

**MEME KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE
TREM2’NİN HÜCRE ÇOĞALMASI, HÜCRE ÖLÜMÜ
VE HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ayten KILINÇLI

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ
Yüksel Lisans Tezi – 2016**

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE TREM2’NİN HÜCRE
ÇOĞALMASI, HÜCRE ÖLÜMÜ VE HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayten KILINÇLI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

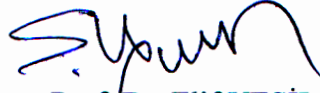
Bu Araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
Tarafından 114S979 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

MALATYA
2016

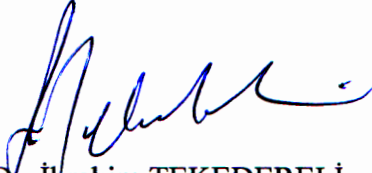
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Ayten KILINÇLI'nın "Meme Kanseri Hücre Modellerinde TREM2'nin Hücre Çoğalması, Hücre Ölümü ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

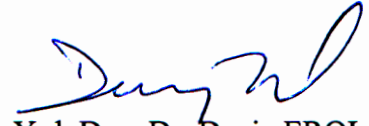
Tez Savunma Tarihi: 11/07/2017



Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye



Yrd. Doç. Dr. Deniz EROL
Fırat Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Meme Kanseri.....	5
2.1.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	5
2.1.2. Meme Kanseri Genetiği	6
2.2. TREM (Triggering Receptors Expressed by Myeloid Cells)	7
2.2.1. TREM1 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları.....	8
2.2.2. TREM2 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları.....	10
2.2.3. TREM2 ve DAP12 İlişkisi.....	12
2.2.3.TREM2'nin İlişkili Olduğu Hastalıklar	13
2.2.4. TREM3 ve TREM4	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Cihazlar.....	19
3.1.2. Sarflar.....	20
3.1.3. Kimyasallar ve Reaktifler	21
3.1.4. Kitler	23
3.1.5. Antikorlar.....	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Hücre Kültürü	24
3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi	26

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	26
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	27
3.2.5. Hücrelerin Sayılması.....	27
3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi.....	28
3.2.7. Protein Miktarının Ölçülmesi	29
3.2.8. Western Blot Analizi	29
3.2.9. siRNA Sistemlerinin Oluşturulması	31
3.2.10. Tripan Mavisı Testi (Trypan Blue Exclusion Assay)	32
3.2.11. Hücre Proliferasyon Testi (MTS)	32
3.2.12. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay).....	32
3.2.13. Propidiyum İyodür (PI) ile Boyama	33
3.2.14. Yazılım ve Veritabanları.....	33
3.2.15. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Canlılık ve Doluluk Oranları	34
4.2. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve SKBR3 Hücre Hatlarında TREM2 Varlığının Belirlenmesi	35
4.3. siRNA sistemleri ile TREM2 ifadesinin baskılanması	38
4.4. TREM2 İfade Edilmeyen Hücreler ve İfade Edilen Hücrelerde TREM2'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	45
4.5. TREM2 siRNA ile Muamele Edilen Hücrelerde Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	47
4.6. TREM2'nin Hücre Döngüsü Üzerindeki Rolünün Belirlenmesi.....	49
4.7. TREM2'nin Hücre Ölümündeki Rolünün Belirlenmesi.....	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	58
EKLER.....	66

EK.1. Özgeçmiş	66
EK.2. Etik Kurul Gerek Olmadığına Dair Belge.....	69

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp her türlü yardımı ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma 114S979 nolu TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir. Bilim alanına yaptıkları katkılardan dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Modellerinde TREM2'nin Hücre Çoğalması, Hücre Ölümü ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Literatürde TREM2 ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda inflamasyon üzerine olan etkileri konusunda yoğunlaşmış olup 2 çalışmada indirekt olarak monosit TREM2 ekspresyonlarının akciğer kanserine karşı immün yanıtla ilişkisi irdelenmiştir. Bu çalışmanın amacı, TREM2'nin proliferasyon, hücre ölümü/hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin in vitro ortamda meme kanseri hücrelerinde araştırılması ve bu bağlamda TREM2'nin kanser gelişim sürecindeki rolünün aydınlatılmasıdır. Daha önce bu konu ile ilgili yapılan 1 çalışma bulunmakta olup bu çalışma glioblastom hücreleri ile yapılmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada, MCF10 normal meme hücresi, SKBR3 ve MDA-MB-231, MCF7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. TREM2'nin 3 hücredeki ifadesinin analiz edilmesi için Western Blot analizi kullanılmıştır. Oluşturulan siRNA sistemleri ile TREM2 ifade edilmeyen hücreler ve ifade edilen hücrelerde TREM2'nin hücre proliferasyonu MTS ile, koloni oluşturma yetenekleri ise koloni oluşturma testi ile test edilmiştir. Hücre ölümündeki rolünün aydınlatılması için Trypan Blue Exclusion Assay boyama kullanılmıştır.

Bulgular: MCF10'da en yüksek olmak üzere MDA-MB-231, MCF7 ve SKBR3 hücrelerinde TREM2 ifadesi belirlenmiştir. siRNA uygulanan hücrelerde hücre proliferasyonunun ve hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin azaldığı belirlenmiştir. MCF10A hücresinde %60-65, MDA-MB-231 hücresinde %45, SKBR3 hücresinde ise %35-40 hücre ölümü meydana gelmiştir. Hücre döngüsünde ise belirgin bir fark saptanamamıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile ilk defa TREM2 ifadesi in vitro'da meme kanseri hücreleri ve meme epitel hücresinde analiz edilmiştir. TREM2 baskılanmasının hücre ölümünü artırıcı, hücre proliferasyonunu azaltıcı etki yaptığı belirlenmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan beklenen etkilerin ortaya çıktığı bu çalışma sonucunda TREM2 hedeflemesinin kanser tedavisi için yeni bir ümit olacağı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: TREM2, Epitel, Meme Kanseri

ABSTRACT

Investigation of the Effects of TREM2 on Cell Proliferation, Cell Death and Cell Cycle in Breast Cancer Cell Models

Aim: In studies in the literature focused on the effects of TREM2 on inflammation. In two works, were examined indirectly TREM2 expression in monocytes relationship with immune response against lung cancer The aim of this study, investigation of the effects of TREM2 on proliferation, cell death / cell cycle on breast cancer cells and clarify its role in cancer development. in vitro study was carried out for this purpose. Before this study one work have been made about this topic with glioblastoma cells.

Material and Method: In this study, MCF10A immortalized normal breast cells, SKBR3 and MDA -MB-231, MCF7 breast cancer cells were used. Western Blot was used for analysis the expression of TREM2 in the third cells. Cell proliferation was tested by MTS, colony forming ability was tested by colony forming assay in the cell treated with siRNA. Trypan Blue Exclusion assay was used for determination role in the cell death.

Results: TREM2 expression was determined in MDA-MB-231, MCF7 and SKBR3 cells. In the cells treated with siRNA, cell proliferation and colony forming ability had reduced. Cell death was occurred %60-65 in MCF10A, %45 in MDA-MB-231, %35-40 in SKBR3. A significant difference was not detected in the cell cycle .

Conclusion: In this study, for the first time TREM2 expression was analyzed in breast cancer cells and mammary epithelial cells in vitro. TREM2 enhancing suppression was determined that a reducing effect on cell proliferation and cell death. This study indicated the expected effects of the drugs used in cancer treatment. As a result of this study it was determined to be a new hope for the treatment of cancer TREM2 targeting.

Key Words: TREM2, Ephetel, Breast Cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	:Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BPE	:Bovın Pituiter Ekstrakt
dk	:Dakika
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medyum
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
FBS	:Fetal Bovine Serum
GA-1000	:Gentamisin Amfoterisin-b
IRAK-4	:Interlökin-1 Reseptor-İlişkili Kinaz 4
kDa	:Kilodalton
KARAP	:Killer Cell Activating Receptor-Associated Protein
KIR	:Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors
MEGM	:Memeli Epitel Hücre Büyüme Ortamı (Mammary Epithelial Cell Growth Medium)
µg	:Mikrogram
µL	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
NAF	:Sodyum Florür
Na₃VO₄	:Sodyum Ortovanadat
P13K	:Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PBS	:Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
PI	:Propidyum İyodit
TGF-α	:Tümör Büyüme Faktörü α (Tumor Growth Factor α)
TREM	:Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells
TYROB	:Tirozin Kinaz Bağlayıcı Protein (Tyrosine Kinases Binding Protein)
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SHIP1	:Src Homoloji 2 (SH2) Domaini İçeren Inositol Fosfataz1
WB	:Western Blot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1.1. 2016 Yılı Tahmini Yeni Kanseri Vakaları ve Ölüm Yüzdeleri.....	2
Şekil 1.2. Kadınlarda Yaşa Bağlı Olarak Meme Kanseri Gelişme Riski	3
Şekil 2.1. TREM Ailesi Proteinlerin Hücresel İfade Profilleri.....	8
Şekil 2.2. TREM1 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları.....	10
Şekil 2.3. İnsan ve Fare TREM2'sinin Protein Sekanslarının Karşılaştırılması. Sekans Üzerindeki Yapısal Domainler	11
Şekil 2.4. Osteoklast ve Makrofajlarda DAP12 ve TREM2 İlişki Sinyal Yolakları	13
Şekil 2.5. Nasu-Hakola Hastalığı Sonucunda Kemiklerde Meydana Gelen Kistler.....	15
Şekil 2.6. Hücrede TREM2 Bağımlı Sinyaller ve γ -Sekretaz Aktivitesi.....	16
Şekil 2.7. Alzheimer Hastalığında Genlerin Keşfi	16
Şekil 2.8. TREM2'nin Alzheimer Hastalığındaki Rolü.....	17
Şekil 3.1. Neubauer Lamı	28
Şekil 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Işık Mikroskopundaki Görüntüleri (100x, 200x).....	34
Şekil 4.2. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde TREM2 İfadesi	35
Şekil 4.3. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$).....	36
Şekil 4.4. MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde TREM2 İfadesi	36
Şekil 4.5. MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$).....	37
Şekil 4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması.....	38
Şekil 4.7. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan MDA-MB-231 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)	38
Şekil 4.8. SKBR3 Hücrelerinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması	39
Şekil 4.9. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan SKBR3 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)	39
Şekil 4.10. MCF10A Hücrelerinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması	40
Şekil 4.11. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan MCF10A Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması ($p<0,05$)	40

Şekil 4.12. MDA-MB-231 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 siRNAları ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x).....	41
Şekil 4.13. MCF10A Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 siRNAları ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x).....	43
Şekil 4.14. SKBR3 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 Custom ile Muamele Edilen Hücrelerin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x).....	44
Şekil 4.15. MDA-MB-231 Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$)	45
Şekil 4.16. SKBR3 Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$)	46
Şekil 4.17. MCF10A Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$) ...	46
Şekil 4.18. MCF7 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği.....	47
Şekil 4.19. MDA-MB-231 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği	48
Şekil 4.20. MCF10A Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği	48
Şekil 4.21. a) MDA-MB-231 Hücresinde Tedavisiz Grubun Flow Sitometri ile Analizi b) MDA-MB-231 Hücresinde Kontrol siRNA Grubunun Flow Sitometri ile Analizi c) MDA-MB-231 Hücresinde TREM2 siRNA Grubunun Flow Sitometri ile Analizi d) MDA-MB-231 Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= $p>0,05$) e) SKBR3 Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= $p>0,05$) f) MCF10A Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= $p>0,05$)	49
Şekil 4.23. Neubauer Lamında Canlı ve Ölü Hücre Sayımı	50
Şekil 4.24. MDA-MB-231 Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p<0,05$).....	51
Şekil 4.25. SKBR3 Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p<0,05$).....	51
Şekil 4.26. MCF10A Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p<0,05$).....	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1.1. Son 5 Yıla Göre Meme Kansesinde Tahmin Edilen Yeni Vaka ve Ölümler ..	1
Tablo 2.1. Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırılması	5
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Hücrelerin Özellikleri	24

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Bu büyüme sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere göre yapısal farklılıklar olduğu gibi, işlevleri açısından da farklılıklar oluşmaktadır; bazen hücre normalde yaptığı işlevlerini yapamazken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri de yapmaya başlamaktadır. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki hatta daha uzaktaki doku ve organları işgal etmekte ve işgal ettiği bu bölümlerin görevlerini engellemektedir. Hücre kontrolünün bozulup bir hastalık olarak kanser tablosu çıkıncaya kadar geçen kanser oluşum süresi, kanser cinslerine göre değişkenlik göstermekle birlikte ortalama 15-20 yıldır (1).

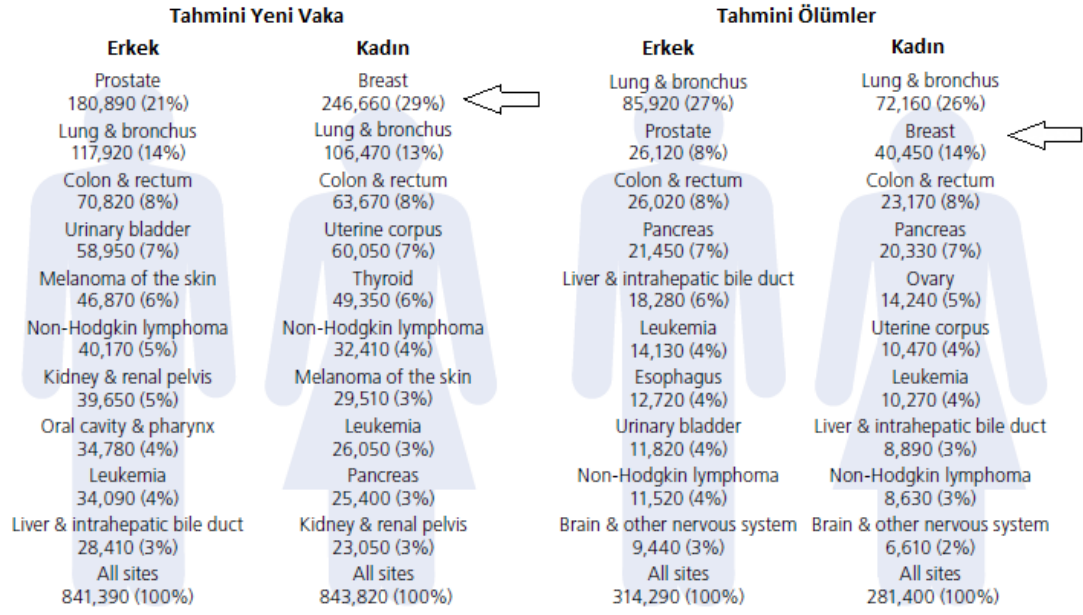
Amerika Kanser Birliği (American Cancer Society)'ne göre 2016 yılı içerisinde ABD'de yaklaşık 1.685,210 yeni kanser vakasının teşhis edilmesi, 595,690 kişinin ise kanserden ölmesi beklenmektedir. 1975-1977 yılı istatistiklerine göre sağ kalım oranı % 49 iken 2005-2011 yılları arasında sağ kalım oranı % 68 olduğu belirlenmiştir. (2). Tablo 1.1'de meme kanserinde son 5 yıllık yeni vaka ve ölüm sayıları verilmiştir. Bu verilere göre 2012 yılında ABD'de 226,870 kadına meme kanseri teşhisi konması, 39,510 kadının ise meme kanserinden ölmesi beklenmektedir (3).

Tablo 1.1. Son 5 Yıla Göre Meme Kanserinde Tahmin Edilen Yeni Vaka ve Ölüm (2-6)

Yıllar	Tahmin Edilen Yeni Vakalar		Tahmin Edilen Ölüm	
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
2012	226,870	2,190	39,510	410
2013	232,340	2,240	39,620	410
2014	232,670	2,360	40,000	430
2015	231,840	2,350	40,290	440
2016	246,660	2,600	40,450	400

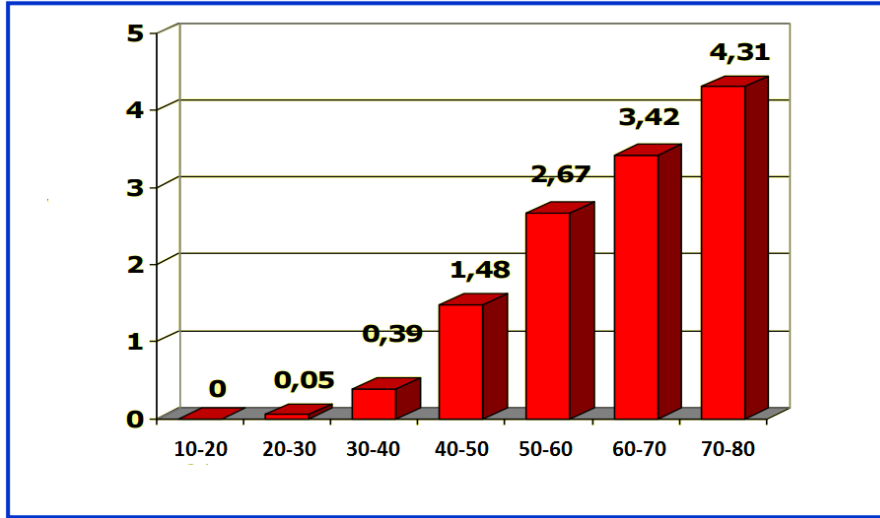
2016 yılı verilerine bakıldığında ise ABD'de her iki cinste 249,260 yeni meme kanseri teşhisi konması, bunlardan 246.660 kişinin kadın olması ve 2.600 kişinin erkek

olması beklenmektedir. 2013-2012 yılları arasında her yıl için meme kanseri ölüm oranının beyaz kadınlarda %1,9 oranında siyah kadınlarında ise %1,4 oranında azaldığı görülmüştür. 1989-2012 yılları arasında ise meme kanseri ölümlerinde %36 azalma olduğu gözlemiştir. Sağ kalım oranındaki gelişme, kanserin erken dönemde tanısı ve tedavisindeki gelişmeyi yansıtmaktadır (2). Şekil 1.1’de 2016 yılı verilerine bakıldığında meme kanseri, tüm kanserler içerisinde kadın ölümlerinde %14 oranla 2.sırayı almaktadır.



Şekil 1.1. 2016 Yılı Tahmini Yeni Kanser Vakaları ve Ölüm Yüzdeleri (2)

Yaşam boyunca her 8 kadından birinde meme kanseri görülmektedir. Bu oran %12.56 şeklinde ifade edilmektedir. Meme kanseri riski, Şekil 1.2’de gösterildiği gibi yaşa bağlı olarak artış göstermektedir. Görülme sıklığı menopoz ile hızlı bir artış sergilemektedir (7).



Şekil 1.2. Kadınlarda Yaşa Bağlı Olarak Meme Kanseri Gelişme Riski (7)

Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü bir etkileşim gösteren kompleks multifaktöriyel bir hastalıktır.

Son 10-20 yıl içerisinde meme kanserinin tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarla risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, etkin tarama stratejilerinin uygulanması ve ayrıca genetik bilimindeki gelişmelerle birlikte özellikle *BRCA-1* ve *BRCA-2* genlerindeki mutasyonların meme kanseri riskiyle ilişkili olduğunun saptaması ve bu kişilerin periyodik aralıklarla takip edilmesi neticesinde erken tanı konan ve tedavi edilen vaka sayısında önemli artışlar olmuştur. Gelişen teknoloji ile birlikte yeni ilaçların ve yeni cerrahi yöntemlerin katkısı ile meme kanserinden ölümlerde azalmalar kaydedilmiştir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen evre 3b meme kanserinde 5 yıllık yaşam süresi % 41, evre 4'te ise bu oran %15 olarak bildirilmektedir (8). Dolayısıyla ilaçlara karşı direnç ve ileri evre metastatik kanserler hala büyük bir sorun olarak önümüzde durmaktadır. Bu bağlamda kanser gelişim sürecinde tanı ve tedavi için yeni arayışlar içerisine girilmiştir.

İmmün sistemde; gen indüklenmesi, farklılaşma, proliferasyon, adezyon, hücre göçünü içeren çeşitli hücresel yanıtları kontrol etmek için gerekli olduğu bildirilen ITAM olarak adlandırılan yapıların olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda ITAM içeren 12 kDA ağırlığında bir polipeptid olan *DAP12*'nin (DNAX-activating protein) varlığından söz edilmektedir (9). *DAP12*, *TREM2* (triggering receptor expressed by myeloid cells 2) olarak adlandırılan reseptörlerin de içerisinde bulunduğu miyeloid

hücrelerdeki birkaç reseptör ile ilişkilendirilmektedir (10). Yapılan yeni çalışmalar, inflamasyon üzerinde etkisi olan TREM (triggering reseptor expressed on myleoid cells) olarak adlandırılan yeni proteinlerin varlığını göstermektedir.

Bu güne kadar *TREM2* proteini ile kanser gelişimi arasında herhangi bir ilişkinin var olup olmadığı ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu  alışmada MDA-MB-231, SKBR3 kanser hücre hatları ve MCF10A ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi kullanılarak *TREM2*'nin varlığı ve *TREM2* ifadesinin normal hücreler ve kanser hücreleri arasında farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *TREM2*'nin proliferasyon, hücre ölümü/hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin *in vitro* ortamda meme kanseri hücrelerinde araştırılması ve bu bağlamda *TREM2*'nin kanser gelişim sürecindeki rolü cevaplanmayı bekleyen önemli bir sorudur. Bu amaç doğrultusunda bu çalışma literatüre yeni bilgiler katma potansiyeline sahiptir. Ayrıca etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlama potansiyelindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2016 yılı verilerine bakıldığında meme kanseri, tüm kanserler içerisinde kadın ölümlerinde %14 oranla 2.sırayı almaktadır (2) (Şekil 1.1).

