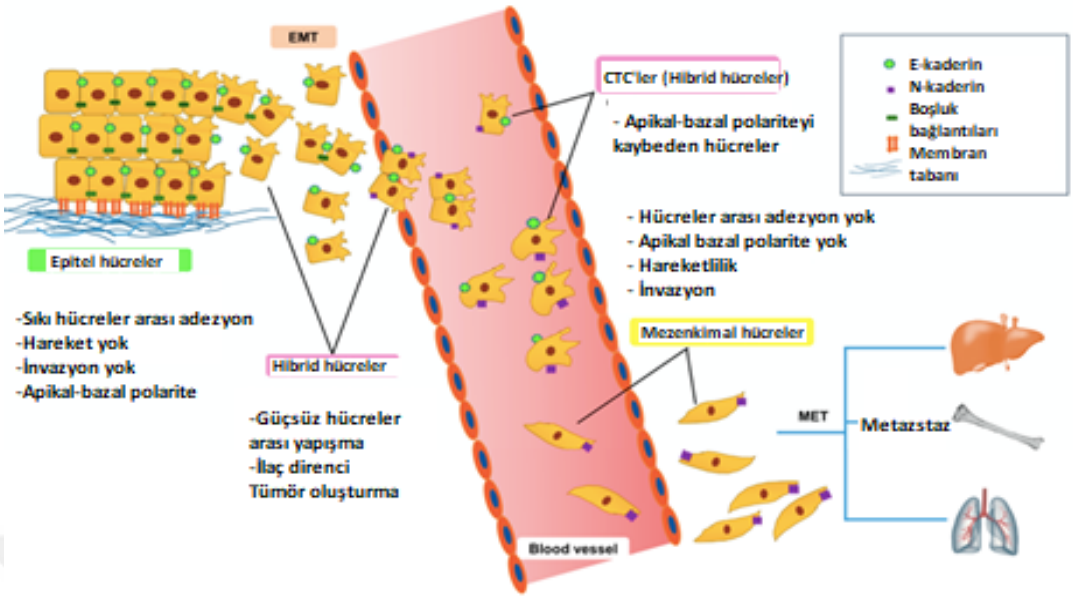
Tümör hücrelerinin spontan bir şekilde EMT'ye maruz kaldığı genetiği değiştirilmiş bir deri skuamöz hücreli karsinom modelinde, tümörler EPCAM+ epitelyal ve EPCAM- mezenkimal popülasyonları içerir. EpCAM- mezenkimal tümör hücrelerinde hibrit E/M durumu, CD106, CD61 ve CD51 yüzey belirteçlerinin ekspresyon modellerine göre erken ve geç hibrit E/M durumlarına bölünmüştür. EMT geçiren skuamöz hücreli karsinomların farklı tümör hücre popülasyonlarının transkripsiyonel profili, epitelyal durumu tanımlamak için kullanılan E-cadherin veya EPCAM gibi bazı belirteçlerin EMT'nin erken adımında kaybolurken, Krt14, Krt5 veya Krt8 gibi diğer epitelyal belirteçlerin hibrit durumlarda korunduğunu ve EMT'nin geç aşamalarında tamamen kaybolduğunu ortaya çıkardı. Benzer şekilde, mezenkimal belirteçler de farklı ekspresyon paternleri sergilediler. Cdh2, Vim, Snai1, TWIST1/2 ve Zeb1/2 EMT genleri ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyesi erken hibrit durumunda artarken daha mezenkimal popülasyonlarda aynı seviyede tutulur ve ayrıca Cdh11, Pdgfra, Pdgfrb, Fap, Loxl1, Col24a1, Mmp19 veya Prrx1 ekspresyonu EMT'nin geç aşamalarında artmıştır. Bu modelde, hibrit EMT popülasyonları, tümör epitel hücrelerine kıyasla tümör yayılımında beş kat artış göstermiştir. Ayrıca birkaç çalışma erken/geç hibrit EM durumunu ayırt etmek için farklı belirteçler de bildirmiştir.



Şekil 17: Hibrid EMT'ye dair şematik çizim. Üst sıra: EMT sırasında, epitel hücreleri sıkı hücreler arası bağlantılarını kaybeder, geçici bir hibrit E/M fenotipi oluşturur ve sonunda mezenkimal özellikler kazanırken epitel özelliklerini kaybeder. Bu süreç, gen transkripsiyon programlarındaki bir dizi değişiklik tarafından yönlendirilir. Alt sıra: Göç stratejileri, EMT ilerledikçe toplu göçten yüksek derecede plastisiteye sahip göçe, bireysel göçe geçer (Coban ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Bu veriler, EMT'nin sıralı bir şekilde gerçekleştiğini ve tümör hücrelerinin farklı ara durumlardan geçerek epitelyal durumdan mezenkimal duruma ilerlediğini göstermektedir. Bununla birlikte, bazı tümör epitel hücrelerinin doğrudan yüksek mezenkimal durumlara yol açması veya tümör mezenkimal hücrelerinin ara durumlardan geçmeden tümör epitel hücrelerine yol açması da mümkündür (Pastushenko ve ark., 2018; Pastushenko ve Blanpain, 2018; Liao ve Yang, 2020).

Hibrit E/M fenotipi meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser ile ilişkilendirilmiştir (Liao ve Yang, 2020). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomalı hastalarda tek hücreli transkriptomik analiz, kısmi EMT (pEMT) sergileyen hücrelerin primer tümörün ön kenarında uzamsal olarak lokalize olduğunu gösterdi (Puram ve ark., 2017). Ayrıca hibrit EMT fenotipine sahip hücreler, komşu hücrelerle hücre-hücre yapışmasını korur, apikal-bazal polarite kaybı sergiler, hareketlilikleri artar, mezenkimal özellikler kazanır ve böylece bir araya gelip birlikte hareket edebilirler (Pastushenko ve Blanpain, 2018). Bu hücre kümeleri kan dolaşımına bozulmadan ulaşırsa, toplu olarak göç edebilen dolaşımdaki tümör hücre kümelerini (CTC'ler) oluştururlar. Az sayıdaki CTC'ler en yüksek plastisiteye sahiptir, kanser kök hücre özelliklerine ve tümör başlatma kabiliyetine sahip olduğuna inanılır, yeni lezyonlar oluşturabilir ve tümör hastalarında ölümcüldür (Liao ve ark., 2021). Ayrıca CTC'lerin sayısı, hasta prognozunu ve tedavi etkinliğini gösteren bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir ve ilerlemiş kanserli hastalarda, hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçleri ifade eden yüksek bir CTC sıklığı kaydedilmiştir (Liao ve Yang, 2020). Hibrit EMT fenotipi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat, karaciğer, meme, kolorektal ve mide kanserleri olan hastaların kanındaki dolaşımdaki tümör hücre kümelerinde de tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, tamamen epitelyal veya mezenkimal fenotipten ziyade epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin birlikte ekspresyonu, bu kanserlerde kötü klinik prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar, pEMT fenotip hücrelerinin metastaz için uygun olabileceğini göstermektedir (Pastushenko ve Blanpain, 2018).



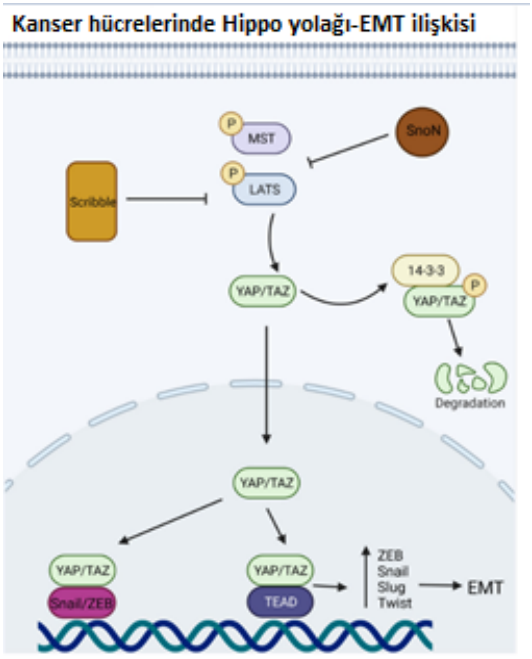
Şekil 18:EMT'nin diğer bir spekturumu olan hibrit EMT'ye dair şematik çizim. Farklı geçiş durumları sırasında epitelyal, mezenkimal ve E/M'ye özgü belirteçler ve özellikler şekilde belirtilmiştir. Epitelyal hücrelerin diğer komşu hücrelerle arasındaki yapışkan özelliğinin kaybı, bu hücrelerin EMT'ye maruz kalmasına izin verir ve dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) olarak kan dolaşımına salınırlar. CTC'lerin, mezenkimal formlarına dönüşebilen ve uzak bölgelerde MET yoluyla metastazı indükleyebilen hibrit E/M fenotipleri sergiler (Sinha ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.4.2. Hippo sinyal yolağı ve EMT

Hippo sinyal yolağı komponentleri, kolorektal, tiroid, meme, akciğer, pankreas, yumurtalık, mide ve beyin başta olmak üzere birçok kanser çeşidi EMT süreci ile ilişkilendirilmiştir. Tümör hücrelerinde, YAP/TAZ çekirdeğe girer ve EMT ile ilgili moleküllerin ekspresyonunu arttırır (Akrida ve ark., 2022).

TAZ, epitel tümör hücrelerinde SCRİBBLE ile bir kompleks oluşturur. SCRİBBLE, Mst1 /2, Lats1 / 2 ve TAZ'yi bir arada tutmak için iskele görevi görür. EMT, hücre polarite faktörü SCRİBBLE delokalizasyonuna yol açar ve TAZ aktivitesini indükler. TAZ seviyelerinin yükselmesi, kanser kök hücreleri ile ilişkili özellikleri teşvik eder (Cordenonsi ve ark., 2011). TEAD2'nin yüksek mRNA ekspresyonu ise EMT ve anjiyogenez ile ilgili genlerle güçlü bir şekilde ilişkilidir. TEAD ekspresyonunun bastırılması, TAZ'nin hücre proliferasyonunu teşvik etmesini ve EMT'yi indüklemesini engeller (Akrida ve ark., 2022).

Bu sonuçlar, kanser hücrelerinde YAP/TAZ-TEAD hedeflemenin EMT'nin metastatik yayılımı yavaşlatmasını veya engellemesini önleyebileceğini düşündürmektedir (Warren ve ark., 2018).



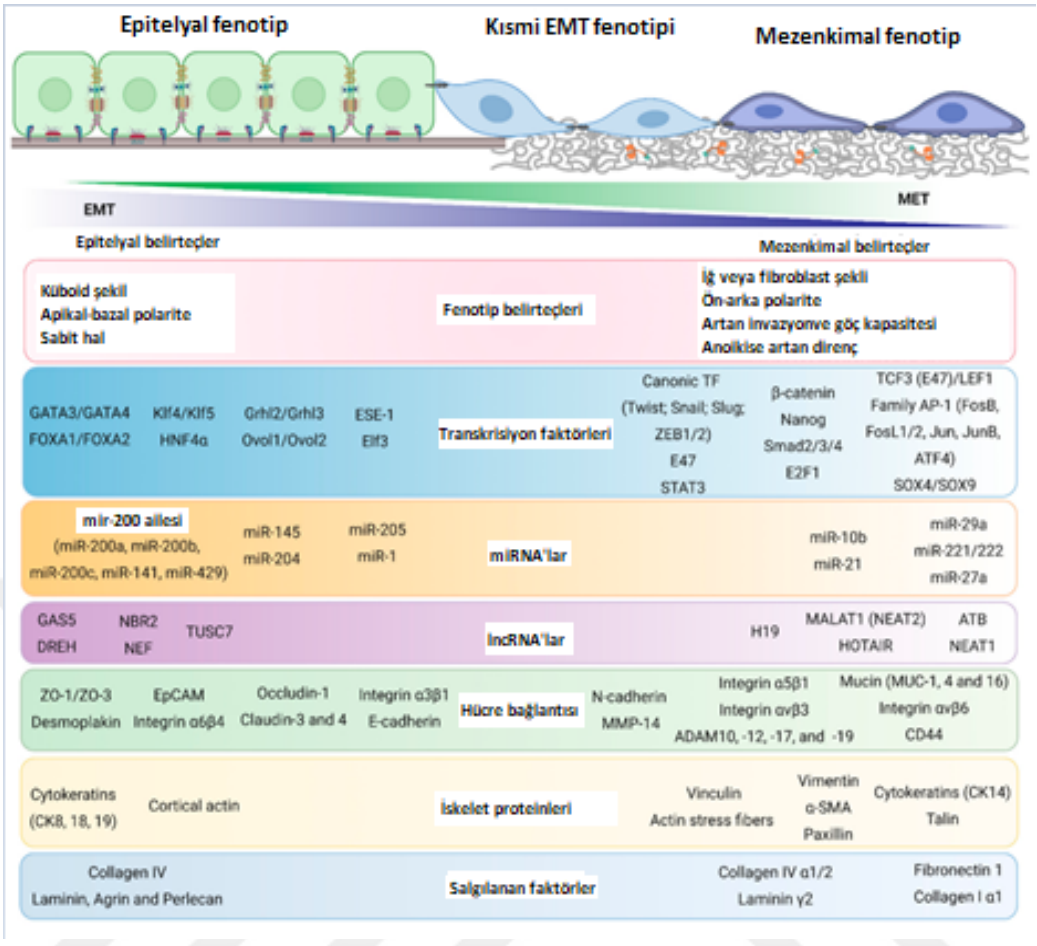
Şekil 19:Hippo sinyal yolağı ve EMT ilişkisine dair şematik çizim. Kanser hücrelerinde Hippo sinyal yolağı kapalı durumdadır. YAP/TAZ çekirdeğe girer ve EMT ile ilgili transkripsiyon faktörleri ile kompleksler oluşturur. EMT sırasında apikobazal polaritenin kaybı, SCRİBBLE 'nin zardan sitoplazmaya yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Ayrıca SnoN degredasyonu aşağı yönde regüle edilir .SnoN, LATS ve MST'ye bağlanma yeteneğine sahiptir ve böylece YAP/TAZ fosforilasyonunu inhibe eder (Akrida ve ark., 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.4.3. EMT belirteçleri

EMT tespitinde birçok biyobelirteç kullanılır. Bu belirteçler, hücre morfolojisi ve iskeletindeki meydana gelen birçok değişime işaret eder (Brown ve ark., 2022). Moleküler düzeyde EMT, epitelyal belirteçlerin (örneğin, sitokeratin 8, 18, 19, E-cadherin, okludinler) baskılanması ve mezenkimal belirteçlerin artışı (örneğin, VIMENTİN, N-cadherin) ile birlikte hücre-hücre adezyonu ve hücre polaritesinin kaybı ve göçmen ve invaziv özelliklerin kazanılması gibi birçok fenotipik değişiklikle sonuçlanır (Ribeiro ve Paredes, 2014). Morfolojik özelliklere ek olarak, transkripsiyon faktörleri gibi EMT veya MET'in gen düzenleyicileri, bir hücrenin epitelyal ve mezenkimal geçişler boyunca ilerlemesini tespit etmede yardımcı olur (Brown ve ark., 2022). EMT transkripsiyon faktörleri, birbirlerinin ekspresyonlarını kontrol eder ve

hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için diğer transkripsiyon faktörleri ile işbirliği yapar. Ayrıca sıklıkla epitelyal genler için baskılayıcı ve mezenkimal genler için aktivatör olarak işlev görür (Liao ve Yang, 2017). Snail1/Snail, Snail2/Slug, TWIST1 ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörleri, EMT'nin düzenlenmesinde rol oynar ve E-kadherin baskılayıcıları olarak nitelendirilirler (Ribatti ve ark., 2020; Brown ve ark., 2022). ESE-1, ELF3, GATA3/GATA4, FOXA1/FOXA2 ve KLF4 gibi transkripsiyon faktörleri ise epitel fenotipi destekler (Olea-Flores ve ark., 2020). Bu belirteçler, özellikle morfolojik özelliklerle eşleştirildiğinde özgünlük sağlar (Brown ve ark., 2022).

EMT, oncomiR'ler tarafından teşvik edilir veya tümör baskılayıcı miRNA'lar tarafından inhibe edilir. miR-122, MET sürecini tetikler, hücre iskeletinin bozulmasına neden olur, hücre adezyonunu arttırır ve kanser hücrelerinin göçünü ve invazyonunu engeller (Grzyva ve ark., 2020). miR-1, miR-145, miR-204 ve mir-205 de epitel durumunun korunmasına katkıda bulunur (Olea-Flores ve ark., 2020). Aksine, miR-9 ve miR-92a, E-cadherin'i kodlayan CDH1'e bağlanır ve miR-10a, EMT'yi düzenleyerek tümör hücresi göçünü ve invazyonunu destekler (Grzyva ve ark., 2020). Birkaç çalışma, lncRNA'ların, farklı EMT durumlarını modüle ettiğini ve EMT'nin baskılayıcıları veya destekleyicileri olarak sınıflandırılabileceğini göstermiştir. GAS5, DREH, TUSC7, NBR2 ve NEF de en çok çalışılan epitelyal lncRNA'lardır (Olea-Flores ve ark., 2020).



Şekil 20: Kanserde EMT'ye dair belirteçlere dair şematik çizim. ZO (zonula oklüdens), oklüdinler ve kaderinler gibi adezyon moleküllerinde değişiklikler meydana gelir; ayrıca Snail, TWIST1 ve Slug gibi belirli transkripsiyon faktörleri etkinleştirilir. Ek olarak, epigenetik olarak her fenotip, spesifik miRNA'lar ve IncRNA'lar tarafından düzenlenir. Bu mezenkimal belirteçler, tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Olea-Flores ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.4.3.1. Tez çalışmasında yer alan EMT belirteçleri

4.4.3.1.1. Epitelyal belirteç E-kaderin /CDH1

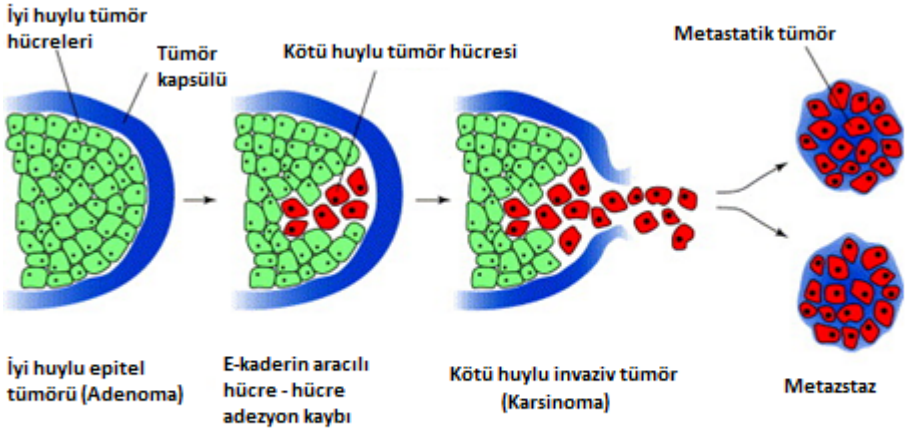
E-kaderin/ CDH1, 16. kromozomun uzun kolunun 22. pozisyonda konumlanan tümör baskılayıcı bir gendir. E-kaderin glikoproteininin sitoplazmik kuyruğu, p120, β-katenin ve α-katenin adı verilen bir dizi adaptör protein aracılığıyla hücre iskeleti filamentleri ile etkileşime girer. Bu yapı, hücrenin stabilitesini sağlar ve bireysel hücre hareketliliği de engeller (Shenoy ve ark., 2019). E-kaderin/katenin kompleksi sadece hücre-hücre adezyonunda görev almakla kalmaz, aynı zamanda hücresel sinyalleri ya

doğrudan ya da diğer kompleks bağlantıları yoluyla çekirdeğe ve hücre iskeletine iletir (Van Aken ve ark., 2011). Ayrıca bu kompleks, Hippo, Wnt, TGFβ, NF-κB gibi birçok sinyal yolakları ile de etkileşime girer (Mendonsa ve ark., 2018).

Hücre adezyonunda gerçekleşen değişiklikler, malign bir tümörün invazyon ve metastazının ana mekanizmasını oluşturur. Adezyon moleküllerindeki değişiklikler, tümör hücrelerinin adezyonunu azaltarak tümör infiltrasyonuna ve metastazına yardımcı olur. Bu sebeple hücre adezyonunun azalması tümör metastazına yol açan önemli bir faktör olarak karşımıza çıkar (Yang ve ark., 2018). Kalsiyum bağımlı hücre adezyon moleküllerinden biri olan N-kaderin normal meme epitelinde eksprese edilmez, ancak meme kanserinde E-kaderin ekspresyonunun kaybıyla birlikte sıklıkla artar. N-kaderin ve diğer mezenkimal kaderinlerin artışı tümör hücrelerin stromaya invazyonuna izin verir. Ayrıca E-kaderinin ekspresyonu ve işlevinden de bağımsız olarak N-kaderin, hücre göçünü ve metastazını destekler (Li ve Feng, 2011). N-kaderin transfekte edilmiş MCF7 meme kanseri hücreleri, bağışıklığı yetersiz farelerin meme yağ yastığına enjekte edildiğinde, tükürük bezi, akciğer, pankreas, karaciğer, lenf düğümleri ve lomber omurilik kasına yaygın olarak metastaz yapar. Hem E- hem de N-kaderin ekspresyonu, hem birincil tümörlerde hem de metastatik lezyonlarda korunur. Bu sonuçlar, N-kaderinin, E-kaderin varlığında bile hareketliliği, invazyonu ve metastazı desteklediğini göstermektedir (Hazan ve ark., 2000). Diğer bir kalsiyum bağımlı hücre adezyon molekülü olan E-kaderinin delesyonu veya deregülasyonu ise, kaderin-katenin kompleksinin bozulması nedeniyle tümörün infiltratif ve metastatik yeteneği ile ilişkilidir. Bu duruma, hücre adezyonunun kaybı ve buna paralel olarak hücre hareketliliğindeki artış eşlik eder (Corso ve ark., 2020). E-kaderinin hücre adezyondaki fonksiyonu, meme, cilt, karaciğer, böbrek, kolon, prostat, ve akciğer karsinomları dahil olmak üzere insan epitel kanserlerinin tümünün olmasa da çoğunun gelişimi sırasında sıklıkla kaybolur (Christofori ve Semb,1999).

E-kaderin baskılanması, bazal benzeri meme kanseri (BLBC) gurubunda, lüminal alt tip, Her2 aşırı eksprese eden ve normal meme benzeri gruplara kıyasla daha yüksektir. BLBC'de (genellikle TNBC olarak adlandırılır) ve invaziv lobüler karsinomların (ILC) çoğunda, histolojik derece ve lenf nodu metastazı, E-kaderinin düşük ekspresyonu ile doğrudan ilişkilidir (Ashaie ve Chowdhury,2016).

E-kaderin genindeki germline mutasyonlar ise kalıtsal yaygın mide kanseri (HDGC) ve lobüler meme kanserleri ile ilişkilendirilir (Zhao ve ark., 2021).



Şekil 21:E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyounun kaybedilmesi ile birlikte gelişen metastaza dair şematik çizim. E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyounun kaybedilmesi iyi huylu ve yayılmayan tümörlerden (adenom) kötü huylu, istilacı tümörlere (karsinom) geçişe katkıda bulunur (Christofori ve Semb,19992den değiştirilerek kullanılmıştır).

