

**IRF6'nın Notch yolağının hücre bölünmesini engelleyici ya da uyarıcı etkilerindeki belirleyici rolünün araştırılması**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 110T895**

Proje Yürütücüsü:  
**Yrd. Doç. Dr. Özden YALÇIN ÖZUYSAL**

Bursiyerler:

Talip ZENGİN

Burcu EKİNCİ

KASIM 2014  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Son yıllarda, teşhis ve tedavi yöntemlerinde önemli gelişmeler olmasına rağmen, meme kanseri halen kadınlarda en çok ölüme sebep olan kanser türüdür. Meme kanserinin moleküler biyolojisinin anlaşılması yeni belirteç moleküller ve hedefe yönelik tedaviler geliştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu projede, tümör oluşumu ve hücre farklılaşmasında rol oynadığı bilinen Notch yolağı ile IRF6 molekülünün meme epitel hücrelerindeki etkileşimi hücre hatları kullanılarak incelenmiştir. Proje sonucunda, Notch'un hücre bölünmesini ve transformasyonu tetiklemek için IRF6'yı aracı olarak kullandığı bulunmuş ve IRF6'nın hücre farklılaşmasında rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Notch-IRF6 ilişkisinin daha kapsamlı olarak meme tümörlerinde incelenmesi için temel niteliği taşımaktadır. Notch-IRF6 ilişkisinin metastaz ve prognoz gibi klinik parametrelere olan etkisinin de araştırılmasıyla meme kanseri moleküler biyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunmuş olacaktır.

Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 1001 programı kapsamında 110T895 numaralı "IRF6'nın Notch yolağının hücre bölünmesini engelleyici ya da uyarıcı etkilerindeki belirleyici rolünün araştırılması" başlıklı projesi ile desteklenmiştir.

Çalışmalar, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ .....	iv
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	7
3.1 Hücre kültürü .....	7
3.2 mRNA ifade analizleri .....	8
3.3 Protein ifade analizleri .....	8
3.4 Hücre bölünmesi analizleri.....	9
3.5 Transformasyon analizleri.....	10
4. BULGULAR .....	11
4.1 Notch yolağının IRF6'nın ifadesi üzerindeki etkileri .....	11
4.1.1 Notch1 aktivasyonu IRF6 ifadesini artırmaktadır. ....	11
4.1.2 Notch yolağı inhibisyonu IRF6 ifadesini azaltmaktadır. ....	12
4.1.3 IRF6'nın fosforlanmış formu tespit edilmemiştir.....	16
4.2 IRF6'nın Notch'a bağlı hücre bölünmesi ve transformasyonu üzerindeki etkileri .....	18
4.2.1 IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı hücre bölünmesini azaltmıştır. ....	20
4.2.2 IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı transformasyon kapasitesini azaltmıştır..	22
4.3 IRF6'nın meme epitel hücrelerinin luminal ve bazal karakterleri üzerindeki etkileri.....	23
4.3.1 IRF6 Notch1'in $\Delta$ Np63 ifadesini baskılaması için gerekli değildir. ....	24
4.3.2 IRF6'nın $\Delta$ Np63 ifadesi üzerindeki etkileri. ....	25
4.3.3 IRF6'nın luminal ve bazal belirteç moleküller üzerindeki etkileri.....	27

<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>29</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>33</b>

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

### Tablo listesi:

Tablo 1. Kullanılan vektörler..... 7

Tablo 2. Primer dizileri..... 9

### Şekil listesi:

Şekil 1. Notch aktivasyonunun HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri. .... 11

Şekil 2. DAPT ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde HEY2 ve IRF6 mRNA analizleri..... 12

Şekil 3. DAPT ile muamele edilen MDA MB 231 hücrelerinde HEY2 mRNA analizleri..... 13

Şekil 4. DAPT ile muamele edilen MDA MB 231 hücrelerinde Notch hedef genlerinin ve IRF6'nın ifade analizleri..... 14

Şekil 5. MDA MB 231 hücrelerinde Dominant Negatif Mastermind-like1 ifadesinin HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri. .... 15

Şekil 6. MDA MB 231 hücrelerinde CSL'nin susuturulmasının HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri..... 16

Şekil 7. MCF10A hücrelerinin MG-132 ile muamelesi sonrası IRF6 protein analizleri. .... 17

Şekil 8. Proteaz ve fosfotaz inhibitörü testleri..... 18

Şekil 9. IRF6'nın shRNA yöntemi ile susturulması. .... 19

Şekil 10. Çift enfeksiyon ile oluşturulan koşullarda HEY2 ve IRF6 mRNA ifadeleri. .... 19

Şekil 11. MCF10A hücrelerinde büyüme eğrisi analizleri. .... 20

Şekil 12. MCF10A hücrelerinde BrdU analizleri. .... 21

Şekil 13. Temsili yumuşak agar fotoğrafları. .... 22

Şekil 14. MCF10A hücrelerinde yumuşak agar analizleri..... 23

Şekil 15. Çift enfeksiyon yöntemiyle oluşturulan dört farklı koşulda  $\Delta$ Np63 ifadesi analizleri. 24

Şekil 16. IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen hücrelerde IRF6 ifadesi analizleri. .... 25

Şekil 17. IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen hücrelerde  $\Delta$ Np63 ifadesi analizleri. .... 26

Şekil 18. IRF6 ifadesi susturulan MCF10A hücrelerinde bazal ve luminal belirteçlerin ifade analizleri. .... 26

Şekil 19. IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen MCF7 hücrelerinde luminal ve bazal belirteçlerin ifade analizleri.....27

## ÖZET

Notch, meme kanseri ve gelişiminde rol oynayan bir sinyal yolağıdır. Notch aktivasyonu, normal meme epitel hücrelerinde hücre bölünmesi ve transformasyonunu, meme gelişimi sırasında ise  $\Delta Np63$ 'ü baskılayarak luminal hücre karakterini tetikler. Notch yolağının bu işlevleri için aracı olarak kullandığı moleküller tam olarak bilinmemektedir. Keratinositlerde, Notch tarafından kontrol edilen IRF6, Notch'un tümör baskılayıcı ve farklılaşmayı tetikleyici özellikleri için kullandığı aracı moleküllerden biridir. IRF (Interferon Regulatory Factors) ailesine mensup IRF6,  $\Delta Np63$  ile beraber orofasiyal ve epidermal gelişimde rol oynamaktadır. Meme epitel hücrelerine aktarıldığında hücre sayılarının azalmasına sebep olan IRF6'nın memede hücre bölünmesinin negatif bir regülatörü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, meme epitel hücrelerinde, Notch yolağının IRF6 ifadesi üzerindeki etkileri ve IRF6'nın Notch işlevleri için aracı olup olmadığı incelenmiştir. Normal meme epitel hücresi MCF10A'da Notch aktivasyonu IRF6 ifadesini artırırken, meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'de Notch inhibisyonu IRF6 ifadesini azaltmıştır. Notch aktivasyonu yapılan MCF10A hücrelerinde, IRF6 susturulduğunda Notch'a bağlı hücre bölünmesi ve transformasyonu azalmıştır. IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı  $\Delta Np63$  baskılanmasını etkilememiş ancak Notch'tan bağımsız olarak  $\Delta Np63$  ifadesini azaltmıştır. Bunlara ek olarak, bazal karakterli MCF10A hücrelerinde IRF6'nın susturulması ve de luminal karakterli MCF7 hücrelerinde IRF6'nın ifade ettirilmesi, bazal ve luminal belirteçlerin ifadesinde değişikliğe yol açmıştır. Bu çalışma sonucunda, meme epitel hücrelerinde IRF6'nın Notch tarafından kontrol edildiği ve Notch'un hücre bölünmesini ve transformasyonu tetikleyici işlevlerinde aracı olarak çalıştığı gösterilmiştir. Ayrıca, Notch yolağı ile paralel olarak, IRF6'nın meme epitel hücrelerinin karakterinin belirlenmesinde önemli olabileceği gösterilmiştir. Notch-IRF6 arasındaki bu ilişkinin in vivo meme gelişimi ve tümör oluşumunda da önemli olup olmadığı bir sonraki aşamada cevaplanması gereken bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Notch yolağı, IRF6, p63, meme kanseri, luminal-bazal epitel hücreler

## ABSTRACT

Notch signaling is involved in breast tumorigenesis and development. Notch activation induces proliferation and transformation of normal breast epithelial cells and regulates luminal cell fate decision via downregulation of  $\Delta$ Np63. The downstream mediators of Notch signaling are poorly understood. IRF6, was described as a direct Notch target and a mediator for its tumor suppressor and pro-differentiation functions in keratinocytes. IRF6, a member of Interferon Regulatory Factors (IRF) family, is involved in orofacial and epidermal development together with  $\Delta$ Np63. In breast, ectopic expression of IRF6 reduces cell numbers suggesting a role as negative regulator of cell cycle. Here, we investigated the effects of Notch signaling on IRF6 expression in breast epithelial cells and asked whether IRF6 is a mediator of Notch's functions. We showed that activation of Notch signaling in normal breast epithelial cell line, MCF10A, induces IRF6 expression, while inhibition of the pathway in breast cancer cell line MDA MB 231 reduces IRF6 expression. We demonstrated that silencing IRF6 in MCF10A cells impaired Notch induced cell proliferation and transformation. Silencing of IRF6 did not affect Notch's function to downregulate  $\Delta$ Np63, but it independently reduced  $\Delta$ Np63. Furthermore, silencing of IRF6 in basal MCF10A cells or overexpression in luminal MCF7 cells, affected expression of luminal and basal markers. Thus, we showed that IRF6 is a target of Notch signaling and an essential mediator for its role in inducing proliferation and transformation in breast epithelial cells. We also provided evidence indicating that IRF6 might be involved in cell fate decision in breast epithelium in parallel with Notch signaling. Whether the Notch-IRF6 relation we established here, is relevant in the context of in vivo breast tumorigenesis and development remains as an intriguing question.

**Keywords:** Notch signaling, IRF6, p63, breast cancer, luminal-basal epithelial cells



## 1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. 2012 yılında tüm dünyada yaklaşık 1,7 milyon yeni meme kanseri vakası tespit edilmiştir. Bu sayı tüm kanser vakalarında %25'lik bir oranla meme kanserini ikinci sıraya yerleştirmektedir. Düzenli mamografi taramalarının erken teşhise yaptığı önemli katkılara rağmen meme kanseri halen kadınlarda kansere bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Sadece 2012'de dünya genelinde yaklaşık olarak yarım milyon kadın meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir (Ferlay J, 2013). Ülkemizde de yaklaşık %24'lük bir oranla meme kanseri kadın kanserlerinde ilk sırada yer almaktadır. 2009 verilerine göre ülkemizde lokalize meme kanseri vakalarında 5 yıllık sağkalım hızı %90 olarak tespit edilmiştir. Ancak vakaların %8,5'ini oluşturan invaziv grup için ortalama ömür yaklaşık olarak 4,5 yıl olarak belirlenmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2014). Meme kanseri tedavisinde izlenen en etkili yöntemlerden biri tümörün veya tüm meme dokusunun ameliyatla alınmasıdır. Buna ek olarak, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavileri ve hedefe yönelik olarak geliştirilmiş olan HER2 tedavileri sayesinde son yıllarda meme kanseri tedavisinde önemli aşamalar kaydedilse de yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Meme kanserinin moleküler biyolojisinin anlaşılması yeni belirteç moleküller ve hedefe yönelik tedaviler geliştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Meme kanserinde rol oynadığı bilinen moleküler yollardan biri de Notch'tur. Oldukça basit bir işleyişi olan Notch yolağında, almaçlar ve değeciler komşu hücre zarlarında saplanmış durumda bulunan, hem hücre dışı hem de hücre içiyle etkileşimi olan proteinlerdir. Değecin bağlanması sonucunda farklı proteazlar tarafından ard arda iki kere kesilen almaç, hücre içindeki (sitoplazmik) kısmının serbest hale gelmesiyle aktifleşmiş olur. Aktif almaç, hücre çekirdeğine ulaşarak transkripsiyon faktörü CSL'nin (RBPjk) birlikte bulunduğu represörleri uzaklaştırarak aktivatörleri (örneğin Mastermind-like 1) çeker ve hedef genlerin ifade ettirilmesine yol açar. Memelilerde dört farklı Notch almaç (Notch1-4) ve beş farklı değec (Delta-lile-ligand-1 (Dll1), Dll3, Dll4, Jagged1-2) vardır. En bilinen hedef genleri HEY ve HES transkripsiyon represör ailelerinin üyeleridir.

Notch yolağının embriyonik gelişim için gerekli olduğu, yetişkin memelilerde de hematopoetik sistem, meme, incebağırsak ve deride farklı hücre türlerinin oluşmasında görev aldığı bilinmektedir. Gelişimde rol oynayan birçok sinyal yolağı gibi Notch'un da normal seviyesinden fazla aktive olması ya da aktivasyonunun engellenmesi tümör oluşumu ya da metastaz gibi kanserin önemli süreçlerini kontrol etmektedir. Notch yolağı farklı kanser türlerinde hem onkogen hem tümör baskılayıcı olarak davranabilmektedir. Örneğin; Notch1 geninin sitoplazmik kısmının sürekli ifade edilmesi ile aktif kalan Notch yolağı, T-hücresi akut lenfoblastik lösemiye (T-ALL) sebep olmaktadır (Radtke ve Raj, 2003). T-ALL'deki onkogenik

işlevinin aksine, deride Notch yolağının susturulması tümör oluşumuna yol açarak tümör baskılayıcı bir özellik göstermektedir (Nicolas vd., 2003). Notch yolağının farklı işlevlerinin altında, içeriğe göre değişen farklı aracı moleküllerin olduğu düşünülmektedir.

Meme kanserinde onkogen olarak davrandığını gösteren çok sayıda çalışma olmakla beraber, son yıllarda yapılan araştırmalarda Notch yolağının normal primer hücrelerin ya da normal hücre hatlarının bölünmesini engelleyerek memede tümör baskılayıcı olarak da davranabileceği gösterilmiştir (Mazzone vd., 2010; Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Meme gelişimi sırasında, luminal epitel hücre farklılaşmasını kontrol ettiği bilinen Notch yolağının, hangi aracı molekülleri kullanarak hangi işlevlerini yerine getirdiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Bouras vd., 2008; Yalcin-Ozuysal vd., 2010).

IRF (Interferon Regulatory Factors) ailesine mensup IRF6'nın, deride Notch'un farklılaşmayı tetikleyici ve tümör baskılayıcı işlevleri için aracı olduğu bulunmuştur (Restivo vd., 2011). Meme epitel hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, hücre döngüsünü negatif olarak kontrol ettiği gösterilen IRF6'nın, bu hücrelerde Notch ile ilişkisi bilinmemektedir (Bailey vd., 2005; Bailey vd., 2008).

Bu projede, IRF6'nın meme epitel hücrelerinde Notch yolağının hedef geni olup olmadığı ve Notch'un hücre bölünmesini, transformasyonu ve luminal hücre farklılaşmasını tetikleyici rollerinde aracı olarak rol oynayıp oynamadığı incelenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Notch yolağı, ilk olarak T-hücreleri akut lenfoblastik lösemide (T-ALL) onkogen olarak tanımlanmıştır. Kansere yol açan t(7;9)(q34;q34.3) kromozom translokasyonunda, kırılma noktalarından birinde Notch1 geninin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu translokasyon sonucu, Notch1'in sadece sitoplazmik kısmı, yani aktif almaç, başka bir genin promotörünün kontrolü altında sürekli olarak ifade edilir. Aktif Notch1'in T-ALL'ye yol açtığı, fare modellerinde yapılan detaylı çalışmalar sonucu kesinlik kazanmıştır (Radtke ve Raj, 2003). Notch yolağı tüm kanser türlerinde onkogen olarak davranmamaktadır. Dokuya ya da hücre tipine göre tümör baskılayıcı olarak ya da hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak davrandığı durumlar bulunmaktadır (Ranganathan vd., 2011). Deride yapılan çalışmalar, Notch yolağını tümör baskılayıcı olarak tanımlamaktadır. Deri epitelinde Notch almaçlarının silinmesi ya da temel ko-aktivatörlerinden Mastermind-like1'in işlevini engelleyen dominant negatif formunun ifade edilmesi farelerde skuamöz hücreli karsinoma oluşumuna yol açmaktadır (Nicolas vd., 2003; Proweller vd., 2006). Buna karşılık, prostat ve akciğer kanserleri modellerinde, Notch yolağının iki şekilde de rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Notch yolağının aktive edilmesi hücre bölünmesini engelleyerek tümör baskılayıcı bir özellik göstermekte iken (Shou vd., 2001; Sriuranpong vd., 2001) aynı zamanda Notch yolağı üyelerinin ifadesinin bu tümörlerde arttığı da bulunmuştur (Santagata vd., 2004; Haruki vd., 2005).