2.1.1. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması

2000 yılında Perou CM vd. tarafından meme tümörleri 4 ana gruba ayrılmıştır (11).

- 1) Luminal hücre benzeri
- 2) Bazal hücre benzeri
- 3) Normal epitel benzeri
- 4) Her2+

Sonraki çalışmalarda luminal hücre benzeri grup içinde luminal A ve B olmak üzere 2 alt grup daha tanımlanmıştır (12, 13). Luminal hücre benzeri grubunun hepsi ER pozitifdir. Luminal A grubu, en fazla ER ekspresyonu gösteren tümörlerdir. Luminal B grubu tümörler, luminal gruba özgü genleri orta düzeyde eksprese eder ve bazıları Her2 pozitifdir. *p53* gen mutasyon sıklığı luminal A grubunda luminal B grubundan daha sıktır. Bazal hücre benzeri grubun %95'i ER negatiftir. Tablo 2.1'de ayrıntılı şekilde verildiği gibi bazal hücre benzeri grup aynı zamanda “triple” negatif meme kanser fenotipine sahiptir (ER-, progesteron reseptörü [PgR-], ve Her2-) (14).

Tablo 2.1. Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırılması (14, 15)

Luminal A:	ER (+), PR (+), c-Erb B2 (-)
Luminal B:	ER (±), PR (±), c-Erb B2 (±)
Her-2 (+):	ER (-), PR (-), c-Erb B2 (+)
–Normal hücre benzeri:	ER (-), PR (-), c-Erb B2 (-), CK5/6 (-), EGFR (-)
– Basal hücre benzeri:	ER (-), PR (-), c-Erb B2 (-), CK5/6 (+), EGFR (+)

2.1.2. Meme Kanseri Genetiği

Günümüze kadar kanser oluşumunun genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar tüm kanserlerin oluşumunda üç gen sınıfının etkili olduğunu, bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanserleşmenin esasını oluşturduğunu göstermektedir. Bu genler sırasıyla proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla açığa çıkan aktif kanser genleri onkogenler, tümör supresör genler ve DNA tamir genleridir. Meme kanserlerini oluşumunda da bu üç gen sınıfındaki mutasyonlar etkili olmaktadır.

Meme Kanserinde Onkogenlerin Rolü: Onkogenler, hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu normal hücre genleri olan proto-onkogenlerin mutasyona uğramış biçimleridir. Meme kanseri oluşumunda *Her-2/neu/c-erbB2*, *c-myc*, *c-fos*, *c-myb*, *bcl-1*, *H-ras*, *ER* gibi onkogenlerin rolü bulunmaktadır (16).

***Her-2/neu/c-erbB2*'nin Rolü:** *Her-2* kromozom 17q11.2-q12'de lokalize olan bir genidir. Bu genin ürünü olan *Her-2* proteini hücre membranının sitozole bakan kısmında yerleşmiş tirozin kinaz aktivitesine sahip EGFR reseptörü *Her-3* ve *Her-4* reseptörü ile ilişkili büyüme sinyallerini sitoplazmadan nükleusa iletme görevi üstlenmiş bir proteindir. *Her-2* proteini 17. kromozomun uzun kolunda bulunan *c-erbB2* geni tarafından sentezlenir. *Her-2* reseptörleri aktif hale gelince hücre içindeki sinyal ileti yollarını etkinleştirerek hücrenin değişimine ve çoğalmasına neden olurlar (13, 17). Ayrıca *Her-2* geninin TGF- α gibi çeşitli farklı ligandlar ile aktive edilmesi ya da amplifikasyonu kanserleşmeye yol açmaktadır. Son zamanlarda bu gen önemli bir biyomarker haline gelmiştir. Transtuzumab *Her-2* pozitif metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde önemli bir tedavi cevabı gösteren onaylanmış ilk hedefli anti-kanser ajanıdır (16).

***c-myc*'nin Rolü:** *c-myc* geni 8q24'de lokalize, nükleus içerisinde işlev gören, hücre bölünmesinde rol oynayan, dimerik yapıda nükleer bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Bu protein *c-fos* ve *c-jun* proteinleri ile birleşerek heterodimerik yapıda bir kompleks proteini oluşturmaktadır ve bu yapı meme kanserinde östrojen ve progesteron tarafından indüklenmektedir. Burkitt lenfomasında kromozomal translokasyon sonucu aktiflenen *myc* geni hücreyi hızla bölünmeye götürmektedir. Küçük hücreli akciğer karsinomlarında in vitro olarak *c-myc* geninin amplifiye olduğu

ve bu tümör hücrelerinin amplifikasyonun olmadığı hücrelere göre daha hızlı çoğaldığı belirlenmiştir.

Nöroblastomalarda *myc* geninin amplifikasyona uğradığı saptanmış, amplifikasyon düzeyi klinik evre ve tedaviye yanıtla yakın ilişkili bulunmuştur (16).

ER Genlerinin Rolü: Meme tümörleri östrojen reseptör anormal splicing'den dolayı varyant östrojen reseptörlerini içerdiği için endokrin tedaviye dirençlilik göstermektedir. Meme kanserlerinin üçte birinde östrojen ve progesteron reseptörleri kaybolmuş durumdadır ve bu tip tümörler kötü prognoz gösterirler. Aynı zamanda gerek östrojen gerekse progesteron reseptör genlerinde meydana gelen polimorfizmler ve metilasyon olayları gibi değişiklikler meme kanserlerinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (16).

RAS Genlerinin Rolü: Hücre membranının iç yüzüne lokalize olmuştur, GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücre büyümenin kontrolünden sorumlu olan p21 proteinini kodlamaktadır. p21 GDP bağlı iken inaktif formdadır. Hücre büyüme faktörü ile uyarıldığında GDP GTP'ye çevirilmektedir. GTP bağlayınca aktif hale gelen p21 sitoplazmik kinazları aktifleyerek hücre proliferasyonunu uyarıcı sinyalin çekirdeğe iletilmesini sağlamaktadır. Uyarı sona erdiğinde intrinsik GTPaz aktivitesi ile GTP hidroliz olur ve p21 GDP bağlı inaktif formuna döner. Mutasyona uğramış ras onkogeninin ürünü olan p21'in intrinsik GTPaz aktivitesi çok düşüktür. Bu durumda p21 sürekli GTP bağlı aktif formunda kaldığından hücre proliferasyona devam etmektedir. *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras* olmak üzere üç homolog formu vardır. İnsan tümörlerinin yaklaşık %30 kadarında RAS genlerinin mutant olmasına karşılık tümörü çevreleyen sağlıklı dokularda RAS genlerinin normal olduğu belirlenmiştir (16).

2.2. TREM (Triggering Receptors Expressed by Myeloid Cells)

2000 yılında Bouchon ve ark. tarafından yayınlanan "Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes" makalesiyle TREM1'in keşfedilmesinden sonra TREM proteinlerine olan ilgi gün geçtikçe artmıştır. İnflamatuvar hastalıklarda TREM proteinlerinin büyük bir rolü olduğu bu ilgiyi daha da arttırmıştır. Yapılan çalışmalar inflamatuvar süreçte rolü olan birçok hücrede TREM'in varlığından söz edildiğini

göstermiştir. Şekil 2.1’de farklı çalışmalardan toplanan verilere göre TREM proteinlerinin hangi hücrelerde ifade edildiği gösterilmektedir.

Cell type/tissue	Species
TREM-1	
Neutrophils, CD14 ^{high} Monocytes	Human
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080)	Human
Differentiated U937 cells	Human
Lymph nodes, placenta, spinal cord, lung, spleen, and heart tissues	Human
High expression: Monocytes, granulocytes, DCs, NK cell	Human
Low expression: T cells and all subsets of B cells except plasma cells	
Normal bronchial epithelial cells	Human
Myofibroblasts and primary hepatic stellate cells	Human
Gastric epithelial cell lines	Human
Liver endothelial cells	Mouse
Kupfer cells and neutrophils	Mouse
Peritoneal macrophages	Mouse
Immature dendritic cells	Mouse
TREM-2	
Monocyte derived dendritic cells	Human
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080), U937, and THP-1	Human
Activated macrophages, peritoneal macrophages, RAW264 cells	Mouse
Ostoclasts	Human
Microglia	Mouse
High expression in CNS, heart and lungs as compared to lymph nodes, kidney, liver, and testes	Mouse
TREM-3	
RAW264, MT2 macrophage cell lines, and T cell lines	Mouse
pDC-TREM (TREM-4)	
pDCs (CD11c ^{dull} population)	Mouse
TLT-1	
Platelets and megakaryocytes	Mouse
TLT-2	
B cells, neutrophils, and macrophages	Mouse

Şekil 2.1. TREM Ailesi Proteinlerin Hücresel İfade Profilleri (18)

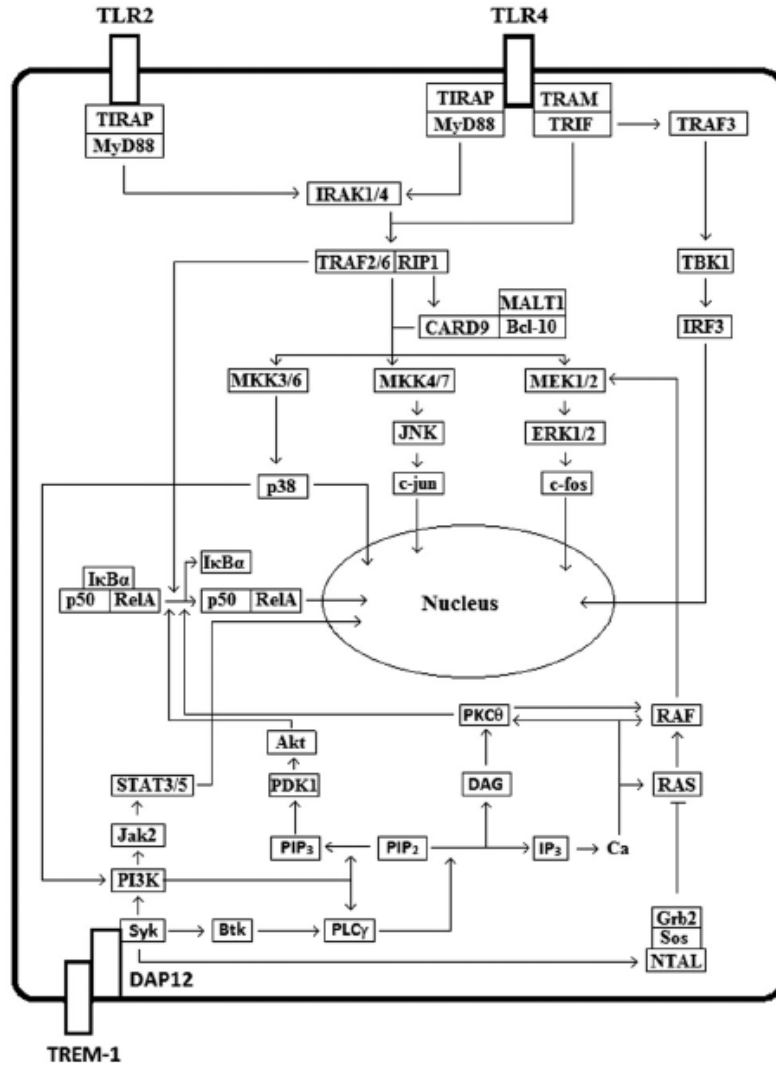
2.2.1. TREM1 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları

TREM1, immunoglobulin süper ailesine üye, 30 kDa civarında glikoprotein reseptördür. TREM ailesi içerisinde inflamatuvar süreçte rolü olduğu bilinen bir proteindir. Miyeloid hücrelerde ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca, nötrofil ve monosit aracılı inflamatuvar süreçte rolü olduğu bilinmektedir. Bu süreçte bakteriyal ve fungal enfeksiyonlarla tetiklenir ve pro-inflamatuvar kemokinlerin ve sitokinlerin salınımını stimüle ederek aynı zamanda hücre yüzeyinde bulunan markerlerin artışına neden olmaktadır. 2001’de yapılan bir çalışmada bakteri ile enfekte olmuş insanların monosit ve nötrofillerinde TREM1’in ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Sepsis için önemli bir

aracı olduğu ve inflamasyonu arttırdığı bildirilmiştir (19). Yapılan başka bir deneyde farelerde gelişen tümörlerin TREM1 ifadesi bastırıldıktan sonra akut kolitleri azalttığı ve kronik inflamasyon boyunca kolit indüklü tümör oluşumunu engellediği bildirilmiştir (20). Anlatılan 2 çalışma arasından bu zamana kadar 12 yıl geçmiş olmasına rağmen TREM1 ve inflamasyon ile ilgili yapılan çalışmalar hala geçerliliğini korumaktadır. Hala bu konuda araştırılmayı bekleyen birçok konu bulunmaktadır.

TREM1 ve DAP12 ilişkisinden de söz edilmektedir. Bu birlikteliğin direk olarak sitokin üretimini indüklediği bildirilmiştir. Şekil 2.2’de TREM1’in ilişkili olduğu sinyal yolları gösterilmektedir. DAP12 ve TREM1 ilişkisinde DAP12’de bulunan ITAM domaininin fosforilasyonu Src ailesi kinazların aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Syk aktive edilerek P13K, PLC γ ve ERK gibi sinyal moleküllerinin de içinde bulunduğu sinyal yollarının başlamasına neden olmaktadır. Bu süreçte Btk’nın da fosforillenmesinin önemli olduğu bildirilmiştir. TLR ve TREM1 ilişkisinde IRAK-1’in aracı olduğu, NTAL’ın da Ca akışında önemli olduğu bildirilmiştir (21).

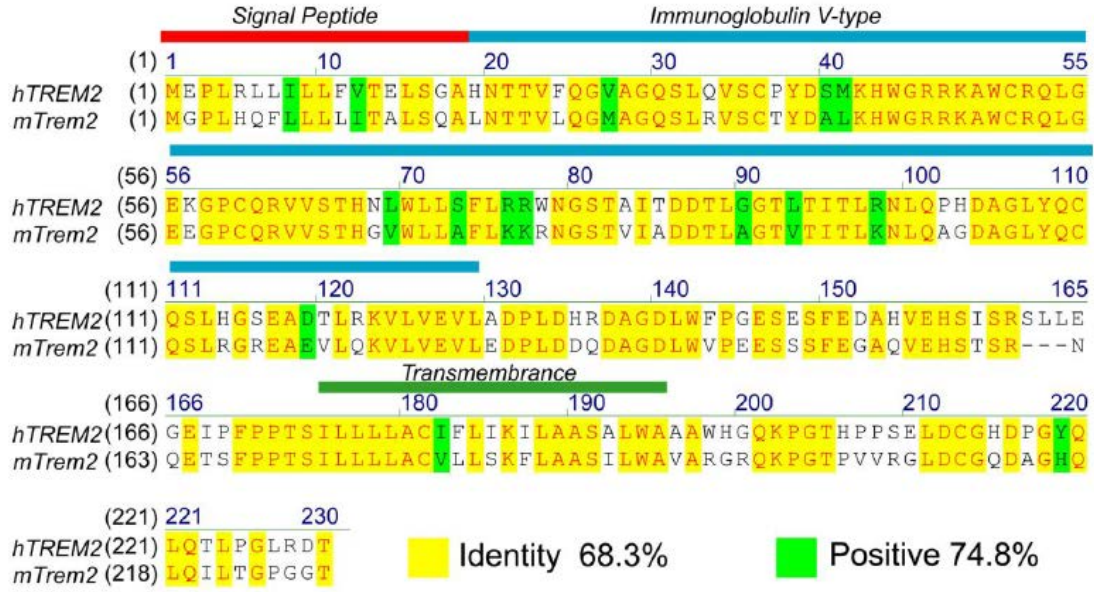
TREM1’in sitokin ve kemokin salınımına neden olduğundan daha önce bahsedilmiştir. TREM1’in IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, p40 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinler ve MIP-1 α , membran kofaktör protein-1 ve -2, GM-CSF gibi kemokinler bunlara örnek olarak verilebilir. Kemokin ve sitokin üretimi 4 yolak tarafından kontrol edilmektedir: Jak-STAT, Akt, ERK1/2 ve NF-Kb (22-25).



Şekil 2.2.TREM1 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları (21)

2.2.2. TREM2 ve İlişkili Olduğu Sinyal Yolakları

TREM2'nin ilk olarak, insan monosit türevli dentritik hücrelerinde ve RAW264 fare makrofaj hücrelerinde ifade edildiği belirlenmiş olup TREM1 homoloğu olarak tanımlanmıştır (22, 26). TREM ailesinin diğer üyelerine benzer şekilde TREM2, transmembran bir glikoproteindir. TREM2, tek bir ekstrasellüler V-tipi immunoglobulin benzeri domaine, pozitif yüklü lizin rezidüsü içeren bir transmembran bölgeye ve kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İnsan ve Fare *TREM2*'sinin Protein Sekanslarının Karşılaştırılması. Sekans Üzerindeki Yapısal Domainler (27)

Dendritik hücreler, mikrogliya, osteoklast ve makrofaj gibi hücre gruplarında ifade edilen TREM2, 40 kDa ağırlığında olan bir glikoproteindir. İnsan TREM2 cDNA'sı 1041 nükleotid uzunluğundadır. *TREM2* genleri, insan 6p21 kromozomu, farede ise 17C3 kromozomu üzerinde bulunmaktadır (28, 29).

TREM2, dendritik hücrelerin yüzeyinde olduğu belirlenen DAP12 ile ilişkili reseptördür. Hamerman JA vd. (2006) ve Ito H vd. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda TREM2'nin hücre yüzeyindeki ifadesinin yabanıl tipte kıyaslandığında DAP12 olmayan kemik iliği dendritik hücrelerde ve DAP12 olmayan makrofajlarda azaldığı bildirilmiştir. Bu bilgi ışığında TREM2/DAP12 kompleksinin, TREM2'nin hücre yüzeyindeki maksimum ifadesine ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (30, 31).

TREM2'nin hücre sağ kalımı (protein kinase B-Akt), hücre aktivasyonu ve farklılaşmasını (Syk, Erk1/2, PLC-c) içeren sinyal yollarını da aktive ettiği bilinmektedir. TREM2'nin ligasyonundan sonra DAP12'deki ITAM tirozin kinaz, Syk ve/veya ZAP70 kinazların aktivasyonuna yol açan src ailesi kinazlar tarafından fosforillendiği bilinmektedir (10).

2.2.3. *TREM2* ve *DAP12* İlişkisi

İnhibitör ve aktivatör sinyaller arasındaki denge immün homeostazı için gereklidir. İmmün yanıt, yüksek derecede korunmuş hücre yüzey reseptörleri tarafından düzenlenmektedir. İmmünoresptör fonksiyonunun düzenlemesi, kontrolsüz inflamasyon için oldukça önemlidir. Bu reseptörlerin çoğu ya adaptör proteinler ile ilişkisi aracılığıyla ya da direk kendi sitoplazmik domaini içerisinde ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) olarak bilinen korunmuş bir bölge içerirler. ITAM, ilk olarak immün sistemde tanımlanmıştır. İmmün sistemde, gen indüklenmesi, farklılaşma, proliferasyon, adezyon, hücre göçünü içeren çeşitli hücresel yanıtları kontrol etmek için gerekli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ITAM içeren proteinlerin, bazı virüslerin genomlarında kodlandığı ve hematopoetik olmayan hücrelerde de bulunduğu bilinmektedir (10).

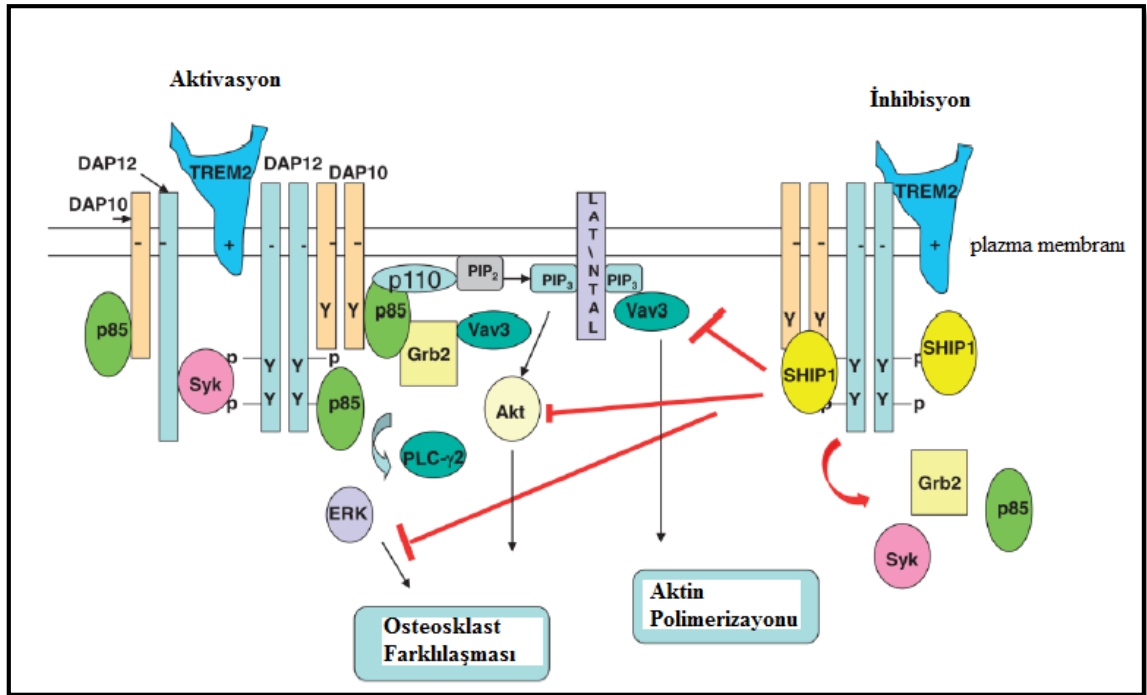
DAP12 (DNAX-activating protein) ITAM motifi içermektedir. DAP12'nin ITAM içermesi onun sinyal yollarına aracılık etmesini kolaylaştırmaktadır. DAP12, KARAP (killer cell activating receptor-associated protein) ya da TYROBP (tyrosine kinases binding protein) olarak da bilinmektedir (9). DAP12, *TREM2*'nin de içerisinde bulunduğu miyeloid hücrelerdeki birkaç reseptör ile ilişkilendirilmektedir. DAP12'nin NK hücreleri tarafından ifade edilen KIR (killer-cell immuoglobulin-like receptors) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (32).