Düzensiz veya delokalize E-kaderin ekspresyonu, hücre-hücre adezyonunun kaybedildiği ve epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüştüğü EMT süreci için anahtar bir özelliktir ve bu nedenle E-kaderin kaybı birçok kanserde tanısal bir biyobelirteç olarak nitelendirilmektedir (Kao ve ark., 2016). TWIST(Yang ve ark., 2004), Zeb1 (Tilló ve ark.,2010), Slug (Bolós ve ark., 2003) ve Snail (Cano ve ark., 2010) de dahil birçok transkripsiyonel faktör, E-kaderin gen ekspresyonunun baskılanmasında rol alarak EMT'yi aktive eder ve hücrelerin mezenkimal bir fenotip elde etmesine yol açar.

E-kaderin ekspresyon kaybının tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazı teşvik edebildiği ve artan E-kaderin ekspresyonunun ise bu fenotipleri tersine çevirdiği kabul edilir (Mendonsa ve ark., 2018). Bununla birlikte yumurtalık kanseri, glioblastoma ve prostat gibi çeşitli invaziv ve metastatik kanserlerde yüksek düzeyde E-kaderin ekspresyonu görülmüştür ve bu sebeple, E-kaderinin, tümör ilerlemesini baskılamak yerine belirli tümörlerde metastazı desteklediği düşünülmektedir (Loh ve ark., 2019). Bunun aksine, yüksek E-kaderin seviyeleri de olumsuz tümör parametreleriyle ilişkilendirilmiştir (Burandt ve ark., 2021).

İnsan kanserlerinde E-kaderinin fonksiyonunu iyi anlamak için daha kapsamlı moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mezenkimal Belirteçler

4.4.3.1.2. VIMENTİN

Bu gen, tip III bir ara filament olan VIMENTİN proteinini kodlar ve mikrotübüller ve mikrofilamentler ile birlikte hücre iskeletini oluşturur (Danielsson ve ark., 2018). VIMENTİN, mezenkimal kökenli hücrelerde eksprese edilen bir proteindir (Steinert ve Roop.,1988). VIMENTİN, meme kanseri, gastrointestinal sistem kanserleri, papiller tiroid karsinomu, prostat kanseri, akciğer kanseri dahil olmak üzere birden fazla kanser türünde aşırı eksprese edilmiştir ve bu durum kanserin agresifliği ve kötü prognozu ile ilişkilendirilirmiştir (Satelli ve Li., 2012).

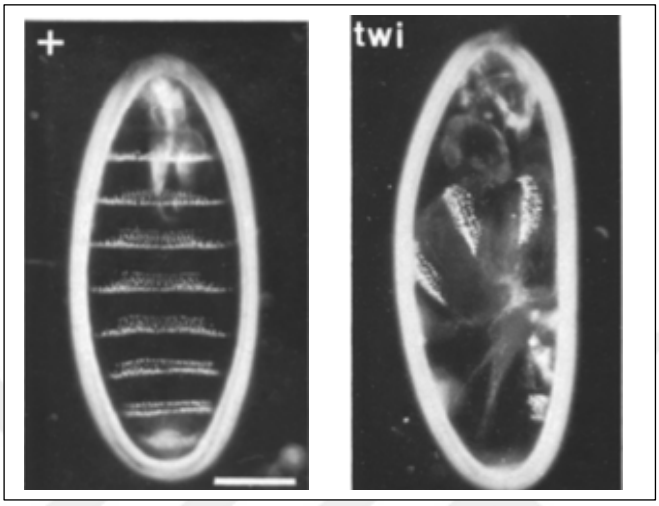
MCF-7 gibi birçok agresif meme kanseri hücre hattı, VIMENTİN eksprese eder ve VIMENTİN aşırı ekspresyonu meme kanseri hücrelerinin artan migrasyonu ve invazyonu ile koreledir (Neve ve ark., 2006 ; Korsching ve ark., 2005). Özellikle, VIMENTİN ekspresyonu, kötü prognozla ilişkili üçlü negatif (ER, PR ve HER2-negatif) tümör tipini temsil eden bazal benzeri meme kanseri hücrelerinin bir belirteci olarak tanımlanmıştır (Neve ve ark., 2006). Akciğer kanserinde VIMENTİN ekspresyonu tümör farklılaşmasının ve invazyonunun bir belirtecidir. 295 küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hastasının 145'inde (%49.2) aşırı VIMENTİN ekpresyonu saptanmıştır. Ayrıca 193 hastanın VIMENTİN ekspresyonunu (tümör hücrelerinin >%50'si) metastaz oluşumu ile yüksek oranda koreledir (Dauphin ve ark., 2013). 1.969 kolorektal kanseri hastasının meta-analizinde, yüksek VIMENTİN ekspresyonunun daha düşük hastalıksız sağkalım, daha kısa genel sağkalım ve daha şiddetli lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu öngörürülmüştür.VIMENTİN, kolorektal kanseri hastalarında sağkalım tahmini için umut verici bir biyobelirteç ve tedavi stratejileri için potansiyel bir hedef olabilir (Du ve ark., 2018). EMT sürecinde mezenkimal bir belirteç olan VIMENTİN upregülasyonu, epitel hücrelerinde morfolojik ve fonksiyonel mezenkimal hücre özelliklerinin kazanılmasını teşvik eder ve hücresel yapıyı invaziv ve göçebe bir fenotipe doğru yönlendirir (Majer ve ark., 2016). Hücreler EMT sürecinden geçtiğinde, hücre iskeletleri yeniden düzenlenir ve

bu duruma VIMENTİN aşırı ekspresyonu ve hücre hareketliğindeki artış eşlik etmektedir. Fakat VIMENTİN'in EMT ile ilişkili kanser progresyonuna nasıl bir katkıda bulunduğu hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Hem mekanik hem de tümörijenik yaklaşımlar kullanarak VIMENTİN'in EMT progresyonundaki rolünü değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada,VIMENTİN'in EMT kanser hücrelerinde hücre iskeleti yapısına ve hücre kuvveti oluşumunun dengesine aracılık ederek, hücre içi mekanik homeostazı korumak için düzenleyici bir rol aldığı belirtilmiştir. VIMENTİN ekspreyonu siRNA ile bastırılan MDA-MB 231 hücre hattında, yara iyileşmesinin bozulur, hücre çoğalmasını azalır, yönsel göç kaybı ve büyük membran genişlemesi artar. VIMENTİN deplesyonu ayrıca hücre iskeletlerinin yeniden düzenlenmesine ve azalmış fokal yapışmalara neden olur, bu da azalmış hücre sertliği ve kasılma kuvveti nedeniyle mekanik mukavemetin bozulmasına sebebiyet verir. Ayrıca MCF7 hücrelerde VIMENTİN'in aşırı eksprese edilmesi, artan β1-integrin ve E-kadherin kaybı nedeniyle hücre sertliğini, yüksek hücre hareketliliğini, yönelimli göçü, ve EMT fenotiplerini arttırır. Sonuç olarak, VIMENTİN tarafından üretilen mekanik modülasyonlarla, EMT ile ilişkili kanser hücreleri, tümör mikro-ortamı tarafından oluşturulan çeşitli streslere direnmek için giderek daha fazla organize olur ve böylece malignitede artar. Ayrıca VIMENTİN artışı ile birlikte, diğer bir mezenkimal belirteç olan Slug ekspresyonu artar ve EMT ile ilişkili gen ekspresyonu, kanser malignitesini daha da teşvik etmek için daha da yükseltilmiş olur. Bu çalışma, EMT ile ilişkili kanser mekanotransdüksiyonu ve tümör malignitesinde VIMENTİN için yeni bir bakış açısı sunar (Liu ve ark., 2015).

4.4.3.1.3. TWIST1

TWIST1, ilk olarak Drosophila Melonogaster'de embriyonik morfogenezin temel bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Simpson, 1983). TWIST1 mutasyonlarını barındıran Drosophila embriyoları, düzgün bir şekilde gastrolasyon yapamadığı ve mezoderm üretemediği için embriyogenezin sonunda iç organlarından yoksun olduklarından dolayı ''bükülmüş'' bir görünüme sahip olurlar ve TWIST1 geni adını buradan alır (Şekil) (Nusslein-Volhard ve ark., 1984). TWIST1 geni, temel heliks-ilmek-heliks (bHLH) alanına sahip bir transkripsiyon faktörünü kodlar. bHLH transkripsiyon faktörleri ailesi, uzuv, kas, sinir, kalp ve göz gelişimi dahil olmak üzere

çok çeşitli gelişimsel süreçlerin kilit düzenleyicileridir (Cai ve Jabs, 2005). İnsanlarda TWIST1 mutasyonu hipertelorizm, pitoz, kraniyosinostoz ve kısa boy gibi belirtiler ile karakterize ve otozomal dominant geçişli bir hastalık olan Saethre-Chotzen sendromuna neden olur (Woods ve ark., 2009).



Şekil 22:Normal embriyo (sol) ve homozigot mutant Drosophila melanogaster embriyolarının kütikül preparatlarının karanlık alan fotoğrafları (Nusslein-Volhard ve ark., 1984'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Fare embriyosunun kranial mezenşimindeki TWIST fonksiyonunun kaybı, sefalik nöral tüpün kapanmamasına ve branial arkların malformasyonuna neden olur. Nöral krest hücreleri subektodermal göç yolundan sapar ve geç göç eden alt popülasyon, birinci ve ikinci branial arklara giden hücre akışını ayıran hücresiz bölgeye invaze olur. Hücre transplantasyonu çalışmaları, doğru lokalizasyonu sağlamak adına nöral krest hücrelerinin göçünü yönlendirmek için kraniyal mezenşimde ve ilk branial ark içindeki nöral krest hücrelerinde TWIST aktivitesinin gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, TWIST, fare embriyosunda, kraniyal nöral tüp morfogenezi sırasında uygun hücre göçü ve lokalizasyonu için gereklidir (Soo ve ark. 2002). Çeşitli türlerde TWIST, embriyonik gelişimin belirli aşamaları sırasında hücre hareketi, hücre göçü ve dokuların yeniden organizasyonunu teşvik etmede önemli bir rol oynar (Castanon ve Baylies, 2002).

Bu tür hücre göçü ve doku yeniden şekillenmesi gibi durumlar, tümör invazyonu ve metastazı sırasında da meydana gelir. 4T1 fare meme tümörü modelinde, TWIST ekspresyonunun bastırılması, 4T1 hücrelerinin meme bezinden akciğere metastaz

yapmasını engeller. MDCK böbrek epitel hücreleri yüksek düzeyde organize bir şekilde hücre-hücre yapışmasını ve hücre polaritesini korur ve bu hücrelerde TWIST'in ekspresyonu, hücre-hücre temaslarının kaybına ve hücrelerin yayılmasına yol açar. Bu epitel hücrelerinin parke taşı benzeri görünümü, iğ benzeri fibroblastik bir morfoloji ile yer değiştirir. Bu morfolojik değişiklik, EMT'nin ayırt edici özelliklerinden birini temsil etmektedir. EMT'nin moleküler değişikliklerinin bu hücrelerde meydana gelip gelmediğini belirlemek adına, E-cadherin, α-katenin, β-katenin ve γ-katenin gibi birkaç adherens bağlantı proteininin lokalizasyonu incelendiğinde, kontrol hücrelerindeki güçlü membran boyamalarına kıyasla, TWIST eksprese eden MDCK hücrelerinde dört proteinin de hücre zarından kaybolduğu görülür. Ayrıca EMT ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinen fibronektin, VIMENTİN, ve N-kadherin fibroblast belirteçlerinin ekspresyonu güçlü bir şekilde indüklenir. Dolayısıyla, TWIST eksprese eden MDCK hücrelerinde hem morfolojik hem de moleküler değişiklikler, bu hücrelerin EMT'ye maruz kaldığını gösterir. TWIST1'in MDCK hücrelerinde EMT'yi indükleme yeteneğine ,insan meme epitel hücrelerinde (HMEC'ler) de bakıldığında bu hücrelerde de EMT ile ilişkili aynı değişiklikler gözlemlendi. Birlikte ele alındığında, bu veriler TWIST'in normal epitel hücrelerinde EMT'yi ve buna bağlı göç davranışını indükleyebildiğini gösterir ve bu durum TWIST'in indüklediği EMT'nin invazyon ve metastaz fenotiplerine katkıda bulunabileceğini ima eder.

TWIST, SUM1315, MDA-MB 231 ve MDA-MB-435 gibi invaziv ve metastatik insan tümör hücre hatlarında eksprese edilir fakat MCF7 ve BT20 gibi metastatik olmayan tümör hücre hatları TWIST'i ekprese etmez. Klinik meme tümörü örneklerinde TWIST ekspresyonunun belirli patolojik fenotiplerle korele olup olmadığını incelemek amacıyla, invaziv duktal, invaziv lobüler ve karışık duktal/lobüler karsinom olmak üzere üç alt tipteki 57 invaziv insan meme tümöründen oluşan bir mikrodizi gen ekspresyonu verisi analiz edilmiştir. Duktal ve lobüler gruplarda TWIST ve E-cadherin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, lobüler grupta duktal gruba kıyasla önemli bir E-kadherin ekspresyonu kaybı vardır ve lobüler grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek seviyede TWIST ekspresyonu gözlenir. Aslında, invaziv lobüler karsinom, EMT geçirmiş hücrelerin birçok özelliğini gösterir (Yang ve ark., 2004).

Bu çalışmada da görüldüğü üzere, TWIST1'in kanserdeki en kritik patolojik işlevi, EMT'yi teşvik ederek tümör invazyonunu ve metastazını kolaylaştırmasıdır. Ayrıca birçok çalışma TWIST1'in invadopodia oluşumu, intravasküler migrasyon, ekstravazasyon ve vaskülojenik taklit (VM) oluşumu gibi tümör invazyonu ve metastazının diğer basamaklarıyla da ilgili olduğunu gösterir (Zhao ve ark., 2009).

TWIST1 meme kanseri hücrelerinde, doğrudan E-kadherin promotörüne bağlanarak promotör aktivitesini ve E-kadherin gen ekspresyonunu baskılar. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi, twist ekspresyonunun E-kadherin ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu gösterir (Vesuna ve ark., 2007).

Bmi1, kök hücrelerin kendi kendine yenilenmesini sağlayan ve insan kanserlerinde sıklıkla aşırı eksprese edilen bir polikomb grubu proteinidir. TWIST1, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında (HNSCC) , Bmi1 seviyesini doğrudan arttırır. TWIST1 ve Bmi1, E-kadherin ekspresyonunu baskılayarak hücrelerin tümör başlatma kabiliyetini ve EMT'ye yönelişini destekler (Yang ve ark., 2010).

TWIST aşırı ekspresyonu, Hippo sinyal yolağının upregülatörü olan PAR1'in ekspresyonunu arttırır ve PAR1, transkripsiyonel ortak aktivatör TAZ'yi aktive ederek meme kanserinde invazyon, göç ve kanser kök hücresi (CSC) benzeri özellikleri destekler. Ayrıca TAZ ekpresyonunun baskılanması, bağ dokusu büyüme faktörünün (CTGF) ekspresyonunu azaltır ve TWIST'in aracılık ettiği invaziv özellikleri bastırır (Şekil) (Wang ve ark., 2016).

TWIST1 ekspresyonu EMT'yi, invazivliği ve metastazı desteklemedeki rolleri nedeniyle kötü prognozlu bazal benzeri meme kanseri (BLBC) ile ilişkilidir (Xu ve ark., 2016). Bununla birlikte, TWIST1'in kanser başlangıcını ve progresyonunu düzenlediği kesin mekanik yollar büyük ölçüde bilinmemektedir fakat çalışmalar devam ettikçe, TWIST1'in spesifik rolleri ve kanser ilerleyişi sırasında sinyal yolaklarına katılımı daha iyi aydınlatılacaktır (Qin ve ark., 2011).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Hasta ve Kontrol Örnekleri

Bu çalışma, daha önce tamamlanmış olan ve danışmanlığını Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK'in yaptığı bir doktora projesinde (C-DRP-100216-0040, Etik Kurul: 09.2015.264) toplanmış olan meme kanseri RNA materyalleri kullanılarak gerçekleştirilen retrospektif bir çalışmadır. RNA materyalleri, 35-60 yaş aralığında 67 meme kanseri hastasının eşleştirilmiş sağlıklı ve primer kanser dokularından (13 bazal, 15 HER2, 20 luminal A ve 19 luminal B alt tiplerde) elde edilmiş olup, bu çalışmada High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanarak RNA'lardan cDNA sentezlendi ve AMPIGENE qPCR Green Mix Hi-ROX ve mRNA PCR setleri (Sentebiolab-Türkiye) kullanılarak RT- PCR (Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi. Elde edilen verilerle gerçekleştirilen istatistik analizlerle de NOS1AP ve diğer hedeflenen genlerin ekspresyon ve korelasyon analizleri değerlendirildi. Bu değerlendirme, meme kanserinde NOS1AP ve EMT süreci arasındaki ilişkiye ışık tutmaktadır.

Çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, anabilim dalı imkanları ve BAPKO bütçesi kullanılarak yapıldı. Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından, ''09.2020.355'' protokol kodu ile onaylandı.

5.2. Kullanılan Aletler

RT- PCR cihazı, Light Cycler 480 Roche (Almanya)

Etüv, Heraeus (Almanya)

Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (ABD)

Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® (Almanya)

Otoklav, All American (ABD)

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

Thermo-Isısal Döngü Cihazı (A.B.D)

Derin Dondurucu -20°C, Philco (Türkiye)

Derin Dondurucu -80°C, Thermo 702 (A.B.D.)

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

5.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

AMPIGENE qPCR Green Mix Hi-ROX

Ependorf Tüp 1.5 ml, Axygen (A.B.D.)

Ependorf Tüp 2.0 ml, Axygen (A.B.D.)

Falkon Tüp 50 ml, TPP (İsviçre)

Falkon Tüp 15 ml, TPP (İsviçre)

Deiyonize Su

Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lık) (Applied Biosystems, ABD)

NOS1AP PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

YAP1 PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

TAZ PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

TEAD2 PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

SCRİBBLE PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

CTGF PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

PAI1 PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

CDH1 PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

TWIST1 PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

VIMENTİN PCR primeri (Sentebiolab,Türkiye)

Çalışmada hedeflenen genlerin ekspresyonunun tayini için kullanılan primerler Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan primer dizileri

GEN İSMİ	FORWARD PRİMER	REVERS PRİMER
NOS1AP	AAATCCAAGAAGAAGAGCCAAGC	ATCTGCATTCTGCTGCGTGT
YAP1	GTTACCAACACTGGAGCAGG	GAGTGATAGGTGCCACTGTTAAG
TAZ	CCTGGGGTTAGGGTGCTACA	TTGTCCTGCGTTTTCTCCTGT
TEAD 2	AATTTCTTGCACAAGTTGCGG	GTTTGTCACCACCTGGAGGA
SCRIBBLE	ATACCCAGTGGAGGAGATCCG	TTGGAGATGAACACACCAGGC
CTGF	GAAGCTGACCTGGAAGAGAACA	GTGCAGCCAGAAAGCTCAAA
PAI1	CCTGGTTCTGCCCAAGTTCT	CGGTCATTCCCAGGTTCTCT
CDH1	AGCCTGTCGAAGCAGGATTG	AGCAAGAGCAGCAGAATCAGAAT
TWIST1	CATGTCCGCGTCCCACTA	TTCTCTGGAAACAATGACATCTAGG
VIMENTİN	CTAACCAACGACAAAGCCCG	AGCATCTCCTCCTGCAATTTCT
β-Actin	AGACCGCGTCCGCCC	TATCATCATCCATGGTGAGCTGG

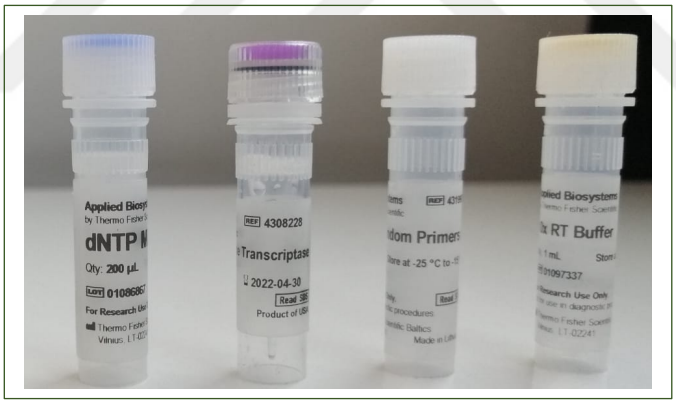
5.4. mRNA'lardan cDNA Sentezi

RT-PCR, çalışılması hedeflenen hücrelerden izole edilen RNA materyallerinin, retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin gerçekleştirilebildiği hassas ve hızlı bir yöntemdir (Okutucu ve Pehlivan,2003). mRNA'yı cDNA formuna çevirmenin amacı mRNA'yı daha dayanıklı cDNA sayesinde daha kolay ve ayrıntılı inceleyebilmektir. Bu tez çalışılmasında da sağlıklı ve meme kanseri dokularından izole edilmiş olan RNA'lar kalıp olarak kullanılarak, RNA'dan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanılarak yapıldı.

Sağlıklı ve meme kanseri hasta gruplarından elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon içeriği ve koşulları aşağıdaki gibidir. Tablo 4'de belirtilen bileşenler, sırasıyla (yüksek hacimli bileşenlerden düşük hacimli bileşenlere doğru) örnek adlarının etiketlendiği mikrotüplere belirtilen hacimlerde eklendi. Total hacmin 10 µl olduğu, her bir tüpün üzerine 10'ar µl total RNA ilave edilir.

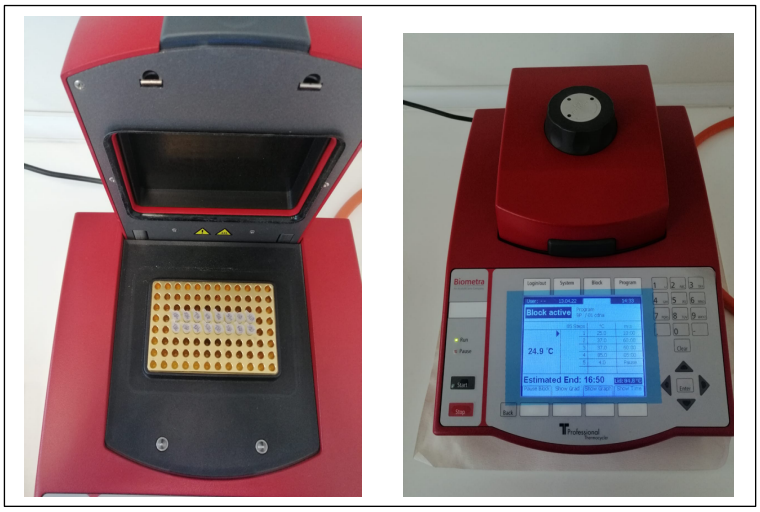
Tablo 4: cDNA sentezi için kullanılan 1x reaksiyon karışımı

Tüpe eklenme sırası	**Bileşen**	**1x**
1	Nuclease-free H_2O	4.2 µL
2	10X RT Random Primers	2.0 µL
3	10X RT Buffer	2.0 µL
4	MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0 µL
5	25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
	Toplam Hacim	10.0 µL



Resim 1:cDNA sentezi için gerekli bileşenler

Hazırlanan reaksiyon tüpleri ısısal döngü cihazına alınarak, Tablo 5 'de belirtilen döngü sırasıyla programlanmıştır. Sentezlenen cDNA örnekleri, RT- PCR deneylerine kadar -20^{O}C'de saklandı.