Notch yolağının meme gelişimi ve kanserinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. In vitro kültür koşullarında normal meme kök hücrelerinin kendini yenilemesini tetikleyen Notch yolağı, meme gelişimi sırasında luminal karakter oluşumunu kontrol etmektedir (Dontu vd., 2004; Bouras vd., 2008; Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Bipotent meme kök hücrelerinde aktive olan Notch yolağı, luminal karakteri tetiklemek için  $\Delta$ Np63'ü aracı olarak kullanmaktadır. Bazal karakteri kontrol eden  $\Delta$ Np63'ün Notch tarafından baskılanmasıyla hücreler, bazal belirteçlerin ifadesini azaltarak luminal karaktere kaymaktadır. Ancak  $\Delta$ Np63'ün dışarıdan verilmesi sonucu Notch aktivitesinin etkisinin ortadan kaldırıldığı koşullarda hücreler, luminal karakter kazanmamaktadır (Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Luminal hücre farklılaşmasında,  $\Delta$ Np63 dışında Notch'un bu işlevini kontrol eden diğer aracı moleküller henüz tam olarak bilinmemektedir.

Notch yolağı meme kanserinde ilk olarak MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) virüsünün entegrasyon noktalarından biri olarak tanımlanmıştır. MMTV'nin Notch4 geninin ortasına entegre olup, almanın sitoplazmik kısmını ifade ettirmesi sonucu Notch yolağının sürekli olarak aktive olup tümör oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir (Jhappan vd., 1992; Smith vd., 1995). Daha sonra, meme epitel hücrelerinde aktif Notch1 ve aktif Notch4 ifade ettirilen fare modelleri oluşturularak iki durumda da meme tümörü oluştuğu görülmüştür (Gallahan vd., 1996; Kiaris

vd., 2004). Notch'un fare modellerindeki onkogenik özellikleri, insan meme tümörü çalışmalarlarıyla da desteklenmiştir. Notch1 ve Notch3'ün mRNA ifadesinin kötü prognozla, Jagged1 mRNA ifadesinin ise hem kötü prognoz hem de nüksetmeyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Reedijk vd., 2005; Reedijk vd., 2008). Notch yolağını inhibe eden Numb proteininin, bazı meme tümörlerinde kaybolarak Notch aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Pece vd., 2004; Stylianou vd., 2006). Yalnızca Notch aktivasyonunun, normal meme epitel hücresi MCF10A'da, hücre bölünmesini ve yumuşak agarda koloni oluşumuyla ölçülen transformasyonunu tetiklemek için yeterli olduğu bildirilmiştir. Buna paralel olarak, meme kanseri hücre hatlarında Notch yolağının aktive olduğu ve inhibisyonun bu hücrelerin transformasyon kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (Stylianou vd., 2006).

Onkogen özelliklerinin yanı sıra, Notch'un memede tümör baskılayıcı olarak da davrandığını gösteren çalışmalar son yıllarda yayınlanmıştır. Primer meme epitel hücrelerinde ve normal meme hücre hattı MCF10A'da Notch aktivasyonunun hücre bölünmesini engellediği gösterilmiştir (Mazzone vd., 2010; Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Buna ek olarak, Notch2 aktivasyonunun Noth4'ün aksine meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediği ve Notch1'in meme kanseri kök hücrelerinde Notch4'ün aksine aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (O'Neill vd., 2007; Harrison vd., 2010).

Notch'un farklı işlevlerinin altında doku ve hücre içeriğine göre farklılık gösteren etkileşim partnerleri ve hedef genleri bulunmaktadır. Notch yolağının, Wnt, Her2, TGF- $\beta$  ve Ras gibi diğer sinyal yolları ile etkileştiğine dair çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen farklı işlevleri için aracı olarak kullandığı alt mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Guo vd., 2011).

IRF6, yakın zamanda Notch yolağının deride farklılaşmayı tetikleme ve tümör baskılama fonksiyonlarında kullandığı aracı moleküllerden biri olarak tanımlanmıştır (Restivo vd., 2011). IRF (Interferon Regulatory Factors) ailesine mensup olan IRF6, diğer üyelerin aksine immün sistem regülasyonunda değil, deri epitel hücrelerinin farklılaşmasında rol oynamaktadır (Savitsky vd., 2010; Mangold vd., 2011). IRF6 mutasyonları, doğuştan olan dudak damak yarıkları taşıyan bireylerde tespit edilmektedir (Kondo vd., 2002). IRF6 işlevinin doğrudan dudak damak yarıklarıyla ilgili olduğu, oluşturulan fare modelleriyle gösterilmiştir. IRF6 geninin tamamen silindiği ya da DNA'ya bağlanma kısmında mutasyona uğratıldığı farelerde dudak damak yarığına benzer orofasiyal bozukluklar gözlenmiştir. Aynı zamanda bu farelerde epitel hücrelerin farklılaşmadığı ve aşırı bölündüğü de tespit edilmiştir (Ingraham vd., 2006; Richardson vd., 2006).

Meme epitel hücrelerinde, IRF6 ilk olarak tümör baskılayıcı protein Maspin'in etkileşim partneri olarak tanımlanmış ve Maspin ile beraber IRF6 ifadesinin normale göre invaziv tümör

dokularında azaldığı gösterilmiştir (Bailey vd., 2005). Ardından yapılan fonksiyonel çalışmalarda, normal meme epitel hücre hattı MCF10A'da hücre döngüsünün durdurulmasının IRF6 birikmesine ve mitogenik sinyallerin IRF6'nın fosforlanmasına ve parçalanmasına sebep olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA MB 231'de adenovirüs yöntemiyle IRF6 ifade ettirilmesi hücre sayısını azaltmıştır (Bailey vd., 2008). Bu çalışmalara dayanarak IRF6'nın meme epitel hücrelerinde hücre döngüsünün negatif regülatörü olduğu sonucuna varılmıştır.

IRF6 ile Notch yolağı arasındaki ilk ilişki, Notch yolağı ligandlarından Jagged2 mutasyonu taşıyan farelerde de dudak damak yarıkları gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır (Jiang vd., 1998). IRF6 ve Jagged2 mutasyonu taşıyan farelerde yapılan detaylı analizlerde iki molekülün embryonik gelişimde damak birleşmesi sırasında birlikte çalıştığı gösterilmiş ancak aralarından doğrudan bir etkileşim bulunmamıştır (Richardson vd., 2009). IRF6 ile Notch yolağı arasında direkt etkileşim olduğuna dair ilk kanıtlar, yakın zamanda keratinositlerde yapılan bir çalışmadan gelmektedir. Notch'un kanonikal yolağı aracılığıyla, primer insan keratinosit hücrelerinde doğrudan promoter bölgesine bağlanarak IRF6 ifadesini artırdığı ve bu artışın, Notch'un keratinositlerin farklılaşmasını indüklemesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Skuamöz hücreli karsinoma (SCC) tümör örneklerinde, IRF6 ifadesinin Notch1 ile paralel olarak azalması ve SCC hücre hatlarında IRF6 ifade ettirilmesinin hücre bölünmesini baskılaması sonucu, deride IRF6'nın Notch'un yalnızca farklılaşmada değil tümör baskılayıcı rolünde de IRF6'yı aracı olarak kullandığı sonucuna varılmıştır (Restivo vd., 2011). IRF6'nın deri dışındaki dokularda Notch yolağı ile nasıl etkileştiği bilinmemektedir.

IRF6 ile, Notch yolağı dışında, deri epitelinde etkileşen bir diğer molekül de p63'tür. p63, homologları p53 ve p73 gibi, apoptoz, hücre farklılaşması ve bölünmesi gibi önemli hücre fonksiyonlarda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (Su vd., 2013). p63'ün iki farklı transkripsiyon başlangıç bölgesinden ifade edilen ve C-terminalinde 3 farklı şekilde alternatif uçbirleştirme ile oluşan en az 6 farklı izoformu bulunmaktadır (Yang vd., 1998).

IRF6 ile benzer şekilde, dudak damak yarığı gösteren çeşitli sendromlarda p63 mutasyonları bulunmaktadır ve p63 geni silinen farelerde ektodermal gelişimde anormalliklerle beraber epidermin farklılaşmadığı gözlenmiştir (Mills vd., 1999; Yang vd., 1999; Rinne vd., 2007). IRF6 ile  $\Delta$ Np63, N-terminal kısmının daha kısa olmasıyla tanımlanan p63 izoformu, arasındaki ilk doğrudan ilişki keratinositlerde gösterilmiştir.  $\Delta$ Np63, IRF6 transkripsiyon başlangıç bölgesinin aşağısındaki ve yukarısındaki elementlere bağlanarak IRF6 ifadesini indüklemektedir (Moretti vd., 2010; Thomason vd., 2010). Buna karşılık IRF6,  $\Delta$ Np63'ün proteosomal parçalanmasını tetikleyerek negatif bir kontrol mekanizması oluşturmaktadır

(Moretti vd., 2010). Meme epitel hücrelerinde IRF6 ile  $\Delta$ Np63'ün etkileşimleri hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Meme epitel hücrelerinde dominant olarak ifade edilen p63 izoformu olan  $\Delta$ Np63, bazal karakterin tetiklenmesi ve sürdürülmesi için gerekli bir moleküldür. Notch,  $\Delta$ Np63'ü baskılayarak bipotent meme kök hücrelerinde luminal karakteri indüklemektedir (Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Meme gelişimi sırasında en fazla laktasyon evresinde lobuloalveolar hücrelerde ifade edilmesi, IRF6'nın da keratinositlerde olduğu gibi meme epitel hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Bailey vd., 2009). Ancak IRF6'nın, Notch ve  $\Delta$ Np63 ile etkileşim halinde, luminal ya da bazal karakterin indüklenmesinde rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir.

Tüm bu veriler ışığında, IRF6'nın meme epitel hücrelerinde Notch ve  $\Delta$ Np63 ile etkileşerek Notch'un fonksiyonlarına aracı olabileceği hipotezi geliştirilmiştir. Özel olarak bu projede, meme epitel hücrelerinde (i) Notch yolağının IRF6 ifadesini nasıl etkilediğinin, (ii) IRF6'nın Notch'un altında nasıl bir görevi olduğunun ve de (iii) IRF6'nın luminal-bazal karakterler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hücre kültürü

Normal meme hücre hattı olarak MCF10A, meme kanseri hücre hattı olarak MDA MB 231 ve MCF7, virüs üretimi ve titrasyonu için insan embriyonik böbrek fibroblast hücre hattı 293T ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı NIH-3T3 kullanılmıştır. MDA MB 231, MCF7 ve 293T hücreleri, %10 Fetal Bovin Serum ve penisilin/streptomisin eklenmiş; NIH-3T3 %10 Calf Serum ve penisilin/streptomisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde büyütülmüştür. MCF10A; 25 mM HEPES, 5% Horse Serum, 20 ng/ml epidermal growth factor, 500 ng/ml hydrocortisone, 100 ng/ml cholera toxin, ve 10 µg/ml insulin içeren DMEM: F-12 (1:1) besiyerinde büyütülmüştür. Tüm hücreler, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş ortamda tutulmuştur.

**Tablo 1. Kullanılan vektörler**

Vektör	Amacı	İçeriği	Türü
<b>MSCV</b>	Kontrol	Boş	Retroviral
<b>MSCV-NICD</b>	Notch aktivasyonu	Notch1 sitoplazmik kısmı	Retroviral
<b>MSCV-DNMM</b>	Notch inhibisyonu	Dominant Negatif Mastermind-like 1	Retroviral
<b>shGFP</b>	Kontrol	GFP için shRNA	Lentiviral
<b>shCSL</b>	Notch inhibisyonu	CSL için shRNA	Lentiviral
<b>shIRF6</b>	IRF6 susturulması	IRF6 için shRNA	Lentiviral
<b>pCMV-XL4-IRF6</b>	IRF6 ifade ettirilmesi	IRF6 cDNA'sı	Memeli ekspresyon vektörü

Çalışmada kullanılan vektörlerin amaçları ve türleri Tablo 1'de listelenmiştir. pCMV-XL4-IRF6 vektörü Open Biosystems firmasından satın alınmış, diğerleri EPFL'den (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) Prof.Dr.Cathrin Brisken'in ve UNIL'den (University of Lausanne) Prof. Dr. Paolo Dotto'nun laboratuvarlarından temin edilmiştir. Virüs üretimi için 10 cm petri kaplarına 2x10<sup>6</sup> 293T hücresi ekilerek, 5 µg viral vektör ve paketlenme vektörleri ile 1:3 oranında X-tremeGENE9 kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyeri değiştirilmiş, 48 ve 72 saat sonra virüsleri içeren supernatantlar toplanmıştır. Supernatantlar

22.000rpm hızda, 16°C'de, 2 saat 20 dakika boyunca çevrildikten sonra elde edilen peletler PBS içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır. Titrasyon için, 6 kuyulu petri kaplarına 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen NIH-3T3 hücreleri 8 µg/ml polybren içeren virüsle gece boyunca muamele edilerek enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan 48 saat sonra antibiyotik ile seçim başlamış, negatif kontrol hücreler ölene kadar devam etmiştir. Titrasyon sonunda oluşan koloni sayıları crystal violet boyamasından sonra belirlenmiştir. Verimlilikleri benzer olan virüsler ve kontrolleri deneyler için kullanılmıştır. Deneyler için 250.000 hücre/kuyu oranında normal meme ya da meme kanseri hücre hattı 6 kuyulu petri kaplarına ekilmiş, ekimden 24 saat sonra enfeksiyon yapılmıştır. pCMV-XL4-IRF6, hücreler 400.000 hücre/kuyu oranında 6 kuyulu petri kaplarına ekildikten sonra 4 µg vektör ve 1:3 oranında X-tremeGENE9 kullanılarak transfekte edilmiştir. Tüm deneylerde ilgili kontrol vektörü de aynı koşullarda kullanılmıştır.

Notch inhibisyonu için  $\gamma$ -sekretaz inhibitörü DAPT, MCF7 hücrelerinde 15 µM, 30 µM, 60 µM, 90 µM ve 180 µM konsantrasyonlarında, MDA MB 231 için 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM, ve 90 µM konsantrasyonlarında 24 ve de 48 saat boyunca denenmiştir. Kontrol olarak, aynı hacimde DAPT'nin çözüldüğü DMSO kullanılmıştır.

### **3.2 mRNA ifade analizleri**

Hücreler enfekte ya da transfekte edildikten 48 saat sonra, "PureLink RNA Isolation Kit" (Invitrogen) kullanılarak total RNA izole edilmiştir. 1 µg total RNA'dan "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas) kiti kullanılarak cDNA sentezlenmiş ve Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas) kullanılarak "iCycler real-time PCR detection system" (Bio Rad) cihazında gerçek zamanlı semi-kantitatif RT-PCR ile mRNA ifadeleri analiz edilmiştir. Kullanılan primerler Tablo 2'de listelenmiştir. Tüm normalizasyonlar için TATA-box Binding protein (TBP) kullanılmış, ardından her deney kendi içinde kontrol koşuluna göre normalize edilmiştir. P-değerleri iki kuyuklu t-testi ile hesaplanmıştır.

### **3.3 Protein ifade analizleri**

Hücreler enfekte ya da transfekte edildikten 48 saat sonra, RIPA çözeltilisinde parçalanıp, 26G'lik şırıngadan geçirilmiştir. Buzda 20 dakika bekletilen lizatlar, 10 dakika boyunca 4°C'de 14.000 rpm hızda çevrildikten sonra supernatantlar alınarak Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları tayin edilmiştir. Toplam 20-100 µg arasında protein SDS/PAGE ile ayrıştırılmış, PVDF membranlara transfer edildikten sonra antikorlar ile muamele edilmiştir. Eşit yükleme kontrolü olarak  $\gamma$ -tubulin kullanılmıştır. Primer antikorlar ve konsantrasyonları şu şekildedir: anti-IRF6 (1:400, ab58915, Abcam), anti-HEY2 (1:1000, AB15562, Millipore), anti-p63 (1:200, sc8431, Santa Cruz),  $\gamma$ -tubulin (1:10000, T6557, Sigma). İkincil antikor olarak



Polyclonal Goat Anti-Mouse (1:1000, P0447, Dako) ve Polyclonal Goat Anti-Rabbit (1:2000, P0448, Dako) kullanılmıştır.