TREM2/DAP12 ilişkisinde, DAP12 üzerindeki ITAM motifinin Syk'nın artışına neden olması, P13K ve MAPK'nın aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle monosit türevli dendritik hücrelerde *TREM2*'nin uyarılması Erk fosforilasyonunu ve Ca^{+2} mobilizasyonunu arttırmaktadır (33).

DAP12 proteinindeki ITAM motifine rağmen, DAP12'nin aynı zamanda negatif sinyallerde verdiği gözlenmiştir. DAP12-eksik makrofajlarda IL-6, IL-2, P40 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu negatif sinyaller aynı zamanda Syk ve Erk sinyallerini de başlatmaktadır (34). Aynı şekilde *TREM2* eksik farelerde de IL-6, TNF α gibi sitokinlerin indüklendiği gösterilmiştir (35). Diğer bir çalışmada ise DAP12 yokluğunda NK hücrelerinin IFN- γ üretimini ve sitolitik aktivitesini başlattığı gözlenmiştir, bu da DAP12'nin NK hücrelerinde aynı zamanda negatif sinyallere de neden olduğunu göstermiştir (36). Son zamanlarda Hamerman ve ark. tarafından yapılan çalışmada PTPN22 geni tarafından kodlanan Lyp'nin

varlığından bahsetmişlerdir. Lyp, monositlerde TLR'nin artışına neden olduğu, ayrıca Lyp'nin monositlerde TLR'nin inhibitör yolağının regülasyonunu azalttığı ve TREM2/DAP12 inhibitör yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (37).

TREM2 ve DAP12 ile ilişkili olan başka bir çalışmada TREM2'nin osteoklastlarda DAP12 ile ilişkili temel reseptör olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada TREM2'nin ligasyonunun P13K'nın, ERK1 ve ERK2'nin aktivasyonuna neden olduğu hücre içi Ca^{+2} mobilizasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca TREM2 ligasyonunun apoptozisi engellediği de belirtilmiştir. Adaptör bir molekül olan DAP10' un TREM2 ve DAP12 kompleksinde anahtar bir rolü olduğu belirlenmiştir. SHIP1, TREM2 ve DAP12 indüklü sinyali DAP12'ye bağlanarak inhibe etmiştir. P13K'nın aktivasyonunu engellemiştir (38). SHIP1'in DAP12 ve TREM kompleksini engelleyen bir molekül olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.4. Osteoklast ve Makrofajlarda DAP12 ve TREM2 İlişki Sinyal Yolakları (38)

2.2.3. TREM2'nin İlişkili Olduğu Hastalıklar

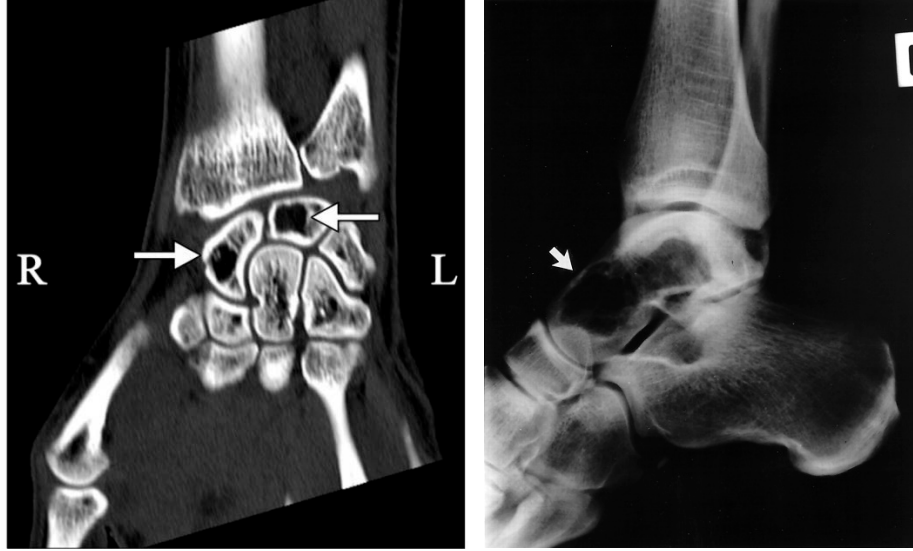
Sepsis ve Septik Şok: Sepsis, mikroorganizmaların kanda sürekli bulunması ve bazı organ yetmezlikleri ile beraber görülen klinik tabloya verilen addır. Sepsis ilerledikçe, ölümcül sonuç doğurabilecek septik şoka yol açabilir. İlerledikçe organlarda fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir. Kanser hastaları, kemoterapiden sonra

enfeksiyona ve sepsise yüksek derece duyarlı hale gelmektedirler. Sepsis, Toll-like reseptörler tarafından üretilmektedir ve patojen birleşenlerinin algılanması ile indüklenmektedir. TLR'ler, tümör nekroz faktör α , interlökin 1 ve 6'yı içeren sitokin kaskadını başlatır (39, 40). Bu inflamatuvar sitokinlere rağmen yapılan çalışmalar yine de sepsisin ölüme neden olabileceğini göstermektedir. Sepsis ile savaşmak için TLR'lerin bu proinflamatuvar sitokinleri nasıl indüklediğinin mekanizmasını anlamak önemlidir (27, 41).

Her ne kadar sepsis ve TREM1 ilişkisinden bahseden birçok yayın olsa da TREM2'nin de sepsis ile ilişkisi üzerinde de durulmaktadır. 2013 yılında Chen Q. vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada RT-PCR ile yapılan analiz sonucunda hastaların mRNA seviyelerine bakılmıştır. Sepsis olan hastalarda TREM2 seviyesinin kontrol grubuna göre artmış olduğu belirlenmiştir (42). 2006'da yapılan bir çalışmada TREM2 aktivasyonunun IL-4 ve IL-13 ilişkili olduğu belirtilmiştir (35). Chen Q. vd. (2013)'nin yaptığı çalışmada sepsis sırasında IL-4'ün TREM2 ifadesini regüle ettiği saptanmıştır. IL-13 ve TREM2 arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (42, 43).

Nasu-Hakola Hastalığı: TREM2 ve DAP12 tanımlandıktan sonra, TREM2 ve DAP12 eksikliği olan hastalar olduğu görülmüştür (44-46). Bu hastalık 1970'lerde Finlandiya'dan Hakola ve Japonya'dan Nasu'nun çalışma grupları tarafından Nasu-Hakola hastalığı olarak tanımlanmıştır (47, 48). Nasu-Hakola hastalığı aynı zamanda PLOSL (polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy) olarak da bilinmektedir (49). Nasu-Hakola, nadir görülen resesif kalıtsal bir hastalıktır. 2015 yılına kadar dünya genelinde sadece 200 vaka belirlenmiştir. Çoğu vakanın Finlandiya ve Japonyadan olduğu gözlenmiştir (27).

Hastalık 4 evreyle tanımlanmaktadır: gizli, kemiksel, erken nörolojik ve geç nörolojik. Normal çocukluk dönemi gizli dönemi içermektedir. Hastalığın başladığı dönem ergenlik dönemidir.



Şekil 2.5. Nasu-Hakola Hastalığı Sonucunda Kemiklerde Meydana Gelen Kistler (50)

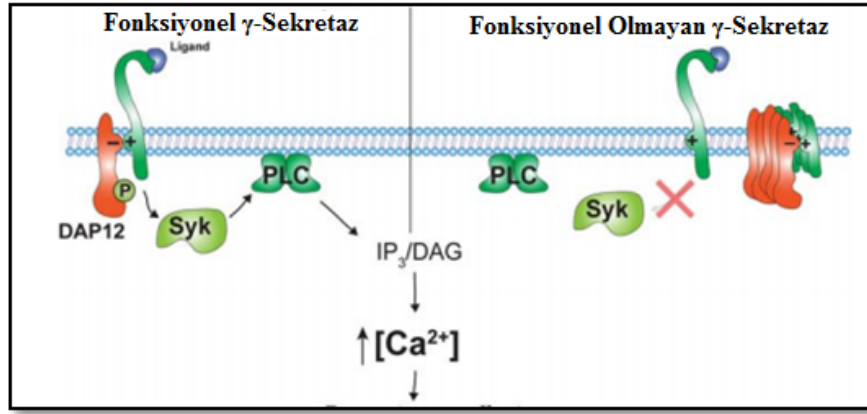
Kemiksel dönem 15-30 yaş arası olarak tanımlanmaktadır. Hastaların bu dönemde bilek, ayak, el ve ayak bileklerinde kemik kırılmaları oluşmaktadır.

Erken nörolojik evre boyunca 30-40 yaşlarında hastalar frontotemporal demansın neden olduğu karakteristik değişiklikler geçirirler. Başlangıçta hafif hafıza bozuklukları sonrasında ilerleyen hafıza bozukluklarıyla kişilik değişimi gerçekleşir. Nöbetler sık görülmektedir. Geç nörolojik evrede hastalarda şiddetli şekilde demans ilerlemesiyle hastalar yatalak hale gelmektedir. Bu hastalık genellikle 50’li yaşlarda çok ağır seyrederek ölüme yol açmaktadır (49, 51, 52). Ayrıca bu hastalığa sahip olan kişilerde kistik kemik boşlukları ve osteoporoz gelişmektedir (27).

TREM2 ve DAP12 beyinde mikroglyada ifade edilmektedir. DAP12 eksik farelerde miyelinizasyon, sinaptik dejenerasyon, aksonlarda sinaptik veziküllerin birikimi azalmıştır (27, 53).

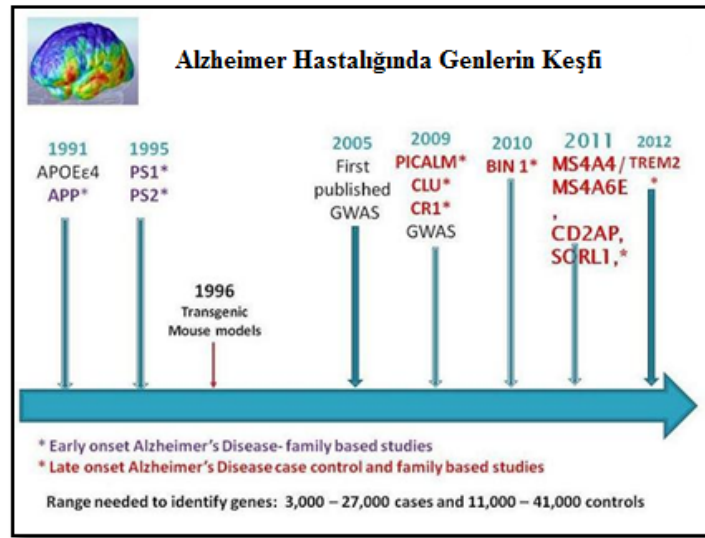
Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Nasu-Hakola hastalığında TREM2’nin önemi üzerinde durulmuş ve TREM2/DAP12 kompleksinin inaktif edilebilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen verilere göre γ -sekretaz aktivitesinin inhibe edilmesiyle TREM/DAP12 kompleksinin fonksiyonelliğinin bozulduğu gösterilmiştir (54). Şekil 2.4’de gösterildiği gibi γ -sekretaz aktivitesi olduğunda DAP12 yapısındaki ITAM sayesinde fosforillenerek Syk’nın aktive edilmesine neden olmaktadır. Syk aktivasyonu da PLC aktivasyonuna, PLC aktivasyonu IP2 ve IP3’ün hücre

membranından salınımına ve endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} mobilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. γ -sekretaz aktivitesi hasar gördüğünde ise DAP12 fosforillenememekte ve Syk aktivasyonu sağlanamadığı için TREM2/DAP12 kompleksinde gerçekleşen olaylar zincirinin aksadığı gösterilmiştir (54).



Şekil 2.6. Hücrede TREM2 Bağımlı Sinyaller ve γ -Sekretaz Aktivitesi (54)

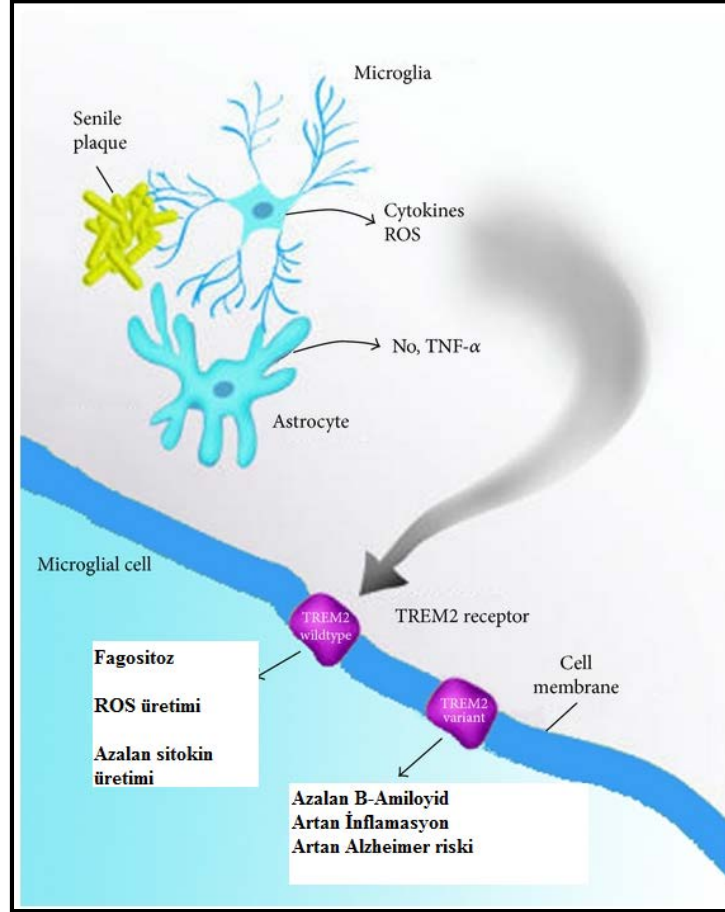
Nörodejeneratif Hastalıklar ve Alzheimer Hastalığı



Şekil 2.7. Alzheimer Hastalığında Genlerin Keşfi (55)

TREM2’de meydana gelen mutasyonlar Alzheimer hastalığı, Parkinson ve Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif durumların riskini arttırmaktadır. TREM2 mikroglialarda DAP12 ile inflamasyon olmadan apoptotik nöronların ve amiloyid beta peptidlerin fagositozunu tetikler. TREM2’de meydana gelen mutasyon bu olayların tamamen tersine dönmesine neden olmaktadır. TREM2’nin homozigot

mutasyonları, frontotemporal demansa neden olmaktadır. R47H heterozigot varyantı Alzheimer hastalığı için önemli olduğu bildirilmiştir. *APOE*'nin E4 alleli Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirildikten sonra bulunan bu gen bu hastalık için önemli bir gelişme olmuştur (56).



Şekil 2.8. TREM2'nin Alzheimer Hastalığındaki Rolü (57)

TREM2 ve DAP12'nin birlikte fonksiyon kaybetmesi NHD/PLOSL olarak adlandırılan otozomal resesif bir hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalıkta, hastalar bunama ile sonuçlanan ilerleyici ensefalopati ve sistemik kemik kistlerinden dolayı acı çekmektedirler. Hastalık 19q13 kromozomal bölgesi ile kalıtılmaktadır ve son zamanlarda yapılan analizlerde DAP12 tarafından kodlanan TYROP'da ekson 1-4'de büyük kromozomal bir delesyonun olduğundan bahsedilmektedir. TREM2'de meydana gelen mutasyonlar NHD/PLOSL hastalığında meydana gelen fenotiple benzer olduğu görülmüştür. TREM2'de meydana gelen mutasyonların diğer nörodejeneratif hastalıklarla bağlantısı olduğu keşfedilmiştir (58).

2.2.4. TREM3 ve TREM4

TREM3, aktivatör reseptördür, *TREM3* kromozom 17 üzerinde lokalize olan immün gen kompleksidir. *TREM3* ortoloğu bir pseudogendir. 2002 yılında Chung DH vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada birbirleriyle yüksek derecede homoloji gösteren 2 tane TREM ailesine üye TREM-2a ve TREM-2b reseptörleri bulunmuştur. Bu reseptörlerin DAP12 ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu reseptörlerin WEHI-3 makrofaj kütüphanesinden elde edilen verilere göre TREM2 ile %20 homoloji gösterdiği görülmüştür. Bu reseptörlerin DNA sekansı *TREM3* adı altında gen bankasına işlenmiştir (59).

TREM3 transkriptlerinin RAW264.7 ve MT2 makrofaj hücre hatlarında olduğu belirlenmiştir. T hücre hatlarında da az da olsa ulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca makrofajlarda, TREM3'ün LPS tarafından upregüle olduğu, IFN-gamma tarafından downregüle olduğu belirlenmiştir. TREM1 ve TREM2 gibi TREM3 de DAP12 ile etkileşim halindedir (59).

TREM4; CLM-9, CD300Lg, Nepmucin adlarıyla da bilinmektedir. TREM4 transmembran bir glikoproteindir. Kapillar endotel, kalp dokuları ve testiste bulunduğu bilinmektedir. TREM4'ün ifadesinin düzenlenmesi vasküler ve kalp hastalıklarında tedavi edici olduğu düşünülmektedir. Farelerde TREM4'ün lenfosit adezyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir (60, 61).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Azot Tankı	Taylor-Wharton
Buz Cihazı	Scotsman AF 80
Hassas Terazı	Ohaus
Isı Bloğu	Benchmark
İnkübatör	Thermo Scientific Heracell 150i
Kemolüminesans	ChemiDoc-It ²
Laminar Kabin	Thermo scientific
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikroskop	Olympus
Otoklav	Hirayama
pH Metre	Mettler Toledo
Santrifüj	Hettich universal 320R
Santrifüj	Hermle
Shaker (Çalkalayıcı)	Benchmark Scientific
Spektrofotometre	Biotek
Su Arıtma Cihazı	Direct-Q 3UV
Su Banyosu	Benchmark
Western Blott Tankı	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph

3.1.2. Sarflar

10 µl'lik Pipet Ucu (RNAz, DNAz free)	Biohit, Cat No: 790011F
100/120 µl'lik Pipet Ucu (RNAz, DNAz free)	Biohit, Cat No: 790101F
1000 µl'lik Pipet Ucu (RNAz, DNAz free)	Biohit, Cat No: 791001F
5 ml'lik Pipet	CAPP, Cat No: SP-5-C
10 ml'lik Pipet	CAPP, Cat No: SP-10-C
15 ml'lik Santrifüj Tüpü	CAPP, Cat No: 5100015
50 ml'lik Santrifüj Tüpü	KIRGEN, Cat No: KG2811
1,5 ml Mikro Santrifüj Tüpü	CAPP, Cat No: 5101500
6 Kuyucuklu Plate	Costar, Cat No: 3516
96 Kuyucuklu Plate	Costar, Cat No:3599
Neubauer Lamı	Marienfeld, Cat No: 0640110
Hücre Dondurma Tüpü	Nalge Company, Cat No: 5000-0020
PVDF Transfer Membranı, 0.45 mikron 30 x 30 cm	UltraCruz, Cat No: PV4HY000GL
Western Blot Filtre Kağıdı 20 cm x 20 cm	Thermo, Cat No: 88620
Nitrosellüloz Transfer Membranı, 0.45 mikron, 30 cmx30cm	Manie Manufacturing, Cat No: 1215230
Mini Trans-Blot Filtre Kağıdı	Bio-Rad, Cat No: 1703932
25 cm ² 'lik Hücre Kültür Kapları (Flask)	Orange Scientific, Cat No: 5510100
75 cm ² 'lik Hücre Kültür Kapları	Sarstedt, Cat No: 0312035

3.1.3. Kimyasallar ve Reaktifler

Akrilamid, %98.5 ekstra saf	Acros Organics, Cat No: 164835000
Amonyum Persülfat %98	Acros Organics, Cat No: 201530010
Bovin Serum Albümin	Sigma, Cat No: A-7906
Custom <i>TREM2</i> siRNA	QIAGEN, Cat No:
Dimetil Sülfoksit	Fisher Scientific, Cat No: BP231-100
DMEM F12 1:1 mix	Lonza, Cat No: BEO4-687Q
Etanol	Sigma-Aldrich, Cat No: 32221
Fetal Bovin Serum	Sigma, Cat No: F9665
Glisin	Carlo Erba, Cat No: 453807
At Serumu	Thermo Fisher, Cat No: 26050070
L-glutamin	Lonza, Cat No: BE17-605E
4-Iodofenilboronik asit	Sigma-Aldrich, Cat No: 471933
Luminata Classico Western HRP Substrate	Millipore, Cat No: WBLUC0100
Luminol	Sigma, Cat No: A-8511
MDA-MB-231 Cell Avalanche Transfeksiyon Ajanı	EZ Biosystems, Cat No: EZT-MDAM-1
MEGM	Lonza, Cat No: CC-3151
2-Merkaptoetanol, %99,ekstra saf	Acros Organics, Cat No: 125470010
Metanol	Sigma-Aldrich, Cat No: 34885
N,N-Metilenbisakrilamid	Sigma, Cat No: M7256
Negatif Kontrol siRNA	Sigma, Cat No: SIC001
Penisilin-Streptomisin	PAN Biotech, Cat No: P06-07300
p-Kumarik Asit	Sigma, Cat No: C9008

Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Zymed, Cat No: 00-3002
Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa)	Abcam, Cat No: ab116028
Prism Ultra Protein Ladder (10-180 kDa)	Abcam, Cat No: ab116027
2-Propanol, minimum %99	Sigma, Cat No: I9516
Propidyum iyodit	Sigma, Cat No: P4170
Protogel (%30 Acr., %0,8 Bis)	National Diagnostics, Cat No: EC-890
Resolving Buffer	National Diagnostics, Cat No: EC-892
SKBR3 Cell Avalanche Transfeksiyon Ajanı	EZ Biosystems, Cat No: EZT-MDAM-1
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, Cat No: 70166
Sodyum klorit	Carlo Erba, Cat No: 368257
Sodyum dodesil sülfat	Fisher Scientific, Cat No: BP166-500
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Cat No: 6203
Sodyum florit, %99	Acros Organics, Cat No: 201295000
Sodyum ortovanadat, %99	Acros Organics, Cat No: 205330500
Stacking Buffer	National Diagnostics, Cat No: EC-893
Stripping Buffer	Thermo, Cat No: 46430
Tetrametiletilendiamin %99	Acros Organics, Cat No: 138455000
TREM2-4 siRNA	QIAGEN, Cat No: S100123368
Trypsin-EDTA	PAN Biotech, Cat No: P10-019100
Tris Base	Fisher Scientific, Cat No: BP152-1
Triton X-100	Sigma, Cat No: T8787
Trizma hidroklorid	Sigma, Cat No: T5941
Tween 20	Sigma-Aldrich, Cat No: P1379

3.1.4. Kitler

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Cat No: G3582
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Cat No: 556547
Protein assay kit	Bio-Rad Cat No: 500-0115

3.1.5. Antikorlar

<i>β-actin</i>	NeoMarkers, Cat No: RB-9421-P
<i>α-tubulin</i>	Santa Cruz, Cat No: sc-8035
Caspase-9 (Human Specific)	Cell Signalling, Cat No: 9502S
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2313
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2004
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2005
TREM-2	Santa Cruz, Cat No: sc-48764
Rabbit anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-358920

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Hücrelerin Özellikleri

Hücre: <u>MCF10A</u>
ATCC Kodu: CRL-10317™
Doku: Meme
Hücre Tipi: Epitel
Hastalık: Normal (Fibrokistik)
Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)

Hücre: <u>SKBR3</u>
ATCC Kodu: HTB-30™
Doku: Meme
Hücre Tipi: Epitel
Hastalık: Adenokarsinom
Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
(ER-,PR-, Her2+)

Hücre: <u>MDA-MB-231</u>
ATCC Kodu: HTB-26™
Doku: Meme
Hücre Tipi: Epitel
Hastalık: Adenokarsinom
Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
(ER-,PR-, Her2-)

Hücre: <u>MCF7</u>
ATCC Kodu: HTB-22™
Doku: Meme
Hücre Tipi: Epitel
Hastalık: Adenokarsinom
Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
(ER+,PR+, Her2+)

Bu çalışmada kullanılan tüm hücreler ticari olarak ATCC (American Type Culture Collection)'den temin edilmiştir. MCF10A hücresi, ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresidir. MDA-MB-231 ve SKBR3, MCF7 meme kanseri hücreleridir. Tablo 3.1'de belirtildiği gibi her ikisi ER-,PR- olan MDA-MB-231 ve SKBR3 hücreleri HER2' yi farklı düzeyde ifade etmektedir. SKBR3, HER2 ifade ederken MDA-MB-231 ifade etmemektedir. Çalışmada bu hücrelerin tercih edilmesinin nedeni ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi ile meme kanseri hücrelerinin ve aynı zamanda HER2'yi ifade eden ve etmeyen iki meme kanser hücresinin TREM2'yi ifade etme düzeyleri arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya koymaktır.

MCF10A hücresi için aşağıda içeriği verilen MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium) besiyeri, MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF7 hücreleri için DMEM:F12 (Dulbecco's modified eagle's medium) besiyeri kullanılmıştır (62).

DMEM:F12 Besiyeri

% 10 FBS
100 µg/ml penisilin streptomisin
2 mM L-glutamin

MEGM Besiyeri

% 5 At serumu
0,5 ml Hidrokortizon
%5'lik 200µl Kolera toksini
0,5 ml İnsülin
0,5 ml EGF

0,5 ml GA-1000

2 ml BPE

Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabinde yapılmıştır. Hücreler 37°C’de, %5 CO₂ içeren, nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir. Yapılan tüm deneylerde pasaj sayısı 15’i geçmeyen hücreler kullanılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi

Hücre çözme işlemine başlamadan önce +4 C°’de bulunan MEGM ve DMEM:F12 besiyerleri su banyosunda (37 °C) ısıtılmıştır. Hücreler –196°C ısıya sahip azot tankından alınıp su banyosunda çözöldükten sonra hücre süspansiyonu 15 ml’lik falkon tüpler içërisine alınmıştır. Hücre süspansiyonu üzerine MDA-MB-231 ve SKBR3 hücreleri için 4 ml DMEM:F12 besiyeri, MCF10A hücresi için 4 ml MEGM besiyeri ilave edilerek hücreler seyreltilmiştir ve 1500 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek yıkanması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pelet üzerine MCF10A hücresi için MEGM, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücreleri için DMEM:F12 besiyeri eklenip pipetaj yapılarak pelet homojen hale getirilmiştir ve hücreler toplam volüm 6 ml olacak şekilde 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına alınıp kültürün devamı sağlanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Çözme işlemi sonrasında 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerin doluluk oranları her gün faz kontrast ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir. %70 doluluk oranına ulaşan hücreler için pasajlama işlemine geçilmiştir. Hücrelerin pasajlanması için öncelikle hücreler üzerindeki besiyeri atılmıştır. 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına 2 ml tripsin ilave edilmiştir. Tripsin eklenen hücre kültür kapları 5 dk. %5 CO₂ içeren 37°C ısıya sahip inkübatörde bekletilmiştir. 5 dk. sonunda hücrelerin hücre kültür kaplarının yüzeyinden kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edilmiştir. Hücreler hücre kültür kaplarının yüzeyinden kaldırıldıktan sonra tripsinin etkisini inhibe etmek için 3 ml besiyeri eklenip hücreler steril 15 ml’lik falkon tüplere alınmıştır. 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pelet üzerine DMEM F-12 ve MEGM besiyerleri ile süspanse edilip 75 cm²’lik hücre kültür kaplarına alınmıştır. Hücrelerin çözme işleminden sonra ilk olarak 25 cm²’lik

hücre kültür kaplarına, hücrelerin ilk pasajlama işleminden sonra 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına aktarımı sağlanmıştır. Kültürün devamının sağlanması için hücreler inkübatöre kaldırılmıştır. Yapılacak olan deneyin gerekliliğine göre hücreler pasajlanarak farklı kültür kaplarına aktarımı yapılmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Dondurma Besiyeri

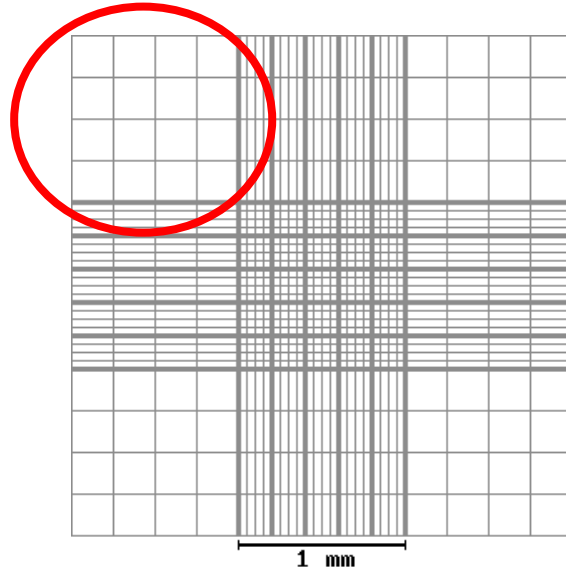
% 10 DMSO

%90 DMEM:F12 veya MEGM

Hücreler pasajlama işlemi sırasında tripsin ile kaldırılıp 15 ml'lik falkon içerine alınmıştır ve 1500 rpm'de, 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atıldıktan sonra pelet üzerine yukarıda içeriği verilen 1 ml dondurma besiyeri eklenip pelet homojen hale getirilmiş ve hücre içeriği dondurma tüplerine alınmıştır. Dondurma tüpleri içerisine alınan hücreler -80°C' de bir gece muhafaza edildikten sonra azot tankında -196 °C' de saklanmıştır.

3.2.5. Hücrelerin Sayılması

Hücre kültürü testleri için hücreler yapılan testlere bağlı olarak 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına, 6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu platelere alınmıştır. Farklı kültür kaplarına alınırken dikkat edilmesi gereken her zaman her kuyucukta eşit sayıda hücre olmalıdır. Bu amaçla yapılan testler için belirli sayıda hücrelerin alınmasını sağlamak amacıyla hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için Neubauer lamı kullanılmıştır. Neubauer lamı üzerinde 16'şar kareden oluşan, hacmi 0,1 µl olan toplam dört alan bulunmaktadır. Toplam dört alandaki Şekil 3.1'de gösterildiği gibi kırmızı ile seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır ve ortalamaları alınarak, alan başına düşen ortalama hücre sayısı hesaplanır. Hücrelerin çok yoğun olduğu zamanlarda süspansiyon dilüe edilir ve yapılan hesaplama dilüsyon faktörü de dahil edilir. 1 ml'deki hücre sayısı; Ortalama canlı hücre sayısı x dilüsyon faktörü x 10⁴ formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Neubauer Lamı

3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi

Liziz Solüsyonu

1 ml %1 Triton X-100

150 mM NaCl

25 mM Tris

Liziz solüsyonu hazırlamak için 50 ml dH₂O üzerine Tris eklenip çözünene kadar karıştırılmıştır. Çözündükten sonra pH 7.6'ya ayarlanmıştır. Karışıma NaCl eklenerek çözülmüştür. Sonra 1ml Triton-X-100 eklenip çözülmüştür. Son pH 7.9'a getirilerek +4°C de muhafaza edilmiştir. Liziz solüsyonunu her kullanımdan önce 2 ml solüsyona 2µL NaF ve 2 µL Na₃VO₄ eklenmiştir.

Hücre lizatı hazırlanması hücrelerin western blot işleminde kullanılmak üzere hazırlanmasında ilk basamaktır. Bu işlem için bölüm 3.2.3'de belirtildiği gibi pasaj işlemi yapılan hücreler 15 ml'lik tüplere alınıp 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine 1 ml PBS eklenerek hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Pelet, PBS ile yıkanıp homojen hale getirilmiştir. Ependorf tüpler 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine hücre sayısına bağlı olarak (2 milyon hücre için 160µl) lizis solüsyonu eklenmiştir. Süspansiyon 15 saniye vortekslenmiştir ve buz üzerine alınarak 10 dk. bekletilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Son olarak hücre süspansiyonu 13000

rpm'de 10 dk. +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınmıştır. Elde edilen lizatlar -80°C'de saklanmıştır (63).

3.2.7. Protein Miktarının Ölçülmesi

Hücrelerden elde edilen lizatların total protein miktarının belirlenmesi amacıyla protein assay kit (Bio-Rad Cat No: 500-0115) kullanılmıştır. Ölçümde kullanılmak üzere BSA (Bovine Serum Albumin) standartı hazırlanmıştır. 10 mg BSA, 1ml dH₂O'da çözülürölerek oluşturulan ana stoktan 6,25, 12.5, 25, 50 µg/µl'lik konsantrasyonlar şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan her 4 standart ve dH₂O, 96 kuyucuklu plaklara her biri 5 µl olacak şekilde eklenmiştir. Lizatı hazırlanan örnekler -80°C'den alınıp buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra toplam hacim 5 µl olacak şekilde 96'lık plağa yüklenmiştir. Yükleme yapıldıktan sonra örnekler üzerine kit içerisinde yer alan 20 µl S solüsyonu + 1 ml A solüsyonu belirtilen oranlarda karıştırılıp her kuyucuk üzerine 25 µl eklenmiştir. Daha sonra kit içerisinde yer alan B solüsyonu 200 µl her kuyucuğa eklenmiştir. Hazırlanan örneklerin spektrofotometrede 750 nm'de ölçümü yapılmıştır.

3.2.8. Western Blot Analizi

10x TBS (Tris Buffer Salin) (1 lt) (+4°C)

31,5 g Tris-HCl

80 g NaCl

ph= 7,6

1x TBS/Tween (1 lt)

900 ml dH₂O

100 ml TBS

2 ml Tween-20

10x Yürütme Solüsyonu (1 lt) (+4°C)

30 gr Tris

144 gr Glisin

1x Yürütme Solüsyonu (1 lt)

100 ml 10x Yürütme Solüsyonu

%10 SDS 10ml

890 ml dH₂O

Transfer Solüsyonu (1 lt) (+4°C)

100 ml 10x Yürütme Solüsyonu

700 ml dH₂O

200 ml Metanol

Yükleme Solüsyonu (-20°C)

7 ml 0,5 M Tris-HCl ph:6,8

3,6 ml Gliserol

1 g SDS

1,2 mg Bromofenol Blue

%18'lik Ayırıcı Jel

2,25 ml dH₂O

3,6 ml %30 ACA/bis ACA

2 ml 1,5 M Tris ph:8,8

80µl %10 SDS

80µl %10 APS

8µl TEMED

%6'lık Depolayıcı Jel

2,6 ml dH₂O

1 ml %30 ACA/bis ACA

1,25 ml 0,5M Tris ph:6,8

50µl %10 SDS

50µl %10 APS

5 µl TEMED

Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı gibi hücre lizatı yapıldıktan sonra bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi her örnek için protein ölçümü yapılmıştır. Her hücre hattı lizatından 40 µg total protein içeren örnekler %6-18’lik kademedeki sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile 90 voltta yürütülerek nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi 30 voltta gece boyu buz üzerinde yapılmıştır (wet-blot). Transfer işlemi sonrasında membran, Tween 20 içeren TBS (Tris-Buffer-Salin) (TBS/T) ile hazırlanan %5’lik süt tozu solüsyonunda 1 saat blotlanmıştır. Bu işlemden sonra 5 kez TBS/T ile 10’ar dk. aralıklarla yıkanmıştır. %2,5’luk süt tozunda 1:1000 oranında seyreltilen TREM2 ve diğer antikorlarla bir gece +4°C’de inkübe edilmiştir. Ardından 3 kez TBS/T ile 10’ar dakika yıkanmıştır. TBS/T’de hazırlanan %2,5’luk süt tozu solüsyonunda horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit veya anti mouse (antikor datasheetinden bakılarak karar verilir) sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir (64). Membran 5 kez TBS/T ile yıkanmıştır. Yıkamalar sonrasında 1:1 oranında karıştırılan Luminol ve peroksit ile muamele edilerek UVP ChemiDoc-It² kemoluminesans cihazı ile görüntülenmiştir. Örneklerin eşit yüklenip yüklenmediğinin anlaşılması için β-aktin antikor kullanılmıştır. Sekonder antikor muamelesi sonrasında yıkamalar yapılarak görüntülenmiştir. Bant yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.9. siRNA Sistemlerinin Oluşturulması

Hedef Sekans	:5'-AAGGAAGATGATGGGAGGAAA-3'
Anlamli (Sense) zincir	:5'-GGAAGAUGAUGGGAGGAAATT-3'
Anlamsız (Anti Sense) zincir	:5'-UUUCCUCCCAUCAUCUUCCTT-3'

siRNA sistemlerinin dizaynı için IDT teknolojinin siRNA dizayn toolu kullanılmıştır. TREM2 için yukarıda verilen dizi BLAST yapılarak spesifik bağlanma olduğu görülmüştür. Stok 10 nM olacak şekilde hazırlanmıştır. Yapılan denemelerde 50 ve 75 nM TREM2 siRNA’sı ve kontrol siRNA kullanılmıştır. En uygun doz seçilerek çalışmaya o doz üzerinden devam edilmiştir. Hücre içerisine siRNA’nın aktarımı için hiperfekt kullanılmıştır. siRNA için uygun saat aralığı belirlenerek deneylerde uygulanmıştır.

3.2.10. Tripan Mavisi Testi (Trypan Blue Exclusion Assay)

25 cm² hücre kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelere siRNA tedavisi uygulanmıştır. Hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda hücre yüzeyindeki besiyeri ayrı ayrı falkon tüplere alınmıştır. Hücreler tripsin yardımıyla hücre kültür kaplarının yüzeyinden kaldırılarak falkon tüplere aktarılmıştır. 15.000 g'de 5 dk. santrifüj yapılarak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine PBS eklenmiştir. Hücrelerin homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Süspansiyon içerisinden 50 µl alınıp 50 µl trypan blue ile karıştırılıp Neubauer lamında 10 µl kullanılarak sayım işlemi yapılmıştır. (Hücrelerin çok yoğun olduğu zamanlarda süspansiyon dilüe edilir ve yapılan hesaplama dilüsyon faktörü de dahil edilir.) Bu işlem sonucunda hesaplama; Ortalama canlı hücre sayısı x dilüsyon faktörü x 10⁴ şeklinde yapılmıştır.

3.2.11. Hücre Proliferasyon Testi (MTS)

Bu bölümde 25 cm² hücre kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelere siRNA tedavisi uygulanmıştır. Hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 96 kuyucuklu plakelere her kuyucukta eşit hücre olacak şekilde besiyeri ile birlikte ekilmiştir. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega kiti kullanılarak her kuyucuğa 10 µl eklenmiştir. 2 saat inkübatörde bekletilerek spektrofotometrede 490 nm'de ölçüm yapılmıştır.

3.2.12. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay)

MDA-MB-231, MCF10A ve MCF7 hücreleri 6 kuyucuklu plakelere her kuyucukta 1000 hücre toplam volüm 2 ml olmak üzere ekilmiştir. Ekim işleminden 1 gün sonra hücreler plate yüzeyine tutunmuştur. Tutunan hücreler üzerine siRNA tedavisi uygulanmıştır. Tedaviden 24 saat sonra hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 7 gün süreyle inkübatörde muhafaza edilerek kültürün devamı sağlanmıştır. Bu süre sonunda tekrar siRNA tedavisi uygulanmıştır. Yine aynı işlem yapılarak 24 saat sonra besiyeri değiştirilip hücreler tekrar 7 gün inkübe edilmiştir. Bu işlemler sonunda hücre yüzeyinden besiyeri uzaklaştırılarak kristal viole ile hücreler boyanmıştır. Koloni oluşturan hücrelerin boyandığı gözlenmiştir. Hücrelerin ışık mikroskobu altında fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.13. Propidiyum İyodür (PI) ile Boyama

Bölüm 3.2.9’da anlatıldığı gibi siRNA uygulaması yapılan hücreler üzerindeki besiyeri 48 saat sonra falkon tüplere alınmıştır. Hücreler tripsin ile kaldırılarak falkon tüplere ilave edilmiştir. Tüpler 1500 rpm’de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant pelet üzerinden uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 ml PBS ile homojen hale getirilmiştir. PBS ile yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilmiştir. PBS hücre yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Pelet %70’lik soğuk etanol ile homojen edilmiştir. Bu işlem sırasında falkon tüpler vorteks üzerindeyken etanol yavaş yavaş eklenerek hücrelerin iyice homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Tüpler 30 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. 5 dk. 2700 rpm’de santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırılmıştır. Pelet 2 kere PBS ile yıkanarak hücre yüzeyinden etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Pelet üzerine 50 µl Rnase A (stok: 100 µg/ml) eklenip pipetaj yapılmıştır. Rnase A üzerine 250 µl PI (stok: 50 µg/ml) solüsyonu eklenip pipetaj yapılmıştır. Son karışım 5-10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra flow sitometride analiz edilmiştir.

3.2.14. Yazılım ve Veritabanları

ImageJ	Western Blot sonuçlarını analiz etmek için kullanılmıştır.
Excel 2013	Sonuçların grafik haline getirilmesi için kullanılmıştır.
Endnote	Kaynakları düzenlemek için kullanılmıştır.