Resim 2:Isısal döngü cihazı

Tablo 5: cDNA sentezi için üretici firma tarafından ısısal döngü cihazına yönelik tavsiye edilen program ayarı

Ayarlar	**Adım 1**	**Adım 2**	**Adım 3**	**Adım 4**
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	Hold

5.5. RT-PCR

Hedeflenen genlerin ekspresyonlarını tespit etmek üzere, cDNA sentezinden sonra RT-PCR işlemi gerçekleştirildi. RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlamak üzere aşağıdaki adımlar uygulandı.

1- Tablo 6'da belirtilen sırayla, her bir gen için ayrı ayrı mikrotüplerde reaksiyon karışımı (9 µl) hazırlanır.
2- 96'lık plate'in her bir kuyucuğuna öncelikle 9 µl'lik karışım eklenir ve daha sonrasında bir önceki basamakta elde edilen cDNA (1 µl) ilave edilip plate Seal ile kapatılır.
3- 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
4- Roche LightCycler 480 II cihazına transfer edilen plate için aşağıdaki Tablo 7' de belirtilen program ayarlanır, kaydedilir ve başlatılır.

Tablo 6: qPCR reaksiyon bileşenleri

Tüpe eklenme sırası	**Bileşen**	**1x**
1	2X AMPIGENE qPCR SYBR Green Mix	5 µL
2	dH20	3.2 µL
3	Forward primer	0.4 µL
4	Revers primer	0.4 µL
5	cDNA	1 µL
	Toplam Hacim	10 µL

Tablo 7:qPCR sıcaklık döngüsü

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Pre- inkübasyon	95°C	2 dakika	1
Amplifikasyon	95°C 60 °C - 65°C	5 saniye 20-30 saniye	40
Erime eğrisi analizi			

RT- PCR, günümüzde gen ekspresyonu tayini için yaygın olarak kullanılan standart PCR tekniğinin bir varyasyonudur. PCR döngüsü sırasında her aşamada amplifiye edilmiş ürün miktarını ölçerek *kantifikasyon* yapmak mümkündür. Amplifiye edilmiş ürünün miktar tayini, termal döngü sırasında floresan problar veya floresan DNA bağlayıcı boyalar kullanılarak elde edilir (https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf, Erişim tarihi:19.09.2022). SYBR Green floresan boya kullanan Light Cycler RT-PCR, düşük miktarlarda mRNA moleküllerini tespit etmede hızlı ve hassas bir yöntemdir ve bu nedenle mRNA ekspresyon seviyesi hakkında önemli fizyolojik bilgiler sunar. SYBR Green floresan boyası, minör oluklu çift sarmallı DNA'ya bağlanarak, RT-PCR'da yeni sentezlenmiş PCR ürünlerini tespit etmeye yardımcı olur (Pfaffl, 2001). Ct veya eşik döngü değeri (threshold cycle), bir reaksiyon içinde üretilen floresansın floresan eşiğini geçtiği döngü sayısıdır ve bu noktada DNA amplifiye olmuştur (Günel, 2007). DNA miktarındaki artış ile birlikte RT-PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar.Ct seviyeleri numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır (yani, Ct seviyesi ne kadar düşükse numunedeki hedef nükleik asit miktarı o kadar fazladır (Schmittgen ve Livak,

2008). Çoğaltılan DNA'nın araştırılan hedef bölge olup olmadığını daha iyi anlamak için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin de yapılması fayda sağlayacaktır (Günel, 2007).

5.6. İstatiksel analiz

$2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta Ct yöntemi, qPCR gerçekleştirilen numunelerin relatif gen ekspresyonlarını hesaplamak için kullanılan bir formüldür. Yöntem, 2001 yılında Kenneth Livak ve Thomas Schmittgen tarafından geliştirildi. Bu tez çalışmasında da relatif gen ekspresyon verilerinin analizinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. Normalizasyon için, çalışılan hedef genin ekspresyon düzeyi, β-aktin housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi. Bu formülü uygulamak için öncelikle sağlıklı (kontrol) ve meme kanseri dokularında, hedeflenen 10 gen ile birlikte β-aktin genine ait Ct değerleri Microsoft Excel programına işlendi ve relatif gen ekspresyon analizi için aşağıdaki adımlar uygulandı.

1- ΔCt = Ct (hedef gen) – Ct (housekeeping gen)
2- $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (Tumor örneği) – ΔCt (Kontrol ortalama)
3- $2^{-\Delta\Delta CT}$

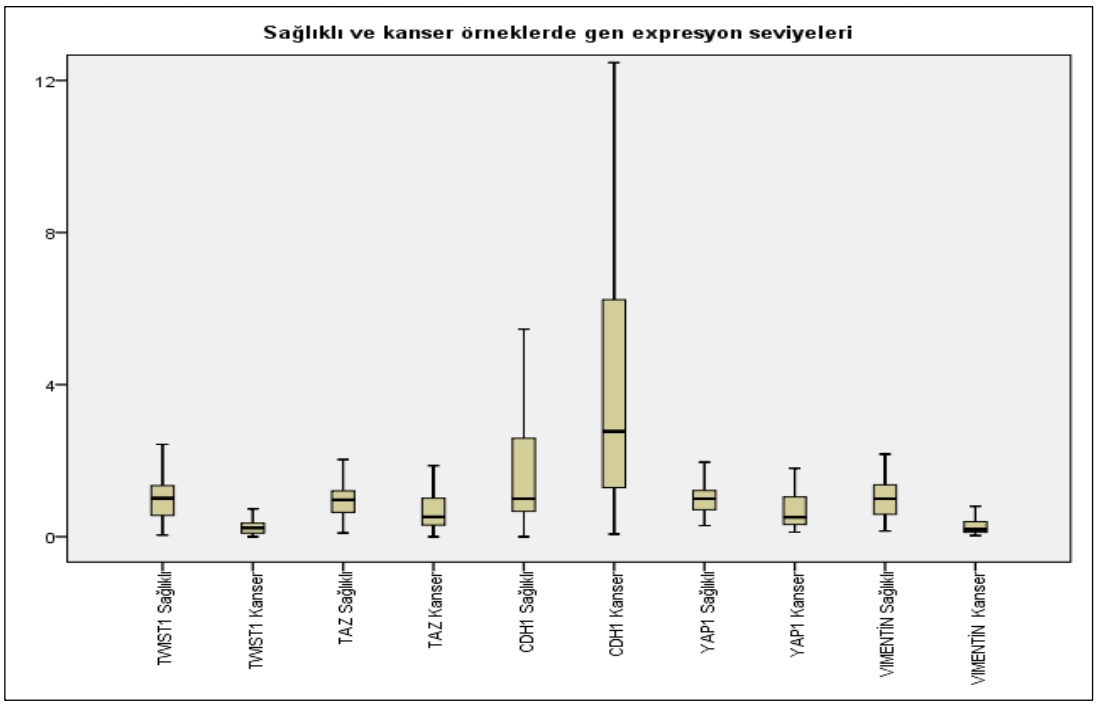
Bir önceki basamakta elde edilen değerler, SPSS 24.0 paket programına yerleştirilerek ekspresyon ve korelasyon analizleri gerçekleştirildi. Normal ve tümörlü doku karşılaştırmasını yapabilmek için öncelikle, verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Shapiro-Wilk testi sonucuna göre p değerinin 0,05'den küçük olması verilerin normal dağılmadığını gösteririr. Bu çalışmadaki gen ekspresyonları da normal dağılıma uygunluk göstermediği için, belirtilen iki dokudaki gen ekspresyon seviyelerini karşılaştırmada Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı**.** $p<0,05$ sahip değerler, iki grup arasındaki hedef gen ekspresyonunda istatiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiğine işaret eder. Tüm verilerin korelasyonlarının tespitinde ise Spearman korelasyon analizi kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. Ekspresyon Bulguları

6.1.1 Sağlıklı-Kanser gruplarda gen ekspresyon analizi

Meme kanseri dokuları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında, 10 gen içerisinden TWIST1, TAZ, CDH1, YAP1 ve VIMENTİN genlerinin ekspresyonlarında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Analizler neticesinde elde edilen medyan, standart sapma, çeyrekler açıklığı ve p değerleri Tablo 8'de belirtilmiştir. Bu bağlamda, medyan (ortanca) değerleri baz alınarak sağlıklı ve meme kanseri örneklerindeki ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde TWIST1 medyan değeri sağlıklı dokularda 1,01 iken tümörlü dokularda 0,23 olarak belirlendi. Bu veri, TWIST1 geninin tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda yaklaşık 4,4 kat daha yüksek eksprese olduğunu gösterir. Tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda TAZ yaklaşık 1,8 kat, YAP1 1,9 kat ve VIMENTİN 2,6 kat daha yüksek eksprese olur. Bu dört genden farklı olarak yalnız CDH1 tümörlü dokularda sağlıklı dokulara nispeten daha fazla eksprese olur (2,7 kat).



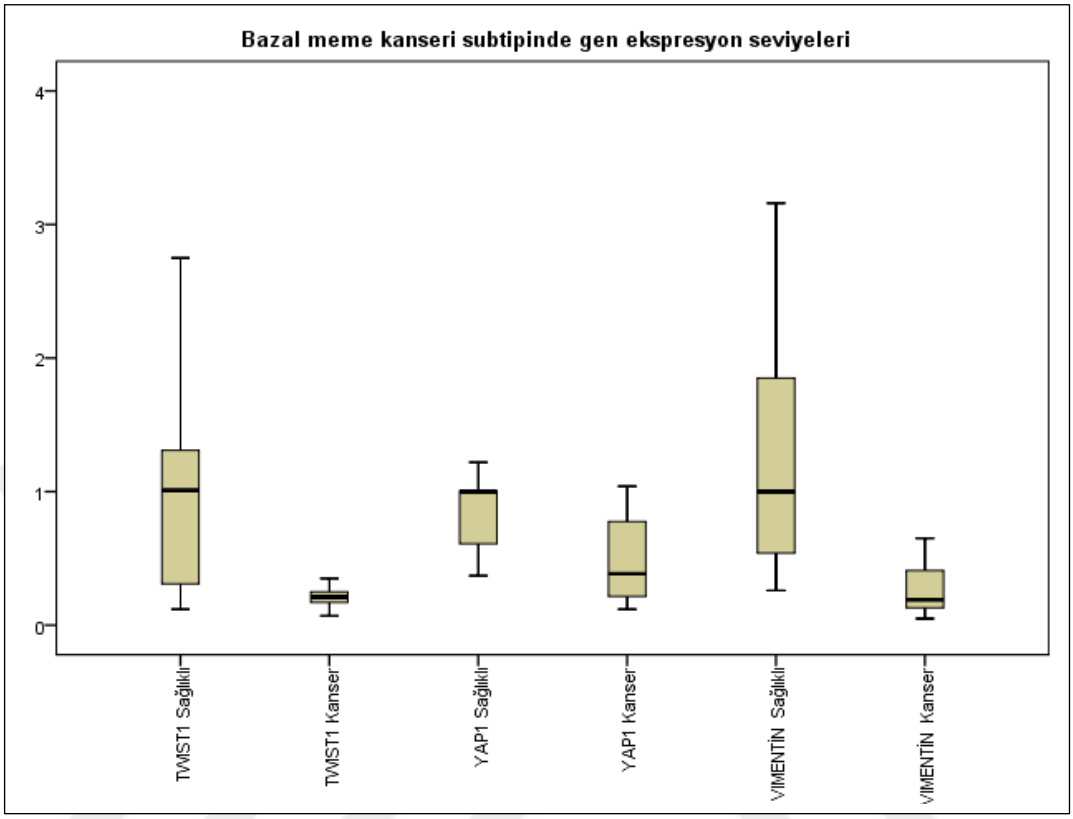
Şekil 23: Sağlıklı ve meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik (n=67).

Tablo 8: Şekil 23'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler

Gen ismi	Medyan	Standart sapma	Çeyrekler açıklığı	
TWIST1 Sağlıklı	1,01	2,24	0,80	p=0,0001
TWIST1 Kanser	0,23	0,33	0,27	
TAZ Sağlıklı	0,97	2,00	0,58	p=0,0001
TAZ Kanser	0,52	2,37	0,75	
CDH1 Sağlıklı	1,00	2,78	1,96	p=0,0001
CDH1 Kanser	2,77	5,35	5,14	
YAP1 Sağlıklı	1,00	0,95	0,51	p=0,0001
YAP1 Kanser	0,51	0,54	0,74	
VIMENTİN Sağlıklı	0,51	1,91	1,00	p=0,0001
VIMENTİN Kanser	0,19	0,33	0	

6.1.1.1. Bazal Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi

Bazal tümör dokuları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında TWIST1, YAP1 ve VIMENTİN genlerinin ekspresyonlarında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Analizler neticesinde elde edilen medyan, standart sapma, çeyrekler açıklığı ve p değerleri Tablo 9'da belirtilmiştir. Tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda TWIST1 yaklaşık 5,1 kat, YAP1 2.1 ve VIMENTİN 5,2 kat daha yüksek eksprese olur.



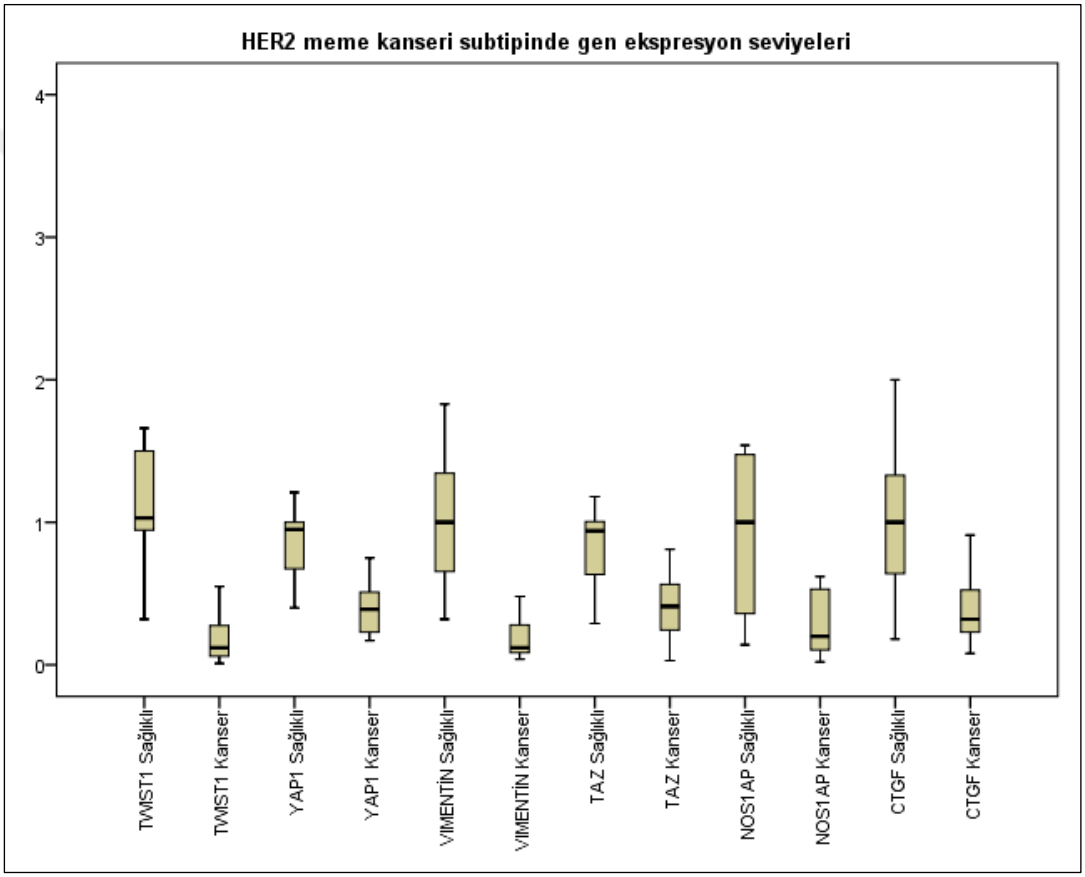
Şekil 24: Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik (n=13).

Tablo 9: Şekil 24'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler

Gen ismi	Medyan	Standart sapma	Çeyrekler açıklığı	
TWIST1 Sağlıklı	1,01	2,21	1,46	p=0,005
TWIST1 Kanser	0,21	0,09	0,11	
YAP1 Sağlıklı	1,00	0,83	0,51	p=0,019
YAP1 Kanser	0,46	0,47	0,67	
VIMENTİN Sağlıklı	1,00	0,87	1,00	p=0,013
VIMENTİN Kanser	0,19	0,52	0	

6.1.1.2. HER2 Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi

HER2 tümör dokuları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında TWIST1, YAP1, VIMENTİN, TAZ, NOS1AP ve CTGF gen ekspresyonlarıında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Analizler neticesinde elde edilen medyan, standart sapma, çeyrekler açıklığı ve p değerleri Tablo 10'da belirtilmiştir. Tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda TWIST1 yaklaşık 8,5 kat, YAP1 2,4 kat, VIMENTİN 8,3 kat, TAZ 2,3 kat , **NOS1AP 5 kat** ve CTGF 3,1 kat daha yüksek eksprese olur.



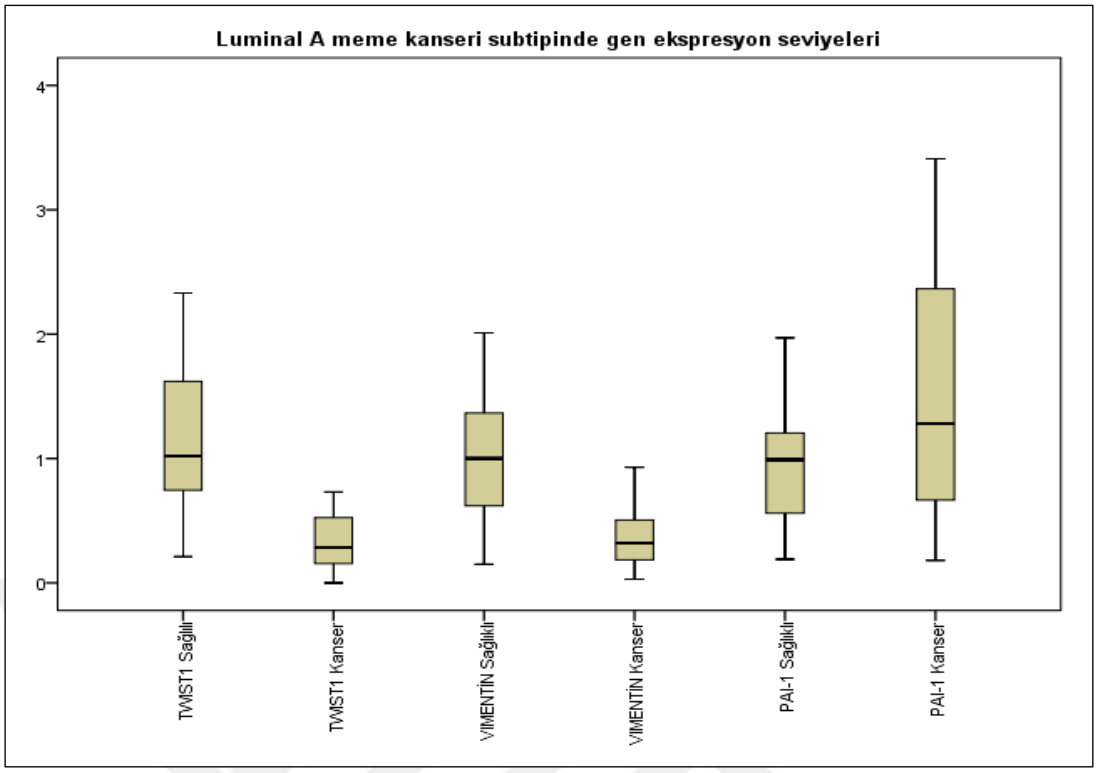
Şekil 25:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik (n=15)

Tablo 10: Şekil 25'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler

Gen ismi	Medyan	Standart sapma	Çeyrekler açıklığı	
TWIST1 Sağlıklı	1,03	0,93	0,75	p=0,001
TWIST1 Kanser	0,12	0,23	0,23	
YAP1 Sağlıklı	0,95	0,37	0,49	p=0,001
YAP1 Kanser	0,39	0,28	0,30	
VIMENTİN Sağlıklı	1,00	1,24	1	p=0,001
VIMENTİN Kanser	0,12	0,22	0	
TAZ Sağlıklı	0,94	0,56	0,42	p=0,011
TAZ Kanser	0,41	0,55	0,37	
NOS1AP Sağlıklı	1,00	1,33	1,21	p=0,017
NOS1AP Kanser	0,20	0,91	0,53	
CTGF Sağlıklı	1,00	3,22	0,88	p=0,041
CTGF Kanser	0,32	0,80	0,34	

6.1.1.3. Luminal A Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi

Luminal A tümör dokuları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında TWIST1,VIMENTİN ve PAI1 gen ekspresyonlarında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Analizler neticesinde elde edilen medyan, standart sapma, çeyrekler açıklığı ve p değerleri Tablo 11'de belirtilmiştir. Tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda TWIST1 yaklaşık 3,6 kat ve VIMENTİN 3,1 kat daha yüksek eksprese olur. Bu dört genden farklı olarak yalnız PAI1 tümörlü dokularda sağlıklı dokulara nispeten daha yüksek eksprese olur (1,3 kat).