**Tablo 2. Primer dizileri**

Gen	Forward	Reverse
CD24	CTGCTGGCACTGCTCCTAC	ACCACGAAGAGACTGGCTGT
$\Delta$ Np63	ATGCCCAGACTCAATTTAGTGA	TTCTGCGCGTGGTCTGTGT
HES1	AACACGACACCGGATAAACC	TCAGCTGGCTCAGACTTTCA
HES5	CTCAGCCCCAAAGAGAAAAA	TAGTCCTGGTGCAGGCTCTT
HEY1	GGGAGGGGAACTATATTGAATTTT	ATTTGTGAATTTGAGATCCGTGT
HEY2	AAGATGCTTCAGGCAACAGG	GCACTCTCGGAATCCTATGC
IRF6	ATCACTTGTTGCTCCCAACC	AAACGGTGGCTGCTTCTCTA
ITGA6	GGCGAGCAAGCTATGAATC	AAAGCAACCATTTCCATTG
ITGB4	ACTGACCCGCTCAGAACACT	CTCCTGCCAGCTCACTCTG
K14	CACAGCCACAGTGGACAATG	GGCTCTCAATCTGCATCTCC
K18	CACAGTCTGCTGAGGTTGGA	GACCTGCTCCATCTGTAGGG
TBP	TAGAAGGCCTTGTGCTCACC	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG

### 3.4 Hücre bölünmesi analizleri

Büyüme eğrisi analizleri için enfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 3000 hücre/kuyu oranında 12 kuyulu petri kaplarına ekilmiş ve 3. günden 7. güne kadar her gün sayılmıştır. Her gün için koşul başına 3 kuyu sayılarak ortalamaları alınmıştır.

BrdU analizleri için, enfeksiyondan 24 saat sonra hücreler açlık besiyerine alınmış, 48 saat sonra da 2 saat 20 $\mu$ M BrdU ile muamele edilip akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Böylece 2 saat içerisinde DNA sentez evresinde olan hücrelerin oranı tespit edilmiştir. Hücrelerin analize hazır hale getirilmesi için ya "APC BrdU Flow Kit" (BD Pharmingen) protokolü ya da kitten bağımsız bir protokol kullanılmıştır. Kitten bağımsız protokol için hücreler, %4 PFA ve NP40 ile sabitlenip geçirgen hale getirilmiş, ardından DNase ile muamele edilerek epitoplara ortaya

Çıkarılmış ve Anti-BrdU-APC (ebiosciences, 17-5071-41, clone Bu20A) ile muamele edilmiştir. Analizler FACSCanto cihazı ile yapılmıştır. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

### **3.5 Transformasyon analizleri**

Enfeksiyondan 48 saat sonra hücreler transformasyon analizleri için hazırlanmıştır. Öncelikle 6 kuyulu petri kaplarının tabanı, besiyerinde hazırlanmış %0.5'lik agar ile kaplanmıştır. Taban agarının katılaşmasının ardından hücreler besiyerinde hazırlanmış %0.35'lik noble agar içerisinde zlmş ve 3000 hücre/kuyu oranında olacak şekilde taban agarının üzerine ekilmiştir. Hücreler haftada iki defa yeni besiyerleri değiştirilerek 8 hafta boyunca büyütülmüştür. Deney sonunda kolonilerin gözlenmesi için petri kapları 0.005% crystal violet ile boyanmış ve Olympus CKX41 mikroskobu altında Olympus DP25 kamerası ve DP2-BSW yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. 5 farklı noktadan 3 farklı derinlikte alınan görüntülerde çapı 30 m'den büyük olan koloniler sayılarak büyüklükleri hesaplanmıştır. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

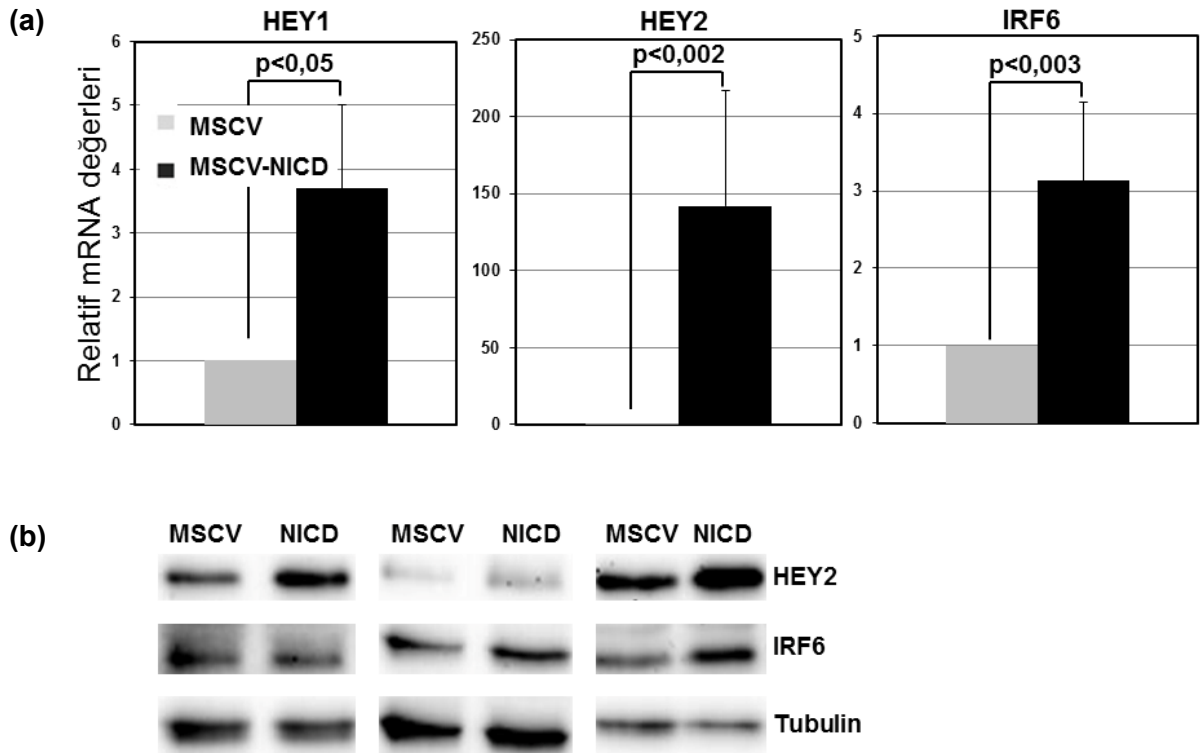
## 4. BULGULAR

### 4.1 Notch yolağının IRF6'nın ifadesi üzerindeki etkileri

Notch yolağının meme epitel hücrelerinde IRF6 ifadesini kontrol edip etmediğinin anlaşılması için iki farklı yaklaşım izlenmiştir: (1) Notch yolağının normal meme hücrelerinde aktivasyonu sonrası ve (2) Notch yolağının meme kanseri hücrelerinde inhibisyonu sonrası IRF6 ifadesinin incelenmesi.

#### 4.1.1 Notch1 aktivasyonu IRF6 ifadesini artırmaktadır.

Notch almaçları, değeçlerin bağlanması ardından farklı proteazlar tarafından ard arda iki kere kesilip sitoplazmik kısımlarının serbest kalmasıyla aktive olur. Bu sebeple, almaçların sitoplazmik kısmının ifade ettirilmesi Notch yolağını aktive etmek için yeterlidir. Normal meme epitel hücresi MCF10A'da Notch yolağı, Notch1 almancının sitoplazmik kısmının (Notch1 IntraCellular Domain: NICD) retrovirus yöntemiyle hücrelere aktarılmasıyla aktive edilmiştir.



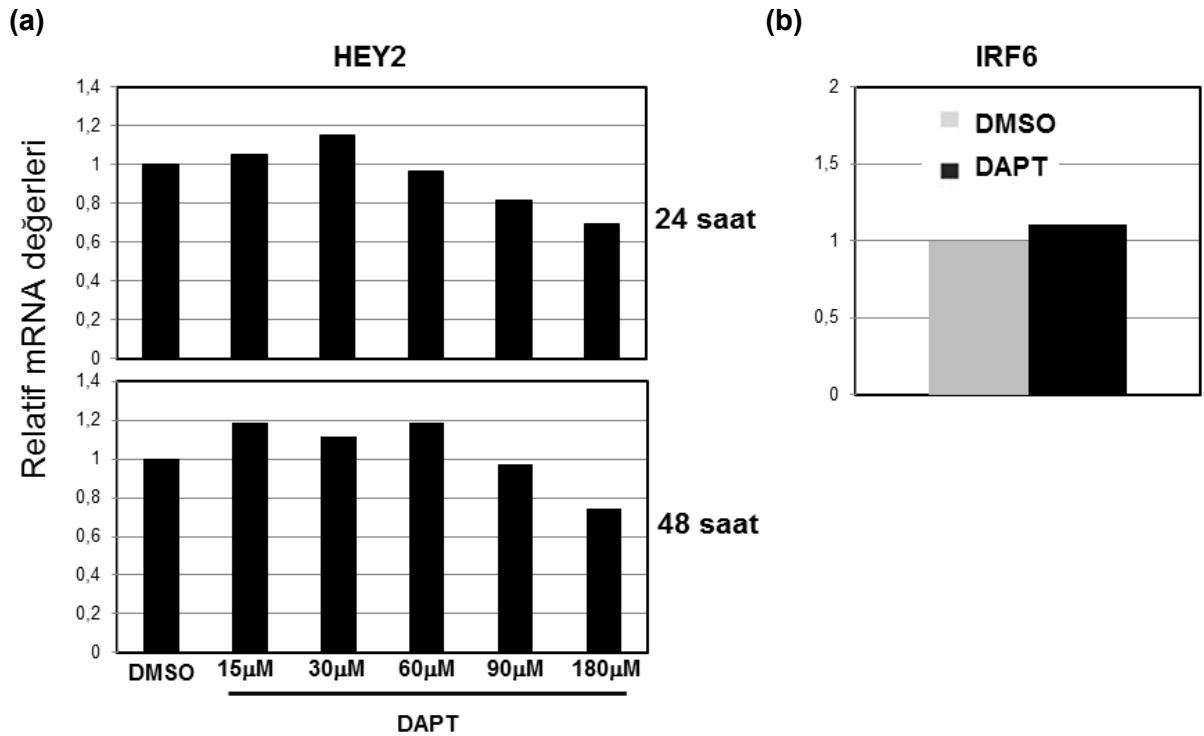
**Şekil 1. Notch aktivasyonunun HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri.** MCF10A hücreleri kontrol (MSCV) ve aktif Notch1 ifade ettiren virus (MSCV-NICD) ile enfekte edildikten 48 saat sonra (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

Hücreler kontrol virüsü (MSCV) ve aktif Notch1 ifade ettiren (MSCV-NICD) virus ile enfekte edildikten 48 saat sonra mRNA ve protein analizleri yapılmıştır. NICD virüsü ile enfekte edilmiş

hücrelerde, kontrol enfeksiyonuna göre Notch hedef genlerinden HEY1 ve HEY2'nin mRNA'ları sırasıyla 3,7 ve 142 kat artmıştır (Şekil 1a). HEY2 proteininin de mRNA'sıyla paralel olarak Notch aktivasyonu sonucu arttığı gözlenmiştir (Şekil 1b). Notch hedef genlerindeki artışlar Notch aktivasyonunun başarılı olduğunu göstermiştir. Bu koşullarda incelenen IRF6 mRNA'sında 3,1 katlık bir artış gözlenmiştir (Şekil 1a). IRF6 proteininde de HEY2 ile karşılaştırıldığında daha az oranda da olsa bir artış gözlenmiştir (Şekil 1b). Bu verilere dayanarak, normal meme hücresi MCF10A'da Notch aktivasyonunun IRF6 ifadesini artırdığı sonucuna varılmaktadır.

#### 4.1.2 Notch yolağı inhibisyonu IRF6 ifadesini azaltmaktadır.

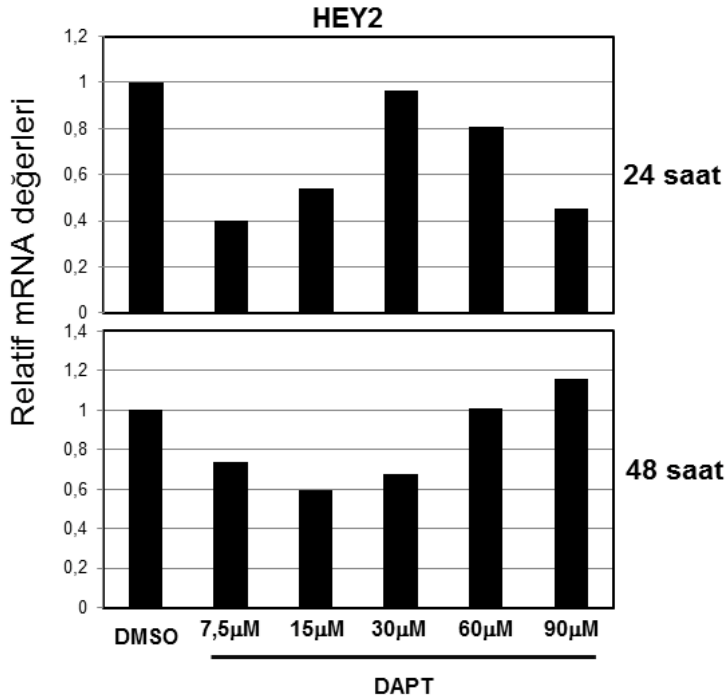
Notch yolağını ihbibe etmek için üç farklı yaklaşım izlenmiştir: (1) Notch almaçlarını keserek aktive eden  $\gamma$ -sekretaz enziminin inhibitörü, DAPT, ile hücrelerin muamele edilmesi, (2) Notch yolağının altında ko-aktivatör olarak çalışan Mastermind-like 1'in dominant negatif formunun (DNMM) hücrelere aktarılması ve (3) kanonikal Notch yolağının transkripsiyonel aracısı olan CSL'nin shRNA (shCSL) yöntemiyle susturulması.



**Şekil 2. DAPT ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde HEY2 ve IRF6 mRNA analizleri.** (a) MCF7 hücreleri kontrol olarak DMSO ile ve farklı konsantrasyonlarda (15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 90  $\mu$ M, 180  $\mu$ M) DAPT ile 24 ya da 48 saat muamele edildikten sonra Notch hedef geni HEY2'nin mRNA analizi yapılmıştır. (b) Kontrol olarak DMSO ile ya da 180  $\mu$ M DAPT ile 48 saat muamele edilen MCF7 hücrelerinde IRF6 mRNA'sı analiz edilmiştir.

**DAPT:** Benzer hücrelerle yapılan çalışmalar taranarak DAPT için kullanılacak konsantrasyon ve inkübasyon süreleri seçilmiştir. Hücreler kontrol olarak DAPT'nin içinde çözüldüğü DMSO ile ya da DAPT ile muamele edildikten sonra Notch inhibisyonunun sağlanıp sağlanmadığını anlamak için Notch hedef geni HEY2'nin mRNA analizi yapılmıştır.

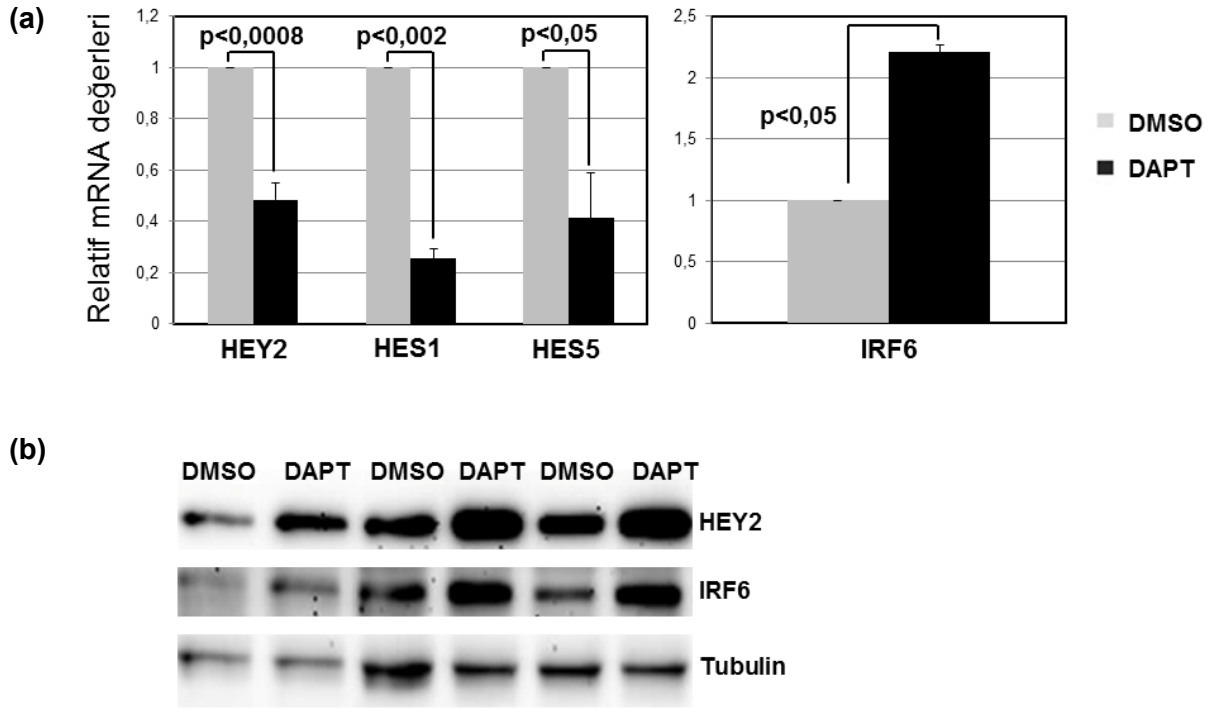
MCF7 hücreleri, 24 ve 48 saat boyunca DMSO ya da 15 µM, 30 µM, 60 µM, 90 µM ve 180 µM konsantrasyonlarında DAPT ile muamele edildiğinde, HEY2 mRNA'sında genel olarak bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 2a). En iyi etki, 180 µM konsantrasyonunda, ancak %30'luk bir düşüş olarak görülmüştür (Şekil 2a). 180 µM DAPT ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF7 hücrelerinde IRF6 mRNA'sında ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 2b). HEY2 baskılması ancak %30 oranında başarılı olduğu ve IRF6 mRNA'sında herhangi bir etki gözlenmediği için Notch inhibisyonu deneylerinde MCF7 hücrelerinin kullanılmamasına karar verilmiştir.