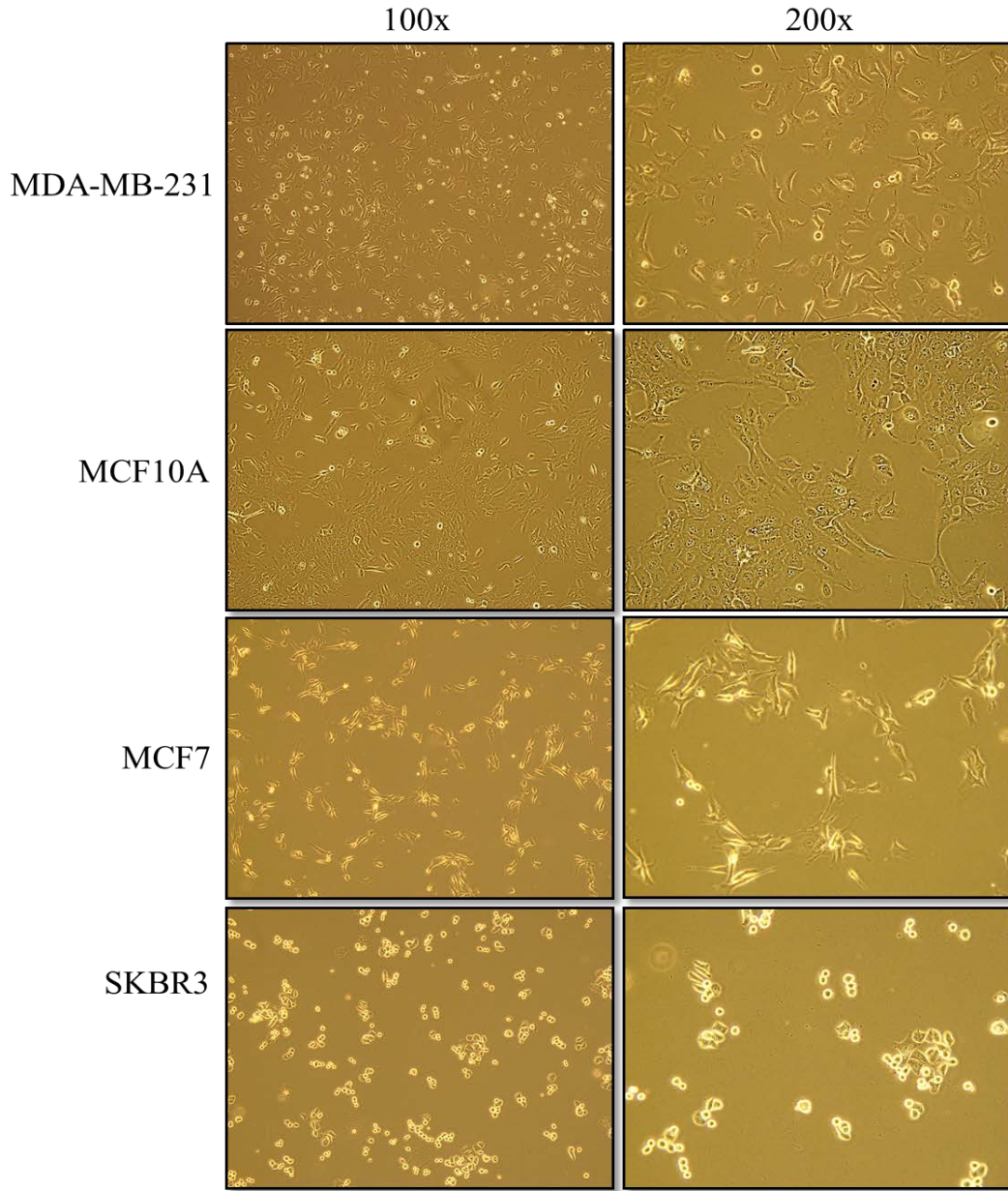
3.2.15. İstatistiksel Analiz

Western Blot sonuçlarına göre elde edilen veriler ImageJ programı kullanılarak sayısal veriler elde edilmiştir. Elde edilen sayısal veriler student t test kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Canlılık ve Doluluk Oranları

MCF10A, MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF7 hücre hatları %70 doluluğa ulaşıncı bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi pasajlanmıştır. Yapılan deneylerde pasaj sayısı 15’ i geçmeyen hücreler kullanılmıştır. Şekil 4.1’de çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik yapıları görülmektedir.



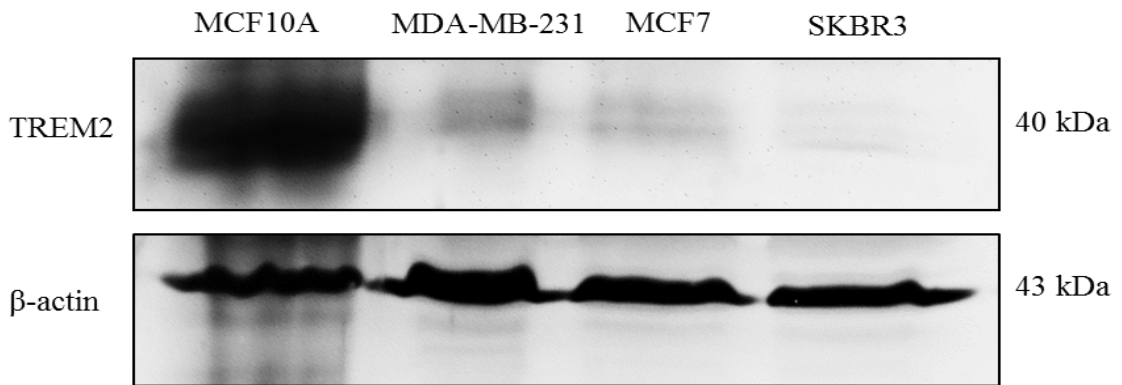
Şekil 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Işık Mikroskopundaki Görüntüleri (100x, 200x)

4.2. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve SKBR3 Hücre Hatlarında TREM2 Varlığının Belirlenmesi

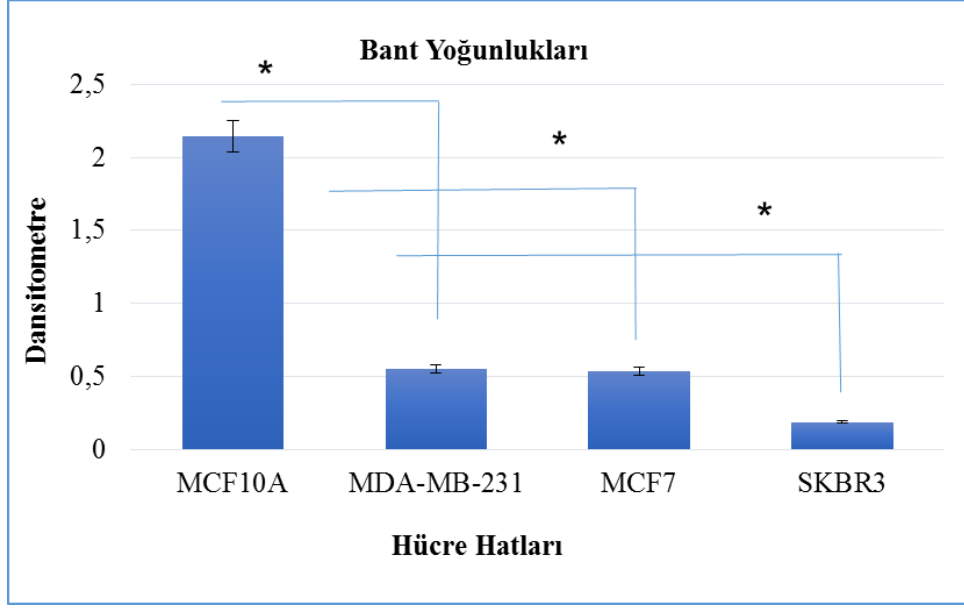
Bu bölümde kültürü yapılan hücrelerin bölüm 3.2.6’da belirtildiği gibi lizati yapılarak protein miktarı ölçülmüştür. Total protein miktarına göre her örnekten 40 µg olacak şekilde Western Blot için yükleme yapılmıştır. WB yöntemi ile TREM2 ifadesine bakılmıştır. Bir house-keeping gen olarak bilinen β -actin geninin ifadesi de bu analizde yüklenen proteinin miktarının eşit olduğunu göstermek amacıyla kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu amaç doğrultusunda α -tubulin de kullanılmıştır.

WB ile TREM2 ifadesi bakılan hücreler sırasıyla; MDA-MB-231 için P6, MCF7 için P5, SKBR3 için P4, MCF10A için P5 pasaj numarasıyla kullanılmıştır. Yapılan WB analizinde bant yoğunluğunu değerlendirmek için ImageJ programı kullanılmıştır. İmage programı ile değerlendirilen bant yoğunlukları Microsoft Office Excel 2013 programında grafik haline getirilmiştir.

WB analizi sonuçları Şekil 4.2’de görülmektedir. Yapılan analizden elde edilen verilere göre diğer hücre gruplarıyla karşılaştırıldığında MCF10A hücresinin en yüksek TREM2 ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Şekil 4.3’de İmageJ ile değerlendirilen bant yoğunluklarına bakıldığında MCF10A hücresinin en yüksek bant yoğunluğuna sahip olduğu MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin bant yoğunluklarının eşit olduğu, SKBR3 hücresinin ise en az olduğu görülmektedir.

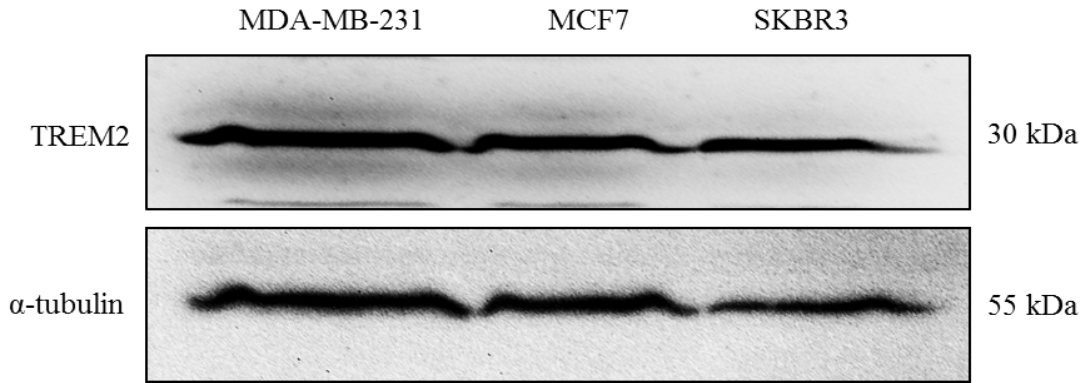


Şekil 4.2. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde TREM2 İfadesi



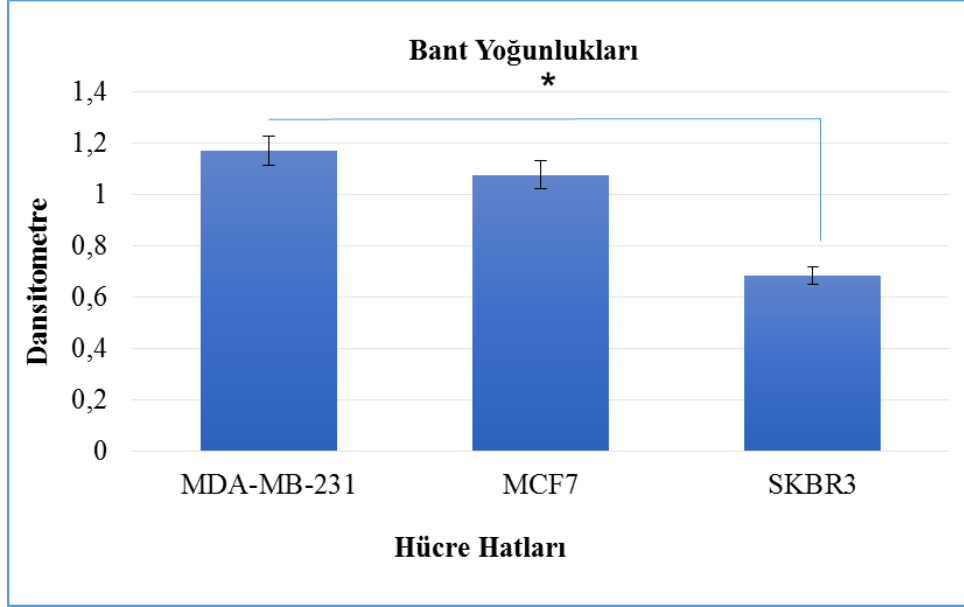
Şekil 4.3. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)

Şekil 4.2’de MCF10A ifadesinin aşırı yüksek olduğu görülmektedir. Bu sebeple cihaz tarafından fazla ışına yapıp görüntünün alınmaya çalışılması diğer hücrelerde bir ifade varsa bile yok gibi göstermektedir. Bu amaçla bir sonraki analizde MCF10A hücresi çıkarılarak diğer hücreler arasında TREM2 ifadesi bakımından bir fark olup olmadığı analiz edilmiştir.



Şekil 4.4. MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde TREM2 İfadesi

Şekil 4.2’de net olarak görülemeyen TREM2 ifadesi daha net bir şekilde Şekil 4.4’de görülmektedir. Yine bir önceki WB analizinde elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Üç meme kanseri hücre grubu karşılaştırıldığında SKBR3’ün diğerlerine göre daha az miktarda TREM2 ifadesi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.5. MDA-MB-231, MCF7, SKBR3 Hücrelerinde Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)

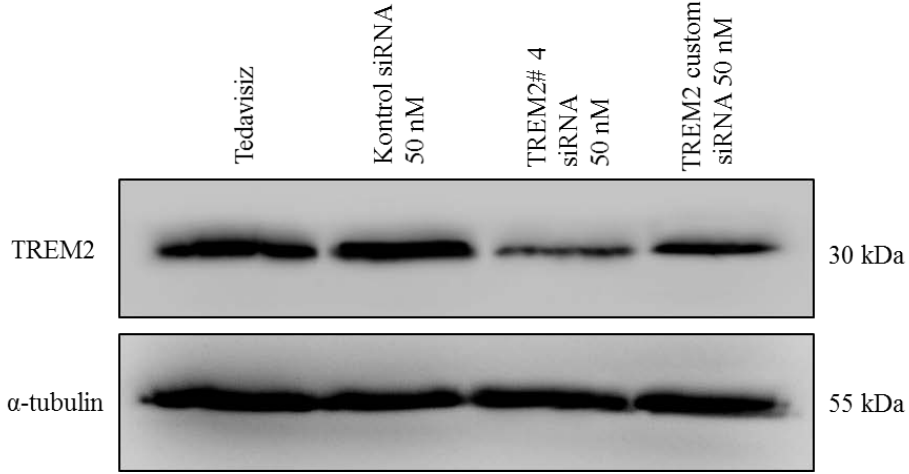
Şekil 4.5’de SKBR3 ve MDA-MB-231 hücresi arasında anlamlı bir fark olduğu yapılan analiz sonucu belirlenmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde MCF7 ve SKBR3 hücreleri arasında da anlamlı bir fark bulunmaktadır. Şekil 4.3’te de görüldüğü gibi SKBR3 diğer iki hücreyle kıyaslandığında TREM2 ifadesinin daha az olduğu belirlenmiştir.

Bu bölümden elde edilen sonuçlara göre MCF10A (ölümsüzleştirilmiş meme hücresi) ve SKBR3,MDA-MB-231,MCF7 (meme kanseri hücreleri) kıyaslandığında MCF10A’nın TREM2’yi daha yüksek düzeyde ifade ettiği belirlenmiştir.

Meme kanseri hücre grupları karşılaştırıldığında ise SKBR3 hücresinin TREM2 ifadesinin daha az olduğu, üç meme kanseri hücre grubu içerisinde TREM2’yi en yüksek düzeyde ifade edenin MDA-MB-231 hücresi olduğu saptanmıştır.

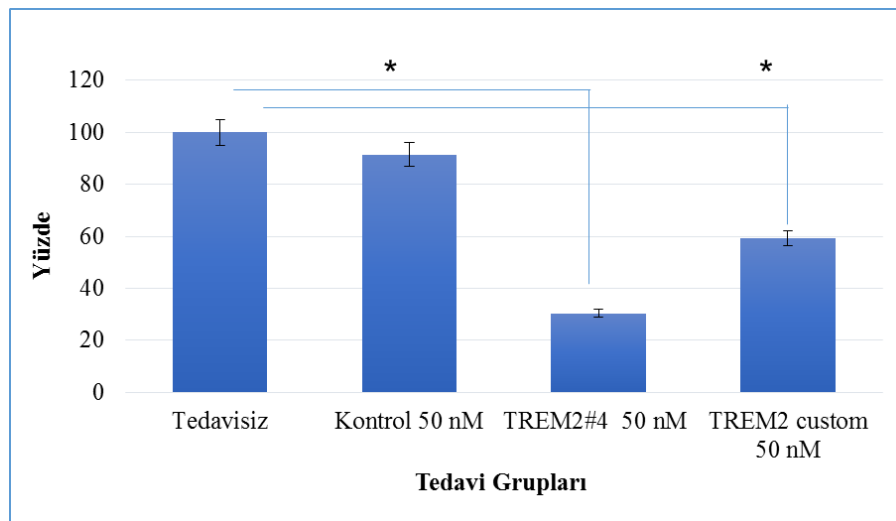
4.3. siRNA sistemleri ile TREM2 ifadesinin baskılanması

MDA-MB-231 hücresinde TREM2 ifadesinin TREM2#4 siRNA'sı ile daha fazla baskılandığı ($p<0,05$), kontrol siRNA ve tedavisiz grup (siRNA uygulaması yapılmayan grup) arasında belirgin bir fark olmadığı şekil 4.6'da görülmektedir.

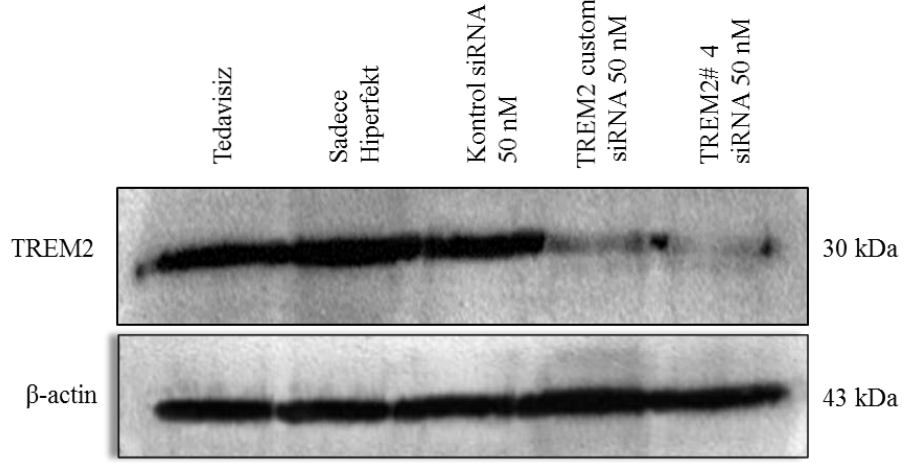


Şekil 4.6. MDA-MB-231 Hücresinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması

WB analizi ile elde edilen veriler şekil 4.7'de grafik haline getirilmiştir. Grafikte tedavisiz grup ile kontrol grubu arasında belirgin bir fark olmadığı, TREM2#4 siRNA'sında baskılanmanın %70 civarında olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

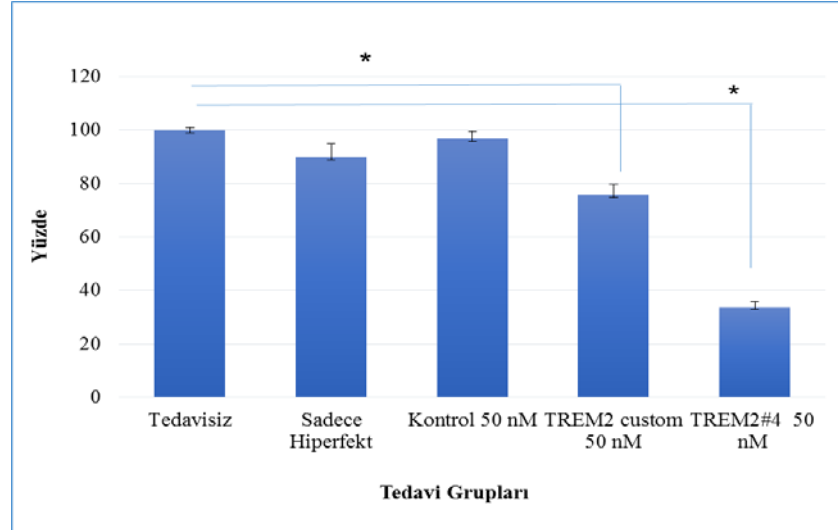


Şekil 4.7. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan MDA-MB-231 Hücresinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)



Şekil 4.8. SKBR3 Hücresinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması

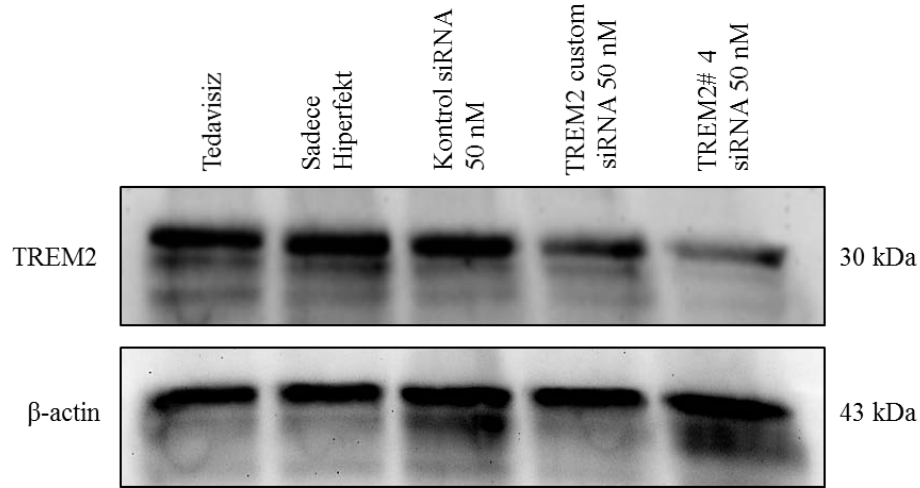
SKBR3 hücresinde şekil 4.9’da görüldüğü gibi TREM2 ifadesinde baskılanmanın TREM2#4 siRNA’sıyla %67 civarında olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Şekil 4.8’de görüldüğü gibi tedavisiz grup ve sadece hiperfekt kullanılan grup arasında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Fark görülmemesi hiperfektin tek başına hücreler üzerinde herhangi bir baskılayıcı etkisi olmadığını göstermektedir. Aynı şekilde kontrol ve tedavisiz grup arasında da belirgin bir fark saptanmamıştır.