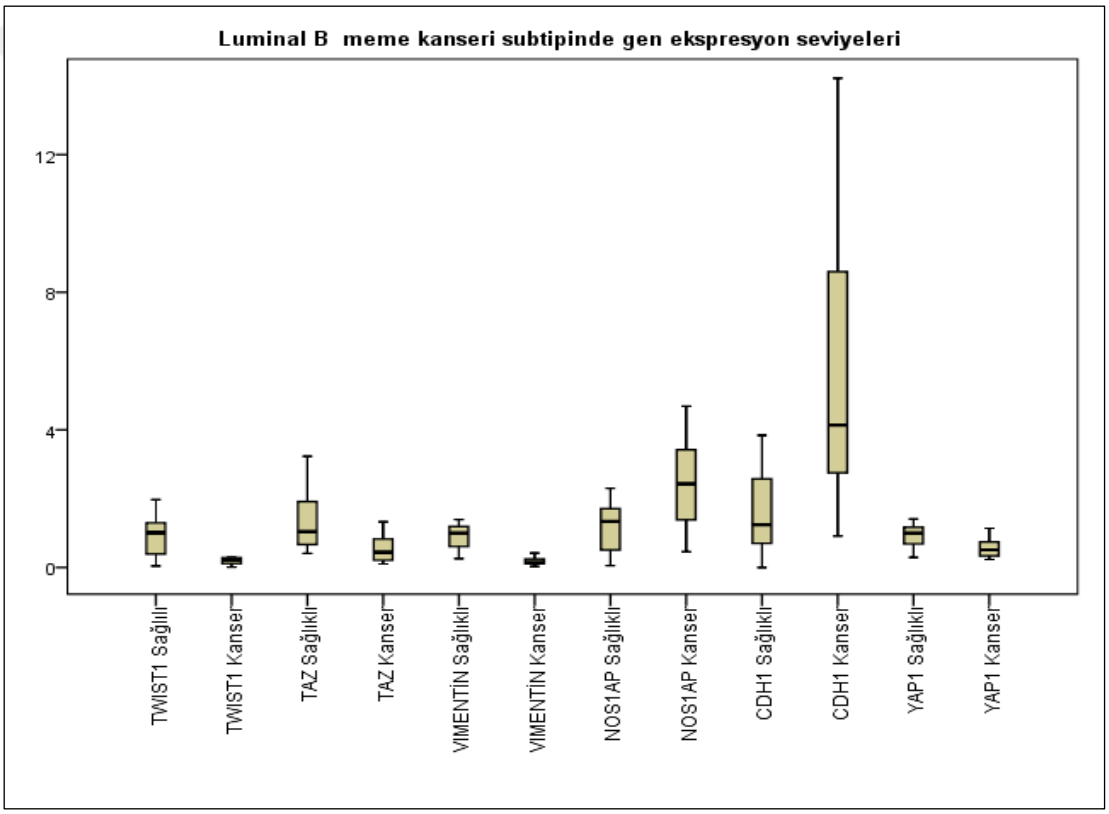
Şekil 26:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik (n=20).

Tablo 11:Şekil 26'da belirtilen grafiğe ait istatistik değerler

Gen ismi	Medyan	Standart sapma	Çeyrekler açıklığı	
TWIST1 Sağlıklı	1,02	0,91	1,05	p=0,001
TWIST1 Kanser	0,28	0,39	0,39	
VIMENTİN Sağlıklı	1,00	0,49	1,00	p=0,001
VIMENTİN Kanser	0,32	0,30	0	
PAI-1 Sağlıklı	0,99	2,62	0,65	p=0,037
PAI-1 Kanser	1,28	3,70	1,76	

6.1.1.4. Luminal B Alt tipde Gen Ekspresyon Analizi

Luminal B tümör dokuları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında TWIST1, TAZ, VIMENTİN, **NOS1AP**, CDH1 ve YAP1 gen ekspresyonlarında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Analizler neticesinde elde edilen medyan, standart sapma, çeyrekler açıklığı ve p değerleri Tablo 12'de belirtilmiştir. Tümörlü dokulara oranla sağlıklı dokularda TWIST1 yaklaşık 4,6 kat ,TAZ 2,4 kat, VIMENTİN 7,1 kat ve YAP1 1,9 kat daha yüksek eksprese olur. Bu dört genden farklı olarak tümörlü dokularda sağlıklı dokulara nispeten CDH1 3,3 kat ve **NOS1AP 1,8 kat daha yüksek** eksprese olur.



Şekil 27: Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri hasta örnekleri arasında anlamlı farklılık gösteren genlerin ekspresyon seviyelerine ait grafik (n=19).

Tablo 12: Şekil 27'de belirtilen grafiğe ait istatistik değerler

Gen ismi	Medyan	Standart sapma	Çeyrekler açıklığı	
TWIST1 Sağlıklı	1,01	3,66	0,95	p=0,002
TWIST1 Kanser	0,22	0,25	0,19	
TAZ Sağlıklı	1,04	3,09	1,42	p=0,001
TAZ Kanser	0,44	0,70	0,81	
VIMENTİN Sağlıklı	1,00	3,33	1,00	p=0,0001
VIMENTİN Kanser	0,14	0,26	0	
NOS1AP Sağlıklı	1,34	1,41	1,22	p=0,008
NOS1AP Kanser	2,43	2,41	2,39	
CDH1 Sağlıklı	1,24	1,42	2,00	p=0,0001
CDH1 Kanser	4,14	4,06	5,90	
YAP1 Sağlıklı	1,00	1,16	0,53	p=0,011
YAP1 Kanser	0,51	0,40	0,41	

Yukarıda meme tümör dokuları ve sağlıklı dokular arasındaki ekspresyon farklıkları incelendi. Bununla birlikte hangi genlerin hangi alt tiplerde, sağlıklı dokulara kıyasla ekspresyon farklılığı gösterdiğine dair açıklayıcı veriler Tablo 13'de belirtilmiştir.

Tablo 13:Sağlıklı dokulara kıyasla meme kanseri alt tiplerinde ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde farklılık gösteren genlerin belirtildiği tablo.

Gen ismi	Sağlıklı-Kanser (Total)	Sağlıklı-Bazal	Sağlıklı-HER2	Sağlıklı-Luminal A	Sağlıklı-Luminal B
TWIST1	TWIST1	TWIST1	TWIST1	TWIST1	TWIST1
VIMENTİN	VIMENTİN	VIMENTİN	VIMENTİN	VIMENTİN	VIMENTİN
YAP1	YAP1	YAP1	YAP1		YAP1
TAZ	TAZ		TAZ		TAZ
NOS1AP			NOS1AP		NOS1AP
CDH1	CDH1				CDH1
CTGF			CTGF		
PAI1				PAI1	
SCRİBBLE					
TEAD2					

6.2. Korelasyon Bulguları

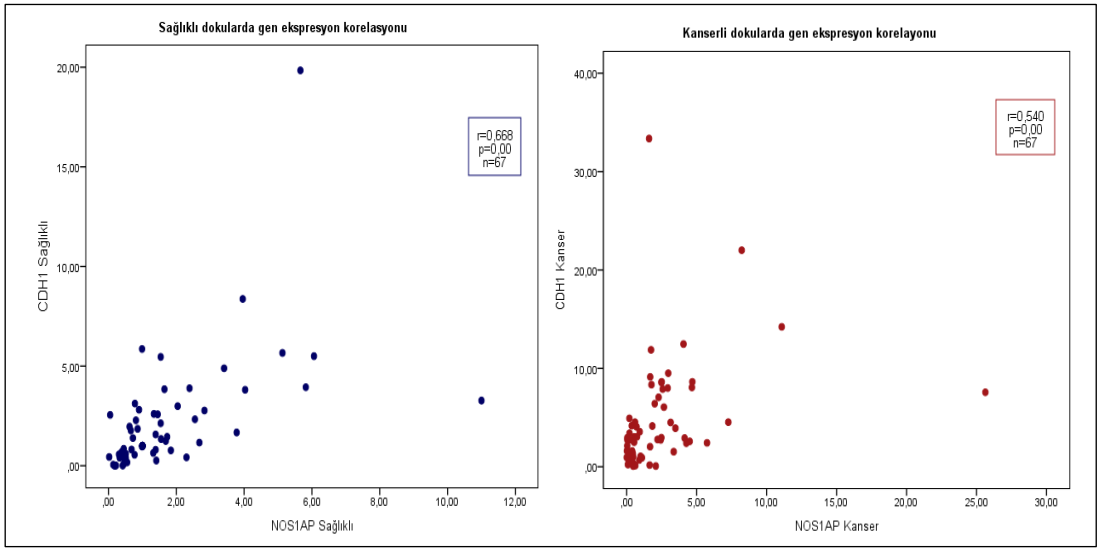
6.2.1. Sağlıklı-Kanser gruplarda korelasyon analizi

Bu tez kapsamında, meme kanserinde hedeflenen 10 genin birbirleri ile korelasyonu incelendi ve korelasyon katsayıları hesaplandı. Korelasyon analizi, aşağıda belirtilen korelasyon kat sayısı aralığına göre değerlendirildi.

Tablo 14:Spearman korelasyon kat sayısı (rs) aralığı (Upadhyay ve Shukla, 2020)

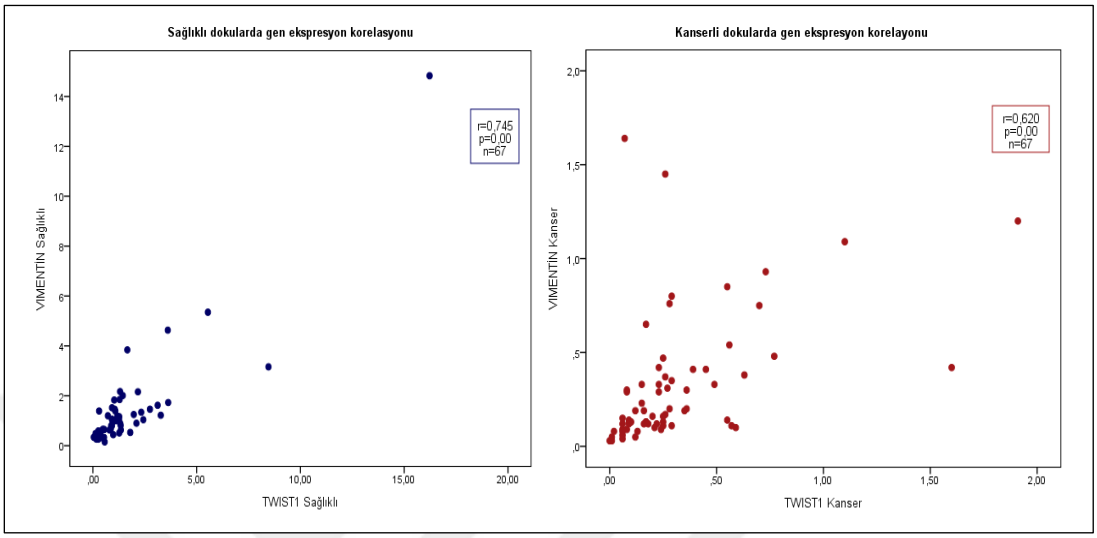
Korelasyon aralığı	İlişki düzeyi
± (0,01-0,19)	Çok zayıf
± (0,20-0,39)	Zayıf
± (0,40-0,59)	Orta
± (0,60-0,79)	Güçlü
± (0,80-1,00)	Çok Güçlü

Sağlıklı ve meme kanseri örnekleri karşılaştırıldığında, 10 gen içerisinden sadece NOS1AP-CDH1 ve TWIST1-VIMENTİN gen ekspresyonları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark ve korelasyon saptandı. Sağlıklı dokularda, NOS1AP-CDH1 genleri arasında gözlenen güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,668), kanser dokularında pozitif orta düzey ilişkiye (r=0,540) doğru zayıflamıştır.



Şekil 28: Sağlıklı ve meme kanseri dokularında NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,668) ve sağdaki grafik ise meme kanseri dokularında (r=0,540) NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=67).

Sağlıklı dokularda, TWIST1-VIMENTİN genleri arasında gözlenen güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,740), kanser dokularında (r=0,620) sağlıklı dokulara nispeten zayıflamıştır fakat yine de iki gen arasında güçlü korelasyon gözlemlenmektedir.

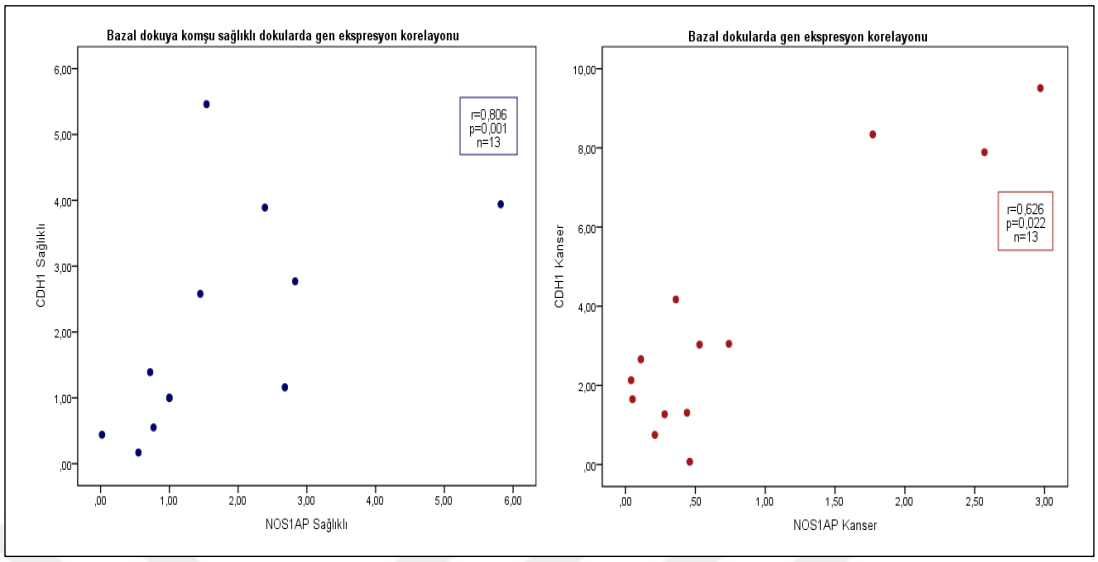


Şekil 29:Sağlıklı ve meme kanseri dokularında TWIST1-VIMENTİN gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,745) ve sağdaki grafik ise meme kanseri dokularında (r=0,620) NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=67).

6.2.2. NOS1AP grafikleri

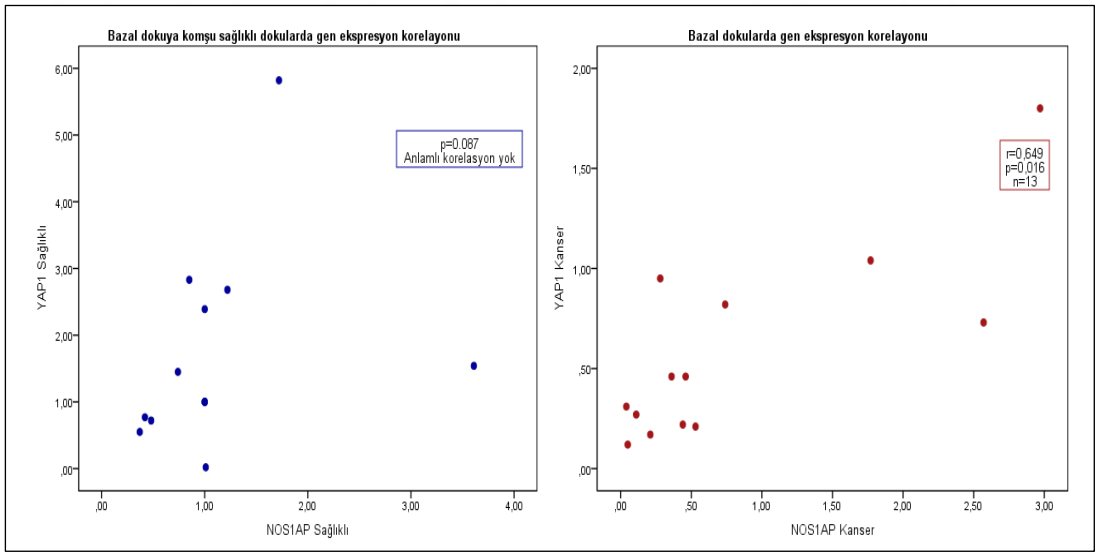
6.2.2.1. Sağlıklı- Bazal alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Bu tez çalışmasında NOS1AP genine odaklanılmaktadır. Bu bağlamda NOS1AP ile korelasyon gösteren genlere ait grafikler ve açıklayıcı şemalar aşağıda belirtilmektedir. Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-CDH1** genleri arasında gözlenen çok güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,806), bazal alt tip meme kanseri dokularında pozitif orta düzey ilişkiye (r=0,626) doğru zayıflamıştır.



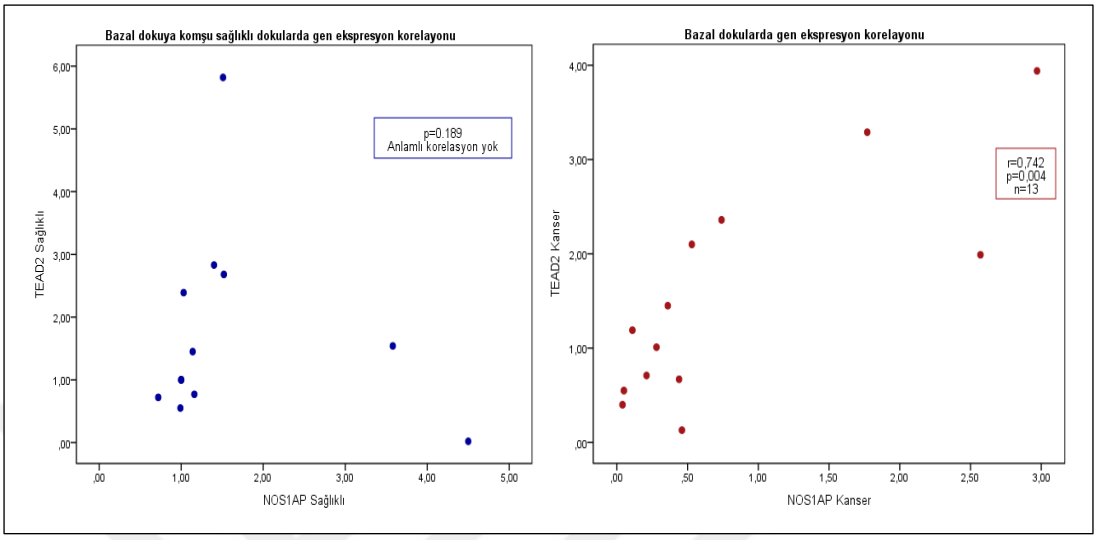
Şekil 30:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,806) ve sağdaki grafik ise bazal alt tip meme kanseri dokularda (r=0,626) NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=13).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-YAP1** genleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir fakat bazal alt tip meme kanseri dokularında pozitif orta düzey korelasyon (r=0,649) saptanmıştır.



Şekil 31:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (p>0,05) ve sağdaki grafik ise bazal alt tip meme kanseri dokularda (r=0,649) NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=13).

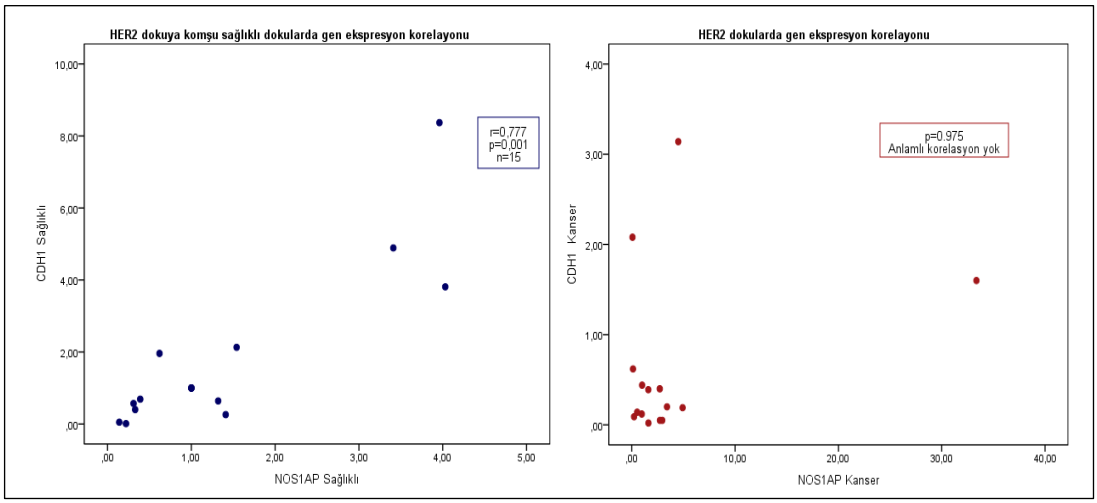
Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-TEAD2** genleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir fakat bazal alt tip meme kanseri dokularında pozitif güçlü düzey bir korelasyon (r=0,742) saptanmıştır.



Şekil 32:Sağlıklı ve bazal alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (p>0,05) ve sağdaki grafik ise bazal alt tip meme kanseri dokularda (r=0,742) NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=13).

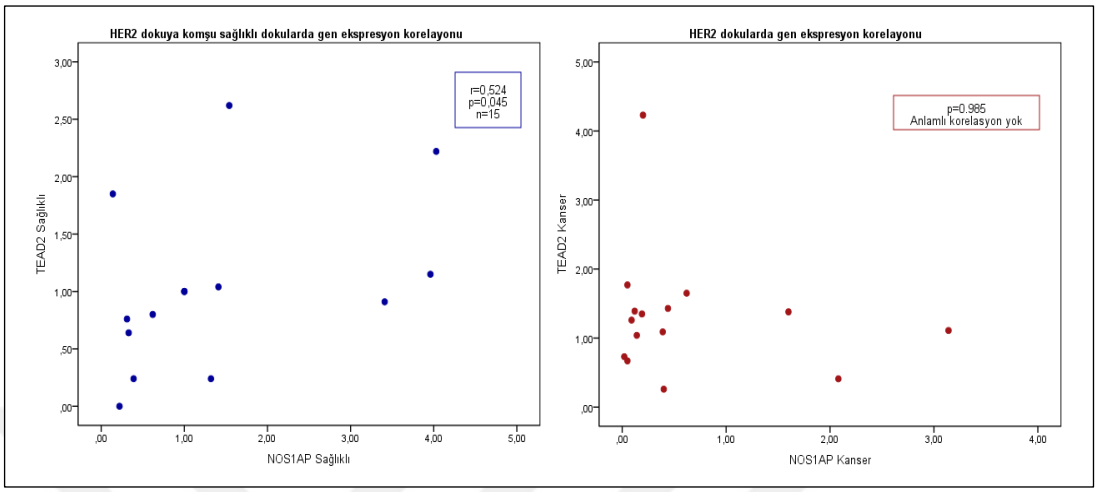
6.2.2.2. Sağlıklı- HER2 alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-CDH1** genleri arasında güçlü pozitif korelasyon (r=0,777) gözlenirken, HER2 alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir.



Şekil 33:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,777) ve sağdaki grafik ise HER2 alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=15).

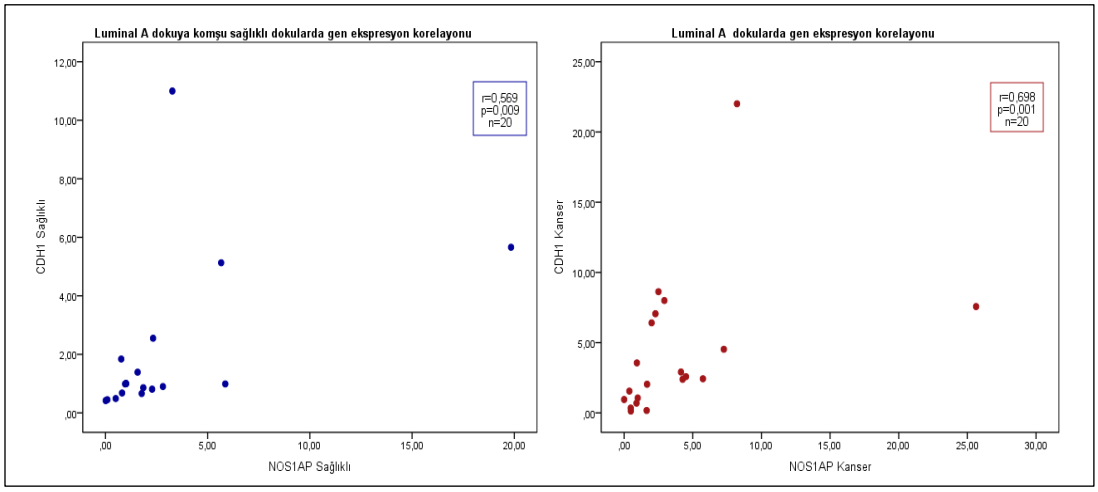
Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-TEAD2** genleri arasında pozitif orta düzey bir korelasyon (r=0,524) gözlenirken, HER2 alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir.