**Şekil 3. DAPT ile muamele edilen MDA MB 231 hücrelerinde HEY2 mRNA analizleri.** MDA MB 231 hücreleri kontrol olarak DMSO ile ve farklı konsantrasyonlarda (7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM, 90 µM) DAPT ile 24 ya da 48 saat muamele edildikten sonra Notch hedef geni HEY2'nin mRNA analizi yapılmıştır.

MDA MB 231 hücreleri, 24 ve 48 saat boyunca DMSO ya da 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM, ve 90 µM konsantrasyonlarında DAPT ile muamele edildiğinde, en iyi etki HEY2 mRNA'sında yaklaşık %60'lık bir düşüş sağlayan 90µM-24 saat koşulunda elde edilmiştir (Şekil 3).

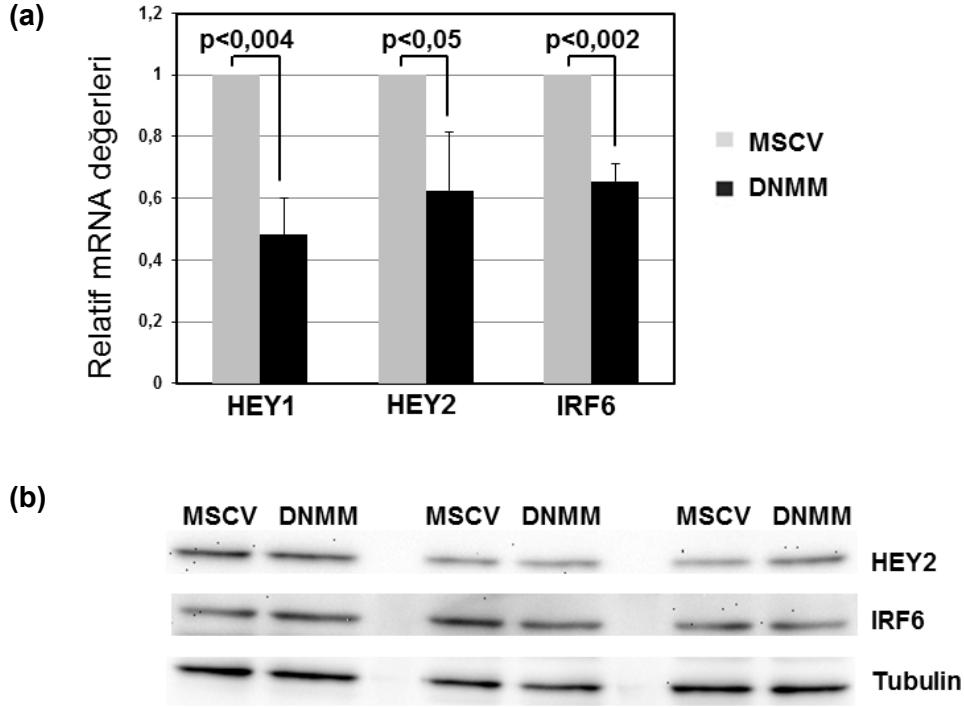
MDA MB 231 hücreleri, HEY2 üzerinde en iyi baskılamayı sağlayan koşullarda, 24 saat-90  $\mu$ M, DAPT ile muamele edildikten sonra, Notch hedef genlerinden HEY2, HES1 ve HES5 mRNA'larında DMSO kontrolüne göre sırasıyla yaklaşık %50, %70 ve %60'lık bir düşüş saptanmıştır (Şekil 4a). Bu düşüş, Notch yolağının başarıyla baskılandığını göstermektedir. Ancak HEY2, mRNA'sındaki düşüşün aksine protein seviyesinde artış göstermiştir (Şekil 4b). Bu artış HEY2 proteininin mRNA'sından bağımsız bir mekanizma ile kontrol edildiğini işaret etmektedir. Hedef genlerin mRNA'larının azalması Notch yolağının baskılandığını göstermek için yeterli bulunduğundan, aynı koşullarda IRF6 analizleri de yapılmıştır. IRF6 mRNA'sında yaklaşık 2 katlık bir artış görülmüştür (Şekil 4a). Buna paralel olarak IRF6 proteini de DAPT muamelesi sonrası artmıştır (Şekil 4b). Bir  $\gamma$ -sekretaz inhibitörü olan DAPT, Notch dışında diğer yolları da etkilediği için IRF6 analizleri Notch'a has baskılama sağlayan iki farklı yöntemle daha yapılmıştır.



**Şekil 4. DAPT ile muamele edilen MDA MB 231 hücrelerinde Notch hedef genlerinin ve IRF6'nın ifade analizleri.** MDA MB 231 hücreleri 24 saat boyunca DMSO ya da 90  $\mu$ M DAPT ile muamele edildikten sonra (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

**Dominant Negatif Mastermind-like1:** Mastermind-like1, Notch yolağının altında çalışan temel ko-aktivatörlerden biridir. Mastermind-like1'in dominant negatif formu (DNMM) hücre içerisindeki Mastermind-like1'in işlevini engelleyerek Notch yolağının baskılanmasına sebep olur. MDA MB 231 hücreleri, kontrol virüsü (MSCV) ve DNMM ifade ettiren virüs (MSCV-

DNMM) ile enfekte edildikten 48 saat sonra yapılan mRNA analizlerinde HEY1'de yaklaşık %50'lik ve HEY2'de yaklaşık %40'lık bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 5a). HEY2 proteininde iki deneyde hafif bir azalma bulunmaktadır (Şekil 5b). Bu analizlere göre Notch yolağının DNMM ifadesi ile baskılandığı sonucuna varılmıştır. Bu koşullarda IRF6 mRNA'sında, kontrol hücrelerine göre DNMM ifade eden hücrelerde yaklaşık olarak %35'lik bir düşüş görülmüş (Şekil 5a) ve iki deneyde protein seviyesinde de hafif bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 5b).

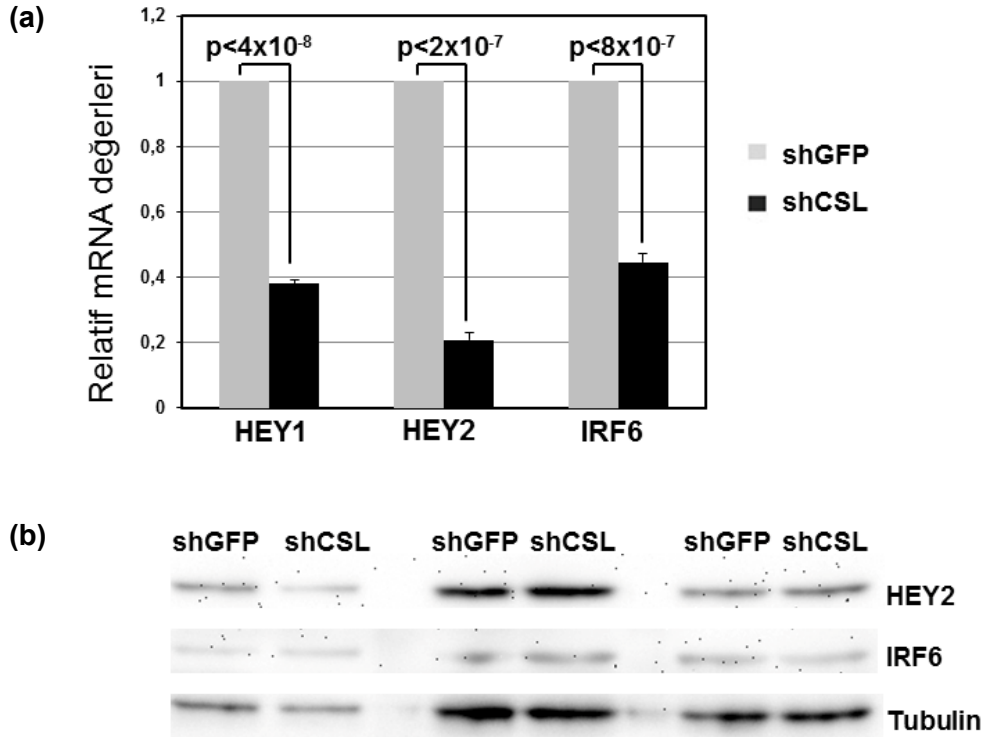


**Şekil 5. MDA MB 231 hücrelerinde Dominant Negatif Mastermind-like1 ifadesinin HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri.** MDA MB 231 hücreleri kontrol (MSCV) ve ya Dominant Negatif Mastermind-like1 (DNMM) ifade ettiren (MSCV-DNMM) virüsler ile enfekte edildikten 48 saat sonra (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

**shCSL:** CSL (RBPj $\kappa$ ), kanonikal Notch yolağının transkripsiyonal aracı molekülüdür. Aktif Notch almaçları çekirdeğe göç ettiğinde hedef DNA sekanslarında bulunan CSL moleküllerine bağlanarak represörlerin uzaklaştırılıp aktivatörlerin bağlanmasına ve transkripsiyonun aktive edilmesine sebep olurlar. Bu sebeple, CSL molekülleri olmadığında Notch almaçları kanonikal hedef genlerini ifade ettiremezler. MDA MB 231 hücrelerinde CSL, shRNA yöntemiyle susturulmuştur. Hücreler, kontrol olarak yeşil floresan proteine (GFP) karşı shRNA ifade ettiren virüsle (shGFP) ya da CSL'ye karşı shRNA ifade ettiren virüsle (shCSL) enfekte edildikten 48 saat sonra mRNA ve protein analizleri yapılmıştır. Notch hedef genlerinden HEY1'de yaklaşık %60'lık, HEY2'de yaklaşık %80'lik bir azalma gözlenmiştir (Şekil 6a). HEY2 proteini bir

deneyde hafif bir azalma göstermekle beraber, diğer iki deneyde mRNA'sına paralel bir değişim göstermemiştir (Şekil 6b). HEY1 ve HEY2 mRNA'larındaki düşüş, CSL'nin susturulmasıyla Notch yolağının inhibe edildiğini göstermektedir. IRF6 mRNA'sı, kontrol hücrelerine göre CSL'nin susturulduğu hücrelerde yaklaşık %50 oranında azalmıştır (Şekil 6a). Bu azalma, daha az belirgin de olsa protein seviyesinde de gözlenmiştir (Şekil 6b).

Notch inhibisyonunun IRF6 ifadesini azaltmasına dayanarak, IRF6'nın Notch yolağı tarafından pozitif olarak kontrol edildiği ve bunun için kısmen kanonikal yolağın kullanıldığı sonucuna varılmıştır.



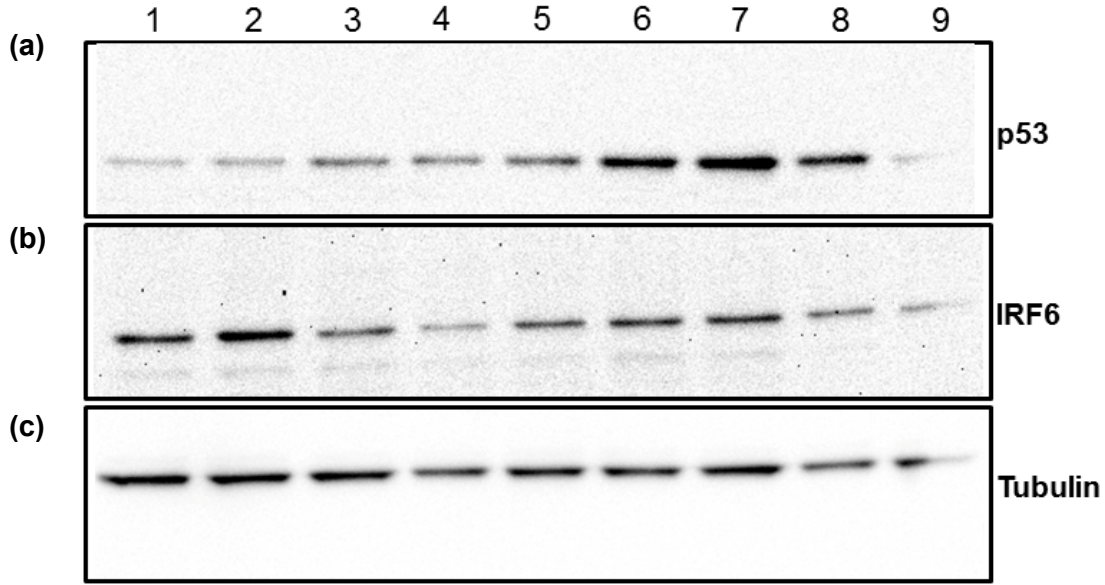
**Şekil 6. MDA MB 231 hücrelerinde CSL'nin susuturulmasının HEY1, HEY2 ve IRF6 ifadeleri üzerindeki etkileri.** MDA MB 231 hücreleri kontrol olarak GFP'ye karşı shRNA ifade eden (shGFP) ve ya CSL'ye karşı shRNA ifade eden (shCSL) virusler ile enfekte edildikten 48 saat sonra (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

#### 4.1.3 IRF6'nın fosforlanmış formu tespit edilmemiştir.

IRF6'nın fosforlanmış ve fosforlanmamış iki formunun hücrede bulunduğu daha önce gösterilmiş olmasına rağmen (Bailey vd., 2008) protein analizlerimizde iki farklı IRF6 formu tespit edilememiştir. Fosforlanmış IRF6'nın proteozom aracılığıyla parçalandığı ve proteozom inhibitörü MG-132 kullanıldığında özellikle fosforlanmış proteinde bir artış olduğu gösterilmiştir



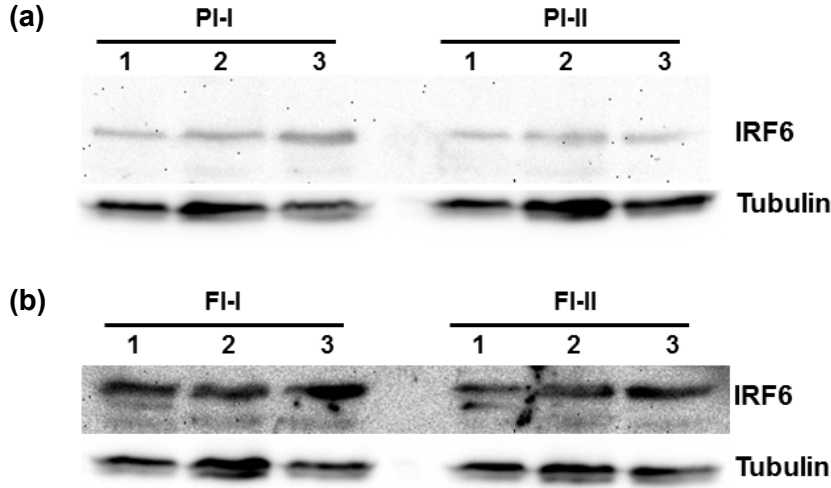
(Bailey vd., 2008). IRF6'nın fosforlanmış formunu tespit edememizin sebebinin proteazomla parçalanması olup olmadığını test etmek için MCF10A hücreleri farklı koşullarda (0,5 $\mu$ M-18 saat, 1 $\mu$ M-18 saat, 5 $\mu$ M-4 saat, 10 $\mu$ M-4 saat, 20 $\mu$ M-4 saat, 50 $\mu$ M-4 saat) MG-132 ile muamele edildikten sonra IRF6 proteini analiz edilmiştir. Artan MG-132 konsantrasyonuyla orantılı olarak artan p53 protein seviyeleri (Şekil 7a) proteazom inhibisyonunun başarılı olduğunu göstermiştir. Ancak tubulin seviyeleri ile karşılaştırıldığında MG-132'nin IRF6 protein seviyeleri üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı ve de fosforlanmış formu ortaya çıkarmadığı görülmüştür (Şekil 7b ve c).