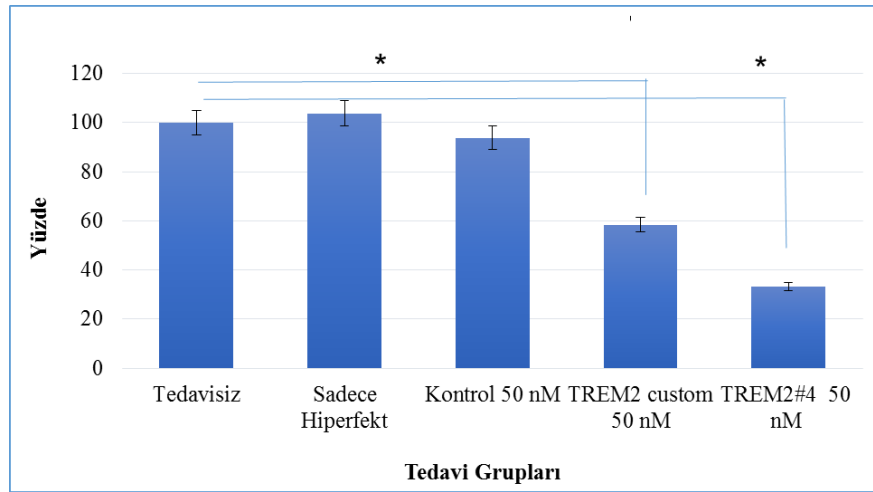
Şekil 4.9. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan SKBR3 Hücresinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (*= $p<0,05$)

Şekil 4.10’da WB sonucu elde edilen veriler Şekil 4.11’de grafik haline getirilmiştir. Grafikte kontrol siRNA ve tedavisiz grup arasında fark olmadığı aynı

şekilde tedavisiz grup ile sadece hiperfekt kullanılan grup arasında da fark olmadığı belirlenmiştir. TREM2 ifadesinin MCF10A hücresinde TREM2#4 siRNA'sı ile %68 oranında baskılandığı saptanmıştır ($p<0,05$). TREM2 custom ile bu oranın %40 civarında olduğu saptanmıştır.

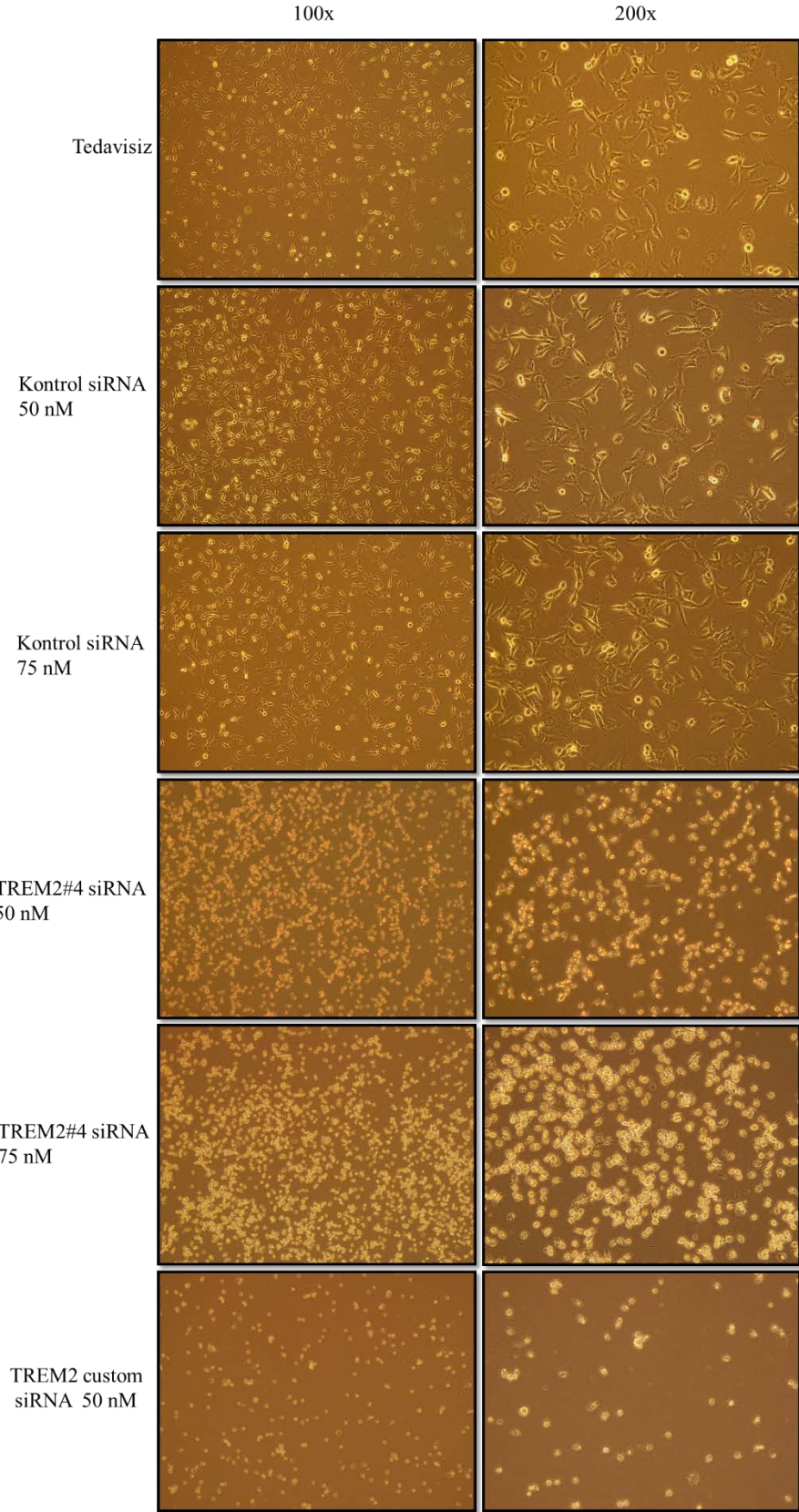


Şekil 4.10. MCF10A Hücresinde TREM2 Protein İfadesinin Baskılanması



Şekil 4.11. TREM2 ifadesi siRNA ile Baskılanan MCF10A Hücresinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması ($p<0,05$)

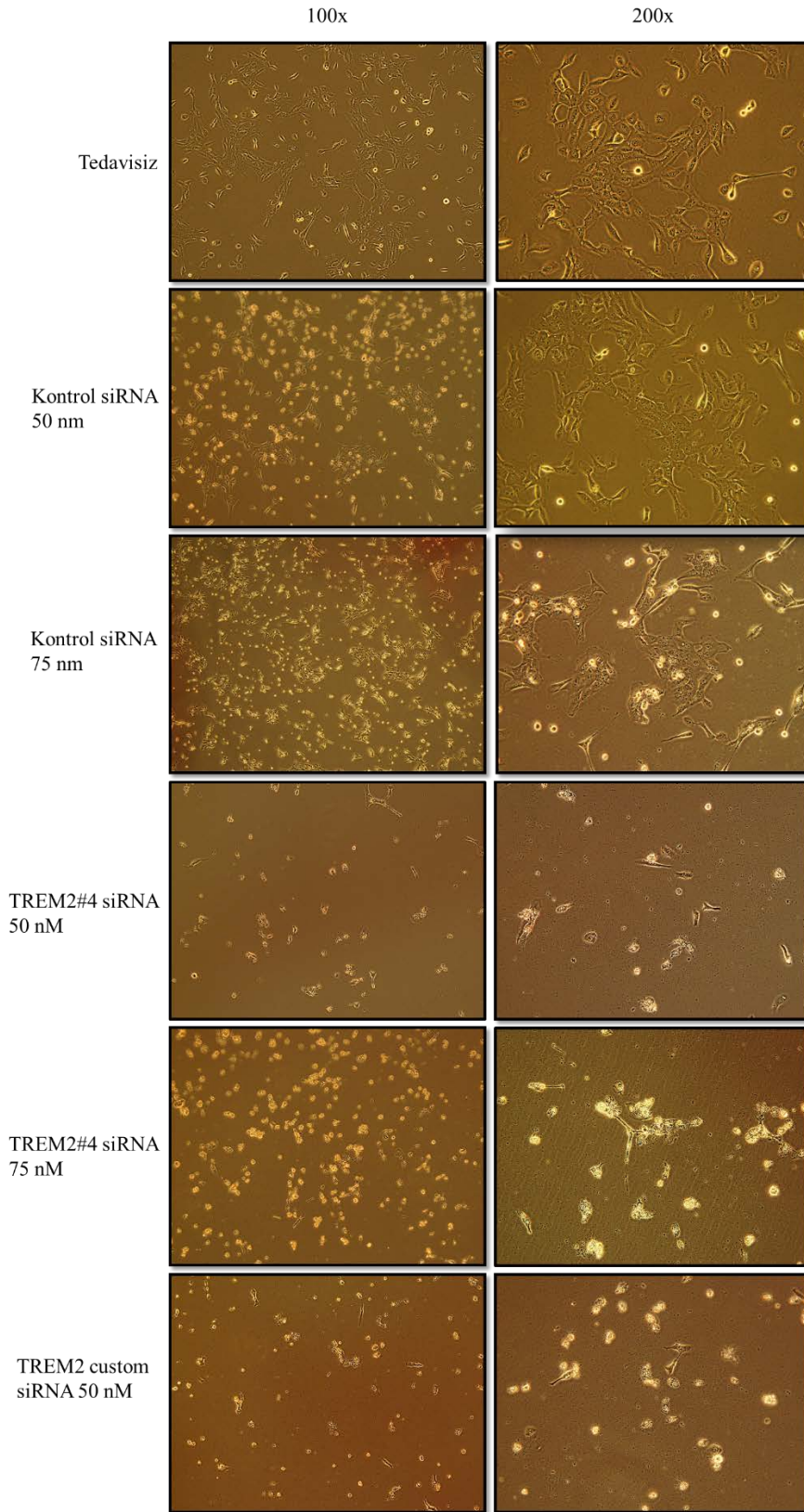
Şekil 4.12’de MDA-MB-231 hücresinde tedavisiz grubun kontrol siRNA ile karşılaştırılması yapılmıştır. 50 ve 75 nM’da kontrol siRNA için gruplar arasında fark olmadığı görülmüştür. Tedavisiz ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.12. MDA-MB-231 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 siRNAları ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x)

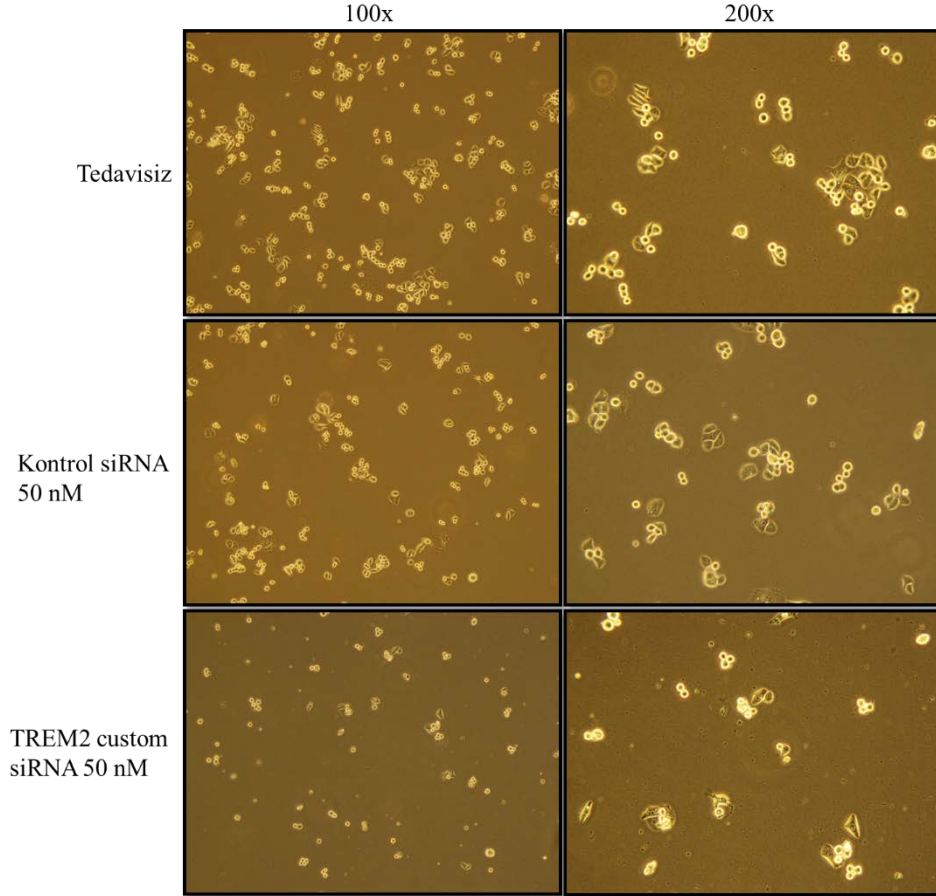
Şekil 4.12’de MDA-MB-231 hücresinde farklı iki marka TREM2 siRNA’sı kullanılmıştır. 48 saat sonrasında hücrelerde TREM2#4 50 nM’da tedavisiz gruba göre belirgin bir fark görülmektedir. 50 nM’da hücrelerin ölmeye başladığı, TREM2 custom siRNA ile 50 nM’da ise ölüm oranının daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.13’de MCF10A hücresinde 48 saat sonra kontrol siRNA ve tedavisiz grup karşılaştırılmıştır. Önemli ölçüde bir fark olmadığı saptanmıştır. 75 nM Kontrol siRNA’da ölüm oranının 50 nM’a göre biraz fazla olduğu belirlenmiştir. Tedavisiz grup ile TREM2#4 50 nM, TREM2#4 75 nM ve TREM2 custom siRNA karşılaştırılmıştır. Tedavi yapılmayan gruba göre 50 nM’da her iki siRNA’da hücrelerin ölmeye başladığı gözlenmiştir. 75 nM’da ise ölüm oranının biraz daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13. MCF10A Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 siRNAları ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x)

Şekil 4.14’de SKBR3 hücre hattında tedavisiz grup, kontrol siRNA ve TREM2 custom 50 nM karşılaştırılmıştır. Beklenildiği gibi kontrol siRNA ve tedavisiz grup arasında fark görülmemektedir. TREM2 custom 50 nM’da ise hücrelerin ölmeye başladığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14. SKBR3 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Kontrol siRNA ve TREM2 Custom ile Muamele Edilen Hücrelerin Karşılaştırılması (48 saat) (100x, 200x)

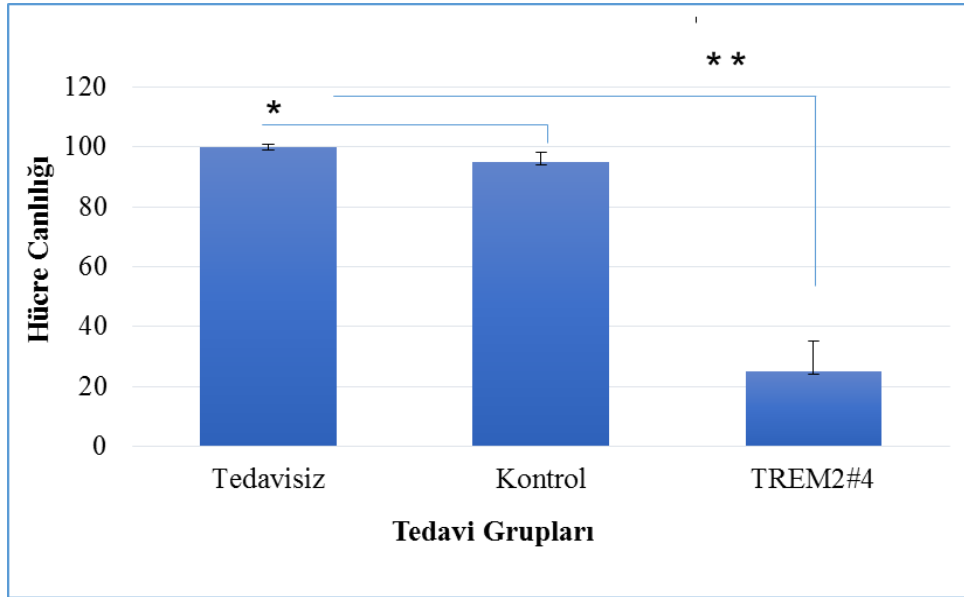
TREM2 ifadesinin baskılanması WB ile analiz edildikten sonra 50 nM’ın siRNA uygulaması için uygun doz olduğu mikroskop görüntüleriyle de desteklenmiştir. Çalışmanın devamı için 50 nM uygun doz olarak belirlenmiştir.

4.4. TREM2 İfade Edilmeyen Hücreler ve İfade Edilen Hücrelerde TREM2'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla hücreler 50 nM kontrol siRNA ve 50 nM TREM2 siRNA ile muamele edildikten 48 saat sonra MTS (hücre proliferasyon testi) ile analiz edilmiştir. Bu test ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

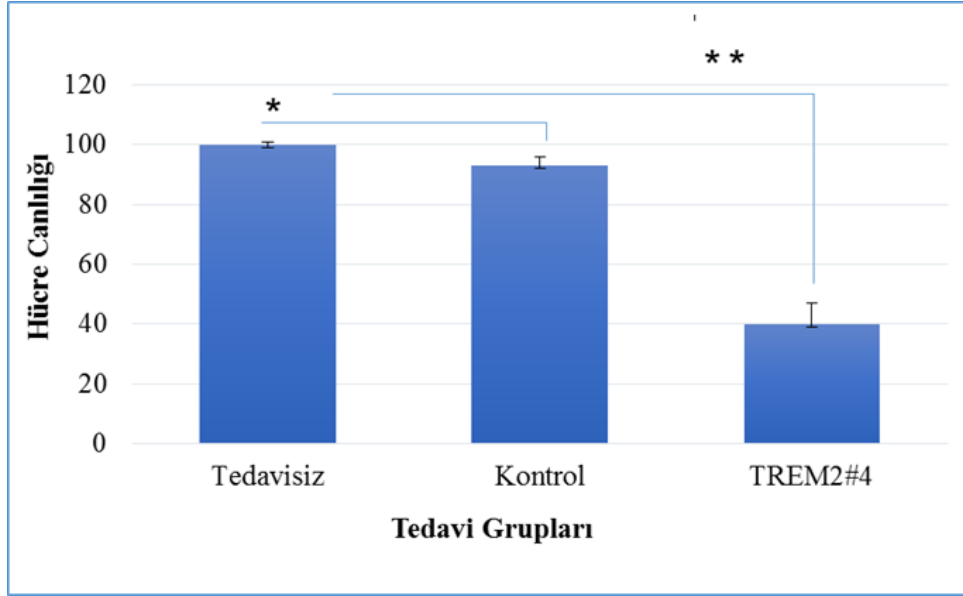
Şekil 4.15'de MDA-MB-231 hücresinin spektrofotometreden elde edilen analiz sonuçları grafik haline getirilmiştir ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir.

MDA-MB-231 hücresinde TREM2 siRNA muamelesi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre azalmış olduğu ve bu azalmanın yaklaşık olarak %60 oranında olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Tedavisiz ve kontrol grup karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamsız olduğu saptanmıştır ($p>0,05$).