Şekil 34:Sağlıklı ve HER2 alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,524) ve sağdaki grafik ise HER2 alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=15).

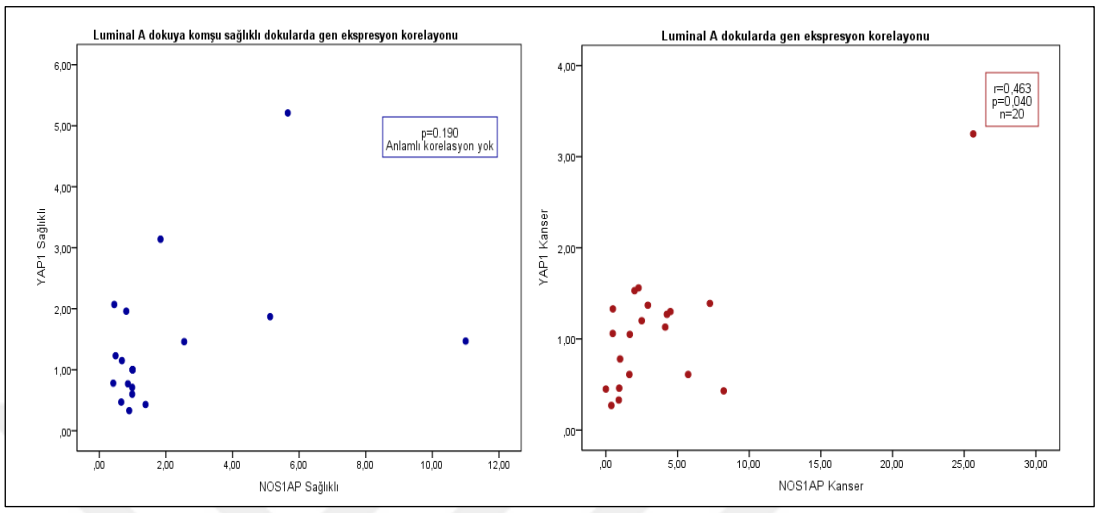
6.2.2.3. Sağlıklı- Luminal A alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-CDH1** genleri arasında orta pozitif korelasyon (r=0,569) gözlenirken, luminal A alt tip meme kanseri dokularında pozitif güçlü düzey ilişkiye (r=0,698) doğru güçlenmiştir.



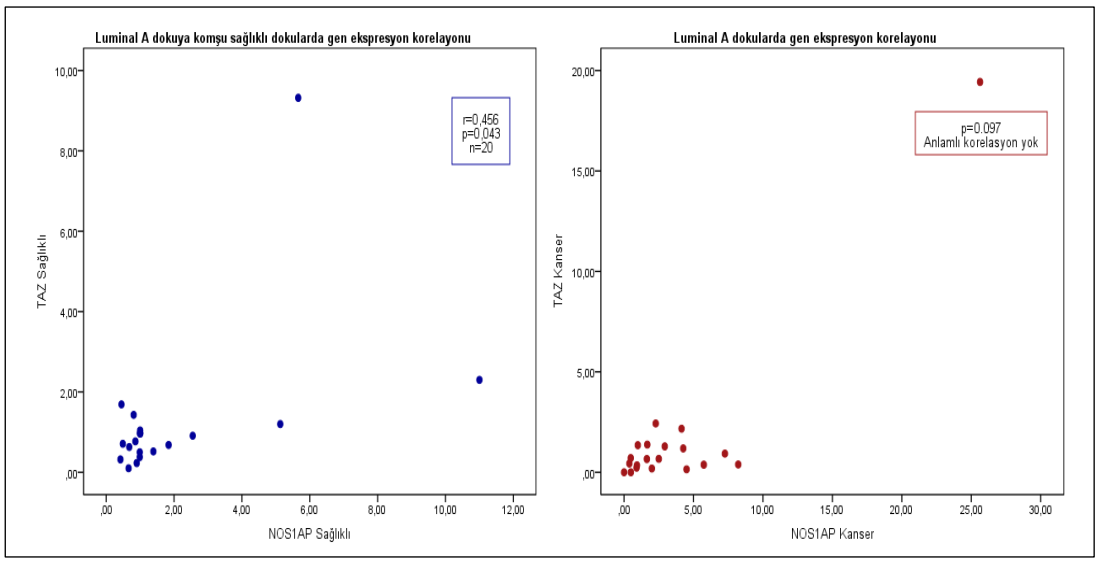
Şekil 35:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,569) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (r=0,698) NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=20).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-YAP1** genleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir fakat luminal A alt tip meme kanseri dokularında pozitif orta düzey bir korelasyon (r=0,463) saptanmıştır.



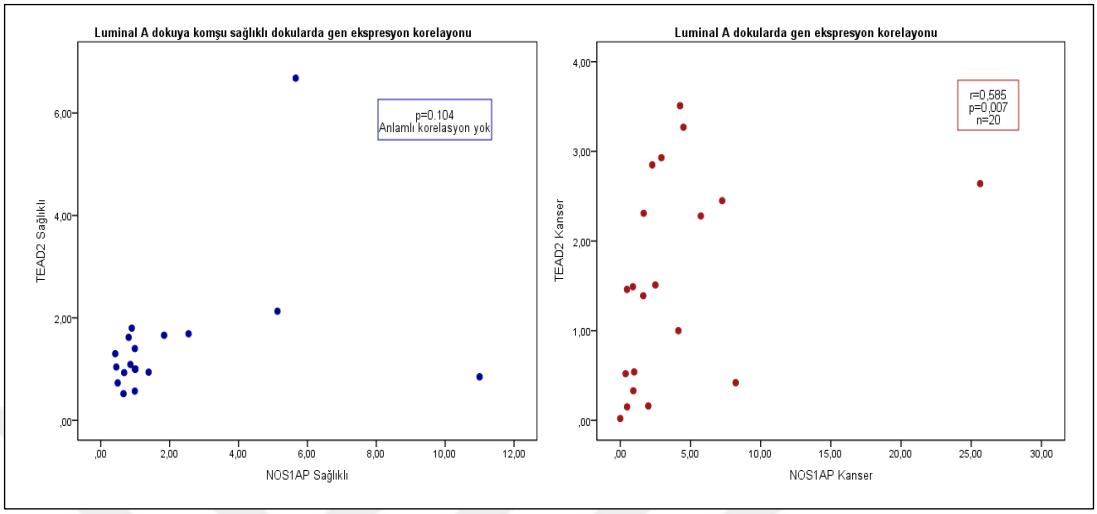
Şekil 36:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (p>0,05) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (r=0,463) NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=20).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-TAZ** genleri arasında pozitif orta düzey bir korelasyon (r=0,456) gözlenirken, luminal A alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir.



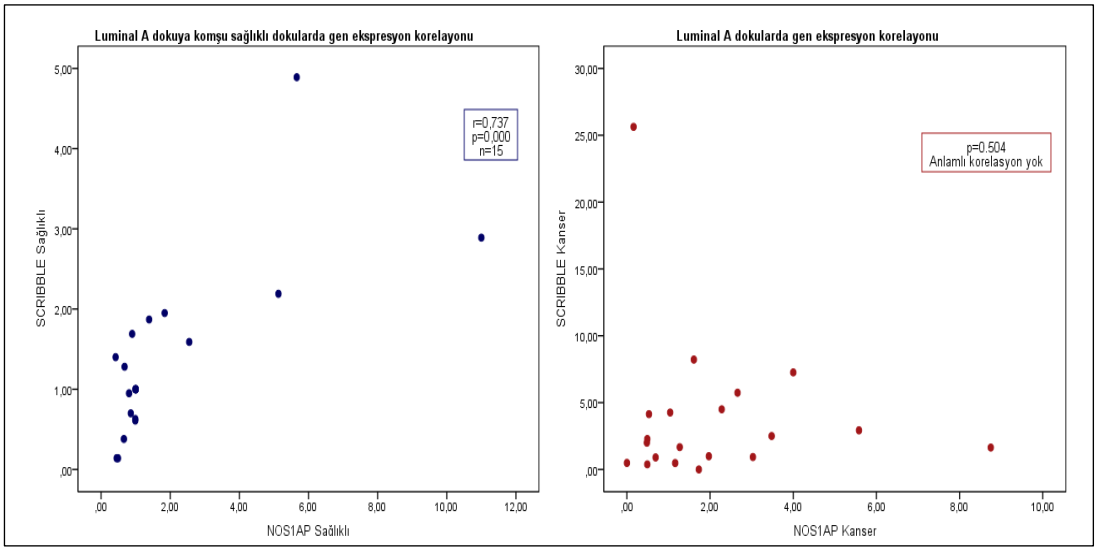
Şekil 37:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,456) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP-TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=20).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-TEAD2** genleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir fakat luminal A alt tip meme kanseri dokularında pozitif orta düzey bir korelasyon (r=0,585) saptanmıştır.



Şekil 38:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP-TEAD2 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (p>0,05) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (r=0,585) NOS1AP-TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=20).

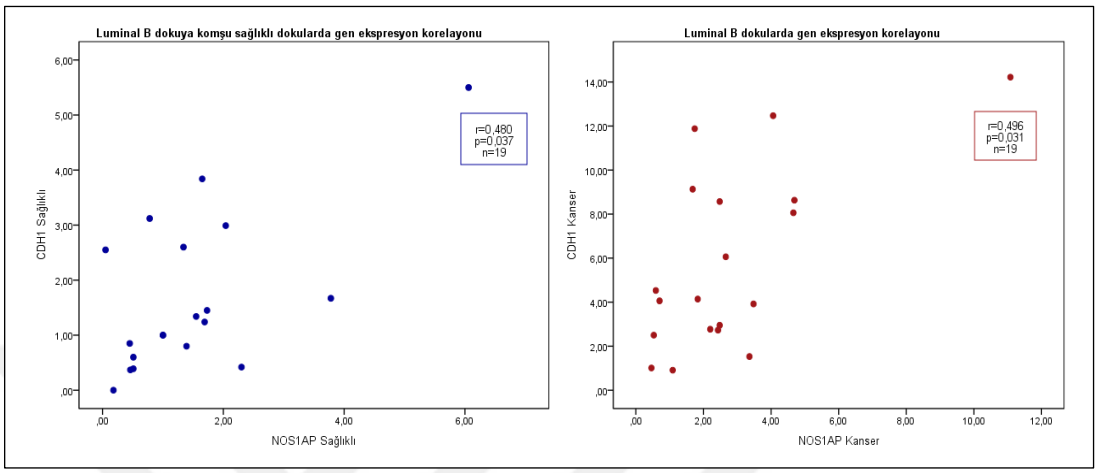
Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-SCRİBBLE** genleri arasında pozitif güçlü düzey bir korelasyon (r=0,737) gözlenirken, luminal A alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir.



Şekil 39:Sağlıklı ve luminal A alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,737) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP- SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=20).

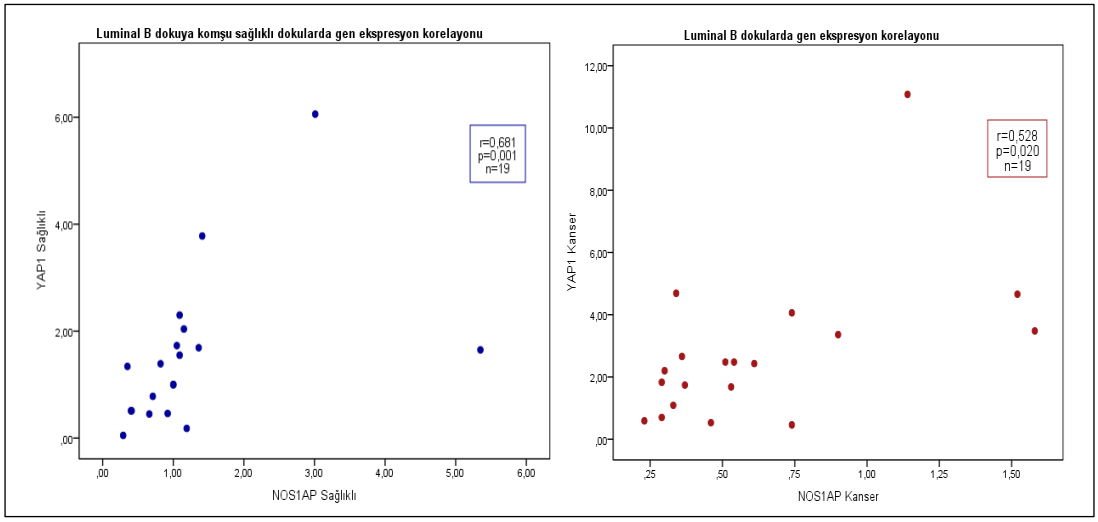
6.2.2.4. Sağlıklı- Luminal B alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularında dokularda, **NOS1AP-CDH1** genleri arasında pozitif orta düzey bir korelasyon gözlemlendi (sırasıyla; r=0,480, r=0,486).



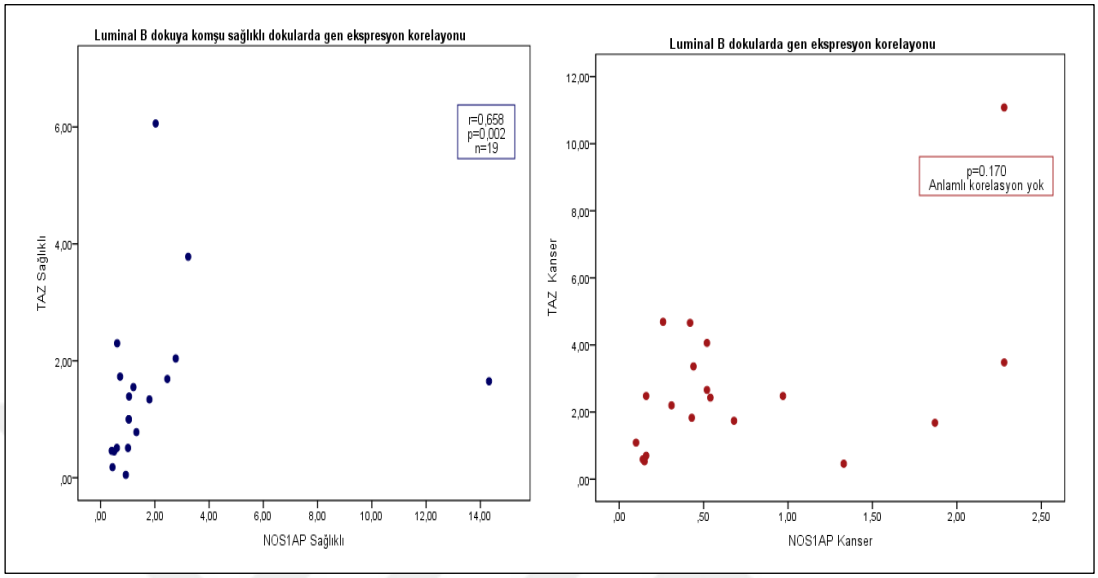
Şekil 40:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,480) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (r=0,496) NOS1AP-CDH1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=19).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-YAP1** genleri arasında gözlenen güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,681), luminal B alt tip meme kanseri dokularında pozitif orta düzey ilişkiye (r=0,528) doğru zayıflamıştır.



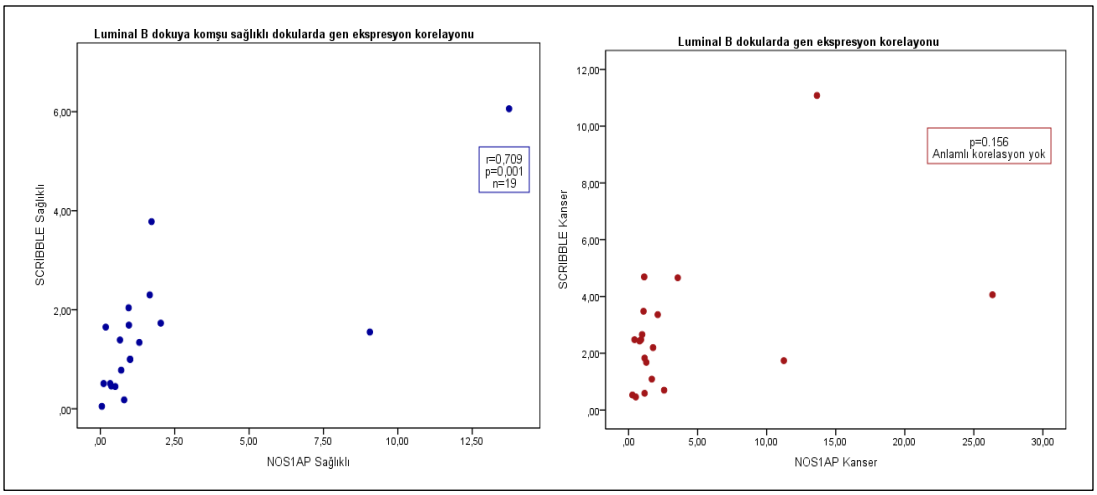
Şekil 41:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,681) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (r=0,528) NOS1AP-YAP1 gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=19).

Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-TAZ** genleri arasında gözlenen güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,658) gözlenirken, luminal B alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.



Şekil 42:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,658) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP-TAZ gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=19).

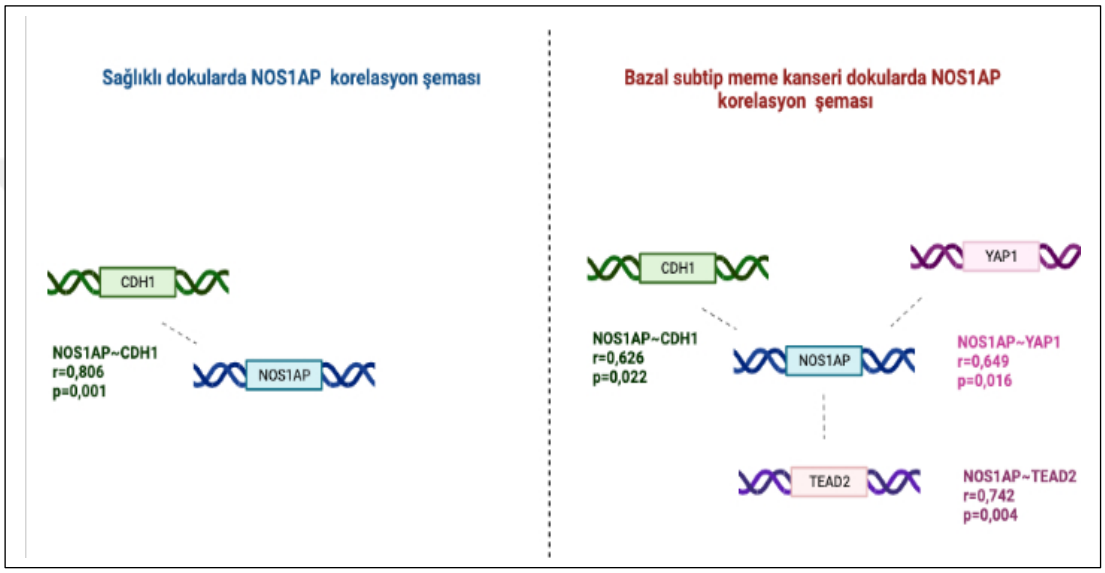
Sağlıklı dokularda, **NOS1AP-SCRİBBLE** genleri arasında gözlenen güçlü pozitif korelasyon ilişkisi (r=0,709) gözlenirken, luminal B alt tip meme kanseri dokularında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.



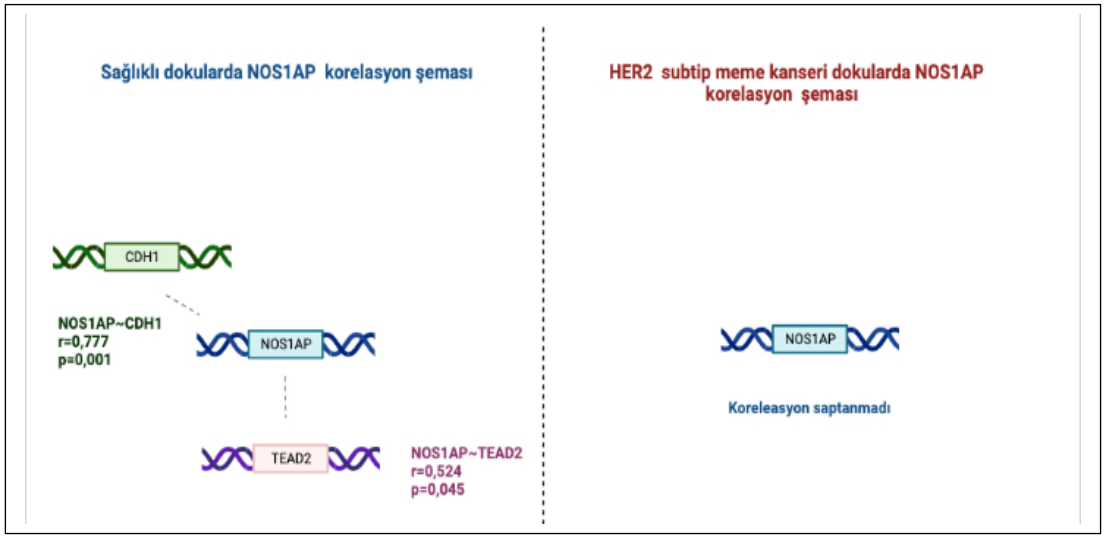
Şekil 43:Sağlıklı ve luminal B alt tip meme kanseri dokularda, NOS1AP- SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona dair grafik. Soldaki grafik sağlıklı dokularda (r=0,709) ve sağdaki grafik ise luminal A alt tip meme kanseri dokularda (p>0,05) NOS1AP- SCRİBBLE gen ekspresyonları arasında gözlenen korelasyona aittir (n=19).