**Şekil 7. MCF10A hücrelerinin MG-132 ile muamelesi sonrası IRF6 protein analizleri.** (1) DMSO, 18 saat, (2) 0,5 $\mu$ M MG-132, 18 saat, (3) 1 $\mu$ M MG-132, 18 saat, (4) 5 $\mu$ M MG-132, 4 saat, (5) 10 $\mu$ M MG-132, 4 saat, (6) 20 $\mu$ M MG-132, 4 saat, (7) 50 $\mu$ M MG-132, 4 saat, (8) DMSO, 4 saat, (9) besiyeri ile muamele edilmiş MCF10A hücrelerinde (a) p53, (b) IRF6 ve (c)  $\gamma$ -tubulin analizleri yapılmıştır.

Fosforlanmış formun protein izolasyonu sırasında kaybedilmediğinden emin olmak için iki farklı proteaz inhibitörü (Şekil 8a) ve iki farklı fosfat inhibitörü (Şekil 8b) kullanılarak protein izolasyonu yapılmış ve IRF6 analiz edilmiştir. Test edilen üç hücrede de, MCF7, MCF10A ve MDA MB 231, kullanılan inhibitörlerle IRF6'nın ikinci bir formu tespit edilememiştir.

Fosforlanmış formun tespit edildiği çalışmada (Bailey vd., 2008) özel olarak üretilmiş bir antikor kullanılmıştır. Bu antikorun aksine satın aldığımız antikorların fosforlanmış formu tanımama ihtimali de bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı, projede IRF6'nın fosforlu formuyla ilgili bir sonuca ulaşmak mümkün olmamıştır.



**Şekil 8. Proteaz ve fosfotaz inhibitörü testleri.** MCF7 (1), MCF10A (2) ve MDA MB 231 (3) hücrelerinde (a) Sigma (PI-I) ve Roche (PI-II) marka proteaz inhibitörleri ve (b) NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> solüsyonları (FI-I) ve Pierce (FI-II) marka fosfotaz inhibitörleri kullanılarak elde edilen protein lizatlarında IRF6 proteini analiz edilmiştir.

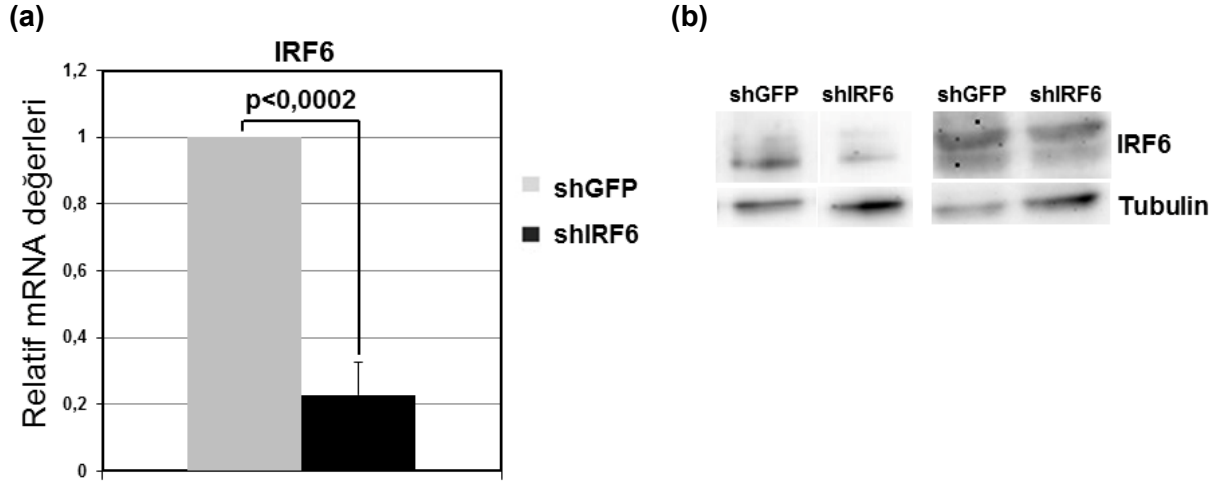
#### 4.2 IRF6'nın Notch'a bağlı hücre bölünmesi ve transformasyonu üzerindeki etkileri

IRF6 ifadesinin Notch yolağının hücre bölünmesini ve transformasyonu indüklemesindeki rolünün araştırılması için IRF6'nın olmadığı koşullarda Notch etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

Bunun için öncelikle, IRF6 ifadesini susturulabilen shRNA dizisi seçilmiştir. MCF10A hücreleri seçilen shRNA virüsü ile enfekte edildikten 48 saat sonra IRF6 mRNA'sında %80 oranında azalma tespit edilmiştir (Şekil 9a). IRF6 protein seviyesinde de belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 9b).

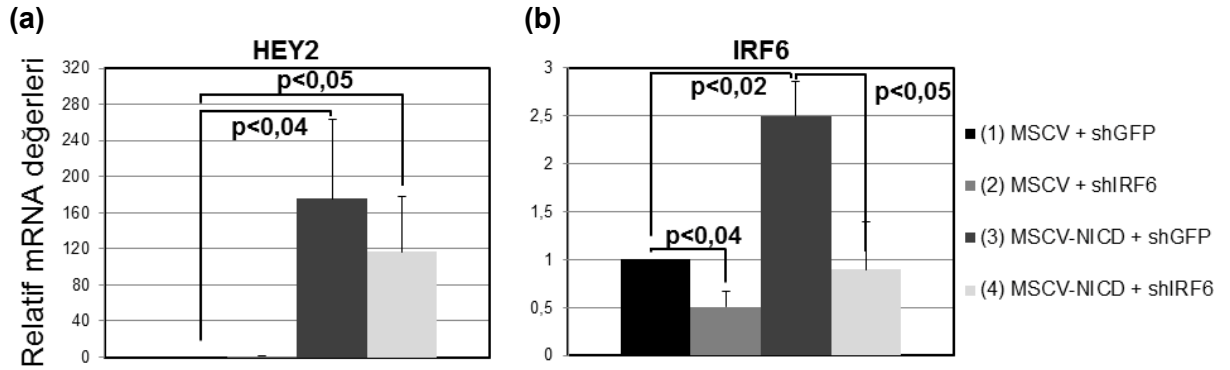
Seçilen IRF6 shRNA virüsü Notch aktivasyonu sonrası artan IRF6 ifadesinin susturulması için kullanılmıştır. MCF10A hücrelerinde Notch yolağının aktive edildiği (MSCV-NICD) ve IRF6'nın olduğu (shGFP) ya da susturulduğu (shIRF6) koşullar çift virüs enfeksiyonu yapılarak gerekli kontroller ile şu şekilde oluşturulmuştur:

- |                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| (1) MSCV (Kontrol virüsü) | + shGFP (Kontrol virüsü) |
| (2) MSCV (Kontrol virüsü) | + shIRF6                 |
| (3) MSCV-NICD             | + shGFP (Kontrol virüsü) |
| (4) MSCV-NICD             | + shIRF6                 |



**Şekil 9. IRF6'nın shRNA yöntemi ile susturulması.** MCF10A hücreleri kontrol shRNA ifade eden (shGFP) ya da IRF6'ya karşı shRNA ifade eden (shIRF6) virüsler ile enfekte edildikten 48 saat sonra IRF6 (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

Çift virüs enfeksiyonundan 48 saat sonra HEY2 mRNA'sında, MSCV-NICD+shGFP ve MSCV-NICD+shIRF6 koşullarında sırasıyla 175 ve 116 katlık bir artış gözlenmiştir (Şekil 10a). IRF6'nın susturulması sonucu HEY2 mRNA'sında hafif bir azalma gözlenmesine rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar çift enfeksiyon yöntemiyle Notch aktivasyonunun başarıyla sağlandığını göstermiştir (Şekil 10a).



**Şekil 10. Çift enfeksiyon ile oluşturulan koşullarda HEY2 ve IRF6 mRNA ifadeleri.** MCF10A hücreleri (1) MSCV+shGFP, (2) MSCV+shIRF6, (3) MSCV-NICD+shGFP ve (4) MSCV-NICD+shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra (a) HEY2 ve (b) IRF6 mRNA analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

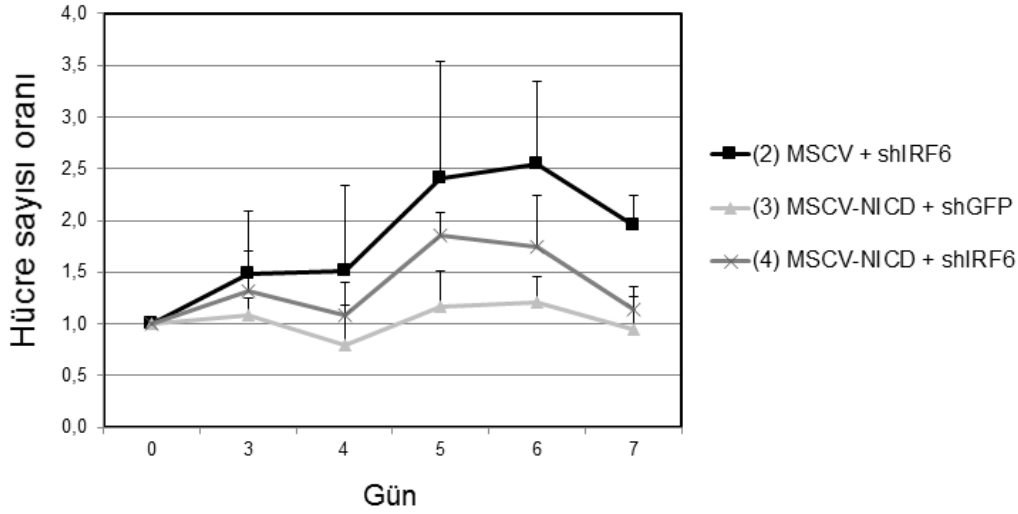
IRF6 mRNA'sında, kontrol hücrelerine (MSCV+shGFP) göre IRF6 shRNA'sı ile enfekte edilen hücrelerde (MSCV+shIRF6) yaklaşık %50'lik bir azalma, NICD ile enfekte edilen hücrelerde

(MSCV-NICD+shGFP) yaklaşık 2,5 katlık bir artış gözlenmiştir (Şekil 10b). Bu sonuçlar çift enfeksiyon yönteminin NICD ve shRNA vektörlerinin işlevini etkilemediğini göstermektedir.

IRF6 shRNA'sı Notch aktivasyonu sonrası artan IRF6 mRNA'sını %40 oranında azaltmıştır (MSCV-NICD+shIRF6) (Şekil 10b). Böylece Notch aktivasyonu sonrası IRF6 mRNA'sının indüklendiği (MSCV-NICD+shGFP) ya da indüklenemediği (MSCV-NICD+shIRF6) koşullar oluşturulmuştur.

#### 4.2.1 IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı hücre bölünmesini azaltmıştır.

Oluşturulan koşulların hücre büyümesi üzerindeki etkisini zamana bağlı olarak gözlemlemek için büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Bu amaçla, MCF10A hücreleri yukarıda açıklandığı şekilde enfekte edildikten 48 saat sonra eşit sayıda hücre (3000/kuyu) 12 kuyulu petri kaplarına ekilmiş ve 3. günden 7. güne kadar her gün sayılarak büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Her gün için koşul başına 3 kuyu hücre sayılarak ortalamaları alınmıştır. Her bir koşul ve gün için hesaplanan hücre sayıları kontrol enfeksiyonuna ((1) MSCV + shGFP) oranlanarak analiz edilmiştir.



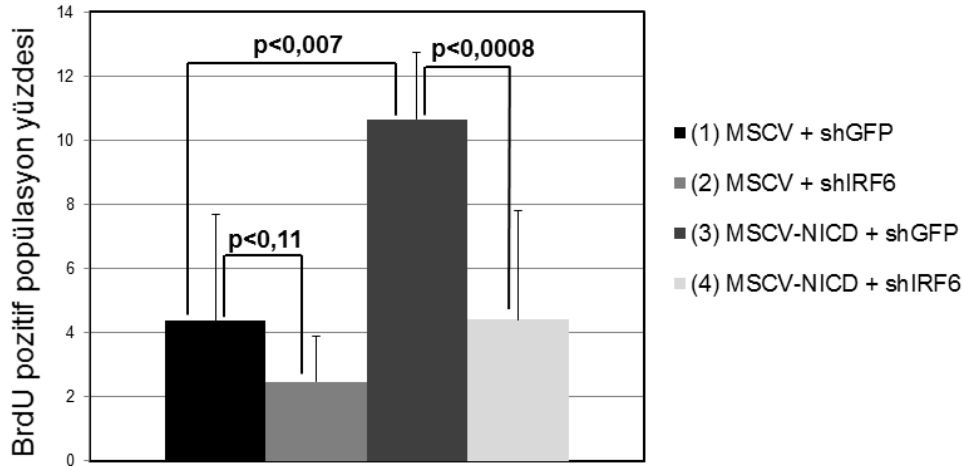
**Şekil 11. MCF10A hücrelerinde büyüme eğrisi analizleri.** Üç farklı deneyde MCF10A hücreleri (1) MSCV + shGFP, (2) MSCV + shIRF6, (3) MSCV-NICD + shGFP ve (4) MSCV-NICD + shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra 12 kuyulu petri kaplarına ekilerek 7 gün boyunca sayılmıştır. Her bir gün için hesaplanan ortalama sayılar kontrol koşulundaki ((1) MSCV + shGFP) hücre sayısına bölünerek oran elde edilmiştir. Üç bağımsız deneyin ortalama sonuçları kullanılmıştır. Hata çubukları standart sapma değerini göstermektedir.

Notch aktivasyonunun (MSCV-NICD+shGFP) beklenenin aksine kontrole göre (MSCV+shGFP) hücre sayısını artırmadığı görülmüştür (Şekil 11). IRF6'nın susturulmasının hücre bölünmesini artırma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değere

ulaşmadığı gözlenmiştir. IRF6'nın bulunduğu (MSCV-NICD+shGFP) ya da bulunmadığı (MSCV-NICD+shIRF6) koşullarda hücre sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 11).

Literatürün aksine (Stylianou vd., 2006), Notch aktivasyonunun hücre sayıları üzerinde bir etki göstermemesi IRF6'nın etkilerinin bu yöntemle analiz edilemeyeceğini göstermiştir. Notch aktivasyonunun normal primer meme hücrelerinde integrin ifadesini azalttığı bilinmektedir (Yalcin-Ozuyal vd., 2010). İntegrin ifadesinin azalması, enfeksiyondan sonra yeni petriye aktarılan hücrelerin yapışmasını engelleyeceği için hücre bölünmesini de negatif yönde etkileyecektir. Bu haliyle büyüme eğrisi deneylerinin hipotezi test etmek için uygun olmadığına karar verilmiştir.

İkinci bir yaklaşım olarak, DNA sentezi evresindeki hücrelerin doğrudan analiz edilmesine olanak veren BrdU yöntemi kullanılmıştır. Yukardaki koşullarda enfekte edilen MCF10A hücreleri, enfeksiyondan 24 saat sonra açlık besiyerine alınmış, 48 saat sonra da 2 saat süreyle 20µM BrdU ile muamele edilip akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Böylece 2 saat süresinde DNA sentez evresine giren hücrelerin oranı tespit edilmiştir.