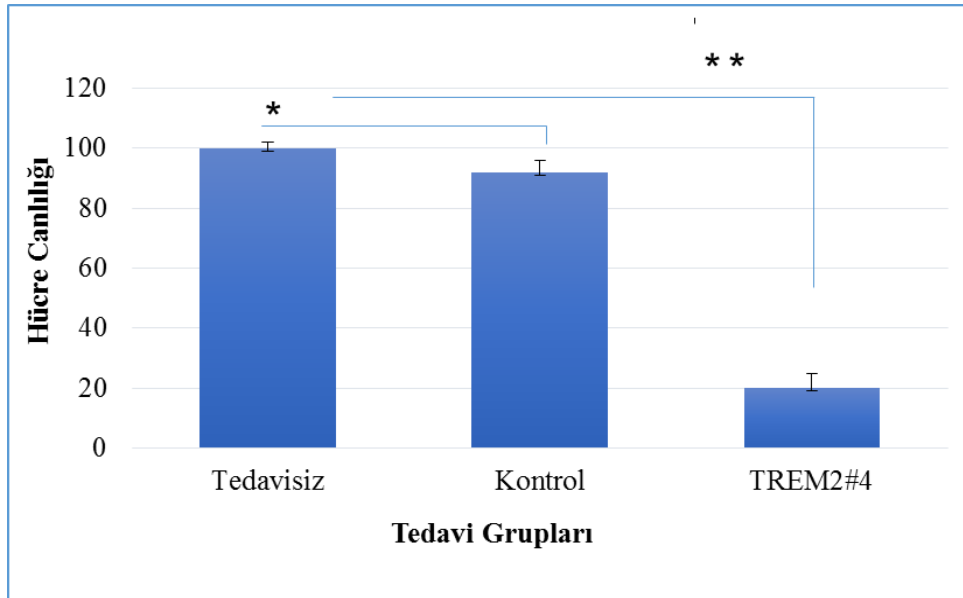
Şekil 4.15. MDA-MB-231 Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$)

Şekil 4.16'de SKBR3 hücresinde siRNA muamelesinden sonra hücre canlılığında meydana gelen değişim yüzde olarak verilmiştir. Bu grafiğe göre tedavisiz ve kontrol grup arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$), tedavisiz ve TREM2 siRNA ile muamele edilen grup karşılaştırıldığında hücre canlılığının yaklaşık olarak %50 oranında azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.16. SKBR3 Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$)

Şekil 4.17’de MCF10A hücresinde ise hücre canlılığının tedavisiz gruba göre yaklaşık olarak %75 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Tedavisiz grup ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

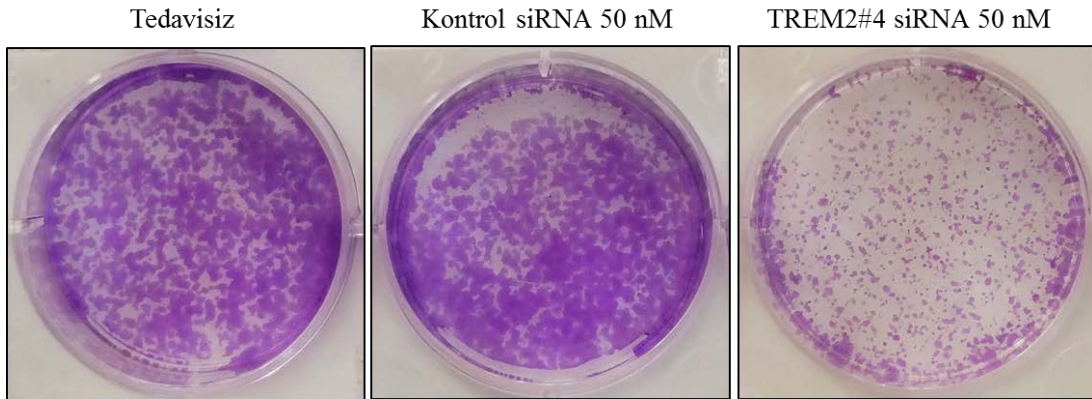


Şekil 4.17. MCF10A Hücresinde Hücre Canlılığı Yüzdesi (*= $p>0,05$) (**= $p<0,05$)

4.5. TREM2 siRNA ile Muamele Edilen Hücrelerde Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

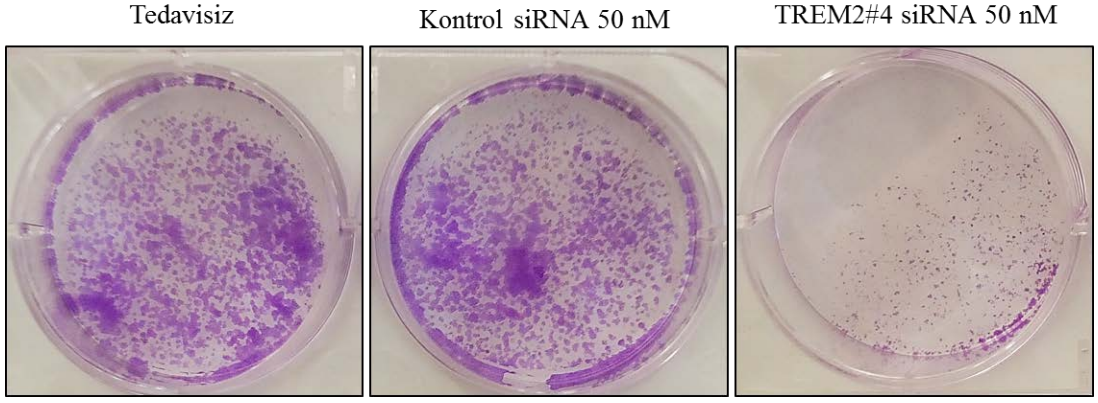
Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini ölçmek için kristal viyole kullanılmıştır. siRNA ile muamele edilen hücrelerin 24 saat sonra besiyeri değiştirilip 7 gün inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrar siRNA tedavisi uygulanıp aynı işlem uygulanmıştır. Toplam 15 gün sonunda kristal viyole ile hücreler boyanmıştır. Her plak analiz için fotoğraflanmıştır.

SKBR3 hücresi kültür sırasında koloni halde çoğaldığı için bu hücreye benzer MCF7 hücresi kullanılmıştır. Şekil 4.18’de MCF7 hücresi boyamasına bakıldığında tedavisiz grup ve kontrol siRNA grubu arasında fark olmadığı görülmektedir. Tedavisiz grup ve TREM2 siRNA ile muamele edilen grup karşılaştırıldığında hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin tedavisiz gruba göre azaldığı saptanmıştır.



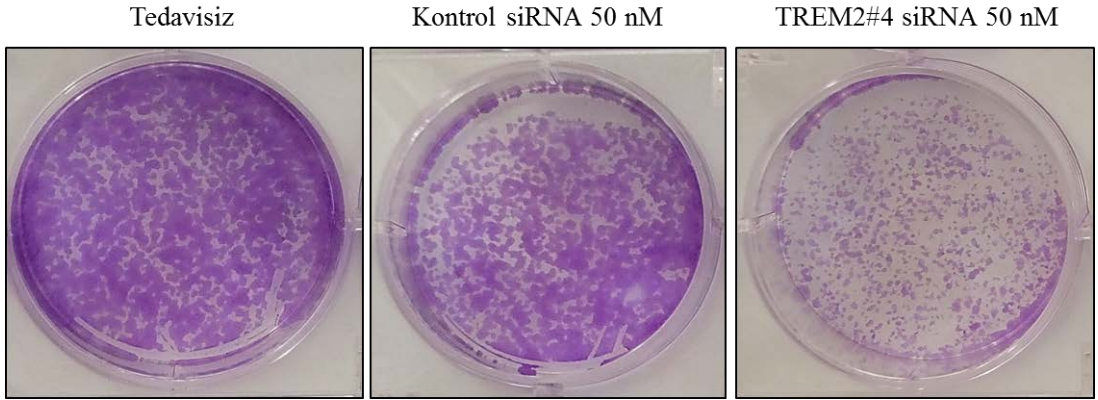
Şekil 4.18. MCF7 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

MDA-MB-231 hücresine bakıldığında Şekil 4.19’da tedavisiz grup ve kontrol grubu arasında fark görülmemektedir. Tedavisiz grup ve TREM2 siRNA ile muamele edilen grup karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücresinde de hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.19. MDA-MB-231 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

Son olarak MCF10A hücresi için yapılan koloni oluşturma testinde MCF10A hücresinin de TREM2 siRNA'sı ile muamelesi sonucunda hücrelerin koloni oluşumlarının etkilendiği, yani azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.22).

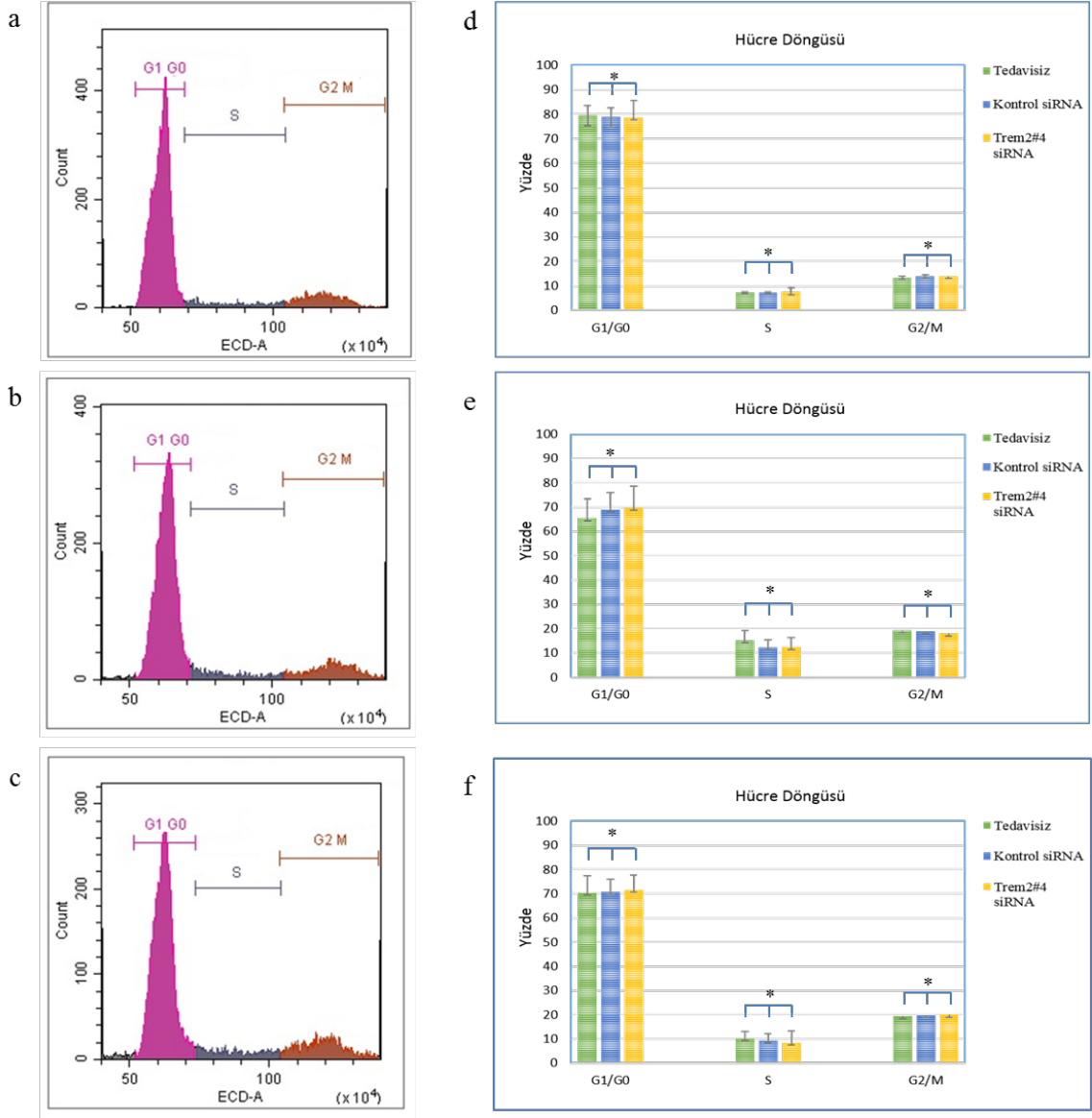


Şekil 4.20. MCF10A Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

Sonuç olarak her üç hücre grubunda da kontrol siRNA ile muamele koloni oluşumunu etkilememiştir. TREM2 siRNA'sı ile muamele ise koloni oluşumunu azaltmıştır.

4.6. TREM2'nin Hücre Döngüsü Üzerindeki Rolünün Belirlenmesi

siRNA ile muamele edilen hücrelerde hücre döngüsünün analizi için Propididyum Iyodür ile boyama yöntemi kullanılmıştır.

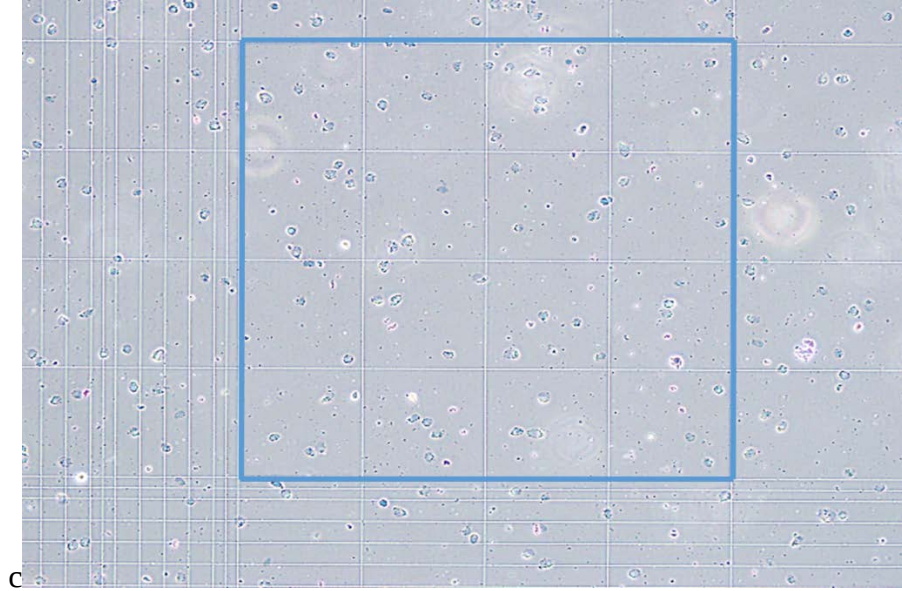


Şekil 4.21. a) MDA-MB-231 Hücresinde Tedavisiz Grubun Flow Sitometri ile Analizi
b) MDA-MB-231 Hücresinde Kontrol siRNA Grubunun Flow Sitometri ile Analizi
c) MDA-MB-231 Hücresinde TREM2 siRNA Grubunun Flow Sitometri ile Analizi
d) MDA-MB-231 Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= p>0,05)
e) SKBR3 Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= p>0,05)
f) MCF10A Hücresinde Flow Sitometri ile Analiz Edilen Gruplar (*= p>0,05)

Şekil 4.21’de siRNA ile tedavi edilen grupların analizi yapılmıştır. Sonuçlardan görüldüğü üzere 3 hücre grubunda da G1/G0 evresi için tedavisiz, kontrol siRNA ve TREM2 siRNA grupları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Aynı şekilde S ve G2/M evresi için de tedavisiz, kontrol siRNA ve TREM2 siRNA grupları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

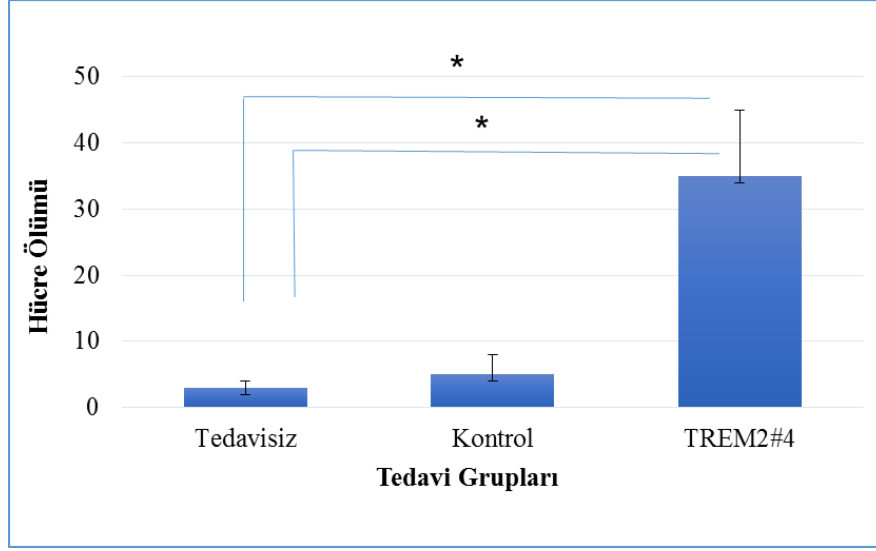
4.7. TREM2’nin Hücre Ölümündeki Rolünün Belirlenmesi

siRNA ile muamele edilen hücreler Tripan mavisi ile boyanmıştır. Bu analiz ile hücrelerde meydana gelen ölüm oranı yüzde olarak değerlendirilmiştir. Neubauer lamında şekil 4.22’de belirtilen 16 kare içerisindeki ölü ve canlı hücre sayısı sayılmıştır. Bu boyamada ölü hücreler şekilde görüldüğü gibi maviye boyanmaktadır.



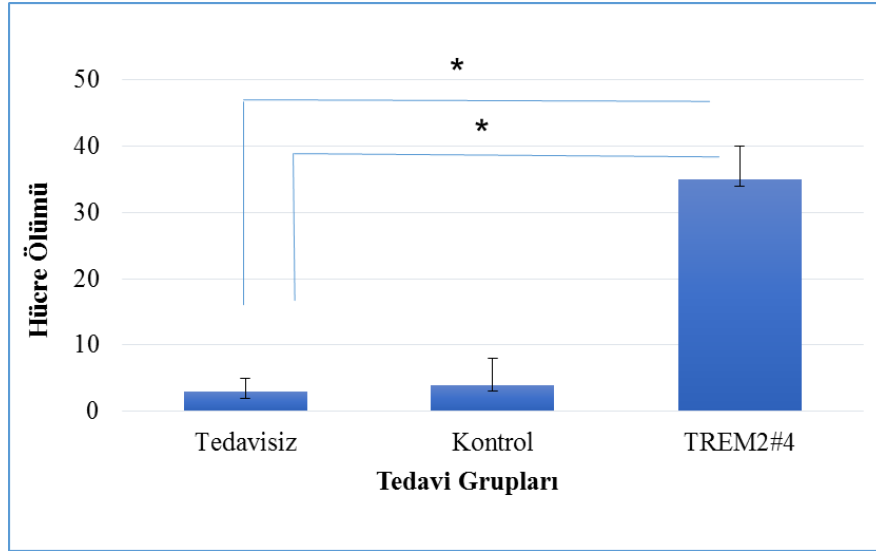
Şekil 4.22. Neubauer Lamında Canlı ve Ölü Hücre Sayımı

MDA-MB-231 hücresinde yapılan boyama sonucunda elde edilen verilere göre TREM2 siRNA ile muamele edilen grupta % 45 civarında ölüm meydana gelmiştir. Tedavi yapılmayan grupta hücre ölümü % 5 iken kontrol siRNA’da oran %9 civarındadır. Şekil 4.23’de belirtildiği gibi istatistiksel olarak tedavisiz ve TREM2 siRNA arasındaki fark anlamlı olup ($p<0,05$), tedavisiz grup ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).



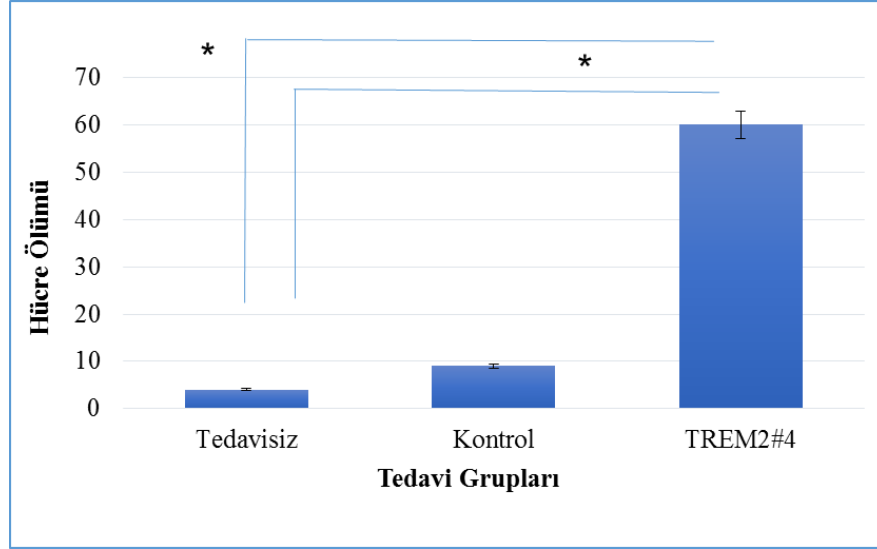
Şekil 4.23. MDA-MB-231 Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p<0,05$)

SKBR3 hücresi için yapılan boyama sonucunda bu hücre grubu için şekil 4.24’de görüldüğü gibi TREM2 siRNA’da hücrelerde %35-40 civarında hücre ölümü saptanmıştır. Tedavisiz ve kontrol siRNA grubunda hücre ölümünün önemsenmeyecek şekilde az olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.24. SKBR3 Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p<0,05$)

MCF10A hücresi için yapılan analizde şekil 4.25’da görüldüğü gibi TREM2 siRNA’sı ile muamele edilen hücrelerde hücre ölümünün %60-65 civarında olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda ise hücre ölümünün %10 civarında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.25. MCF10A Hücresinde Hücre Ölümü Yüzdesi ($p < 0,05$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, öncelikle TREM2'nin kanser hücrelerinde ifade edilme düzeyine bakılmıştır. Kanser hücrelerinde ifade edilip edilmediğinin belirlenmesi için MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF7 meme kanser hücre hatları kullanılmıştır. Meme kanseri ve normal hücrelerdeki ifadesinin değerlendirilmesi için MCF10A ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi kullanılmıştır. WB analizi sonucunda TREM2 ifadesinin ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi olan MCF10A'da meme kanseri hücrelerine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Meme kanseri hücrelerinde TREM2 ifadesi karşılaştırıldığında ise MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinde neredeyse eşit derecede ifade edildiği SKBR3'de ise diğerlerine göre en az şekilde ifade edildiği saptanmıştır.

Bugüne kadar TREM2 ifadesinin kanser sürecindeki etkisinin gösterildiği çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Genellikle yapılan bu çalışmalar in vivo olarak yapılmıştır. Bu konunun aydınlatılması için hala daha birçok eksik bulunmaktadır. Literatürde TREM2 ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda inflamasyon üzerine olan etkileri konusunda yoğunlaşmış olup 2 çalışmada indirekt olarak monosit TREM2 ekspresyonlarının akciğer kanserine karşı immün yanıtla ilişkisi irdelenmiştir (65).