6.2.3. NOS1AP korelasyon şeması

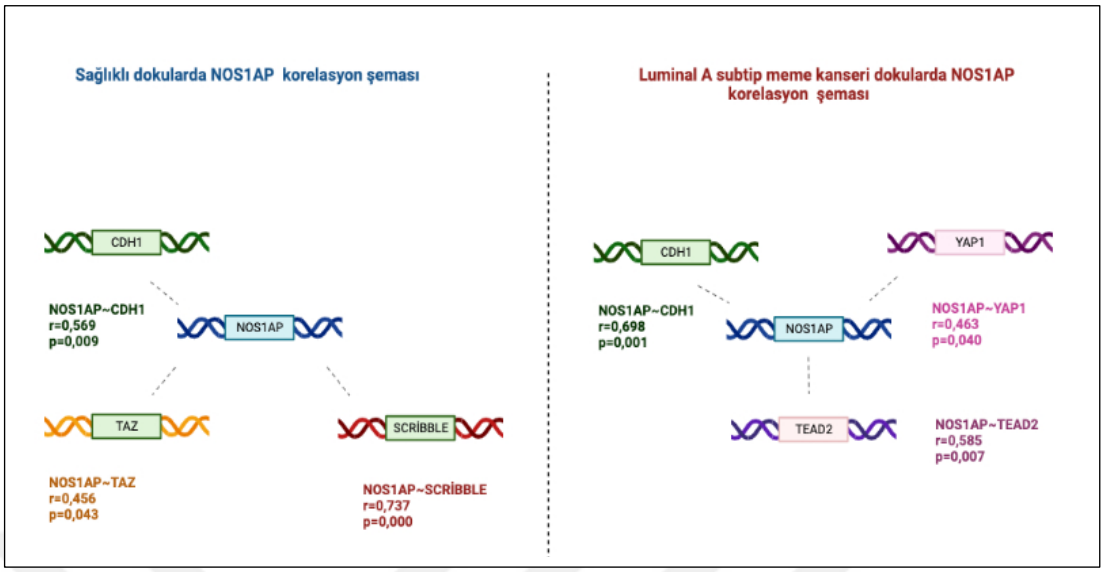
Yukarıda NOS1AP geninin meme tümör dokuları ve sağlıklı dokularındaki korelasyon verileri incelendi. Bununla birlikte NOS1AP'nin hangi genler ile hangi alt tiplerde anlamlı korelasyona sahip olduğuna dair açıklayıcı şemalar aşağıda belirtilmiştir. Meme kanseri alt tiplerine komşu olan sağlıklı dokularda NOS1AP'nin CDH1, TAZ, SCRİBBLE, YAP1 ve TEAD2 genleri ile korelasyonu ve meme kanseri alt tiplerinde ise NOS1AP'nin CDH1,YAP1 ve TEAD2 genleri ile korelasyonu dikkat çekicidir.



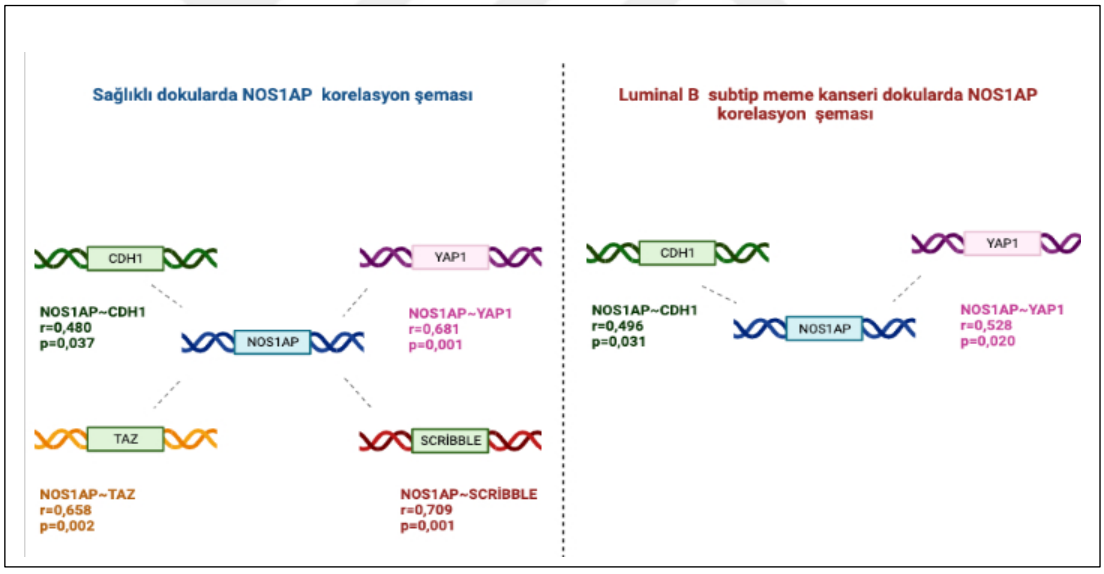
Şekil 44: Sağlıklı ve bazal alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim. Bu şema BioRender'da çizildi.



Şekil 45: Sağlıklı ve HER2 alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim. Bu şema BioRender'da çizildi.



Şekil 46: Sağlıklı ve luminal A alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim. Bu şema BioRender da çizildi.



Şekil 47: Sağlıklı ve luminal B alt tiplerde NOS1AP ile korele olan genlere dair şematik çizim. Bu şema BioRender'da çizildi.

7.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, meme kanserinde tümör baskılayıcı rolü olduğu ve nöronal Hippo sinyal ağı ile ilişkili olduğu bildirilen NOS1AP'nin, meme kanserinde Hippo sinyal yolağı ve EMT ile ilişkisine dair ilk değerlendirmeyi sunmak amaçlandı. 35-60 yaş aralığında 67 meme kanseri hastasının eşleştirilmiş sağlıklı ve primer kanser (13 bazal, 15 HER2, 20 luminal A ve 19 luminal B alt tiplerde) dokularında üzerinden elde ettiğimiz ekspresyon ve korelasyon bulguları aşağıdaki gibidir.

-NOS1AP

Sağlıklı dokular ve meme kanseri dokuları arasında NOS1AP ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Alt tipler açısından değerlendirdiğimizde ise sağlıklı dokulara kıyasla HER2 tipte NOS1AP ekspresyonunun kontrole göre azaldığını ve luminal B tümörlerde ise artığını gözlemledik (Şekil 23, 25 ve 27). Literatürde meme kanserinde NOS1AP'ye dair yer alan tek çalışmada, NOS1AP'nin normal, primer ve lenf nodu metastaz bölgelerindeki protein seviyesi ve lokalizasyonu üzerine immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. NOS1AP'nin hem normal dokularda hem primer tümör dokularında ER/PR/HER2 durumundan bağımsız olarak sitoplazmada lokalize olduğu , yaklaşık olarak her iki dokuda da aynı seviyede eksprese edildiği ve lenf nodu metastazlarında sağlıklı dokular ve primer tümörlere göre NOS1AP boyanmasının azaldığı bildirilmiştir (Anastas ve ark., 2012). Bahsedilen bu veriler ile çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular benzerlik gösterir. Ayrıca Anastas ve arkadaşları, NOS1AP'nin normal ve primer dokulardaki ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark olmadığını protein düzeyinde tespit etmişlerdir fakat çalışmamızda bunun gen düzeyinde ve dört alt tipte incelenmesi literatürde bu konuya ilişkin yer alan tek kaynağa anlamlı bir katkı sağlar.

NOS1AP ekspresyonunun HER2 tümörlerde sağlıklı dokuların 0,2 katı ve luminal B tümörlerde sağlıklı dokuların 1,8 katı kadar eksprese olması dikkat çekicidir (Şekil 25 ve 27). Bu anlamlı ekspresyon farklılığının yalnızca HER2 ve luminal B tip tümörlerde gözlenmesi NOS1AP'nin HER2 ve luminal B tip meme kanserleri için aday biyobelirteç olabileceğini düşündürür. Bir genin, sağlıklı dokulara kıyasla bir tümör alt tipinde ekspresyon seviyesinin yüksek iken bir başka alt tipinde düşük olması

dikkat çekicidir. Literatürde, NOS1AP ve meme kanseri alt tiplerine ilişkin böyle bir veri yoktur ancak Claudin 1 pozitif tümörlerin sıklığı ER pozitif meme kanserlerine kıyasla ER negatif meme kanserlerinde önemli ölçüde daha yüksektir ve buna paralel olarak Claudin 1'in ER pozitif alt tiplerde (luminal A ve B) tümör baskılayıcı ve ER negatif alt tiplerde (bazal, Her2) ise tümör tetikleyici olduğu öne sürülmüştür (Myal ve ark., 2010). Bu profilin aksine SALL1, normal meme dokusu ile karşılaştırıldığında bazal benzeri meme kanserinde ve ER, PR, HER2 üçlü negatif meme kanseri hastalarında tümör baskılayıcı olarak işlev görür (Ma ve ark., 2022). Bu veriler, bir genin tümör baskılayıcı veya onkogen olma durumunun alt tipe özgü olabileceğini düşündürmektedir, bizim bulgularımızda HER2 ve luminal B tiplere özgü olması da bu durumu destekler. Literatürde alt tipden bağımsız olarak birçok kanserde NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolü üzerinde durulmuştur. Çalışmamızda NOS1AP ekspresyonunun sağlıklı dokulara kıyasla HER2 alt tipinde düşük olması bu genin HER2 alt tipe özel tümör baskılayıcı rolü olabileceğine işaret eder. Ayrıca, Anastas ve arkadaşları NOS1AP'nin ikili bir rolünün olabileceğine de işaret etmiştir (Anastas ve ark., 2012). HER2 alt tipinden farklı olarak sağlıklı dokulara kıyasla luminal B alt tipte NOS1AP ekspresyonun yüksek olması bu genin luminal B alt tipe özel onkogen rolünün olabileceğine işaret eder. Bu değerlendirmemiz alt tip özelinde literatür ile uyumludur.

HER2 ve luminal B alt tiplerin her ikisi de HER2 pozitiftir (Perou ve ark., 2000). Bununla birlikte, NOS1AP ekspresyonun bazal ve luminal A gibi HER2 negatif alt tiplerin aksine HER2 pozitif olan HER2 ve luminal B alt tiplerde anlamlı farklılık göstermesi, NOS1AP'nin HER2 reseptörü veya onkogeni ile arasında bir ilişki olabileceğini düşündürür. Literatürde HER2 geni ve NOS1AP'ye ilişkisine yönelik veri yer almamaktadır da elde ettiğimiz bu sonuç yeni bir ilişkinin kapısını aralayabilir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bu bulgular literatürü alt tip özelinde destekler ve NOS1AP'nin alt tipler açısından değerlendirilmesinin önemine dikkat çeker. Ayrıca gen ekspresyonlarının meme kanseri alt tipleri özelinde değerlendirilmesi kanser terapötisi açısından da fayda sağlayacaktır.

NOS1AP dışında incelediğimiz dokuz genin farklı alt tiplerdeki ekspresyon seviyelerine dair bulgularımız, çalışmamızda yer alan primer tümör dokuların Hippo yolağı ve EMT durumuna ışık tutarak NOS1AP'ye dair değerlendirmemize katkı sunar.

-EMT

EMT, EpCAM, Occludin-1 ve CDH1 gibi epitelyal belirteçlerin kaybı ve VIMENTİN ve Fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin varlığı ile ilişkili karmaşık bir programdır (Theys ve ark., 2011). Çalışmamızda tümör dokularında TWIST1 ve VIMENTİN ekspresyonunun kontrolden düşük ve CDH1 ekspresyonunun ise kontrolden yüksek olduğunu gözlemledik (Şekil 23), yani epitel kökenli primer tümörlerde henüz EMT geçişi gerçekleşmemiştir. Ayrıca GENT2, GEPIA ve TNMplot veri tabanlarını kullanarak gerçekleştirdiğimiz biyoinformatik analizde de sağlıklı dokulara kıyasla meme kanseri dokularında TWIST1 ve VIMENTİN ekspresyonunun düşük ve CDH1 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu gözlemledik.

TWIST1; CDH1 gibi epitelyal fenotiple ilgili genlerin ekspresyonunu baskılar, VIMENTİN gibi mezenkimal hücre fenotipi ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırır. EMT indükleyici transkripsiyon faktörüdür tümör ilerlemesi ve metastatik süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Meng ve ark., 2018; Proestling ve ark., 2015). Metastaz ile ilişkilendirilen TWIST1'in çalışmamızda yer alan primer tümör dokularındaki (metastaz yapmamış doku) düşük ekspresyon seviyesi literatür ile uyumludur. Ayrıca, çalışmamızda farklı tümör alt tiplerinde TWIST1 ve VIMENTİN genlerinin ekspresyon değişimlerinin benzer seviyede olduğunu gözlemledik. Örneğin; bazal tümörlerin TWIST1 ve VIMENTIN ekspresyonu sağlıklı dokuların yaklaşık %20'si kadardır.

-Hippo yolağı

YAP/TAZ, proliferasyon, hücre sağkalımı, göç ve metastaz, kemoterapiye direnç, EMT ve kanser kök hücresi gibi kanserle ilişkili birçok süreçte önemli rol üstlenmiştir (Maugeri-Sacca ve ark., 2015). Kanser hücrelerinde artan YAP/ TAZ ekspresyonu veya aktivasyonu, hücre-hücre bağlantılarını bozar, mezenkimal gen ekspresyonunu

uyarır ve EMT ile ilişkili morfolojik değişikliklere yol açar (Warren ve ark., 2018). Çalışmamızda, primer tümör dokularda Hippo yolağı üyeleri YAP1 ve TAZ'nin, EMT sürecinde yer alan mezenkimal belirteçler TWIST1 ve VIMENTİN'in ekspresyonu sağlıklı dokulara göre azalmış, epitelyal marker CDH1'in ekspresyonu ise sağlıklı dokulara göre artmıştır. Bu durum primer tümör dokularda EMT sürecinin başlamadığını ve epitelyal karakterin baskın olduğunu göstermektedir.

YAP aşırı ekspresyonu, proliferasyon, transformasyon, göç ve invazyon dahil olmak üzere meme kanseri hücrelerinde tümörijenez ve metastaz gibi çoklu süreçlerle ilişkilendirilmektedir (Lamar ve ark., 2012). 200 Pakistanlı meme kanseri hastasının tümör örneklerinde YAP1 mRNA ve protein seviyeleri incelenmiş, tümör dokularında YAP1 ekspresyonunun sağlıklı dokulardan dokuz kat daha yüksek olduğu ve bu durumun metastaz ve kötü sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur (Qadir ve ark., 2021). Ancak tümörojenez açısından YAP1'in varlığı kadar hücresel lokalizasyonu da önem taşımaktadır. YAP1 sitoplazmada fosforile formda bulunur ve inaktiftir ancak nükleusa geçtiğinde defosforile olur ve onkogenik aktivite gösterir. 455 primer meme kanseri hastası üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, hastaların %75.6'inin kontrole göre düşük nükleer YAP1 seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (Cha ve ark., 2021) ayrıca yüksek YAP1 seviyesi metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda primer kanser dokularında YAP1 ekspresyonunun kontrol dokularına göre daha düşük olduğunu bulduk. Bu durum dokularımızın henüz metastaz gözlenmemiş primer dokular olması ile ilişkilendirilebilir.

Son çalışmalar, YAP'nin onkojenik rolünün dışında tümör baskılayıcı olarak da hareket edebileceğini göstermektedir (Jho, 2018). Oncomine, TIMER, TCGA ve GEPIA veri tabanlarından alınan veri setleri kullanarak gerçekleştirilen bir biyoinformatik analizde YAP1 ekspresyon seviyesi birçok kanser tipinde incelenmiştir. YAP1 ekspresyon seviyesinin kontrole kıyasla meme, özofagus ve akciğer kanseri dokularında düşük olduğu ve bu kanser tiplerinde artan YAP1 ekspresyonunun iyi bir prognoz ve nüksüz sağkalım (RFS) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 2020). Meme kanseri hücre hatlarında YAP'nin shRNA ile susturulması anoikisi baskılar, migrasyon ve invazivliği arttırır, taksole yanıtı inhibe eder ve nude farelerde tümör büyümesini arttırır. Bu veri, YAP'nin tümör baskılayıcı

rolünü ortaya koyan ilk rapordur (Yuan ve ark., 2008). Çalışmamızda da kanser dokularındaki YAP1 ekspresyonunun sağlıklılardan düşük olduğunu bulmuştuk, bu durum YAP1'in tümör baskılayıcı bir gen olduğunu ve ekspresyonunun azalmasının tümör gelişimine katkı sağladığını düşündürebilir. Elde ettiğimiz bulgular literatüre katkı sağlamaktadır ancak YAP1'in meme kanserindeki rolünün aydınlatılması için fonksiyonel çalışmalar yapılmalıdır.

YAP paroloğu olan TAZ, meme, akciğer, prostat ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli tümör tiplerinde onkogen olarak tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2022). MCF10A meme kanseri hücrelerinde TAZ'nin aşırı ekspresyonu da hücre göçü ve invazyonu uyarır. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde shRNA ile TAZ ekspresyonunun bastırılması ise hücre göçünü ve invazyonu azaltır (Chan ve ark., 2008). Bu bulgular, YAP1 ve TAZ'nin aşırı ekspresyonu ile metastaz arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Çalışmamız primer dokular (non metastatik doku) üzerinde gerçekleştiği için sağlıklı dokulara kıyasla tümörlü dokularda YAP1 ve TAZ ekspresyonunun düşük olması literatürle uyumludur. Literatürde primer tümör dokuda Hippo yolağı üyelerinin ekspresyonlarına dair sınırlı sayıda çalışmanın yer alması da çalışmamızın literatüre katkısını ön plana çıkartmaktadır.

-Hippo yolağı ve EMT

Hippo yolağı üyeleri YAP/TAZ meme kanseri başta olmak üzere mide, akciğer, pankreas gibi birçok kanserde EMT ile ilişkilendirilmiştir. YAP/TAZ aşırı ekspresyonunun tümör büyümesini desteklediği, invazyonu artırdığı ve EMT'yi indüklediği bilinmektedir (Lamar ve ark., 2012). Literatürde yaygın biçimde Hippo yolağının EMT'nin önemli bir indükleyicisi olduğu yer almaktadır fakat EMT süreci mi Hippo yolağını tetiklemekte yoksa HİPPO yolağı mi EMT'yi indüklemekte henüz tam aydınlatılamamıştır (Akrida ve ark., 2022). 30 eşleştirilmiş peritümöral dokuya kıyasla pankreas tümör grubunda YAP ekspresyonu yüksektir. Ayrıca Capan-1-Mock (düşük seviyede YAP eksprese eden) hücrelerine kıyasla Capan-1-YAP (yüksek seviyede YAP eksprese eden) hücrelerinde mezenkimal belirteç Snail ve N-kaderin seviyeleri daha yüksek iken epitelyal belirteç CDH1 ekspresyon seviyesi daha düşüktür. Bu da YAP'nin pankreas kanseri hücrelerinde de EMT'nin güçlü bir

indükleyicisi olabileceğini düşündürmektedir (Yuan ve ark., 2015). Çalışmamızda da tümör dokularında YAP1, TWIST1 ve VIMENTİN ekspresyon seviyelerinin düşük iken CDH1'in yüksek olması bu primer tümör dokularda EMT sürecinin başlamadığını ve epitelyal karakterin baskın olduğunu göstermektedir.

Eşleştirilmiş sağlıklı dokulara kıyasla kolorektal kanser dokularında TAZ ekspresyonu anlamlı bir şekilde yüksektir ve yüksek TAZ ekspresyonuna sahip kolorektal kanser hastalarının genel sağkalım süreleri daha kısa ve nüksüz sağkalım oranları daha zayıftır (Wang ve ark., 2022). Yumurtalık kanserinde de TAZ aşırı eksprese edilir ve yüksek TAZ mRNA ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilidir. TAZ baskılanmış hücrelerde epitelyal belirteç ZO-1'de orta derecede bir artış ve mezenkimal belirteç VIMENTİN seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, SKOV-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde TAZ'nin bastırılması ile MET'in indüklendiğini gösterir. Bu sonuç, TAZ'nin yumurtalık kanseri hücrelerinde de çoğalma, göç ve EMT'yi teşvik etmede hayati bir rol oynadığını göstermektedir (Chen ve ark., 2016). Bu çalışmada da gözlemlediğimiz üzere YAP1'in paroloğu olan TAZ da mezenkimal genler ile benzer, epitelyal genlere zıt bir ekspresyon paterni sergilemektedir. Çalışmamızda TAZ, TWIST1 ve VIMENTİN ekspresyon seviyelerinin düşük iken CDH1'in yüksek olması bu primer tümör dokularında EMT sürecinin başlamadığını göstermektedir.

Bu tez kapsamında, sağlıklı-kanser grupları arasında TEAD2, CTGF, PAI1 ve SCRIBBLE gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık görülmez iken alt tipler açısından değerlendirdiğimizde bu durumun değiştiğini tespit ettik. Sağlıklı dokulara kıyasla HER2 alt tipinde CTGF ekspresyonu düşük ve luminal B alt tipinde PAI-1 ekspresyon seviyesi yüksektir (Şekil 23,25 ve 26).

Hem YAP hem de TAZ, transkripsiyonel koaktivatörlerdir ve TEAD 1-4 transkripsiyon faktörlerleriyle etkileşime girerek CTGF ve PAI-1 gibi hedef genlerin ekspresyonlarını indükler (Guo ve Teng, 2015) ve EMT'yi teşvik eder (Ansari ve ark., 2019). Çalışmamızdaki primer tümör dokularda YAP/TAZ'nin ekspresyon seviyesinin düşük olması ile birlikte TEAD2, CTGF ve PAI1'in sağlıklı ve tümör gruplarında ekspresyon seviyesinin anlamlı farklılık göstermemesi literatür ile uyumludur.

TAZ’nin aşağı yönünde yer alan TEAD transkripsiyon faktörü meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve EMT'yi teşvik etmede TAZ’ye aracılık eder. CTGF; TAZ-TEAD ikilisinin hedef genidir ve TAZ'nin CTGF’yi indüklemesi için TEAD gereklidir. TAZ-TEAD arasındaki bağlantının bozulması veya TEAD ekspresyonunun susturulması TAZ'nin EMT'ye desteğini bloke eder (Zhang ve ark., 2009). Çalışmamızdaki primer tümör dokularda yüksek TAZ seviyesi gözlemlemedik ve bu sebeple TEAD2 ve CTGF ekspresyonlarının da sağlıklı dokulara kıyasla anlamlı bir şekilde farklılık göstermemesi literatüre göre beklenen bir sonuçtur.

TEAD ailesinin üyesi olan TEAD2, metastazı ve EMT’yi teşvik etmede YAP ve TAZ ile birlikte hareket eder. Yüksek TEAD2 seviyesi, YAP ve TAZ'nin artan nükleer lokalizasyonuna yol açar ve bu üç proteinin kompleks oluşturmasıyla, EMT indüksiyonu ve malign tümör fenotipi oluşumu tetiklenir (Diepenbruck ve ark., 2014). Çalışmamızda primer tümörler ile sağlıklı dokuların TEAD2 ekspresyonlarında anlamlı fark olmadığını gözlemledik. Bu sonuç, çalışmamızda yer alan primer tümör dokularında EMT’nin başlamadığına yönelik değerlendirmemiz ile uyumludur.

T47D-TWIST meme kanseri hücrelerinde PAR1 ve TAZ proteinleri aktive olur, fosforile TAZ seviyesi önemli ölçüde azalır ve TAZ'nin transkripsiyonel hedefi CTGF ekspresyonu artar. CTGF yüksek ekspresyonu TWIST aracılı EMT 'nin invazivliğini destekler ve meme kanseri hücrelerinin göç kabiliyetini arttırır. siTAZ tarafından TAZ ekspresyonu düşürüldüğünde CTGF ekspresyonu da azalır ve TWİST'nin aracılık ettiği invaziv özellikleri bastırır (Wang ve ark., 2016). Çalışmamızdaki primer tümör dokularında EMT sürecinin başlamadığını belirtmiştik ve yukarıdaki veriye de paralel olarak bu dokularda TWIST1 ve TAZ seviyesinin düşük olması ve CTGF’nin sağlıklı tümör gruplarında anlamlı farklılık göstermemesi bu değerlendirmemiz ile uyumluluk göstermektedir.