**Şekil 12. MCF10A hücrelerinde BrdU analizleri.** Beş farklı deneyde MCF10A hücreleri (1) MSCV + shGFP, (2) MSCV + shIRF6, (3) MSCV-NICD + shGFP ve (4) MSCV-NICD + shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra 2 saat BrdU ile muamele edilip akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Hata çubuğu standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

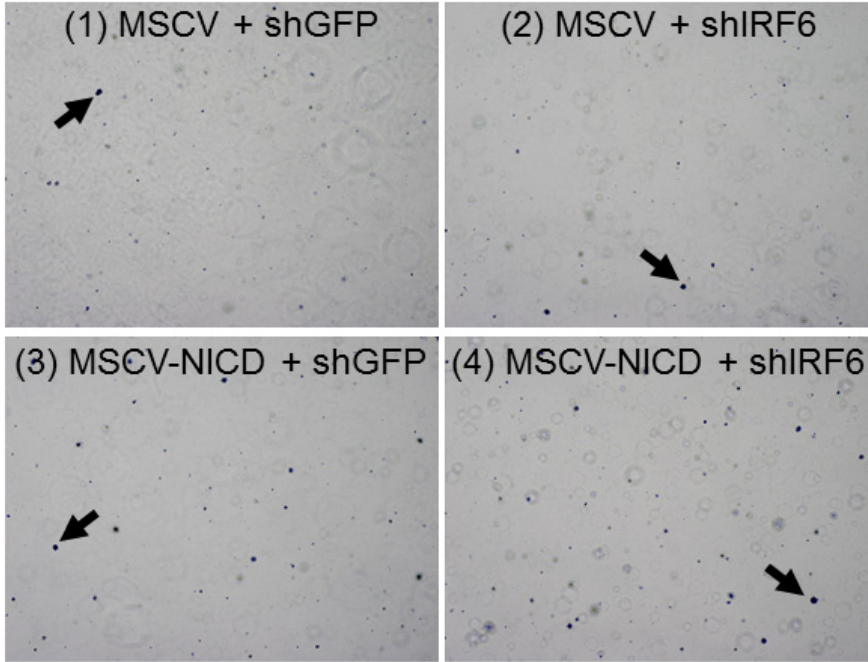
Kontrol koşulunda %4 olan BrdU pozitif hücrelerin oranı, Notch aktivasyonu sonrası (MSCV-NICD+shGFP) %10'a çıkmıştır (Şekil 12). Literatürle uyumlu olan bu artış, hipotezimizi test etmek için yöntemin uygun olduğunu göstermiştir. Yalnızca IRF6'nın susturulması (MSCV + shIRF6) pozitif hücre oranını %2,5'a düşürse de bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Notch aktivasyonu ile beraber IRF6 susturulduğunda ise (MSCV-

NICD+shIRF6) Notch'un etkisinin kaybolduğu ve BrdU pozitif hücre oranının %4'e düşerek kontrol seviyesine geldiği gözlenmiştir (Şekil 12).

Bu sonuçlara dayanarak, IRF6 ifadesinin Notch'un hücre bölünmesini indüklemesi için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

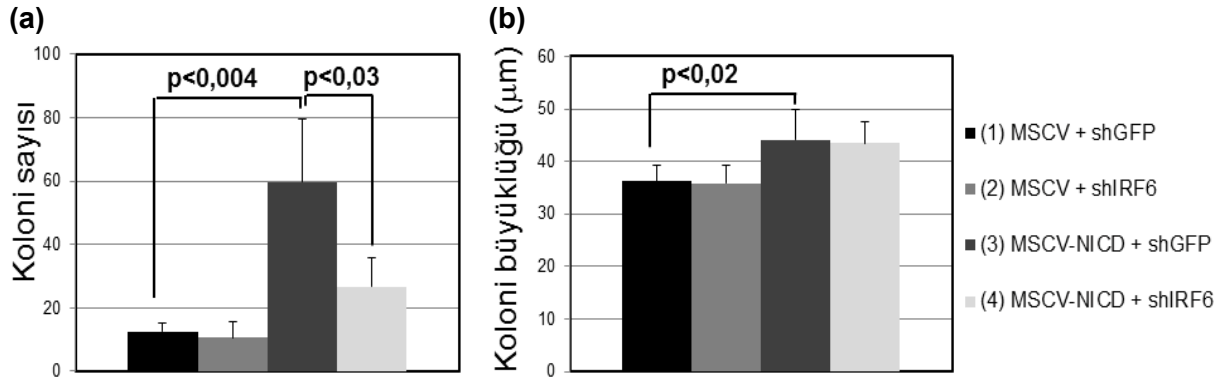
#### 4.2.2 IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı transformasyon kapasitesini azaltmıştır.

MCF10A hücrelerinin tranformasyon kapasitesini ölçmek için iki farklı yaklaşım uygulanabilir: (i) yumuşak agarda koloni oluşturma deneyleri ve (ii) düşük yoğunlukta normal petri yüzeyine ekilen hücrelerin tek hücreden koloni oluşturma kapasitesinin analiz edilmesi. Normal petri yüzeyinde yapılacak tek hücreden koloni oluşturma deneylerinde de büyüme eğrisi deneylerinde olduğu gibi petri kabına yapışamamaya bağlı olarak hücre bölünmesi etkilenecektir. Bu sebeple uzun dönem kültürde olması gereken hücrelerin koloni büyüklüğü ve sayısı da dolaylı olarak etkilenecek Notch'un transformasyon kapasitesini ölçmemizi engelleyecektir. Bu sebeple ikinci metodun amacımız için uygun olmayacağına karar verilmiştir. Ancak yumuşak agar yöntemi zaten hücrelerin yüzeye yapışmadan büyüme kapasitesini ölçtüğünden Notch'a bağlı transformasyon analizleri için uygundur.



**Şekil 13. Temsili yumuşak agar fotoğrafları.** MCF10A hücreleri (1) MSCV + shGFP, (2) MSCV + shIRF6, (3) MSCV-NICD + shGFP ve (4) MSCV-NICD + shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra yumuşak agara gömülerek 8 hafta büyütülmüştür. Crystal violet boyamasının ardından çekilen fotoğraflar gösterilmiştir. Oklar, çapı 30 µm'den büyük olduğu için analizlere dahil edilen temsili kolonileri göstermektedir.

Yumuşak agar analizleri için yukarıda açıklandığı şekilde dört farklı koşul çift enfeksiyon yöntemiyle oluşturulmuştur. Enfeksiyondan 48 saat sonra, kuyu başına 30.000 hücre gelecek şekilde MCF10A hücreleri 6 kuyulu petri kaplarına ekilmiştir. Kuyuların tabanında %0.5'lik agar yatak olarak kullanılmış, hücreler %0,35'lik agara gömülerek 8 hafta boyunca büyütülmüştür. Oluşan koloniler %0.005 crystal violet solüsyonu ile boyanarak fotoğraflanmış, çapı 30 µm'den büyük olan koloniler sayılmıştır (Şekil 13).



**Şekil 14. MCF10A hücrelerinde yumuşak agar analizleri.** Üç bağımsız deneyde, MCF10A hücreleri (1) MSCV + shGFP, (2) MSCV + shIRF6, (3) MSCV-NICD + shGFP ve (4) MSCV-NICD + shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra yumuşak agara gömülerek 8 hafta büyütülmüştür. Crystal violet boyamasının ardından çapı 30 µm'den büyük olan kolonilerin (a) sayısı ve (b) büyüklüğü analiz edilmiştir. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

Kontrol enfeksiyonu sonrasında kuyu başına ortalama 12 olan koloni sayısı, Notch aktivasyonu ile (MSCV-NICD+shGFP) 60'a yükselmiştir (Şekil 14a). Ortalama koloni büyüklüğü ise 36µm'den 44µm'ye çıkmıştır (Şekil 14b). IRF6'nın susturulması tek başına, iki parametrede de anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Notch aktivasyonu olan hücrelerde IRF6'nın susturulması (MSCV-NICD+shIRF6) ise koloni sayısını 60'tan 27'ye indirmiş (Şekil 14a) ancak ortalama koloni büyüklüğünü etkilememiştir (Şekil 14b).

Yumuşak agar koloni sayısı sonuçlarına bakılarak, IRF6'nın Notch'a bağlı transformasyon için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak koloni büyüklüğünde değişiklik olmaması bir kere transform olan hücrelerin geçirecekleri hücre bölünmesi sayısının IRF6'dan bağımsız olduğuna işaret etmektedir.

#### 4.3 IRF6'nın meme epitel hücrelerinin luminal ve bazal karakterleri üzerindeki etkileri

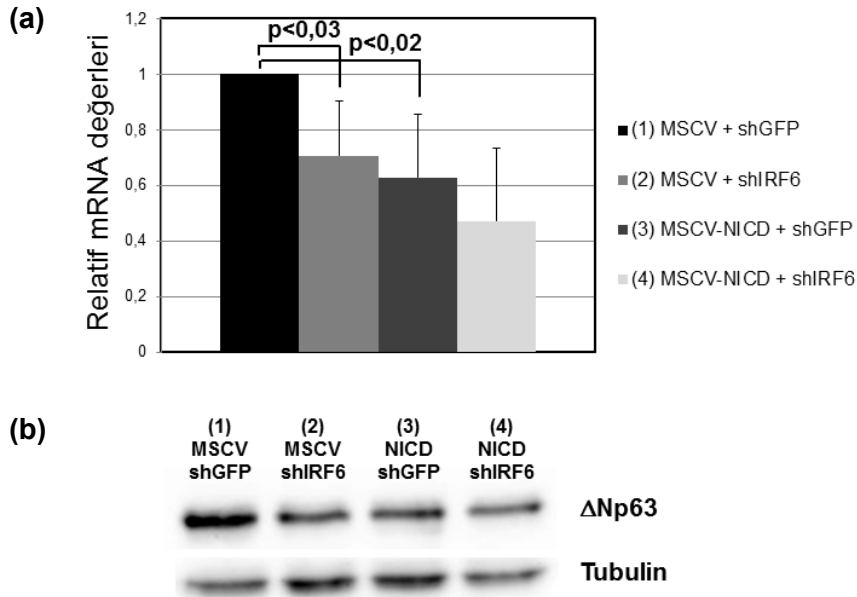
Notch yolağının, bazal karakter oluşumunu kontrol eden ΔNp63'ü baskılayarak meme epitel hücrelerinin luminal karakter kazanmasını tetiklediği bilinmektedir (Yalcin-Ozuysal vd., 2010). IRF6'nın Notch'un bu fonksiyonu için aracı olup olmadığının araştırılması için öncelikle

IRF6'nın  $\Delta$ Np63 ifadesi üzerindeki etkileri ve ardından IRF6'nın meme epitel hücrelerinin luminal ve bazal belirteçleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

#### 4.3.1 IRF6 Notch1'in $\Delta$ Np63 ifadesini baskılaması için gerekli değildir.

Notch yolağının,  $\Delta$ Np63'ü baskılamak için IRF6'yı aracı olarak kullanıp kullanmadığının anlaşılması için Notch aktivasyonu sonucu IRF6'nın indüklenebildiği ve indüklenemediği koşullarda  $\Delta$ Np63 ifadesi analiz edilmiştir.

Çift enfeksiyon yöntemiyle oluşturulan koşullarda, Notch aktivasyonunun (MSCV-NICD+shGFP) beklendiği gibi  $\Delta$ Np63 mRNA (Şekil 15a) ve protein (Şekil 15b) ifadesini azalttığı görülmüştür (Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Notch aktivasyonu ile beraber IRF6'nın susuturulması (MSCV-NICD+shIRF6)  $\Delta$ Np63 ifadesinde herhangi bir anlamlı değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 15). Burdan Notch'un  $\Delta$ Np63 ifadesini baskılaması için IRF6'yı aracı olarak kullanmadığı sonucuna varılmaktadır. IRF6'nın tek başına susuturulması (MSCV+shIRF6) kontrol hücrelerine göre  $\Delta$ Np63 mRNA ve proteininde hafif bir azalmaya sebep olmuştur. Bu da IRF6'nın hücrede bulunmasının, Notch'tan bağımsız olarak,  $\Delta$ Np63 ifadesinin devamlılığı için gerekli olabileceğine işaret etmektedir.

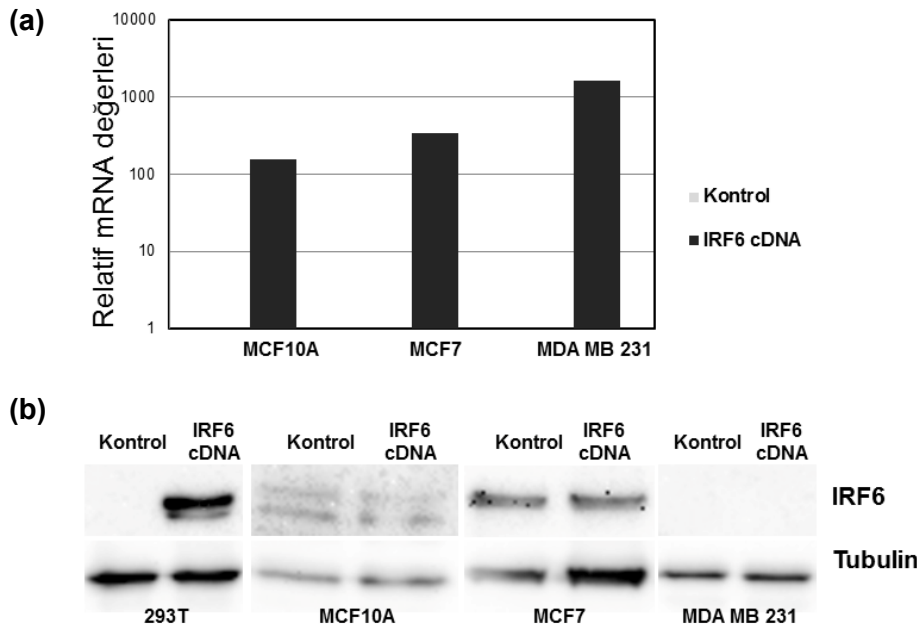


**Şekil 15. Çift enfeksiyon yöntemiyle oluşturulan dört farklı koşulda  $\Delta$ Np63 ifadesi analizleri.** MCF10A hücreleri (1) MSCV+shGFP, (2) MSCV+shIRF6, (3) MSCV-NICD+shGFP ve (4) MSCV-NICD+shIRF6 virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra  $\Delta$ Np63 için (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