Tümör taşıyan hücrelerde immün fonksiyon bozukluğuna yol açan TREM2'nin rolünün araştırılması için Yao Y vd., (2016) tarafından yapılan bir çalışmada akciğer kanseri hastalarında periferik kan monositleri flow sitometri ile, akciğer dokusundaki tümör hücrelerinin etrafındaki makrofajlar immunohistokimya ile analiz edilmiştir. 3LL (Lewis lung carcinoma) hücreleri kullanılarak tümör mikro çevresine uygun ortam sağlanmaya çalışılmıştır. Sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında akciğer kanserli hastalarda TREM2'nin ifadesinin monositlerde artış gösterdiği bildirilmiştir. Cerrahi operasyon ile tümör bölgesinin çıkarılması sonucunda monosit TREM2 ifadesinde önemli derecede azalma olduğu saptanmıştır (65). Ayrıca, fare akciğerinde tümör oluşumundan sonra TREM2⁺ dendritik hücrelerin yüzdesinin artış gösterdiği ve TREM2⁺ dendritik hücrelerin TREM2⁻ hücrelerden daha fazla olarak T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada TREM2'nin akciğer kanserinin ilerlemesinde negatif immün regülatör olarak rol oynadığı bildirilmiştir (65).

TREM2 ifadesi Correale C vd., (2013) tarafından “Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells type-2 (TREM-2) induces a transmissible and protective intestinal microbiota for colitis and colitis associated cancer” adıyla “9th Congress of ECCO. Copenhagen” kongresinde sunulan daha sonra makale haline getirilen bildiride, sağlıklı ve tümör taşıyan knock-out farelerde araştırılmıştır. Bu çalışmada tümör proliferasyonu ve TNF, IL-6, IL-23, TGF- β , iNOS, COX-2 seviyeleri yabancıl tip ve knock-out farelerde karşılaştırılmıştır. TREM2 proteinin yokluğu, IL-23 ve IL-6 üretimini ve COX-2, iNOS gibi tümörü teşvik edici proteinlerin ifadesini, ayrıca knock-out farelerde tümör proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile TREM2’nin kolit ile ilişkili kolon kanseri gelişimini kontrol etme sürecinde anahtar bir rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca TREM2 ifadesinin, CD11c⁺ dendritik hücreler tarafından uyarılan kolit ilişkili kanser sırasında artış gösterdiği, TREM2 ifadesinin susturulması sonucunda tümör oluşumunun ve proliferasyonun engellendiği bildirilmiştir (66).

Ayrıca 1 çalışmada TREM2’nin kolon kanserinde inflamatuvar süreç üzerinde rolünden bahsedilmiştir. Bu çalışmada TREM2 transgenik fareler ve MC38 kolon adenokarsinom hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada TREM2’nin kolon kanserinde hücre proliferasyonu, kolon hücrelerinin migrasyonu, TREM2’nin hücre döngüsü ile ilişkili genler üzerindeki rolü ve TREM2’nin kanser hücrelerini öldürmek için aktive ettiği natural killer hücrelerinin ifadeleri belirlenmiştir (67).

Direk olarak TREM2’nin hücreler üzerindeki ifadesinin WB analizi ile değerlendirildiği 1 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma in vitro olarak yapılmıştır. Çalışmada öncelikle normal dokular ve gliyomların TREM2 düzeyi PCR ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak TREM2 ifadesinin normal dokulara göre gliyomlarda daha fazla ifade edildiği bildirilmiştir. Çalışmada SHG44, U251, T98G, U373 ve U87 hücreleri kullanılmış ve bu hücrelerden en yüksek TREM2 ifadesi gösteren hücre çalışmanın devamı için seçilmiştir. U373 ve U87’nin en yüksek TREM2 ifadesine sahip olduğu bildirilmiştir (68).

Literatürde bu güne kadar TREM2 ifadesinin kolon kanseri, gliyomlar, monositler gibi dokularda ifade edildiğine dair bilgilere rastlanmaktadır (65-68). Bu çalışma kapsamında kullanılan ölümsüzleştirilmiş meme epitel hücresi (MCF10A) ve

meme kanseri hücrelerinde de (MDA-MB-231, MCF7 ve SKBR3) ifade edildiği saptanmıştır.

Hücrelerde TREM2 ifadesi analiz edildikten sonra TREM2'nin ifadesi siRNA ile baskılanıp meydana gelen değişiklikler gözlenmiştir. Wang XQ vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada da aynı şekilde gliyoma hücrelerinin TREM2 ifadesi siRNA ile baskılanmıştır (68). Bu çalışmada hücreleri siRNA ile baskıladıktan sonra hücre proliferasyonunda meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek için MTS analizi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise proliferasyonun MDA-MB-231 hücresinde %60, SKBR3 hücresinde %50, MCF10A da ise %75 civarında azaldığı belirlenmiştir. Wang XQ vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise proliferasyonun gliyomlarda zamana bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Correale C vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada da TREM2 ifadesinin farelerde susturulması sonucunda tümör oluşumunun ve proliferasyonun engellendiği bildirilmiştir (66).

siRNA ile TREM2 ifadesi baskılanan hücrelerin proliferasyonu değerlendirildikten sonra koloni oluşturma yetenekleri test edilmiştir. Yapılan analizde meme kanseri ve ölümsüzleştirilmiş epitel hücresinde hücrelerin siRNA ile tedavi edilmesi sonrasında koloni oluşturma yeteneklerinin azaldığı belirlenmiştir.

siRNA tedavisi ile hücrelerde meydana gelen hücre ölümü belirlenmiştir. TREM2 ifadesi baskılandıktan sonra hücre ölümünde MCF10A hücresinde %60-65, MDA-MB-231 hücresinde %45, SKBR3 hücresinde ise %35-40 olarak belirlenmiştir. Ayrıca TREM2 baskılamasının hücre döngüsü üzerine etkileri de incelenmiş ancak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Çalışmamızda TREM2'nin normal meme epitel hücresinin ölümsüzleştirilmesiyle elde edilen MCF10A hücrelerinde kanser hücrelerinden daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu sonuç meme kanseri gelişiminde TREM2 fazla ifade edilmesinin koruyucu bir rol üstlendiğini veya kanser geliştikten sonra ortaya çıkan mekanizmalarla ifade düzeyinin azaltıldığını düşündürmektedir. Ancak siRNA ile yapılan TREM2 ifadesinin baskılanmasının hücre proliferasyonunda azalma, koloni oluşturma yeteneklerinin azalması, hücre ölümünde artmaya sebep olması kanser hücrelerindeki ifadelene azalmasının koruyucu bir etki yapmadığı, kanser gelişiminden sonra ortaya çıkan mekanizmalarla ifadelene baskılandığını düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızın sonuçlarına göre; siRNA ile yapılan

baskılamanın hücreler üzerine etkilerine bakıldığında kanser hücrelerinde azalmış olsa dahi var olan TREM2 ifadesinin hücreler için kritik olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile ilk defa TREM2 ifadesi in vitro'da meme kanseri hücreleri ve meme epitel hücresinde analiz edilmiştir. TREM2 baskılanmasının hücre ölümünü artırıcı, hücre proliferasyonunu azaltıcı etki yaptığı belirlenmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan beklenen etkilerin ortaya çıktığı bu çalışma sonucunda TREM2 hedeflemesinin kanser tedavisi için yeni bir ümit olacağı aşikardır. İn vitro ortamda alınan olumlu sonuçların in vivo modellerde nasıl sonuçlar doğuracağı, toksik etkilerinin olup olmayacağı gelecek araştırmalarımızın odak noktaları olacaktır. Ayrıca TREM2 hedeflemesinin diğer kanser türlerinde vereceği sonuç, TREM2'yi baskılayıcı doğal ve sentetik ilaçların keşfi de gelecek araştırmalarımızın konuları olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler. http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutup_hane/kitaplar/kanser.pdf. 5 Şubat 2016.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016, 66: 7-30.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012, 62: 10-29.
4. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013, 63: 11-30.
5. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 2014, 64: 9-29.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 2015, 65: 5-29.
7. Özmen V. Meme hastalıkları dernekleri federasyonu meme kanseri eğitim modülü. http://www.tmhdf.org.tr/Uploads/Editor/files/MemeKanseri_UzmanHekim.pdf. 3 Ocak 2016.
8. American Cancer Society ACS. Breast cancer survival rates by stage. 2012, 1-37.
9. Tomasello E, Vivier E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. Eur J Immunol 2005, 35: 1670-7.
10. Paradowska-Gorycka A, Jurkowska M. Structure, expression pattern and biological activity of molecular complex TREM-2/DAP12. Hum Immunol 2013, 74: 730-7.
11. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000, 406: 747-52.
12. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent

- gene expression data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003, 100: 8418-23.
13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001, 98: 10869-74.
 14. Çavuşoğlu AÇ, Saydam, S., Canda, T., Sakızlı, M. Meme Tümör Sınıflamasında Yenilik Çabaları. The Journal of Breast Health 2009, 5: 187-90.
 15. Eliyatkin N, Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., Vardar, E. Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk Journal Breast of Health 2015, 11: 59-66.
 16. Engin K. Meme Kanseri. 8. Baskı. Bursa, Nobel Tıp Kitapevi, 2005: 55-69
 17. Atalay C. HER2 Pozitif Meme Kanseri Cerrahi Yaklaşım Nasıl Olmalı? The Journal of Breast Health 2015, 6: 1-4.
 18. Roe K, Gibot S, Verma S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity? Frontiers in microbiology 2014, 5: 627.
 19. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. Nature 2001, 410: 1103-7.
 20. Zhou J, Chai F, Lu G, Hang G, Chen C, Chen X, Shi J. TREM-1 inhibition attenuates inflammation and tumor within the colon. International immunopharmacology 2013, 17: 155-61.
 21. Arts RJ, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. Journal of leukocyte biology 2013, 93: 209-15.
 22. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. J Immunol 2000, 164: 4991-5.

23. Fortin CF, Lesur O, Fulop T, Jr. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *International immunology* 2007, 19: 41-50.
24. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Bollaert PE, Lozniewski A, Mory F, Levy B, Faure GC. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 2004, 200: 1419-26.
25. Bosco MC, Pierobon D, Blengio F, Raggi F, Vanni C, Gattorno M, Eva A, Novelli F, Cappello P, Giovarelli M, Varesio L. Hypoxia modulates the gene expression profile of immunoregulatory receptors in human mature dendritic cells: identification of TREM-1 as a novel hypoxic marker in vitro and in vivo. *Blood* 2011, 117: 2625-39.
26. Bouchon A, Hernandez-Munain C, Cella M, Colonna M. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 2001, 194: 1111-22.
27. Chen LY. Regulation Of Toll-Like Receptor Signal Transduction Pathways. Graduate Department of Medical Biophysics. Doktora Tezi, Kanada: Toronto Üniversitesi, 2009.
28. Molloy EJ. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM) family and the application of its antagonists. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009, 4: 51-6.
29. Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 2008, 213: 701-13.
30. Hamerman JA, Jarjoura JR, Humphrey MB, Nakamura MC, Seaman WE, Lanier LL. Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol* 2006, 177: 2051-5.
31. Ito H, Hamerman JA. TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cell-2, negatively regulates TLR responses in dendritic cells. *Eur J Immunol* 2012, 42: 176-85.

32. Turnbull IR, Colonna M. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nature reviews Immunology* 2007, 7: 155-61.
33. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Vivier E, Hong-Geller E, Wei S, Djéu JY. Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J Immunol* 2002, 168: 3155-64.
34. Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nature immunology* 2005, 6: 579-86.
35. Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 2006, 177: 3520-4.
36. Takaki R, Watson SR, Lanier LL. DAP12: an adapter protein with dual functionality. *Immunological reviews* 2006, 214: 118-29.
37. Hamerman JA, Pottle J, Ni M, He Y, Zhang ZY, Buckner JH. Negative regulation of TLR signaling in myeloid cells--implications for autoimmune diseases. *Immunological reviews* 2016, 269: 212-27.
38. Peng Q, Malhotra S, Torchia JA, Kerr WG, Coggeshall KM, Humphrey MB. TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Science signaling* 2010, 3: ra38.
39. Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clinical and experimental immunology* 2004, 136: 312-9.
40. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 2008, 30 Suppl 1: 73-7.
41. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *Bmj* 2016, 353: i1585.
42. Chen Q, Zhang K, Jin Y, Zhu T, Cheng B, Shu Q, Fang X. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2 protects against polymicrobial sepsis by enhancing

- bacterial clearance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013, 188: 201-12.
43. Gregory DJ. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2: a new ally against sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013, 188: 125-6.
 44. Paloneva J, Kestila M, Wu J, Salminen A, Bohling T, Ruotsalainen V, Hakola P, Bakker AB, Phillips JH, Pekkarinen P, Lanier LL, Timonen T, Peltonen L. Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 2000, 25: 357-61.
 45. Paloneva J, Manninen T, Christman G, Hovanes K, Mandelin J, Adolfsson R, Bianchin M, Bird T, Miranda R, Salmaggi A, Tranebjaerg L, Konttinen Y, Peltonen L. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 656-62.
 46. Klunemann HH, Ridha BH, Magy L, Wherrett JR, Hemelsoet DM, Keen RW, De Bleecker JL, Rossor MN, Marienhagen J, Klein HE, Peltonen L, Paloneva J. The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia, and bone cysts: DAP12 and TREM2. *Neurology* 2005, 64: 1502-7.
 47. Hakola HP. Neuropsychiatric and genetic aspects of a new hereditary disease characterized by progressive dementia and lipomembranous polycystic osteodysplasia. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1972, 232: 1-173.
 48. Nasu T, Tsukahara Y, Terayama K. A lipid metabolic disease-"membranous lipodystrophy"-an autopsy case demonstrating numerous peculiar membrane-structures composed of compound lipid in bone and bone marrow and various adipose tissues. *Acta Pathol Jpn* 1973, 23: 539-58.
 49. Xing J, Titus AR, Humphrey MB. The TREM2-DAP12 signaling pathway in Nasu-Hakola disease: a molecular genetics perspective. *Research and reports in biochemistry* 2015, 5: 89-100.
 50. Yamazaki K, Yoshino Y, Mori Y, Ochi S, Yoshida T, Ishimaru T, Ueno S. A Case of Nasu-Hakola Disease without Fractures or Consanguinity Diagnosed Using Exome Sequencing and Treated with Sodium Valproate. *Clinical*

psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology 2015, 13: 324-6.

51. Hakola HP, Puranen M. Neuropsychiatric and brain CT findings in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica* 1993, 88: 370-5.
52. Bianchin MM, Capella HM, Chaves DL, Steindel M, Grisard EC, Ganev GG, da Silva Junior JP, Neto Evaldo S, Poffo MA, Walz R, Carlotti Junior CG, Sakamoto AC. Nasu-Hakola disease (polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy--PLOS): a dementia associated with bone cystic lesions. From clinical to genetic and molecular aspects. *Cellular and molecular neurobiology* 2004, 24: 1-24.
53. Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama WM, Kudo A, Fujiwara M, Asou H, Takai T. Osteopetrosis and thalamic hypomyelinoses with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 2003, 111: 323-32.
54. Glebov K, Wunderlich P, Karaca I, Walter J. Functional involvement of gamma-secretase in signaling of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2). *Journal of neuroinflammation* 2016, 13: 17.
55. Sanchez R. TREM2 gene mutation raises the risk of Alzheimer's disease. <http://www.thealzheimerssolution.com/TREM2-gene-mutation-raises-the-risk-of-alzheimers-disease/>. 20 May 2016.
56. Guerreiro R, Hardy J. Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2014, 11: 732-7.
57. Rohn TT. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: "TREM-ming" the inflammatory component associated with Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 2013: 860959.
58. Painter MM, Atagi Y, Liu CC, Rademakers R, Xu H, Fryer JD, Bu G. TREM2 in CNS homeostasis and neurodegenerative disease. *Molecular neurodegeneration* 2015, 10: 43.

59. Chung DH, Seaman WE, Daws MR. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur J Immunol* 2002, 32: 59-66.
60. Jin S, Umemoto E, Tanaka T, Shimomura Y, Tohya K, Kunizawa K, Yang BG, Jang MH, Hirata T, Miyasaka M. Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro. *FEBS letters* 2008, 582: 3018-24.
61. Pelham CJ, Pandya AN, Agrawal DK. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 2014, 24: 1383-95.
62. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2013, 2: e121.
63. Shao L, Tekedereli I, Wang J, Yuca E, Tsang S, Sood A, Lopez-Berestein G, Ozpolat B, Ittmann M. Highly specific targeting of the TMPRSS2/ERG fusion gene using liposomal nanovectors. *Clinical Cancer Research* 2012, 18: 6648-57.
64. Borahay MA, Lu F, Ozpolat B, Tekedereli I, Gurates B, Karipcin S, Kilic GS. Mullerian inhibiting substance suppresses proliferation and induces apoptosis and autophagy in endometriosis cells in vitro. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2013, 2013: 361489.
65. Yao Y, Li H, Chen J, Xu W, Yang G, Bao Z, Xia D, Lu G, Hu S, Zhou J. TREM-2 serves as a negative immune regulator through Syk pathway in an IL-10 dependent manner in lung cancer. *Oncotarget* 2016,
66. Correale C, Genua M, Vetrano S, Mazzini E, Martinoli C, Spinelli A, Arena V, Peyrin-Biroulet L, Caprioli F, Passini N, Panina-Bordignon P, Repici A, Malesci A, Rutella S, Rescigno M, Danese S. Bacterial sensor triggering receptor expressed on myeloid cells-2 regulates the mucosal inflammatory response. *Gastroenterology* 2013, 144: 346-56 e3.

67. Kang H S KEM, Kim D H, Choi H R, Lee E H, Kim I S, Park C E. TREM-2 Gene and protein as inhibitors of expression of GA733-2, and transgenic animals comprising the same and uses thereof. 2010,
68. Wang XQ, Tao BB, Li B, Wang XH, Zhang WC, Wan L, Hua XM, Li ST. Overexpression of TREM2 enhances glioma cell proliferation and invasion: a therapeutic target in human glioma. *Oncotarget* 2015, 7: 2354-66.

EKLER

EK.1. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ayten KILINÇLI

Doğum Yeri ve Tarihi: SÖKE-1988

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

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

Bilimsel Faaliyetleri

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

Kilic-Eren M., Ural M., KILINÇLI A. 2011. Role Of Hypoxia in Modulation Of Oncogene-Induced Senescence In Human Diploid Fibroblasts. The 4th Annual Conference on Cancer and Control of Genomic Integrity (CANGENIN), Amsterdam, HOLLANDA Abstract Book p 45,2011 (poster).

KILINÇLI A., Kilic-Eren M. 2011. Resveratrol İndüklü Preatüre Senesensin Azalmış Sirt1 ve Sirt2 Ekspresyonu İle Asosiasyonu. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ANTALYA, Journal Of Medical Sciences (Tıp Bilimleri Dergisi) , Vol.31, N 6, p 117, Dec, 2011 (poster)

Kilic-Eren M., KILINÇLI A. 2012. Hypoxia Modulates Oncogene-Induces Senescence. The 5th Annual Meeting on Cancer and Control Of Genomic Integrity, Barselona-İSPANYA Abstract Book p 36, 2012 (poster).

KILINÇLI A., Eren Ö., Kilic-Eren M. 2012. Resveratrol induced premature senescence associated with attenuated Sirt1 and 2 expressions. The 5th Annual Meeting on Cancer and Control Of Genomic Integrity, Barselona-İSPANYA Abstract Book p 37, 2012 (poster).

KILINÇLI A. Eren Ö., Kilic-Eren M. 2012. Decreased Sirt1 and 2 expression emerges through resveratrol induced premature senescence. Dynamics Of Cell Signal Systems, Oslo, NORVEÇ, 2012 (poster).

-Ulusal

KILINÇLI A., Taysı N. 2009. İnsan Sağlığı Açısından Myiasisin Önemi. 16.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, NİĞDE.

Kant H., KILINÇLI A., Eren Ö. 2011 . Botanikte Tip Kavramı ve Adnan Menderes Üniversitesi Herbaryumundaki Tip Örneklerinin Tanıtılması. 18.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, İSTANBUL, 2011 (sözlü sunum).

c) Katıldığı Kurs ve Sempozyumlar

2. Kök hücre kursu ve 6. Kök hücre sempozyumu, Ankara, 2011.

Optimization Techniques for Western Blot, Immunoprecipitation and Immunohistochemistry, İzmir, 2012.

Hücre Ölümüne Biyoinformatik Yaklaşım Uygulamalı Kursu, İzmir, 2015.

2.Hematogenetik Sempozyumu, Gaziantep, 2015.

d) Katıldığı Projeler

Onkogen İndüklü Prematüre Senesensin Modülasyonunda Hipoksinin Etkileri: Hif-1 alfa ile Mif in Rollerinin İnsan Diploid Fibroblastlarında Araştırılması, Tübitak 108S379 (COST-BM703-26), 2011, Bursiyer

Resveratrolün hücresel yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtüinlerin aktivasyonunda rolünün insan dermal fibroblastlarında araştırılması, BAP (FEF-12035), 2012, Araştırmacı

TREM2 meme kanseri patogenezinde rol oynar mı?, Tübitak (114S979), 2015,
Bursiyer

İş Deneyimi

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

İletişim

E-posta Adresi : a.kilincli@gmail.com

Tarih : 2016

EK.2. Etik Kurul Gerek Olmadığına Dair Belge

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Tez danışmanlığını yaptığım yüksek lisans öğrencim Ayten KILINÇLI'nın "Meme Kanseri Hücre Modellerinde TREM2'nin Hücre Çoğalması, Hücre Ölümü ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Araştırılması" adlı tezinde çalışma gereği etik kurul raporu gerekmemektedir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

22.06.2016

Tez Danışmanı

Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