Luminal A meme kanserlerinde PAI-1 ekspresyonunun kontrole göre yüksek olduğunu tespit ettik (Şekil 26). CTGF’ye benzer bir profil çizeceğini tahmin ettiğimiz PAI-1 bu tahminimizden farklı bir ekspresyon paterni çizdi. Bu durumun PAI-1’in tümör baskılayıcı ve onkogenik ikili rolünden (Inoue ve ark., 2005) kaynaklanabileceğini öngörmekteyiz.

Bu tez çalışması kapsamında, sağlıklı-kanser grupları ve alt tipler açısından değerlendirdiğimizde TEAD2 haricinde ekspresyon seviyesinde farklılık görülmeyen bir diğer gen SCRIBBLE'dir (Şekil 23). SCRIBBLE, epitel dokuların apikal-bazal hücre polaritesinin korunmasında rol oynayan bir zar proteinidir ve meme, prostat ve kolon gibi çeşitli insan kanserlerinde baskılanır. Ancak bazı çalışmalarda SCRİBBLE'nin insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiği de gösterilmiştir. Hepatoselüler karsinom ve tümörlü olmayan karaciğer örnekleri arasında SCRİBBLE ekspresyon seviyesinin ve lokalizasyonunun değerlendirildiği immünohistokimyasal bir analizde, tümörlü olmayan bölgeye kıyasla tümörlü olan bölgede daha yoğun SCRİBBLE boyaması gözlenmiştir. Ayrıca SCRİBBLE aşırı ekspresyonunun hepatoselüler karsinom hücrelerinin büyümesini baskıladığı ve SCRİBBLE eksikliğinin karaciğer tümörü büyümesini arttırdığı tespit edilmiştir. SCRİBBLE'nin YAP1, c-Myc ve siklin D1 onkogenlerinin ekspresyonunu baskılayarak karaciğer kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve böylece karaciğer kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü de bildirilmiştir. Bu çalışmalar SCRİBBLE'nin yalnızca bir tümör baskılayıcı olarak değil, aynı zamanda bir onkogen olarak da işlev gördüğünü göstermektedir (Kapil ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında sağlıklı-kanser grupları arasında SCRİBBLE ekspresyon seviyesi açısından anlamlı bir fark gözlemlemedik. Literatürde SCRİBBLE'ye atfedilen tümör baskılayıcı veya onkogen fonksiyonlarına yönelik bir değerlendirmede bulunamayız. BBCancer veri tabanında sağlıklı meme dokuları ile meme tümörlerinin SCRIBBLE ekpresyonlarında anlamlı fark olmaması elde ettiğimiz bulguyu destekler niteliktedir.

Sonuç olarak Hippo yolağı üyeleri YAP1 ve TAZ'nin, mezenkimal belirteçler TWIST1 ve VIMENTİN'in primer tümör dokularındaki ekspresyon seviyesinin düşük ve epitelyal belirteç CDH1'in yüksek olması, Hippo yolağı hedef gen ekspresyonlarında sağlıklı ve kanser grupları arasında anlamlı farklılık olmaması bu primer dokularda EMT sürecinin başlamadığını ve epitelyal karakterin baskın olduğunu göstermektedir. Bu nedenle NOS1AP ve EMT arasındaki ilişki saptanmadı.

-NOS1AP ve Hippo yolağı

Literatürde NOS1AP ve Hippo sinyal yolağına dair birkaç yayın bulunmaktadır ve bu çalışmalar sıçan beyninden izole edilmiş NOS1AP izoformları ile yapılmıştır. Çalışmamızda meme kanserinde NOS1AP ve Hippo yolağı arasındaki ilişkiye odaklandık ve bu ikiliye yönelik değerlendirmemizi korelasyon bulgularımız ile destekledik.

Sağlıklı ve meme kanseri tümör gruplarında yalnız TWIST1 ~ VIMENTİN ve NOS1AP ~ CDH1 genleri arasında anlamlı korelasyon saptadık.

Adrenokortikal (r=0,783) ve hepatosellüler karsinomlarda (r=0,724) TWIST1 ve VIMENTİN genleri arasında güçlü pozitif korelasyon gözlenmiştir (Bulzico ve ark., 2019; Meng ve ark., 2018). Çalışmamızdaki tümör dokularında da TWIST1 ~ VIMENTİN genleri arasında güçlü pozitif korelasyon (r=0,745) saptadık ve bu bulgumuz literatür ile uyumludur.

NOS1AP ~ CDH1 arasında da hem sağlıklı dokularda (r=0,668) hem de kanser dokularında (r=0,540) pozitif korelasyon saptadık (Şekil 28). Alt tipler açısından bu genler arasındaki korelasyonu değerlendirdiğimizde ise HER2 tümörler hariç diğer tüm sağlıklı dokularda ve tümör alt tiplerinde NOS1AP ve CDH1 arasında pozitif korelasyon olduğunu gözlemledik. Bizim araştırmalarımıza göre literatürde kanser dokularında NOS1AP ve CDH1 ikilisinin incelendiği bir çalışma yoktur. Bu iki genin ekspresyonlarını farklı meme kanseri alt tiplerinde incelediğimizde sağlıklı dokulara kıyasla yalnız luminal B alt tipinde yüksek ekspresyon gösterdiğini ve bu alt tipte ekspresyonu arttan yegane genlerin NOS1AP ve CDH1 olduğunu bulmuştuk, bu durum bu iki genin onkogenik fonksiyonlarının olabileceğini düşündürür. Luminal B tip meme kanserleri her ne kadar diğer alt tiplere göre daha az agresif seyretse de ilerlemiş kanserin tedavisi daha zordur, NOS1AP ve CDH1 bu klinik farklılığın oluşmasına katkıda bulunuyor olabilir. NOS1AP'nin meme kanserinde tümör baskılayıcı olabileceği ancak NOS1AP baskılanmasının koloni oluşumunu artırdığı fakat hücre göçünü baskıladığı, metastatik dokularda ise eksprese edilmediği gözlenmiştir (Anastas ve ark., 2012). Dolayısıyla NOS1AP hücre bölünmesini baskılıyor ancak hücre mobilitesinin erken evrelerini tetikliyor olabilir. Elde ettiğimiz

bulgular bu veri ile örtüşmektedir fakat NOS1AP'nin metastatik potansiyel açısından değerlendirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ekspresyon analizlerimizde, NOS1AP'nin sağlıklı dokulara göre yalnız HER2 pozitif olan HER2 ve luminal B alt tiplerde anlamlı farklılık göstermesinin, NOS1AP ile HER2 reseptörü veya onkogeni arasında bir ilişki olabileceğini düşündürür. HER2 alt tipinde tümör baskılayıcı rolüne işaret ettiğimiz NOS1AP, sağlıklı dokularda CDH1 (r=0,777) ve TEAD2 (0,524) ile korelasyon gösterir fakat bu korelasyon HER2 alt tipinde bozulur (Şekil 45). Ayrıca HER2 tip tümörlerde NOS1AP, incelediğimiz genlerden hiçbiri ile korelasyon göstermemiştir, bu sonuçlar, HER2 geninin NOS1AP'nin korele olduğu genler ile ilişkisinin bozulmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. TNMplot veri tabanında, meme kanserinde NOS1AP ve HER2 genleri arasında anlamlı ve çok düşük negatif korelasyon gözlemledik. Bu bulgu, öngörümüzü destekler niteliktedir fakat HER2 ve NOS1AP arasındaki ilişkiye yönelik ileri analizlere ihtiyaç vardır.

Alt tipler açısından değerlendirdiğimizde NOS1AP ile belirgin şekilde korelasyon gösteren genler vardır. NOS1AP'nin sağlıklı dokularda CDH1, TAZ, SCRİBBLE, YAP1 ve TEAD2 ile korelasyonu ve tümör alt tiplerinde CDH1, YAP1 ve TEAD2 genleri ile korelasyonu göze çarpar (Şekil 44, 45, 46 ve 47). NOS1AP'nin hem sağlıklı hem meme kanseri alt tiplerinde Hippo yolağı komponentleri YAP1, TAZ ve Hippo yolağı ile ilişkili TEAD2, SCRİBBLE genleri ile arasındaki korelasyon, meme kanserinde ve meme kanseri alt tiplerinde NOS1AP'nin Hippo sinyal yolağı ilişkili olabileceğini gösterir.

NOS1AP, SCRIBBLE ve VANGL1 proteinleri ile aynı komplekste yer alır ve meme kanseri hücrelerinin polaritesini, göçünü ve büyümesini modüle eder. Daha önce de belirttiğimiz gibi, literatürde NOS1Ap proteininin meme kanserinde tümör baskılayıcı ve tümör tetikleyici olduğuna dair bir paradoks vardır (Anastas ve ark., 2012). Elde ettiğimiz bulgular, meme kanserinde NOS1AP'nin rolünü ilk kez ortaya koyan Anastas ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir.

Meme kanseri hücrelerinde, NOS1AP-SCRİBBLE-VANGL1 proteinleri hücresel çıkıntılarda birlikte lokalize olur fakat sağlıklı meme hücrelerinde NOS1AP bu kompleksteki proteinlerden farklı olarak sitozolde lokalize olur (Anastas ve ark., 2012). NOS1AP ve SCRIBBLE, sağlıklı dokularda birlikte lokalize değil iken meme kanseri dokularında birlikte aynı komplekste yer alır. Çalışmamız protein düzeyinde ve lokalizasyon analizine yönelik bir çalışma değildir fakat bu iki gen arasında elde ettiğimiz korelasyon bulguları da literatüre katkı sunacaktır. Sağlıklı dokularda bu genler arasında gözlenen pozitif korelasyonun luminal tip meme kanserlerinde tamamen bozulduğunu gözlemledik (Şekil 46 ve 47). Bu sonuç, bu genler arasındaki korelasyonun kanserden etkilenebileceğine, ya da bu iki gen arasındaki ilişkinin bozulmasının karsinogeneze katkıda bulunabileceğini, bu iki genin benzer sinyal yolaklarında rol alabileceğini ve benzer transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenebileceğini düşündürür.

Luminal gruplarda NOS1AP'nin hem SCRIBBLE hem de TAZ ile arasındaki korelasyonun bozulması, SCRIBBLE ve TAZ genleri arasında da bir etkileşimin var olup olmadığını akıllara getirir. SCRIBBLE; YAP/TAZ, MST1/2 ve LATS1/2 proteinlerini, LKB1 ve PAR-1 kinazlarını aşağı yönde tutan büyük bir iskele proteinidir (Mohseni ve ark., 2014) ve epitelyal meme kanseri hücrelerinde TAZ inhibisyonuna yol açan Hippo yolağının yukarısında yer alan bir aktivatördür. (Cordenonsi ve ark., 2011). Çalışmamızda da sağlıklı ve meme kanseri alt tiplerinde TAZ ve SCRİBBLE arasında da anlamlı bir korelasyon saptayacağımızı ummuştuk fakat bu iki gen arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlemedik. İskele proteini SCRIBBLE ile NOS1AP, YAP/TAZ arasındaki ilişkinin incelenmesi için ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

NOS1AP'nin PTB alanı ile SCRIBLLE'nin dördüncü PDZ alanı arasında doğrudan bir etkileşim vardır ve bu proteinler dendritlerde birlikte lokalize olur (Richier ve ark., 2010). Nöronal ağda birbiriyle ilişkili olan bu iki genin tüm sağlıklı dokularda korelasyon göstermezken luminal tip meme kanseri hastalarının komşu sağlıklı dokularında pozitif korelasyon göstermesi de dikkat çekici bir noktadır.

NOS1AP ile Hippo sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma, sıçan beyni cDNA'sından amplifiye edilen ve PTB domainine sahip NOS1AP izoformlarının hem SCRIBBLE hem de YAP ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Örneğin, HEK293T hücre hattında SCRIBBLE antikorları, NOS1APa, -c, -d ve -e izoformlarını çökeltir fakat beklendiği gibi NOS1APf ile ilişkili değildir çünkü bu izoform PTB alanından yoksundur. Burada, NOS1AP'nin çoklu izoform yapılarından kaynaklanan farklılıktan dolayı etkileşime gireceği proteinlerin de değişebileceği öngörülmektedir (Clattenburg ve ark., 2015). Bu nedenle meme kanserinde de NOS1AP izoform domainlerine yönelik gerçekleştirilecek çalışmalara, bu domainler özelindeki korelasyon bulgularına ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca sıçan beyninden izole edilen NOS1AP izoformları ile SCRIBBLE arasında gözlenen bu ilişki, çalışmamızda luminal tip meme kanseri hastalarının sağlıklı dokularında NOS1AP ve SCRİBBLE arasında gözlemlediğimiz korelasyonu da kısmen açıklayabilir.

SCRIBBLE proteini YAP proteini ile birlikte çöker (Clattenburg ve ark., 2015). Çalışmamızda, sağlıklı dokularda SCRIBBLE ve YAP arasında gözlemlediğimiz orta düzey korelasyonun luminal B alt tipinde kaybolduğunu gözlemledik (Ek Tablo 1.4) Bu bulgumuz SCRIBBLE ve YAP arasındaki ilişkinin nöronal sinyal ağı dışında kanser çalışmalarınında da incelenmesine kapı aralar.

YAP ile etkileşime girebilen birden fazla NOS1AP izoformu tespit edilmiştir. HEK293T hücre hattında, NOS1AP'nin susturulması YAP ve Lats1 fosforilasyonunu azaltır iken NOS1AP aşırı ekspresyonu YAP ve Lats1 fosforilasyonunu destekler ve çekirdeğe lokalize YAP miktarında ve YAP'nin TEAD'i aktive etme yeteneğinde bir azalmaya yol açar (Clattenburg ve ark., 2015). NOS1Apa izorformu eksprese eden MCF7 hücrelerinde serum varlığında ve yokluğunda proliferasyonda bir azalma görülür. Bu çalışmada NOS1AP ve YAP arasında doğrudan bir bağlantı olduğu saptanamamış ve NOS1AP proteinlerinin YAP ile doğrudan ilişkili olmasının pek olası olmadığı belirtilmiştir. NOS1AP'nin PTB alanı aracılığıyla Hippo sinyal işlevleri üzerindeki etkisinin SCRİBBLE'den kaynaklı olabileceği, NOS1AP ve YAP arasındaki etkileşim için diğer proteinlerin gerekli olabileceği bildirilmiştir Clattenburg ve ark., 2015). Çalışmamızda yalnızca bazal ve luminal A alt tiplerinde

bu iki gen arasında pozitif korelasyon olduğunu saptadık (Şekil 44 ve 47). Bu iki genin arasındaki ilişkinin aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, NOS1AP geninin susturulduğu hücreler kontrollerine kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla koloni oluşturur. Bu çalışma meme kanserinde NOS1AP'nin tümör baskılayıcı rolünün ilk kez bahsedildiği çalışmadır (Anastas ve ark., 2012). Bu sonuçlar, NOS1AP'nin HER2 alt tipinde tümör baskılayıcı role sahip olduğuna yönelik değerlendirmemiz ile uyumluluk gösterir. Clattenburg ve arkadaşlarının bulguları da dikkate alındığında meme kanserindeki NOS1AP izoformlarının ve bu izoformların PTB ve PDZ domainlerinin tanımlanması Hippo yolağında NOS1AP ile ilişkili proteinlerin tanımlanması açısından fayda sağlayacaktır.

Araştırmalarımıza göre bu tez çalışması, primer meme kanseri/meme kanseri alt tiplerinde NOS1AP'nin Hippo sinyal yolağı ve EMT ile arasındaki ilişkiye ilk kez ışık tuttu. Çalışmamız, literatürde nöronal sinyal ağı üzerindeki rolüne yoğunlaşılmış NOS1AP/CAPON'un meme kanserinde incelendiği ilk çalışmalardandır. Bu tez çalışması, literatürde bir paradoks olarak geçen NOS1AP geninin hem tümör baskılayıcı hem de tetikleyici olması durumunun kanserin moleküler alt tipine göre şekillenebileceğini göstermiştir. Bu durum kanser-gen çalışmalarında moleküler alt tiplendirmenin kıymetine yeniden dikkat çeker. Sonuçlarımız, NOS1AP'nin HER2 ve luminal B alt tip meme kanserleri için aday biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. HER2 alt tipinde düşük ve luminal B alt tipinde yüksek olması NOS1AP'nin HER2 alt tipe özel tümör baskılayıcı ve luminal B alt tipe özel onkogen rolüne sahip olabileceğine işaret etmiştir. NOS1AP ve CDH1'in sağlıklı dokulara kıyasla luminal B alt tipinde yüksek ekspresyon göstermesi bu iki genin onkogenik fonksiyonlarının olabileceğini göstermiştir. NOS1AP ve CDH1 arasında pozitif korelasyon olması meme kanserinde bu iki genin birlikteliğinin önemli olabileceğini düşündürmüştür. NOS1AP ve Hippo yolağına ilişkin elde ettiğimiz korelasyon bulguları ise nöronal ağda olduğu gibi meme kanserinde de Hippo yolağı ile NOS1AP arasında ilişki olabileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında RT-PCR yöntemi kullanarak mRNA düzeyinde incelediğimiz genlerin protein seviyesinde incelenmesi, fosforilasyon ve hücre içi lokalizasyonlarının da dikkate alınarak, farklı izoformların dahil edildiği deneyler planlanması yerinde olacaktır. Ayrıca hem farklı moleküler alt tiplerin hem de primer ve metastatik kanserlerin bir arada değerlendirilmesi bu proteinlerin kanser evresi ve türüne özgü etkilerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. In vitro deneyler tasarlanarak NOS1AP'nin hücre polarizasyonundaki rolüne yönelik araştırmalar yapılması, hücre polaritesiyle ilişkili Hippo yolağının NOS1AP ile birlikte hücresel fonksiyonunun ortaya çıkarılması için büyük önem taşımaktadır. Elde ettiğimiz bulgular NOS1AP dolayısıyla Hippo sinyal yolağının karsinogenezde yer aldığını düşündürmektedir, bu yolağın farklı kanser tiplerinde ileri analizleri ile yeni belirteçler veya yeni tedavi hedefleri belirlenebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the Epithelial–Mesenchymal Transition. *EMBO Rep*. 2008;9(4):322.
2. Akrida I, Bravou V, Papadaki H. The deadly cross-talk between Hippo pathway and epithelial–mesenchymal transition (EMT) in cancer. *Mol Biol Rep*. 2022;49(10):10065-10076.
3. Alvarez H, Corvalan A, Roa JC, et al. Serial Analysis of Gene Expression Identifies Connective Tissue Growth Factor Expression as a Prognostic Biomarker in Gallbladder Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(9):2631-2638.
4. Alzahrani F, Clattenburg L, Muruganandan S, et al. The Hippo component YAP localizes in the nucleus of human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2017;46(1):1-7.
5. Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene*. 2012;31(32):3696.
6. Ansari D, Ohlsson H, Althini C, et al. The Hippo Signaling Pathway in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. 2019;39(7):3317-3321.
7. Arnott JA, Lambi AG, Mundy C, et al. The Role of Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) in Skeletogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011;21(1):43.
8. Azbazdar Y, Karabicici M, Erdal E, Ozhan G. Regulation of Wnt Signaling Pathways at the Plasma Membrane and Their Misregulation in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:17.
9. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, plasticity and tumor metastasis. *Trends Cell Biol*. 2020;30(10):764.
10. Beyer TA, Weiss A, Khomchuk Y, et al. Switch Enhancers Interpret TGF-β and Hippo Signaling to Control Cell Fate in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Rep*. 2013;5(6):1611-1624.
11. Boopathy GTK, Hong W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(APR):49.

12. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*. 1991;114(6):1285.
13. Brzustowicz LM. NOS1AP in Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 2008;10(2):158.
14. Brzustowicz LM, Simone J, Mohseni P, et al. Linkage Disequilibrium Mapping of Schizophrenia Susceptibility to the CAPON Region of Chromosome 1q22. *Am J Hum Genet*. 2004;74(5):1057.
15. Bulzico D, Pires BRB, de Faria PAS, Neto LV, Abdelhay E. Twist1 Correlates With Epithelial-Mesenchymal Transition Markers Fibronectin and Vimentin in Adrenocortical Tumors. *Anticancer Res*. 2019;39(1):173-175.
16. Cai X, Wang KC, Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in Cellular Homeostasis and Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:1333.
17. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, et al. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology*. 2007;17(23):2054-2060.
18. Cao L, Sun PL, Yao M, Jia M, Gao H. Expression of YES-associated protein (YAP) and its clinical significance in breast cancer tissues. *Hum Pathol*. 2017;68:166-174.
19. Cha YJ, Bae SJ, Kim D, et al. High Nuclear Expression of Yes-Associated Protein 1 Correlates With Metastasis in Patients With Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:609743.
20. Chen G, Xie J, Huang P, Yang Z. Overexpression of TAZ promotes cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2016;12(3):1821.
21. Chen YA, Lu CY, Cheng TY, Pan SH, Chen HF, Chang NS. WW domain-containing proteins YAP and TAZ in the hippo pathway as key regulators in stemness maintenance, tissue homeostasis, and tumorigenesis. *Front Oncol*. 2019;9(FEB):60.
22. Chen Z, Zhang N, Chu HY, et al. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:1239.
23. Cherrett C, Furutani-Seiki M, Bagby S. The Hippo pathway: Key interaction and catalytic domains in organ growth control, stem cell self-renewal and tissue regeneration. *Essays Biochem*. 2012;53(1):111-127.

24. Clattenburg L, Wigerius M, Qi J, et al. NOS1AP Functionally Associates with YAP To Regulate Hippo Signaling. *Mol Cell Biol*. 2015;35(13):2265.
25. Cominetti MR, Altei WF, Selistre-De-araujo HS. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation . *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2019;11:165-178.
26. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*. 2011;147(4):759-772.
27. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: Identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*. 1989;59(1):45-54.
28. Courtney MJ, Li LL, Lai YY. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(AUG):252.
29. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*. 2017;8(16):3131.
30. Dasgupta I, McCollum D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J Biol Chem*. 2019;294(46):17693.
31. Deng H, Wang W, Yu J, Zheng Y, Qing Y, Pan D. Spectrin regulates Hippo signaling by modulating cortical actomyosin activity. *Elife*. 2015;4(4).
32. deRan M, Yang J, Shen CH, et al. Energy Stress Regulates Hippo–YAP Signaling involving AMPK-mediated Regulation of Angiomotin Like-1 Protein. *Cell Rep*. 2014;9(2):495.
33. Diepenbruck M, Waldmeier L, Ivanek R, et al. Tead2 expression levels control the subcellular distribution of yap and taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2014;127(7):1523-1536.
34. Duffy MJ, Walsh S, McDermott EW, Crown J. Biomarkers in Breast Cancer: Where Are We and Where Are We Going? *Adv Clin Chem*. 2015;71:1-23.
35. Duggan C, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer*. 1995;61(5):597-600.
36. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature 2011 474:7350*. 2011;474(7350):179-183.

37. Fan R, Kim NG, Gumbiner BM. Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(7):2569-2574.
38. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, et al. TGF-β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*. 2012;209(3):479.
39. Gao S, Wang J, Zhang T, et al. Low Expression of CAPON in Glioma Contributes to Cell Proliferation via the Akt Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
40. Guo L, Teng L. YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review). *Int J Oncol*. 2015;46(4):1444-1452.
41. Hadzimichalis NM, Previtera ML, Moreau MP, et al. NOS1AP protein levels are altered in BA46 and cerebellum of patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010;124(1-3):248-250.
42. Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med*. 2019;17(1).
43. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer 2013 13:4*. 2013;13(4):246-257.
44. Hashimoto S, Matsuba Y, Kamano N, et al. Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. *Nat Commun*. 2019;10(1).
45. Hata A, Chen YG. TGF-β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9).
46. Hay ED. An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Cells Tissues Organs*. 1995;154(1):8-20.
47. Hiemer SE, Szymaniak AD, Varelas X. The Transcriptional Regulators TAZ and YAP Direct Transforming Growth Factor β-induced Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2014;289(19):13461.
48. Huang C, Yuan W, Lai C, et al. EphA2-to-YAP pathway drives gastric cancer growth and therapy resistance. *Int J Cancer*. 2020;146(7):1937-1949.
49. Huang F, Chen YG. Regulation of TGF-β receptor activity. *Cell Biosci*. 2012;2(1):1-10.

50. Inoue M, Sawada T, Uchima Y, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene transfection inhibits the liver metastasis of pancreatic cancer by preventing angiogenesis. *Oncol Rep*. 2005;14(6):1445-1451.
51. Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJL, Cohen NA, Snyder SH. CAPON: A Protein Associated with Neuronal Nitric Oxide Synthase that Regulates Its Interactions with PSD95. *Neuron*. 1998;20(1):115-124.
52. James CR, Quinn JE, Mullan PB, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1, a Potential Predictive Biomarker in the Treatment of Breast Cancer. *Oncologist*. 2007;12(2):142-150.
53. Jho E. Dual role of YAP: oncoprotein and tumor suppressor. *J Thorac Dis*. 2018;10(Suppl 33):S3895.
54. Jiao S, Wang H, Shi Z, et al. A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 2014;25(2):166-180.
55. JIANG L, LI J, ZHANG C, SHANG Y, LIN J. YAP-mediated crosstalk between the Wnt and Hippo signaling pathways (Review). *Mol Med Rep*. 2020;22(5):4101-4106.
56. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery 2013 13:1*. 2013;13(1):63-79.
57. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2018;1870(2):151-157.
58. Jolly MK, Somarelli JA, Sheth M, et al. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacol Ther*. 2019;194:161-184.
59. Jones RL, Constantinidou A, Reis-Filho JS. Molecular Classification of Breast Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2012;5(3):701-717.
60. Jørgensen CLT, Forsare C, Bendahl PO, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers and phenotypes during breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;181(2):369-381.
61. Juliano RL. Addressing cancer signal transduction pathways with antisense and siRNA oligonucleotides. *NAR Cancer*. 2020;2(3).

62. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*. 1995;9(5):534-546.
63. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420.
64. Kapil S, Sharma BK, Patil M, et al. The cell polarity protein Scrib functions as a tumor suppressor in liver cancer. *Oncotarget*. 2017;8(16):26515-26531.
65. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, et al. Promoter Hypermethylation Contributes to Frequent Inactivation of a Putative Conditional Tumor Suppressor Gene Connective Tissue Growth Factor in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2007;67(15):7095-7105.
66. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(29):11930-11935.
67. Kim SY, Park SY, Jang HS, Park YD, Kee SH. Yes-associated protein is required for zo-1-mediated tight-junction integrity and cell migration in e-cadherin-restored ags gastric cancer cells. *Biomedicines*. 2021;9(9).
68. Kim W, Jho EH. The history and regulatory mechanism of the Hippo pathway. *BMB Rep*. 2018;51(3):106.
69. Kubala MH, DeClerck YA. The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Paradox in Cancer: A Mechanistic Understanding. *Cancer Metastasis Rev*. 2019;38(3):483.
70. Lai D, Ho KC, Hao Y, Yang X. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res*. 2011;71(7):2728-2738.
71. Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):E2441.
72. Lambi AG, Pankratz TL, Mundy C, et al. The Skeletal Site-Specific Role of Connective Tissue Growth Factor in Prenatal Osteogenesis. *Dev Dyn*. 2012;241(12):1944.
73. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014 15:3*. 2014;15(3):178-196.

74. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*. 2006;172(7):973-981.
75. Lee KA, Nelson CM. New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis. *undefined*. 2012;294:171-221.
76. Li N, Feng Y, Hu Y, et al. Helicobacter pylori CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1).
77. Li YW, Xu J, Zhu GY, et al. Apigenin suppresses the stem cell-like properties of triple-negative breast cancer cells by inhibiting YAP/TAZ activity. *Cell Death Discov*. 2018;4(1):105.
78. Liang D, Song Y, Fan G, et al. Effects of Long Form of CAPON Overexpression on Glioma Cell Proliferation are Dependent on AKT/mTOR/P53 Signaling. *Int J Med Sci*. 2019;16(4):614.
79. Liao C, Wang Q, An J, et al. Partial EMT in Squamous Cell Carcinoma: A Snapshot. *Int J Biol Sci*. 2021;17(12):3036-3047.
80. Liao TT, Yang MH. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells*. 2020;9(3).
81. Lin E, Kuo PH, Liu YL, Yang AC, Tsai SJ. Transforming growth factor-β signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population. *Scientific Reports 2017 7:1*. 2017;7(1):1-8.
82. Liu F, Lagares D, Choi KM, et al. Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis: Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344.
83. Liu H, Du S, Lei T, et al. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review). *Oncol Rep*. 2018;40(1):16-28.
84. Liu Q, Liu X, Song G. The Hippo Pathway: A Master Regulatory Network Important in Cancer. *Cells 2021, Vol 10, Page 1416*. 2021;10(6):1416.
85. Liu Y, Lu J, Zhang Z, et al. Amlexanox, a selective inhibitor of IKBKE, generates anti-tumoral effects by disrupting the Hippo pathway in human glioblastoma cell lines. *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e3022.

86. Luo T, Wang L, Wu P, et al. Downregulated vimentin and upregulated E-cadherin in T1 stage non-small-cell lung cancer: Does it suggest a mesenchymal-epithelial transition? *Neoplasma*. 2017;64(5):693-699.
87. Ma C, Wang F, Han B, et al. SALL1 functions as a tumor suppressor in breast cancer by regulating cancer cell senescence and metastasis through the NuRD complex. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1-21.
88. Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:577-604.
89. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955.
90. Malik SA, Khan MS, Dar M, et al. Molecular Alterations and Expression Dynamics of LATS1 and LATS2 Genes in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Pathology and Oncology Research*. 2018;24(2):207-214.
91. Marquard S, Thomann S, Weiler SME, et al. Yes-associated protein (YAP) induces a secretome phenotype and transcriptionally regulates plasminogen activator Inhibitor-1 (PAI-1) expression in hepatocarcinogenesis. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1).
92. Maugeri-Saccà M, Barba M, Pizzuti L, et al. The Hippo transducers TAZ and YAP in breast cancer: oncogenic activities and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2015;17.
93. Meng J, Chen S, Han JX, et al. Twist1 Regulates Vimentin through Cul2 Circular RNA to Promote EMT in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2018;78(15):4150-4162.
94. Miller E, Yang J, Deran M, et al. Identification of Serum-Derived Sphingosine-1-Phosphate as a Small Molecule Regulator of YAP. *Chem Biol*. 2012;19(8):955-962.
95. Mogre S, Makani V, Pradhan S, et al. Biomarker Potential of Vimentin in Oral Cancers. *Life 2022, Vol 12, Page 150*. 2022;12(2):150.
96. Mohseni M, Sun J, Lau A, et al. A genetic screen identifies an LKB1/PAR1 signaling axis controlling the Hippo/YAP pathway. *Nat Cell Biol*. 2014;16(1):108.
97. Moon S, Yeon Park S, Woo Park H. Regulation of the Hippo pathway in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences 2018 75:13*. 2018;75(13):2303-2319.

98. Moya IM, Halder G. Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2018 20:4*. 2018;20(4):211-226.
99. Mundy C, Gannon M, Popoff SN. Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) Negatively Regulates BMP-2 Induced Osteoblast Differentiation and Signaling. *J Cell Physiol*. 2014;229(5):672.
100. Myal Y, Leygue E, Blanchard AA. Claudin 1 in Breast Tumorigenesis: Revelation of a Possible Novel "Claudin High" Subset of Breast Cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.
101. Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal–epithelial transition in endometrial function. *Hum Reprod Update*. 2019;25(1):114-133.
102. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2019;29(3):212-226.
103. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature 2018 556:7702*. 2018;556(7702):463-468.
104. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature 2000 406:6797*. 2000;406(6797):747-752.
105. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res*. 2015;75(15):2969.
106. Proestling K, Birner P, Gamperl S, et al. Enhanced epithelial to mesenchymal transition (EMT) and upregulated MYC in ectopic lesions contribute independently to endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(1):1-11.
107. Puglisi S, Vancheri C. Pathobiology of Novel Approaches to Treatment. *Interstitial Lung Disease*. Published online 2018:25-37.
108. Puram S v., Tirosh I, Parikh AS, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*. 2017;171(7):1611-1624.e24.
109. Qadir J, Riaz SK, Taj K, et al. Increased YAP1 expression is significantly associated with breast cancer progression, metastasis and poor survival.
110. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*. 2020;13(6).

111. Richier L, Williton K, Clattenburg L, et al. NOS1AP Associates with Scribble and Regulates Dendritic Spine Development. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(13):4796.
112. Safadi FF, Xu J, Smock SL, et al. Expression of connective tissue growth factor in bone: Its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Cell Physiol*. 2003;196(1):51-62.
113. Sahasrabuddhe AA, Rolland DCM, Banerjee PP. SIGNALING PATHWAYS AS BIOMARKERS. *Biomark Cancer*. 2015;7(Suppl 2):33.
114. Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol Oncol*. 2013;7(2):283-296.
115. Sebio A, Lenz HJ. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5002.
116. Shen Y, Liu H, Gu S, Wei Z, Liu H. The role of capon in multiple myeloma. *Tumor Biology*. 2017;39(7):1-9.
117. Shen YW, Zhou YD, Chen HZ, Luan X, Zhang WD. Targeting CTGF in Cancer: An Emerging Therapeutic Opportunity. *Trends Cancer*. 2021;7(6):511-524.
118. Siew WC, Chun JL, Guo K, et al. A Role for TAZ in Migration, Invasion, and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2008;68(8):2592-2598.
119. Sinha D, Saha P, Samanta A, Bishayee A. Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. *Biomolecules*. 2020;10(11):1-22.
120. Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2012;18(7):601.
121. Snigdha K, Gangwani KS, Lapalikar GV, Singh A, Kango-Singh M. Hippo signaling in cancer: Lessons from Drosophila models. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(May):85.
122. Stephens R, Lim K, Portela M, Kvansakul M, Humbert PO, Richardson HE. The Scribble Cell Polarity Module in the Regulation of Cell Signaling in Tissue Development and Tumorigenesis. *J Mol Biol*. 2018;430(19):3585-3612.
123. Sulaiman A, Yao Z, Wang L. Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression. *J Biomed Res*. 2018;32(2):81.
124. Sun H, Ying M. Abstract 4444: Small molecule drug Verteporfin inhibits TAZ/YAP-driven signaling and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2015;75(15_Supplement):4444-4444.

125. Sun K, Zhang X de, Liu XY, Lu P. YAP1 is a Prognostic Biomarker and Correlated with Immune Cell Infiltration in Pancreatic Cancer. *Front Mol Biosci*. 2021;8:504.
126. Sun Z, Xu R, Li X, et al. Prognostic Value of Yes-Associated Protein 1 (YAP1) in Various Cancers: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135119.
127. Theys J, Jutten B, Habets R, et al. E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. *Radiotherapy and Oncology*. 2011;99(3):392-397.
128. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature Cell Biology 2003 5:10*. 2003;5(10):914-920.
129. Upadhyay AK, Shukla S. Analysis of COVID-19 Case Fatality Rates in the States and Union Territories of India. Published online October 14, 2020.
130. Varelas X, Miller BW, Sopko R, et al. The Hippo Pathway Regulates Wnt/β-Catenin Signaling. *Dev Cell*. 2010;18(4):579-591.
131. Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, et al. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature Cell Biology 2008 10:7*. 2008;10(7):837-848.
132. Wang J, Jin L, Zhu Y, Zhou X, Yu R, Gao S. Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases. *Brain Res Bull*. 2016;125:99-105.
133. Wang M, Dai M, Wang D, Xiong W, Zeng Z, Guo C. The regulatory networks of the Hippo signaling pathway in cancer development. *J Cancer*. 2021;12(20):6216.
134. Wang Y, Liu J, Ying X, Lin PC, Zhou BP. Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Sci Rep*. 2016;6.
135. Wang Y, Nie H, Li H, et al. The Hippo Pathway Effector Transcriptional Co-activator With PDZ-Binding Motif Correlates With Clinical Prognosis and Immune Infiltration in Colorectal Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:2009.
136. Warren JSA, Xiao Y, Lamar JM. YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(4).
137. Wei C, Wang Y, Li X. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. *Onco Targets Ther*. 2018;11:2185.

138. Wierzbicki PM, Rybarczyk A. The Hippo pathway in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(2):105-119.
139. Wu L, Yang X. Targeting the Hippo Pathway for Breast Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11).
140. Xiao Y, Dong J. The Hippo Signaling Pathway in Cancer: A Cell Cycle Perspective. *Cancers (Basel)*. 2021;13(24).
141. Xie, D., Chen, Y., Wan, X., Li, J., Pei, Q., Luo, Y., Liu, J., & Ye, T. (2022). The Potential Role of CDH1 as an Oncogene Combined With Related miRNAs and Their Diagnostic Value in Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *13*.
142. Xu B, Wratten N, Charych EI, Buyske S, Firestein BL, Brzustowicz LM. Increased Expression in Dorsolateral Prefrontal Cortex of CAPON in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *PLoS Med*. 2005;2(10):e263.
143. Xu J, Zhang W, Tang L, Chen W, Guan X. Epithelial-mesenchymal transition induced PAI-1 is associated with prognosis of triple-negative breast cancer patients. *Gene*. 2018;670:7-14.
144. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*. 1995;121(4):1053-1063.
145. Yamashita N, Tokunaga E, Iimori M, et al. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(5):e1003-e1009.
146. Yang K, Wang X, Zhang H, et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Laboratory Investigation 2016 96:2*. 2015;96(2):116-136.
147. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
148. Yeung KT, Yang J. Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017;11(1):28.
149. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*. 2015;163(4):811.
150. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*. 2012;150(4):780-791.

151. Yuan M, Tomlinson V, Lara R, et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. *Cell Death & Differentiation 2008 15:11*. 2008;15(11):1752-1759.
152. Yuan Y, Li D, Li H, Wang L, Tian G, Dong Y. YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):237-242.
153. Yuen HF, McCrudden CM, Huang YH, et al. TAZ Expression as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):54211.
154. Zhang H, Liu CY, Zha ZY, et al. TEAD Transcription Factors Mediate the Function of TAZ in Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13355.
155. Zhang W, Xu J, Fang H, et al. Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis via PAI-1 and CCL5 signaling. *FASEB Journal*. 2018;32(1):276-288.
156. Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L. Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *International braz j urol*. 2014;40(2):179-189.
157. Zhou D, Zhang Y, Wu H, et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):E1312.
158. Zhu LJ, Li TY, Luo CX, et al. CAPON-nNOS coupling can serve as a target for developing new anxiolytics. *Nature Medicine 2014 20:9*. 2014;20(9):1050-1054.

9. EKLER

Ek 1: Sağlıklı-Meme kanseri alt tip gruplarında korelasyon analizi

Ek Tablo 1: Sağlıklı-Bazal alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı	CDH1	TAZ	YAP1	SCRİB	CTGF	TEAD2	VIM	**Bazal Kanser**	CDH1	TAZ	YAP1	SCRİB	CTGF	TEAD2	VIM
NOS1AP	r=0,806 p=0,001		p>0,05			p>0,05		***NOS1AP***	r=0,626 p=0,022		r=0,649 p=0,016			r=0,742 p=0,004	
CDH1			p>0,05			p>0,05		CDH1			r=0,553 p=0,050			r=0,852 p=0,000	
TAZ					r=0,553 p=0,050	r=0,686 p=0,010	r=0,559 p=0,047	TAZ					p>0,05	p>0,05	r=0,583 p=0,036
YAP1	p>0,05					r=0,667 p=0,013	p>0,05	YAP1	r=0,553 p=0,050					r=0,586 p=0,035	r=0,613 p=0,026
TWIST1		r=0,594 p=0,032		r=0,609 p=0,027	r=0,730 p=0,005		r=0,941 p=0,000	TWIST1		p>0,05		p>0,05	p>0,05		p>0,05
SCRİB						r=0,650 p=0,016		SCRİB						r=0,610 p=0,027	
CTGF		r=0,553 p=0,050					r=0,678 p=0,011	CTGF		p>0,05					p>0,05

Sarı renkli kutular, güçlü korelasyonu, yeşil renkli kutular orta düzey korelasonu ve açık turuncu renkli kutular zayıf korelasyonu ifade eder. Beyaz renkli kutuların karşı geldiği genler arasında korelasyon gözlenmez. p>0,05 yazan kutuların karşı geldiği genler arasında da korelasyon gözlenmez fakat karşı geldiği sağlıklı veya kanser grubunda o genler arasında korelasyon gözlemlendiği için bu farklı ortaya koymak adına bu şekilde ifade edildi.

Ek Tablo 2:Sağlıklı-HER2 alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı	CTGF	PAI1	CDH1	TEAD2	VIM	**HER2 Kanser**	CTGF	PAI1	CDH1	TEAD2	VIM
NOS1AP			r=0,777 p=0,001	r=0,524 p=0,045		***NOS1AP***			p>0,05	p>0,05	
TAZ	r=0,642 P=0,010					TAZ	r=0,556 p=0,031				
TWIST1	r=0,545 p=0,036	r=0,621 p=0,014	r=- 0,538 p=0,039		r=0,685 p=0,005	TWIST1	r=0,825 p=0,000	r=0,847 p=0,000	p>0,05		r=0,822 p=0,000
SCRİB				r=0,694 p=0,004	r=0,646 p=0,009	SCRİB				p>0,05	p>0,05
PAI1	p>0,05			r=0,536 p=0,039	p>0,05	PAI1	r=0,804 p=0,000			p>0,05	r=0,771 p=0,001
VIM	p>0,05	p>0,05				VIM	r=0,694 p=0,004	r=0,771 p=0,001			

Sarı renkli kutular, güçlü korelasyonu, yeşil renkli kutular orta düzey korelasonu ve açık turuncu renkli kutular zayıf korelasyonu ifade eder. Beyaz renkli kutuların karşı geldiği genler arasında korelasyon gözlenmez. p>0,05 yazan kutuların karşı geldiği genler arasında da korelasyon gözlenmez fakat karşı geldiği sağlıklı veya kanser grubunda o genler arasında korelasyon gözlemlendiği için bu farklı ortaya koymak adına bu şekilde ifade edildi.

Ek Tablo 3: Sağlıklı-Luminal A alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı	***NOS1AP***	TWIST1	TAZ	CTGF	PAI1	YAP1	TEAD2	**Luminal A Kanser**	***NOS1AP***	TWIST1	TAZ	CTGF	PAI1	YAP1	TEAD2
SCRİB	r=0,737 p=0,000						r=0,485 p=0,030	SCRİB	p>0,05						p>0,05
CDH1	r=0,569 p=0,009							CDH1	r=0,698 p=0,001						
TAZ	r=0,456 p=0,043	p>0,05		p>0,05		r=0,766 p=0,000		TAZ	p>0,05	r=0,628 p=0,003		r=0,837 p=0,000	r=0,672 p=0,001		r=0,536 p=0,015
CTGF		r=0,481 p=0,032	p>0,05		r=0,670 p=0,001			CTGF		r=0,699 p=0,001	r=0,837 p=0,000		r=0,830 p=0,000		
PAI1		p>0,05	p>0,05	r=0,670 p=0,001				PAI1		r=0,617 p=0,004	r=0,672 p=0,001	r=0,830 p=0,000			
VIM		r=0,624 p=0,003	p>0,05	p>0,05	p>0,05	r=0,544 p=0,013		VIM		r=0,793 p=0,000	r=0,740 p=0,000	r=0,686 p=0,001	r=0,727 p=0,001	p>0,05	
YAP1			r=0,766 p=0,000					YAP1	r=0,463 p=0,040		p>0,05				r=0,474 p=0,035
TEAD2								TEAD2	r=0,585 p=0,007					r=0,474 p=0,035	

Sarı renkli kutular, güçlü korelasyonu, yeşil renkli kutular orta düzey korelasonu ve açık turuncu renkli kutular zayıf korelasyonu ifade eder. Beyaz renkli kutuların karşı geldiği genler arasında korelasyon gözlenmez. p>0,05 yazan kutuların karşı geldiği genler arasında da korelasyon gözlenmez fakat karşı geldiği sağlıklı veya kanser grubunda o genler arasında korelasyon gözlemlendiği için bu farklı ortaya koymak adına bu şekilde ifade edildi.

Ek Tablo 4:Sağlıklı-Luminal B alt tip meme kanseri gruplarında korelasyon analizi

Sağlıklı	SCRİB	TAZ	PAI1	YAP1	VIM	CDH1	TWIST1	**Luminal B Kanser**	SCRİB	TAZ	PAI1	YAP1	VIM	CDH1	TWIST1
NOS1AP	r=0,709 p=0,001	r=0,658 p=0,002		r=0,681 p=0,001		r=0,480 p=0,037		***NOS1AP***	p>0,05	p>0,05		r=0,528 p=0,020		r=0,496 p=0,031	
CDH1	p>0,05	r=0,777 p=0,000					p>0,05	CDH1	r=0,464 p=0,045	p>0,05					r=0,471 p=0,042
TWIST1				r=0,594 p=0,007	r=0,670 p=0,002			TWIST1					p>0,05	r=0,471 p=0,042	
TAZ				r=0,480 p=0,038	p>0,05	r=0,777 p=0,000		TAZ				r=0,621 p=0,005	r=0,618 p=0,005	p>0,05	
YAP1	r=0,483 p=0,036	r=0,480 p=0,038			r=0,709 p=0,001		r=0,594 p=0,007	YAP1	p>0,05	r=0,621 p=0,005			r=0,606 p=0,006		p>0,05
CTGF			p>0,05					CTGF			r=0,636 p=0,003				
TEAD2					r=0,542 p=0,017		r=0,554 p=0,014	TEAD2					p>0,05		p>0,05
SCRİB			p>0,05	r=0,483 p=0,036		p>0,05		SCRİB			r=- 0,512 p= 0,025	p>0,05		r=0,464 p=0,045	

Sarı renkli kutular, güçlü korelasyonu, yeşil renkli kutular orta düzey korelasonu ve açık turuncu renkli kutular zayıf korelasyonu ifade eder. Beyaz renkli kutuların karşı geldiği genler arasında korelasyon gözlenmez. p>0,05 yazan kutuların karşı geldiği genler arasında da korelasyon gözlenmez fakat karşı geldiği sağlıklı veya kanser grubunda o genler arasında korelasyon gözlemlendiği için bu farklı ortaya koymak adına bu şekilde ifade edildi.