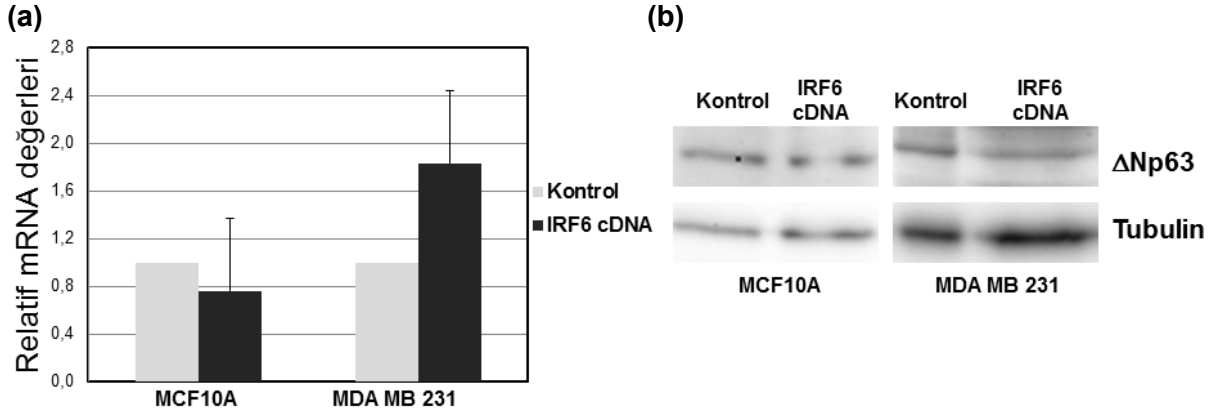


#### 4.3.2 IRF6'nın $\Delta$ Np63 ifadesi üzerindeki etkileri.

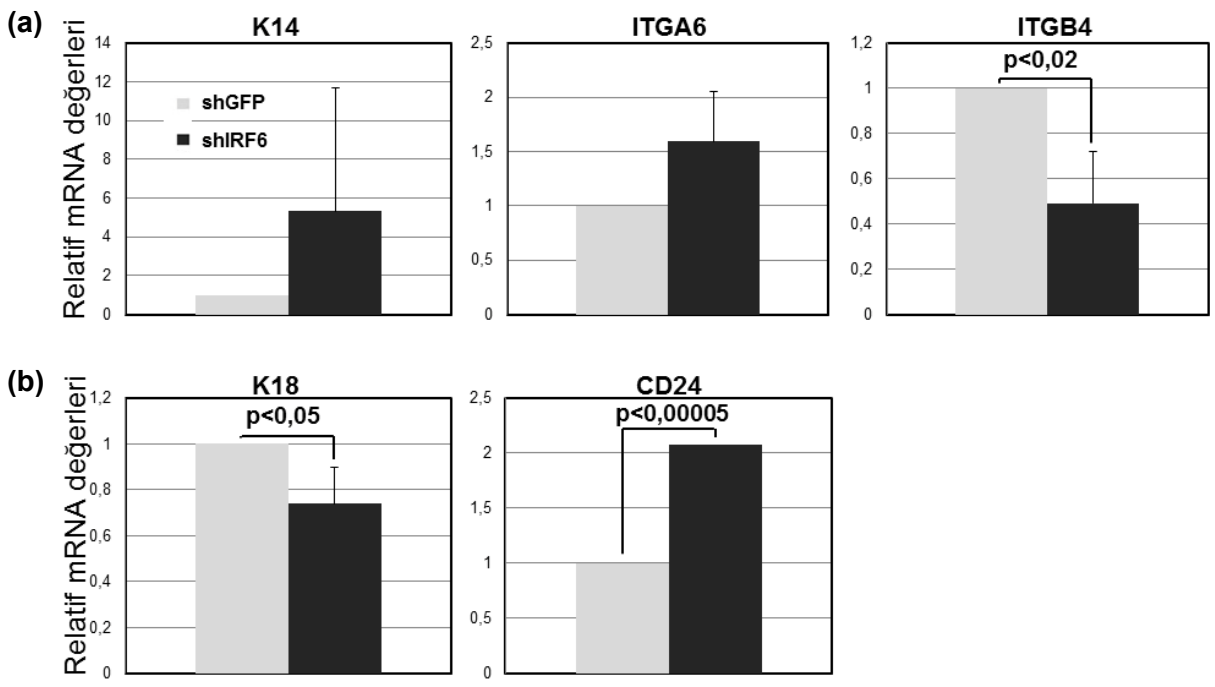
IRF6'nın,  $\Delta$ Np63 üzerindeki doğrudan etkisinin analiz edilebilmesi için IRF6 cDNA'sının hücrelere akarılması planlanmıştır. IRF6 cDNA'sı, memeli ekspresyon vektöründe satın alınmış ve viral vektörlere klonlanmaya çalışılmıştır. Ancak klonlamaların başarılı olmaması sebebiyle, memeli ekspresyon vektörününün transfeksiyon ile hücrelere aktarılmasına karar verilmiştir. Normal meme hücre hattı MCF10A ve meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA MB 231 IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edildikten 48 saat sonra IRF6 mRNA seviyeleri yaklaşık 100 ile 1000 kat arasında artış göstermiştir (Şekil 16a). mRNA seviyelerindeki yüksek artışa rağmen, IRF6 proteininde bir fark görülmemiştir (Şekil 16b). Protein analizleri transfeksiyondan 72 saat sonra tekrarlandığında da sonuçlar değişmemiştir. Yalnızca embriyonik böbrek fibroblast hücresi olan 293T'de transfeksiyon sonrası IRF6 proteininde artış görülmüştür (Şekil 16b). Meme epitel hücrelerinde IRF6 mRNA'sında artış görülmesine rağmen proteinde fark görülmemesi iki şekilde açıklanabilir: (i) proteinin farklı bir mekanizmayla kontrol edilip aktif olarak parçalanması ya da (ii) yüksek miktarda ifade edilen cDNA'nın post-translasyonel bir modifikasyona uğraması sonucu antikor tarafından tanınmaması. İkinci seçeneğin geçerli olması durumunda hücrede IRF6 proteini bulunacağı için  $\Delta$ Np63 analizleri yapılmıştır.



**Şekil 16. IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen hücrelerde IRF6 ifadesi analizleri.** Hücreler kontrol ya da IRF6 cDNA'sı taşıyan ekspresyon vektörü ile transfeke edildikten 48 saat sonra IRF6 için (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır.



**Şekil 17. IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen hücrelerde  $\Delta Np63$  ifadesi analizleri.** MCF10A ve MDA MB 231 hücreleri kontrol ya da IRF6 cDNA'sı taşıyan ekspresyon vektörü ile transfeke edildikten 48 saat sonra  $\Delta Np63$  için (a) mRNA ve (b) protein analizleri yapılmıştır.



**Şekil 18. IRF6 ifadesi susturulan MCF10A hücrelerinde bazal ve luminal belirteçlerin ifade analizleri.** MCF10A hücreleri kontrol shRNA ifade eden (shGFP) ya da IRF6'ya karşı shRNA ifade eden (shIRF6) virüsleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra (a) bazal (K14, ITGA6 ve ITGB4) ve (b) luminal (K18 ve CD24) belirteç moleküllerin mRNA ifadeleri analiz edilmiştir. Sonuçlar üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart sapma değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

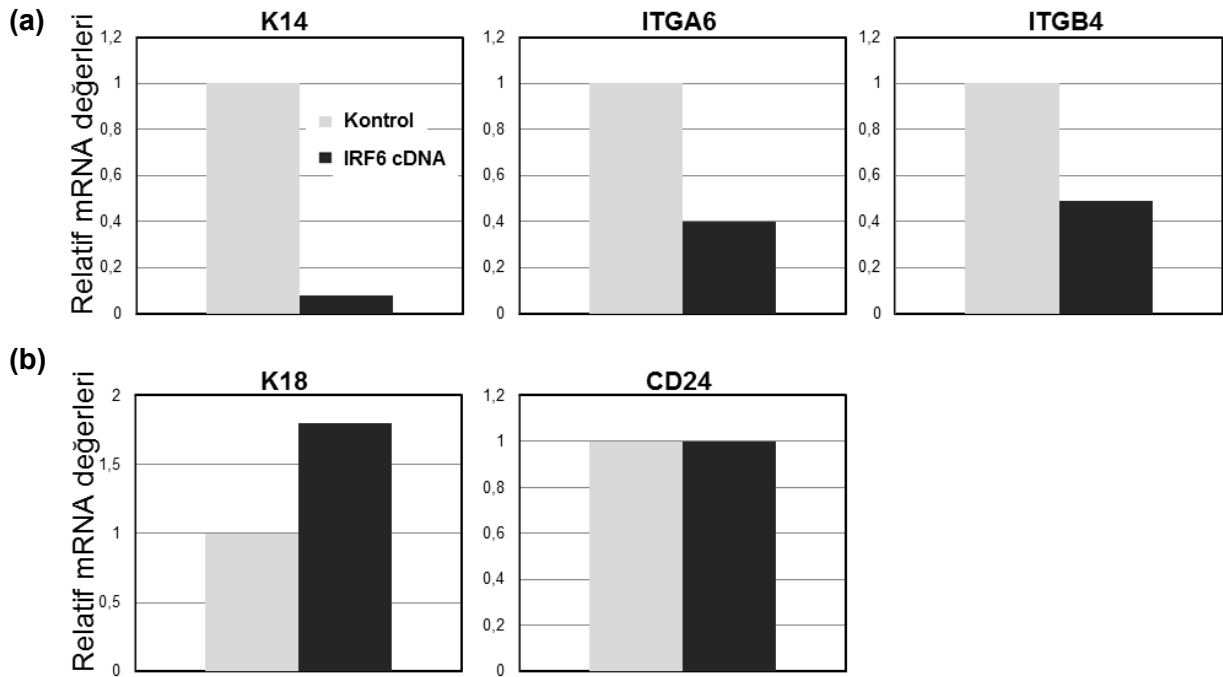
IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilen MCF10A ve MDA MB 231 hücrelerinde  $\Delta Np63$  mRNA'sında hafif bir fark gözlemlense de bu istatistiksel olarak anlamlı bir seviyeye ulaşmamıştır (Şekil 17a). mRNA sonuçları ile paralel olarak  $\Delta Np63$  proteininde de bir fark görülmemiştir

(Şekil 17b). Bu sonuçlara dayanarak IRF6'nın  $\Delta$ Np63 ifadesinde belirgin bir değişikliğe sebep olmadığı sonucuna varılmıştır.

#### 4.3.3 IRF6'nın luminal ve bazal belirteç moleküller üzerindeki etkileri.

IRF6'nın luminal ve bazal belirteçler üzerindeki etkisinin anlaşılması için bazal karakterli MCF10A ve luminal karakterli MCF7 hücreleri kullanılmıştır. IRF6 ifade eden MCF10A hücrelerinde IRF6 susturulmuş ve daha az IRF6 ifade eden MCF7 hücrelerinde IRF6 cDNA'sı ifade ettirilmiştir.

IRF6'nın MCF10A hücrelerinde susturulması sonucunda bazal hücre belirteçlerinden keratin-14 (K14) ve integrin-alfa-6'nın (ITGA6) ifadelerinde hafif bir artış görülsede anlamlı bir seviyeye ulaşmamıştır (Şekil 18a). Diğer bir bazal belirteç olan integrin-beta-4'ün (ITGB4) ifadesinde yaklaşık %50'lik anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 18a). Luminal belirteçlerden keratin-18'de yaklaşık %30'luk bir azalma, CD24'te ise yaklaşık iki katlık bir artış tespit edilmiştir (Şekil 18b). Bazı luminal ve bazal belirteçlerin ifadesini etkilemekle beraber, sonuç olarak IRF6'nın susturulmasının MCF10A hücrelerinde iki karakterden birini özel olarak indüklediği görülmüştür.



**Şekil 19. IRF6 cDNA vektörü ile transfeke edilen MCF7 hücrelerinde luminal ve bazal belirteçlerin ifade analizleri.** MCF7 hücreleri kontrol ya da IRF6 cDNA'sı taşıyan ekspresyon vektörü ile transfeke edildikten 48 saat sonra (a) bazal (K14, ITGA6 ve ITGB4) ve (b) luminal (K18 ve CD24) belirteç moleküllerin mRNA ifadeleri analiz edilmiştir.

MCF7 hücrelerinin IRF6 cDNA vektörü ile transfekte edilmesi sonucu, bazal belirteçlerden K14, ITGA6 ve ITGB4 ifadelerinde sırasıyla %90, %60 ve %50'lik azalma görülmüştür (Şekil 19a). Luminal belirteçlerden CD24 ifadesinde bir değişiklik görülmezken K18'de yaklaşık 1,5 katlık bir artış tespit edilmiştir (Şekil 19b). Sonuç olarak, IRF6'nın MCF7 hücrelerinde bazal karakteri engellerken luminal karakteri indükleyebileceği görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Notch yolağı ve IRF6, damak gelişimi ve keratinosit farklılaşması gibi (Jiang vd., 1998; Ingraham vd., 2006; Richardson vd., 2006; Dotto, 2008), benzer gelişimsel evrelerde rol oynasalar da aralarındaki doğrudan ilişki yakın zamana kadar bilinmemekteydi. Notch yolağı ile IRF6'nın doğrudan etkileştiği, keratinositlerde kanonikal (CSL'ye bağlı) Notch yolağının IRF6 ifadesini artırmasıyla gösterilmiştir (Restivo vd., 2011). Ancak bunun keratinositlere has bir etkileşim mi olduğu yoksa diğer doku ve hücre tiplerinde de mi korunduğu bilinmemektedir. Bu çalışmada, meme epitel hücrelerinde kanonikal Notch yolağının IRF6 ifadesini kontrol ettiği, dolayısıyla Notch-IRF6 etkileşiminin doku tipinden bağımsız olduğu ilk defa gösterilmiştir. Notch aktivasyonu, normal meme epitel hücre hattı MCF10A'da IRF6 ifadesini artırırken; kanonikal Notch yolağının aracı molekülü CSL'nin ya da ko-aktivatörü Mastermind like 1'in meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'de susturulması IRF6 ifadesini azalmıştır. Bu sonuçlar, Notch yolağının meme epitel hücrelerinin normal ya da kanser hücresi olmasından bağımsız olarak IRF6 ifadesini kontrol ettiğini ve keratinositlerde olduğu gibi, kısmen kanonikal yolağın kullanıldığını göstermiştir.

Notch inhibisyonu için kullandığımız yöntemlerden CSL'nin susturulması ya da dominant negatif Mastermind-like 1 ifade edilmesi IRF6 için benzer sonuçlar vermişken, DAPT ile Notch yolağı inhibe edildiğinde, IRF6'da belirgin bir artış görülmüştür. DAPT, Notch almaçlarını kesen  $\gamma$ -sekretaz enziminin bir inhibitörüdür. DAPT'nin, Notch'a has yöntemlerden farklı sonuç vermesi, IRF6'nın diğer  $\gamma$ -sekretaz substratları tarafından da kontrol edildiğini göstermektedir.  $\gamma$ -sekretazın Notch dışında cadherinler, ephrinler ve VEGF gibi birçok farklı substratı daha bulmaktadır (Haapasalo ve Kovacs, 2011). IRF6'nın bu moleküllerle ilişkisi henüz bilinmemektedir. DAPT'nin Notch hedef genlerinden HEY2 mRNA ve proteini üzerinde de beklenmedik etkileri gözlenmiştir. HEY2 mRNA'sının aksine proteininde görülen artış HEY2 proteininin de Notch dışındaki  $\gamma$ -sekretaz substratları tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir.

IRF6, skuamöz hücreli karsinomada (SCC) tümör baskılayıcı olarak davranmaktadır. SCC tümörlerinde IRF6 ifadesinin azaldığı, SCC hücre hatlarına dışarıdan IRF6 verildiğinde ise koloni oluşumu ve invazyonun engellendiği görülmüştür (Botti vd., 2011; Restivo vd., 2011). Memede de benzer şekilde, IRF6'nın meme kanseri hücre hatlarında ve invaziv meme tümörlerinde ifadesinin azaldığı, MCF10A'da hücre döngüsü durdurulduğunda IRF6'nın biriktiği ve de meme kanseri hücre hatlarına adenoviral yöntemlerle IRF6 verilmesinin hücre sayılarını düşürdüğü görülmüştür (Bailey vd., 2005; Bailey vd., 2008). Bütün bu veriler, IRF6'nın memede hücre döngüsünün negatif bir regülatörü olduğuna işaret etmektedir. Bu projede, ilk defa IRF6'nın Notch yolağının altında alternatif bir görevi olabileceği gösterilmiştir.

IRF6'nın susturulması, MCF10A'da Notch'a bağılı hücre bölünmesini ve transformasyon kapasitesini azaltmıştır. IRF6'nın bu şekilde iki farklı rol oynaması hücrelerin bulunduğu farklı koşullar ile açıklanabilir. Notch yolağının aktif olduğu durumda IRF6, diğer Notch hedef genleriyle beraber hücre bölünmesi ve transformasyonun indüklemesi için çalışırken, Notch'un aktif olmadığı koşullarda ise sadece birikerek hücre bölünmesini engelleyebilir. IRF6'nın koşullara bağılı olarak farklı işlevleri olabileceği keratinositlerde de gösterilmiştir. Beklenenin aksine, kısa dönemli kültürde IRF6 geni silinmiş olan embriyolardan alınan keratinositlerin bölünmesinin normal hücrelerden farklı olmadığı gösterilmiştir (Biggs vd., 2012). Ancak uzun dönemli kültürlerinde, IRF6 geni silinmiş olanların sayılarının artması, bu süre içerisinde IRF6'nın tümör baskılayıcı fonksiyonunu göstermesi için gerekli koşulların oluştuğu şekilde açıklanabilir.

IRF6'nın mitogenik sinyaller sonucu fosforlandığı ve ardından proteazom aracılığıyla parçalandığı gösterilmiştir (Bailey vd., 2005; Bailey vd., 2008). Fosforlanmış ve fosforlanmamış IRF6 formlarının farklı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Fosforlanmış IRF6'nın, parçalanmadan hemen önce hücrelerin G0 evresinden çıkıp G1 evresine girmelerini sağlayarak hücre bölünmesini tetikleyen bir işlev gösterdiği, fosforlanmamış formunun ise birikerek hücre döngüsünü durdurduğu öne sürülmektedir (Bailey vd., 2008). Bu çalışmada, proteazom inhibitörleri, farklı fosfotaz ve proteaz inhibitörleri denenmesine rağmen IRF6'nın fosforlanmış formu tespit edilememiştir. Ancak, Notch aktivasyonunun yalnızca IRF6 ifadesini değil fosforlanmasını da indükleyebileceği ihtimali halen bulunmaktadır. Böylece, fosforlanmış IRF6 Notch'un altında hücre bölünmesini ve transformasyonunu tetikleyen başlıca faktör olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Notch yolağının luminal karakteri tetiklediği ve bunu kısmen  $\Delta$ Np63'ü baskılayarak başardığı bilinmektedir (Yalcin-Ozuysal vd., 2010). Bu projede, IRF6'nın hücre bölünmesi ve transformasyonun aksine Notch'un  $\Delta$ Np63'ü baskılama fonksiyonu için gerekli olmadığı gösterilmiştir. IRF6'nın Notch'un aktivasyonu ile beraber susturulması  $\Delta$ Np63'ün ifadesini belirgin olarak etkilememektedir. Keratinositlerde,  $\Delta$ Np63'ün IRF6 ifadesini artırmasına karşılık IRF6'nın da  $\Delta$ Np63'ün proteazom aracılığıyla parçalanmasını tetikleyerek karşılıklı bir regülasyon mekanizması oluşturdukları bilinmektedir (Moretti vd., 2010). Bu dataya paralel olarak, bu çalışmada MCF10A hücrelerinde IRF6'nın susturulmasının Notch'tan bağımsız olarak  $\Delta$ Np63 ifadesi üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir. IRF6'nın susturulmasının,  $\Delta$ Np63'ün yalnızca protein değil mRNA ifadesini de azaltması, meme eptel hücrelerinde  $\Delta$ Np63 ifadesinin devamlılığı için IRF6'nın gerekli olduğuna işaret etmektedir. Ancak IRF6 cDNA'sının MCF10A ve MDA MB 231 hücrelerine verilmesi sonucu  $\Delta$ Np63 ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi IRF6'nın,  $\Delta$ Np63 ifadesini transkripsiyon ya da proteazom aktivitesini kontrol

ederek regüle etmediğini göstermektedir. IRF6 cDNA'sının western analizlerinde tespit edilememiş olması sebebiyle, elde edilen sonuçların doğrudan IRF6 ile ilgili olmayabileceği ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. IRF6 cDNA'sı vektöründen, embriyonik böbrek fibroblast hücrelerinde protein ifadesi tespit edilebilirken, meme epitel hücrelerinde yüksek mRNA seviyelerine rağmen protein ifadesi tespit edilememiştir. Hücre tipleri arasındaki bu farklılık, meme epitel hücrelerinde çok yüksek miktarda ifade edilen IRF6 proteininin farklı bir mekanizmayla kontrol edilip aktif olarak parçalanması ya da post-translasyonel bir modifikasyona uğraması sonucu antikor tarafından tanınmaması ile açıklanabilir.

Laktasyon evresinde lobuloalveolar hücrelerde ifade edilmesi (Bailey vd., 2009) ve Notch tarafından meme epitel hücrelerinde kontrol edilmesi IRF6'nın aynı zamanda meme epitel hücrelerinin luminal ya da bazal yönde farklılaşmasında rol oynayabileceğine işaret etmektedir. IRF6'nın bazal karakterli MCF10A hücrelerinde baskılanması, test edilen beş belirteçten üçünün ifadelerini değiştirmekte ancak tutarlı olarak luminal ya da bazal karakteri tetikleyecek şekilde bir etki göstermemektedir. Buna karşılık IRF6 cDNA'sı aktarılan luminal karakterli MCF7 hücrelerinde, test edilen üç bazal belirteçte de azalma gözlenirken, test edilen iki luminal belirteçten birinde artış gözlenmiştir. Bu da, Notch'la uyumlu olarak, IRF6'nın luminal karakteri indüklemeye rol oynayabileceğini göstermiştir. Ancak yukarıda açıklandığı şekilde, IRF6 cDNA'sı aktarılan MCF7 hücrelerinde de artan mRNA seviyelerinin aksine IRF6 proteini tespit edilemediğinden, görülen etkinin IRF6'dan bağımsız olma ihtimali de göz ardı edilememektedir. Meme epitel hücrelerinin farklılaşmasında IRF6'nın rolünün Notch ile beraber ya da Notch'tan bağımsız olarak en iyi incelenebileceği sistem, tüm kök ve progenitor hücreleri barındıran, in vivo modellerdir. IRF6'nın koşullu olarak meme epitel hücrelerinde silindiği fare modellerinde, bu tür hücre popülasyonlarının çalışılmasıyla IRF6'nın meme epitel hücre farklılaşmasındaki rolü daha net olarak ortaya çıkarılabilecektir.

Sonuç olarak bu projede, IRF6'nın dokudan ve hücre tipinden bağımsız olarak meme epitel hücrelerinde kanonik Notch yolağı tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, IRF6'nın tümör baskılayıcı işlevinin yanı sıra, Notch aktivasyonu altında normal meme epitel hücrelerinin bölünmesini ve transformasyonunu tetikleyerek onkogenik özellikler gösterebileceği de ortaya çıkarılmıştır.

Notch'un iki önemli hücresel görevini gerçekleştirmesi için gerekli olan IRF6'nın, Notch'un tümör oluşumunda rol oynayan, apoptozu engelleme, kök hücre popülasyonunu artırma ya da epitelial-mezenkimal geçişi tetikleme gibi, diğer işlevleri için de aracı olup olmadığı cevaplanması gereken bir soru olarak önümüze çıkmaktadır. Bununla beraber, IRF6-Notch ilişkisinin klinikteki öneminin anlaşılması için, IRF6'nın Notch ile beraber tümör dokularında

bulunmasının genel olarak hastalığın gelişimini, metastaz kapasitesini, prognozunu, ilaç dirençliliğini nasıl etkilediğinin incelenmesi bir sonraki aşama olmalıdır.



## 6. KAYNAKLAR

- Bailey C. M., Abbott D. E., Margaryan N. V., Khalkhali-Ellis Z., Hendrix M. J. 2008. "Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner", *Mol Cell Biol*, 28(7): 2235-43.
- Bailey C. M., Khalkhali-Ellis Z., Kondo S., Margaryan N. V., Seftor R. E., Wheaton W. W., vd. 2005. "Mammary serine protease inhibitor (maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: Identification of a novel serpin partnership", *J Biol Chem*, 280(40): 34210-7.
- Bailey C. M., Margaryan N. V., Abbott D. E., Schutte B. C., Yang B., Khalkhali-Ellis Z., vd. 2009. "Temporal and spatial expression patterns for the tumor suppressor maspin and its binding partner interferon regulatory factor 6 during breast development", *Dev Growth Differ*, 51(5): 473-81.
- Biggs L. C., Rhea L., Schutte B. C., Dunnwald M. 2012. "Interferon regulatory factor 6 is necessary, but not sufficient, for keratinocyte differentiation", *J Invest Dermatol*, 132(1): 50-8.
- Botti E., Spallone G., Moretti F., Marinari B., Pinetti V., Galanti S., vd. 2011. "Developmental factor irf6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33): 13710-5.
- Bouras T., Pal B., Vaillant F., Harburg G., Asselin-Labat M. L., Oakes S. R., vd. 2008. "Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment", *Cell Stem Cell*, 3(4): 429-41.
- Dontu G., Jackson K. W., McNicholas E., Kawamura M. J., Abdallah W. M., Wicha M. S. 2004. "Role of notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells", *Breast Cancer Res*, 6(6): R605-15.
- Dotto G. P. 2008. "Notch tumor suppressor function", *Oncogene*, 27(38): 5115-23.
- Ferlay J S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. "Globocan 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 11" <http://globocan.iarc.fr> Son erişim tarihi 04 Kasım 2014.
- Gallahan D., Jhappan C., Robinson G., Hennighausen L., Sharp R., Kordon E., vd. 1996. "Expression of a truncated int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis", *Cancer Res*, 56(8): 1775-85.
- Guo S., Liu M., Gonzalez-Perez R. R. 2011. "Role of notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer", *Biochimica et biophysica acta*, 1815(2): 197-213.
- Haapasalo A., Kovacs D. M. 2011. "The many substrates of presenilin/gamma-secretase", *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 25(1): 3-28.
- Harrison H., Farnie G., Howell S. J., Rock R. E., Stylianou S., Brennan K. R., vd. 2010. "Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the notch4 receptor", *Cancer Res*, 70(2): 709-18.
- Haruki N., Kawaguchi K. S., Eichenberger S., Massion P. P., Olson S., Gonzalez A., vd. 2005. "Dominant-negative notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers", *Cancer Res*, 65(9): 3555-61.
- Ingraham C. R., Kinoshita A., Kondo S., Yang B., Sajan S., Trout K. J., vd. 2006. "Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (irf6)", *Nat Genet*, 38(11): 1335-40.

- Jhappan C., Gallahan D., Stahle C., Chu E., Smith G. H., Merlino G., vd. 1992. "Expression of an activated notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands", *Genes Dev*, 6(3): 345-55.
- Jiang R., Lan Y., Chapman H. D., Shawber C., Norton C. R., Serreze D. V., vd. 1998. "Defects in limb, craniofacial, and thymic development in jagged2 mutant mice", *Genes Dev*, 12(7): 1046-57.
- Kiaris H., Politi K., Grimm L. M., Szabolcs M., Fisher P., Efstratiadis A., vd. 2004. "Modulation of notch signaling elicits signature tumors and inhibits hras1-induced oncogenesis in the mouse mammary epithelium", *Am J Pathol*, 165(2): 695-705.
- Kondo S., Schutte B. C., Richardson R. J., Bjork B. C., Knight A. S., Watanabe Y., vd. 2002. "Mutations in irf6 cause van der woude and popliteal pterygium syndromes", *Nat Genet*, 32(2): 285-9.
- Mangold E., Ludwig K. U., Nothen M. M. 2011. "Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting", *Trends in molecular medicine*, 17(12): 725-33.
- Mazzone M., Selfors L. M., Albeck J., Overholtzer M., Sale S., Carroll D. L., vd. 2010. "Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to notch pathway activation in mammary epithelial cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11): 5012-7.
- Mills A. A., Zheng B., Wang X. J., Vogel H., Roop D. R., Bradley A. 1999. "P63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis", *Nature*, 398(6729): 708-13.
- Moretti F., Marinari B., Lo Iacono N., Botti E., Giunta A., Spallone G., vd. 2010. "A regulatory feedback loop involving p63 and irf6 links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias", *J Clin Invest*, 120(5): 1570-7.
- Nicolas M., Wolfer A., Raj K., Kummer J. A., Mill P., van Noort M., vd. 2003. "Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin", *Nat Genet*, 33(3): 416-21.
- O'Neill C. F., Urs S., Cinelli C., Lincoln A., Nadeau R. J., Leon R., vd. 2007. "Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human mda-mb-231 xenograft growth", *Am J Pathol*, 171(3): 1023-36.
- Pece S., Serresi M., Santolini E., Capra M., Hulleman E., Galimberti V., vd. 2004. "Loss of negative regulation by numb over notch is relevant to human breast carcinogenesis", *J Cell Biol*, 167(2): 215-21.
- Proweller A., Tu L., Lepore J. J., Cheng L., Lu M. M., Seykora J., vd. 2006. "Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation", *Cancer Res*, 66(15): 7438-44.
- Radtke F., Raj K. 2003. "The role of notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor?", *Nat Rev Cancer*, 3(10): 756-67.
- Ranganathan P., Weaver K. L., Capobianco A. J. 2011. "Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time", *Nat Rev Cancer*, 11(5): 338-51.
- Reedijk M., Odorcic S., Chang L., Zhang H., Miller N., McCreedy D. R., vd. 2005. "High-level coexpression of jag1 and notch1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival", *Cancer Res*, 65(18): 8530-7.
- Reedijk M., Pinnaduwege D., Dickson B. C., Mulligan A. M., Zhang H., Bull S. B., vd. 2008. "Jag1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer", *Breast Cancer Res Treat*, 111(3): 439-48.

- Restivo G., Nguyen B. C., Dziunycz P., Ristorcelli E., Ryan R. J., Ozuysal O. Y., vd. 2011. "Irf6 is a mediator of notch pro-differentiation and tumour suppressive function in keratinocytes", *EMBO J*, 30(22): 4571-85.
- Richardson R. J., Dixon J., Jiang R., Dixon M. J. 2009. "Integration of irf6 and jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence", *Human molecular genetics*, 18(14): 2632-42.
- Richardson R. J., Dixon J., Malhotra S., Hardman M. J., Knowles L., Boot-Handford R. P., vd. 2006. "Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch", *Nat Genet*, 38(11): 1329-34.
- Rinne T., Brunner H. G., van Bokhoven H. 2007. "P63-associated disorders", *Cell Cycle*, 6(3): 262-8.
- Santagata S., Demichelis F., Riva A., Varambally S., Hofer M. D., Kutok J. L., vd. 2004. "Jagged1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence", *Cancer Res*, 64(19): 6854-7.
- Savitsky D., Tamura T., Yanai H., Taniguchi T. 2010. "Regulation of immunity and oncogenesis by the irf transcription factor family", *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 59(4): 489-510.
- Shou J., Ross S., Koeppen H., de Sauvage F. J., Gao W. Q. 2001. "Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis", *Cancer Res*, 61(19): 7291-7.
- Smith G. H., Gallahan D., Diella F., Jhappan C., Merlino G., Callahan R. 1995. "Constitutive expression of a truncated int3 gene in mouse mammary epithelium impairs differentiation and functional development", *Cell Growth Differ*, 6(5): 563-77.
- Sriuranpong V., Borges M. W., Ravi R. K., Arnold D. R., Nelkin B. D., Baylin S. B., vd. 2001. "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells", *Cancer Res*, 61(7): 3200-5.
- Stylianou S., Clarke R. B., Brennan K. 2006. "Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer", *Cancer Res*, 66(3): 1517-25.
- Su X., Chakravarti D., Flores E. R. 2013. "P63 steps into the limelight: Crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis", *Nat Rev Cancer*, 13(2): 136-43.
- T.C. Sağlık Bakanlığı. "Türkiye kanser İstatistikleri" <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> Son erişim tarihi 04 Kasım 2014.
- Thomason H. A., Zhou H., Kouwenhoven E. N., Dotto G. P., Restivo G., Nguyen B. C., vd. 2010. "Cooperation between the transcription factors p63 and irf6 is essential to prevent cleft palate in mice", *J Clin Invest*, 120(5): 1561-9.
- Yalcin-Ozuysal O., Fiche M., Guitierrez M., Wagner K. U., Raffoul W., Brisken C. 2010. "Antagonistic roles of notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates", *Cell Death Differ*, 17(10): 1600-12.
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dotsch V., vd. 1998. "P63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities", *Molecular cell*, 2(3): 305-16.
- Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R. T., vd. 1999. "P63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development", *Nature*, 398(6729): 714-8.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ÖZDEN YALÇIN ÖZUYSAL
Proje No:	110T895
Proje Başlığı:	IRf6'Nın Notch Yolağının Hücre Bölünmesini Engelleyici Ya Da Uyarıcı Etkilerindeki Belirleyici Rolünün Araştırılması
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2011 - 15/09/2014
Onaylanan Bütçe:	273648.0
Harcanan Bütçe:	239198.94
Öz:	<p>Notch, meme kanseri ve gelişiminde rol oynayan bir sinyal yolağıdır. Notch aktivasyonu, normal meme epitel hücrelerinde hücre bölünmesi ve transformasyonunu, meme gelişimi sırasında ise DNp63'ü baskılayarak luminal hücre karakterini tetikler. Notch yolağının bu işlevleri için aracı olarak kullandığı moleküller tam olarak bilinmemektedir. Keratinositlerde, Notch tarafından kontrol edilen IRF6, Notch'un tümör baskılayıcı ve farklılaşmayı tetikleyici özellikleri için kullandığı aracı moleküllerden biridir. IRF (Interferon Regulatory Factors) ailesine mensup IRF6, DNp63 ile beraber orofasiyal ve epidermal gelişimde rol oynamaktadır. Meme epitel hücrelerine aktarıldığında hücre sayılarının azalmasına sebep olan IRF6'nın memede hücre bölünmesinin negatif bir regülatörü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, meme epitel hücrelerinde, Notch yolağının IRF6 ifadesi üzerindeki etkileri ve IRF6'nın Notch işlevleri için aracı olup olmadığı incelenmiştir. Normal meme epitel hücresi MCF10A'da Notch aktivasyonu IRF6 ifadesini artırırken, meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'de Notch inhibisyonu IRF6 ifadesini azaltmıştır. Notch aktivasyonu yapılan MCF10A hücrelerinde, IRF6 susturulduğunda Notch'a bağlı hücre bölünmesi ve transformasyonu azalmıştır. IRF6'nın susturulması Notch'a bağlı DNp63 baskılanmasını etkilememiş ancak Notch'tan bağımsız olarak DNp63 ifadesini azaltmıştır. Bunlara ek olarak, bazal karakterli MCF10A hücrelerinde IRF6'nın susturulması ve de luminal karakterli MCF7 hücrelerinde IRF6'nın ifade ettirilmesi, bazal ve luminal belirteçlerin ifadesinde değişikliğe yol açmıştır. Bu çalışma sonucunda, meme epitel hücrelerinde IRF6'nın Notch tarafından kontrol edildiği ve Notch'un hücre bölünmesini ve transformasyonu tetikleyici işlevlerinde aracı olarak çalıştığı gösterilmiştir. Ayrıca, Notch yolağı ile paralel olarak, IRF6'nın meme epitel hücrelerinin karakterinin belirlenmesinde önemli olabileceği gösterilmiştir. Notch-IRF6 arasındaki bu ilişkinin in vivo meme gelişimi ve tümör oluşumunda da önemli olup olmadığı bir sonraki aşamada cevaplanması gereken bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Notch yolağı, IRF6, p63, meme kanseri, luminal-bazal epitel hücreler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır