TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DUSP1 PROTEİNİNİN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sefa METİN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "DUSP1 proteininin meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından,02/11/2022 tarihinde, 2022-19-169 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sefa METİN

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%10	%3	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%5
2	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	%1
3	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	qdoc.tips İnternet Kaynağı	<%1
5	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1
6	ri.ues.edu.sv İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Queen Mary and Westfield College Öğrenci Ödevi	<%1
8	Sahar Eljack, Stephanie David, Areeg Faggad, Igor Chourpa, Emilie Allard-Vannier. "Nanoparticles design considerations to co-deliver nucleic acids and anti-cancer drugs for	<%1

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Sefa METİN	**Sınav tarihi:** 22 / 03 / 2023
Anabilim/Bilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji	
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan GÜRDAL	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER		
Tezin Başlığı: DUSP1 proteinin'in meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması.		
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak
☒ Kabulüne
☐ Reddine
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.

Prof. Dr. Hakan GÜRDAL
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı (TEZ DANIŞMANI)

Prof. Dr. Eyüp S. AKARSU
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Kemal SAYAR
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında tecrübelerinden ve bilgisinden yararlandığım, takıldığım yerde bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hakan Gürdal'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aklıma takılan soruları özenle yanıtlayan ve yardımlarını esirgemeyen, başta Prof. Dr. Hakan Ergün olmak üzere, bilgi ve birikimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli Ankara Tıp Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Mehmet Melli, Prof. Dr. Eyüp Sabri Akarsu, Prof. Dr. Hasan Ongun Onaran, Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz, Prof. Dr. Özlem Uğur ve Doç. Dr. Kemal Sayar ve öğretim görevlisi Dr. Suzan Usanmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyimini ve bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan, beraber keyifle çalıştığım, her zaman güler yüzlü ve yardımsever olan Hilal Altan'a, engin tecrübelerinden yararlandığım, sürekli yanımda olan Soner Mamuk'a ve ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyen Mustafa Kaynar'a teşekkürlerimi sunarım.

Bölüme başladığımda beni ilk karşılayan, yardım isteklerimi hiçbir zaman geri çevirmeyen, çalışkanlığını ve sabrını örnek aldığım Satılmış Kaysi'ye çok teşekkür ediyorum.

Birlikte 4 sene boyunca asistanlığın stresini paylaştığım ve sayesinde keyifli vakit geçirdiğim, gerek bilim gerek felsefe tartışabildiğim nadir insanlardan olan açık fikirli eş kıdemlim Gökçe Süral'a, Hem iş hayatı hem de sosyal hayat konusundaki değerli fikirleriyle bana yol gösteren ve sohbet etmekten her zaman keyif aldığım Serkan Kemer'e, düzen ve çalışma disiplini konusunda örnek almam gereken ama pek alamadığım, güler yüzlü arkadaşım Tuğçe Nomenoğlu'na, bilgi ve deneyimini paylaşmaktan çekinmeyen, gönlü bol ve aynı zamanda alçakgönüllü arkadaşım Saliha Kasapoğlu'na, kendisiyle daha fazla vakit geçirmeyi içtenlikle istediğim sosyal zekası da analitik zekası kadar yüksek Mert Yüksel'e, bölümde geçirdiğim süre boyunca beraber çalışmaktan keyif aldığım, çalışkan arkadaşım Aygül Durdurur'a, hem laboratuvarda hem de dışarda birlikte vakit geçirmekten zevk aldığım ince ruhlu arkadaşım Beyza Cengiz'e çok teşekkür ederim. Sizlerle çalışmak zevkti.

Mutluluğumu ve üzüntümü paylaştığım eski ev arkadaşım Tarık Özdemir'e de çok teşekkür ediyorum. Son olarak, bu tez çalışmasını, sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim hem çocukluk döneminde hem de sonrasında mutlu bir hayat yaşamamdaki en büyük vesile olan annem Hatice Metin'e, babam Ali Kemal Metin'e ve kardeşim Nevriye Merve Aslan'a ithaf ediyorum.

Sefa METİN

Ankara, 2023

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Özgünlük Raporu iii
Kabul ve Onay Sayfası iv
Önsöz v
İçindekiler vi
Simgeler ve Kısaltmalar viii
Şekiller Dizini x
Tablolar Dizini xii

1. TÜRKÇE ÖZET 1

2. ABSTRACT 3

3. GİRİŞ VE AMAÇ 5

4. GENEL BİLGİLER 7

5. GEREÇ ve YÖNTEM 15
5.1 Gereç 15
5.1.1 Hücre Kültürü 15
5.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler 15
5.2 Yöntem 15
5.2.1 CRISPR/Cas9 Transfeksiyonu 15
5.2.2 Hücre Proliferasyonu Deneyleri 16
5.2.3 Hücre Motilitesi Deneyleri 16
5.2.4 Protein İfadesinin Değerlendirilmesi 17
5.2.5 İstatistiksel Değerlendirme 18

6. **BULGULAR 19**

6.1 MDA-MB-231 Hücrelerine DUSP1 CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında Hücrelerin GFP Sinyaline Göre Seçilmesi. 19

6.1.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Uygulaması ile DUSP1 Proteini İfadesinin Azaltılması 20

6.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında MAPK Proteini İfadelerinin Değerlendirilmesi 21

6.2.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında JNK Proteini İfadesinin Değişimi 21

6.2.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında p38 Proteini İfadesinin Değişimi 21

6.2.3 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında ERK Proteini İfadesinin Değişimi 21

6.3 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 Proteini İnhibisyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi 25

6.3.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1-CRISPR Uygulaması Sonrasında Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi 25

6.3.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde BCI Uygulaması Sonrasında Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi 26

6.4 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1-CRISPR Uygulaması Sonrasında Migrasyon Kapasitesinin Değerlendirilmesi 28

6.5 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında JNK ve p38 İnhibitörlerine Yanıtın Değerlendirilmesi 30

6.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Uygulaması Sonrasında Sisplatin Duyarlılığının Değerlendirilmesi 33

6.7 MDA-MB-231 Hücrelerinde BCI Uygulaması Sonrasında Sisplatin Duyarlılığının Değerlendirilmesi 36

6.8 MDA-MB-231 Hücrelerinde JNK ve p38 İnhibitörleri Uygulaması Sonrasında Sisplatin Duyarlılığının Değerlendirilmesi 38

7. TARTIŞMA 42

8. SONUÇ ve ÖNERİLER 50

9. KAYNAKLAR 51

10. EKLER 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC : American Type Culture Collection

BMK1 : Big MAP kinase 1

BSA : Bovine Serum Albumin

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DUSP : Dual-specificity phosphatase

DUSP1 : Dual-specificity phosphatase 1

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ER : Östrojen reseptörü

ERK : Extracellular signal regulated kinases

FSS : Fötal Sığır Serumu

GAPDH : Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

GFP : Yeşil Floresan Protein

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HRP : Horse Radish Peroxidase

IL-3 : Interleukin 3

JNK : c-Jun N-terminal kinases

M : Molar konsantrasyon

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MKP : MAPK fosfataz

MÖ : Milattan Önce

mRNA : messenger RNA

PARP : Poly ADP-ribose polymerase

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PR : Progesteron reseptörü

PTP : Protein Tirozin Fosfataz

PVDF : Polyvinyliden Difluoride

siRNA : Small interfering RNA

TBS : Tris-Buffered Saline

TNF-α : Tumor necrosis factor alpha

UV : Ultraviyole

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1	Transwell migration assay deneyinin şematik olarak gösterimi	17
Şekil 6.1	DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında GFP sinyalinin değerlendirilmesi	19
Şekil 6.2	CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde DUSP1 düzeyi	20
Şekil 6.3	CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde JNK düzeyi.	22
Şekil 6.4	CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde p38 proteini düzeyi	23
Şekil 6.5	CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde ERK proteini düzeyi	24
Şekil 6.6	MDA-MB231 hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi	25
Şekil 6.7	MDA-MB231 kanser hücrelerinde BCI'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi.	27
Şekil 6.8	MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında hücre göçünün Yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirilmesi	28
Şekil 6.9	MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında hücre göçünün Yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirilmesi	29
Şekil 6.10	MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün Maksimum hücre sayısına etkisi.	31
Şekil 6.11	MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün proliferasyona etkisinin değerlendirilmesi.	32
Şekil 6.12	MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatin duyarlılığının değerlendirilmesi.	34
Şekil 6.13	MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatinin ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin değerlendirilmesi.	35
Şekil 6.14	MDA-MB-231 kanser hücrelerinde 8 µg/ml sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi	35

Şekil 6.15 MDA-MB231 kanser hücrelerinde BCI ve sisplatinin antiproliferatif etkinsin değerlendirilmesi. 37

Şekil 6.16 MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında p38 ve JNK inhibitörleri ve sisplatinin proliferasyona etkisinin değerlendirilmesi. 39

Şekil 6.17 MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında Sisplatin, p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün Maksimum hücre sayısına etkisi. 40

Şekil 7.1 Alternative Splicing işleminin şematik gösterimi 43

Şekil 7.2 DUSP1 proteini MAPK proteinlerinin aktivitesini düzenleyerek proliferasyon ve apoptozis sinyallerine yol açabilir. 46

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 6.1	BCI'nın MDA-MB231 kanser hücrelerinde ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin	26
Tablo 6.2	MDA-MB231 kanser hücrelerinde 48. Saatte verilen sisplatinin ikiye katlanma zamanı üzerine etkisi	33
Tablo 6.3	MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatin ve BCI'nın ikiye katlanma zamanı üzerine etkisi	36
Tablo 6.4	MDA-MB231 kanser hücrelerinde SB202190 ve SP600125'un ikiye katlanma zamanı üzerine etkisi	38

1. TÜRKÇE ÖZET

DUSP1 PROTEİNİNİN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ailesi hedef proteinlerinin serin ve treonin aminoasitlerini fosforile eden bir protein kinaz ailesidir. Bu protein kinazlar ERK, JNK, p38 olmak üzere üç temel alt aile şeklinde sınıflandırılabilir. MAPK ailesi hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, mitoz, apoptozis gibi birçok hayati hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde görev alır. Dual-specificity phosphatase (DUSP) ailesi MAPK'leri defosforile eden protein fosfataz ailesidir. Hedef proteinlerinin hem tirozin hem de serin/treonin rezidülerini defosforile edebilme yeteneklerinden dolayı bu proteinlere Çift Spesifik fosfataz ismi verilmiştir. Dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) MAPK aktivasyonunu düzenleyerek inflamasyon, apoptozis, hücre büyümesi, hücre proliferasyonu gibi birçok hücresel fonksiyonda rol alır.

Çalışmamızda üçlü negatif meme kanseri olan MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. CRISPR/Cas9 yöntemi ile bu hücrelerde DUSP1 proteini ifadesi azaltılmıştır. Bu hücrelerde proliferasyon ve motilite deneyleri yapılmış, Western Blot yöntemi ile MAPK proteinlerinin ifadelerinde değişmeler değerlendirilmiştir. Proliferasyon deneyleri Incucyte live-cell analysis' sistemi ile yapılmıştır. Elde edilen proliferasyon eğrileri üzerinden hücrelerin ikiye katlanma zamanları ve maksimum hücre sayıları hesaplanmıştır. Hücre motilitesi 'Transwell migration assay' ve yara iyileşmesi deneyleri ile ölçülmüştür.

Proliferasyon deneylerinde DUSP1 ifadesinin azalmasının hücrelerin proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. Ek olarak DUSP1 inhibitörü olan BCI, MDA-MB231 hücrelerinde antiproliferatif etki göstermiştir. Bu antiproliferatif etki kontrol hücrelerinde daha fazladır. Bu durumun nedeninin, DUSP1-CRISPR hücrelerinde DUSP1 proteininin azalmasından kaynaklandığı ve azalmış DUSP1 ifadesi nedeniyle BCI'nın bu grupta daha az etkin olduğu düşünülmüştür. Ayrıca DUSP1 ifadesinin azalması bu hücrelerde sisplatinin antiproliferatif etkisinin artmasına neden olmuştur. Aynı sisplatin konsantrasyonunda DUSP1-CRISPR hücrelerinin ikiye katlanma zamanları kontrol hücrelerine göre daha fazla artmıştır. Yukarıdaki sonuçlara benzer şekilde DUSP1 inhibitörü olan BCI'nın kontrol hücrelerinde sisplatinin antiproliferatif etkisini DUSP1- CRİSPR grubuna göre daha fazla artırdığı görülmüştür. Bu sonuç da benzer şekilde bize, DUSP1-CRISPR hücrelerinde BCI'nın daha az etkili olmasının DUSP1 proteininin azalmasından kaynaklandığını düşündürmüştür.

DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında hücrelerin migrasyon kapasiteleri yara iyileşme deneyi ve Transwell migrasyon deneyi ile değerlendirilmiştir. Bu deneyler sonucunda DUSP1-CRISPR uygulamasının hücrelerin migrasyon kapasitesini azalttığı görülmüştür. Bu sonuç DUSP1 düzeyinin azalmasının MDA-MB231 hücrelerinin hareketliliği ve metastaz yeteneğini azalttığını göstermektedir.

p38 ve JNK inhibitörleri ile yapılan deneylerde, p38 inhibitörü SB202190'ın her iki hücre grubunda benzer düzeylerde proliferasyonu artırdığı görülmüştür. Sisplatin etkinliğinde, tedavisinde ve gelişen dirençte, p38 ve JNK'nın aktivitesinin rol aldığı düşünülmektedir. Sisplatin ve p38 inhibitörünün beraber verilmesi DUSP1-CRISPR hücrelerinde kontrol hücrelerine göre daha büyük bir proliferasyon artışına yol açmıştır. Bu durum DUSP1-CRISPR hücrelerinde görülen sisplatinin antiproliferatif etkisindeki artışın nedeninin, artmış p38 proteini aktivasyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar DUSP1 aktivitesindeki azalmanın dolaylı olarak p38 proteini aktivitesini değiştirerek sisplatine olan duyarlılığı ve tedaviye direnci etkileyebileceğini göstermektedir.

Western blot sonuçlarına göre DUSP1-CRISPR hücrelerinde p38 ve JNK proteinlerinin fosforile/total protein oranlarında artış saptanmış bu artış ERK proteininde görülmemiştir. DUSP1 proteininin hedef seçiciliği düşünüldüğünde DUSP1 aktivitesindeki değişikliğin p38 ve JNK proteini üzerinden olabileceğini göstermektedir ve bu sonuç literatür ile uyumludur.

Sonuç olarak DUSP1 proteini ifadesinin azalması MDA-MB231 kanser hücrelerinde, hücre hareketliliğini, migrasyonu ve proliferasyonunu azaltarak antikanser etkinlik göstermektedir. Ayrıca sonuçlarımız, sisplatine olan duyarlılıkta ve gelişen dirençte p38 aktivitesinin önemli olduğunu düşündürmüş ve DUSP1 inhibisyonu ile p38 aktivitesinin dolaylı olarak artırılmasıyla, sisplatin duyarlılığının ve antikanser etkinliğin arttırılabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: DUSP1, Meme Kanseri, Sisplatin, JNK, p38, MDA-MB-231

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DUSP1 PROTEIN ON BREAST CANCER

The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) family is a protein kinase family that phosphorylate the serine and threonine amino acids of target proteins. These protein kinases can be classified as three basics subfamilies: ERK, JNK, p38. The MAPK family is involved in the regulation of many vital cellular functions such as cell growth, cell proliferation and apoptosis. Dual-Specificity Phosphase (DUSP) family is the protein phosphatase family that dephosphorylate MAPKs. These proteins are called double specificity phosphatases because of their ability of dephosphorylating both tyrosine and serine/Treonin residues of target proteins. Dual-Specificity Phosphase 1 (DUSP1) protein regulates MAPK activation. In this way, it is involved in many cellular functions such as inflammation, apoptosis, cell growth, cell proliferation.

In our study, triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-231 were used. With the CRISPR/CAS9 method, the expression of DUSP1 protein in these cells is reduced. We performed proliferation and motility assays in these cells and evaluated the changes in the expressions of MAPK proteins. Proliferation assays were performed with Incucyte Live-Cell Analysis system. The doubling time of the cells and the maximum number of cells were calculated over the obtained proliferation curves. Protein expression analysis were evaluated by Western Blot method. The cell motility was measured by 'Transwell Migration Assay' and wound healing assay.

In proliferation assays, the reducing the expersion level of DUSP1 by using CRISPR/Cas9 methodology inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells. In addition, BCI, which is an inhibitor of DUSP1, has an antiproliferative effect on MDA-MB-231 cells. The antiproliferative effect of BCI is lower in the DUSP1-CRISPR group than Control CRISPR group. This is most probably related to decreased DUSP1 expression in DUSP1 CRISPR group. The decrease in DUSP1 expression caused an increased antiproliferative effect of sisplatin in MDA-MB-231cells. In the same concentration of cisplatin, doubling times of DUSP1-CRISPR group were more than the control group's. Similar to the above results, it has been seen that BCI increased the antiproliferative effect of cisplatin in DUSP1-CRISPR group more than the control group. Similarly, this result supported the explanation that the less effectiveness of BCI in DUSP1-CRISPR group was due to the reduction of the DUSP1protein.

Migration capacities of the cells in DUSP1-CRISPR group were evaluated by wound healing assay and transwell migration assay. As the result of these experiments, the migration capacity of MDA-MB-231 cells in DUSP1-CRISPR group significantly declined compared to Control CRISPR group. This result shows that the decrease in DUSP1 protein level reduces the mobility and metastasis ability of MDA-MB-231 cells.

In experiments with p38 and JNK inhibitors, the p38 inhibitor SB202190, increased proliferation in both groups at similar levels. When cells treated together with p38 inhibitor and cisplatin, DUSP1-CRISPR group has led to a greater increase in proliferation than control group. This situation was thought to be caused by increased p38 protein activation in DUSP1-CRISPR group. Additionally, it is thought that p38 and JNK proteins can take a part in developing cisplatin resistance.

According to Western Blot results, ratio of phosphorylated/total proteins of p38 and JNK were increased in DUSP1-CRISPR group. This increase has not been seen in ERK protein. Considering the target selectivity of DUSP1 protein, this result is compatible with the literature.

As a result, the decrease in DUSP1 protein expression mediates anticancer activity in MDA-MB231 cancer cells by reducing cell mobility, migration and proliferation. In addition, our results suggest that p38 activity takes important role in DUSP1-inhibition mediated anticancer effect and also in susceptibility to cisplatin treatment in MDA-MB-231 cells.

Key Words: DUSP1, Breast Cancer, Cisplatin, JNK, p38, MDA-MB-231

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, çevre dokulara yayılması ile karakterize olan kanser, içerisinde 100'den fazla alt tipi barındıran bir hastalık grubudur. Hastalık normal hücrelerin kanser hücresine dönüşmesi ile gelişmektedir. Bu dönüşüm ile hücreler aşırı çoğalma, apoptotik sinyallere direnç, yeni damar oluşturma, bağışıklık yanıtından kaçınma gibi özellikler kazanmaktadır. 2020 yılında kanser nedeniyle yaklaşık 10 milyon insan hayatını kaybetmiştir. Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %25'ini oluşturarak kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedeni olarak birinci sıradadır(1). Meme kanseri birçok alt tip içeren heterojen ve geniş bir hastalıktır. Kanser köken aldığı hücreye göre veya barındırdığı reseptör tiplerine göre sınıflandırılabilmektedir. Reseptör tiplerine göre sınıflandırma kanser için prognostik öneme sahiptir ve bunlar, Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR) ve HER2 reseptörüdür. ER ve PR bulunduran hormon reseptörü pozitif grup, HER2 reseptörü bulunduran HER2 pozitif veya bu üç reseptörü de bulundurmayan üçlü negatif meme kanseri olarak adlandırılır (2).

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ailesi hedef proteinlerini fosforile eden bir protein kinaz ailesidir. Bu proteinler hücre büyümesi, mitoz bölünme, apoptozis gibi birçok hayati hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde görev almaktadır. Dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) MAPK aktivasyonunu düzenleyerek inflamasyon, apoptozis, hücre büyümesi, hücre proliferasyonu gibi birçok hücresel fonksiyonda rol alır. Bu hücresel fonksiyonları nedeniyle DUSP1'in kanser patofizyolojisindeki etkileri merak edilmektedir. Bu proteinin kanser oluşumu, hastalık prognozu ve kemoterapi direncindeki rolü çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (3–6). DUSP1 proteininin kanser üzerindeki etkileri, MAPK aracılığıyla olduğu düşünülmektedir(7).

DUSP1 proteini ifadesi ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar farklı sonuçlar sunmaktadır. Malign dokudaki DUSP1 ifadesini artışının meme kanseri hastalarında sağkalımı azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur(8–10). DUSP1 proteininin meme kanseri tedavisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalar, bu proteinin radyoterapi ve kemoterapi direnci gelişmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. HER-2(+) meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifadesinin artışının radyoterapi direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada siRNA ile DUSP1 ifadesinin baskılanmasının meme kanseri hücrelerinin sağkalımını azalttığı ve bu hücrelerin radyoterapiye duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (8). MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifadesi artışının alkilleyici ajanlar, antrasiklinler ve mikrotübül

inhibitörlerine karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını azaltırken, DUSP1 ifadesinin baskılanmasının kemoterapi ile tetiklenen apoptozisi artırdığı gösterilmiştir(5). Başka bir çalışmada DUSP1 aşırı ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinde doksorubisin ve dosetaksel direncine yol açtığı gösterilmiştir(9).

Bu tez çalışmasında üçlü negatif meme kanseri olan MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerine CRISPR/Cas9 uygulaması yapılarak bu hücrelerdeki DUSP1 proteini ifadesi azaltılmıştır. Daha sonra bu hücrelerin proliferasyonu ve motilitesinin DUSP1 proteini ifadesinin azaltılması ile nasıl değiştiği değerlendirilmiştir. DUSP1 proteini ifadesinin azaltılmasının MAPK yolağı proteinlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri western blot yöntemi ile incelenmiştir. DUSP1 proteini silinmesinin hücre proliferasyonu ve migrasyonuna olan etkileri Incucyte live-cell analysis' sistemi ile incelenmiştir. Proliferasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar kanserin büyüme hızı, migrasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar ise kanserin metastaz kapasitesi hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca hücrelere antineoplastik ajan verilerek DUSP1 proteininin kemoterapi direncindeki olası rolü incelenmiştir. Daha sonra spesifik MAPK inhibitörleri kullanılarak DUSP1, MAPK yolağı ve proliferasyon ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmanın amacı DUSP1 proteininin meme kanseri ve kemoterapi direnci üzerindeki etkilerini daha iyi anlayabilmek ve bu etkilerin olası mekanizmaları hakkında fikir sahibi olmak ve bu proteinin antikanser etkinlik açısından hedef olup olmayacağını açıklığa kavuşturmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, çevre dokulara yayılması ile karakterize olan kanser, içerisinde 100'den fazla alt tipi barındıran bir hastalık grubudur. Kanser kelimesinin kökeni Yunan hekim Hipokrat'a (MÖ 460-370) dayandırılır. Hipokrat bazı tümörleri tanımlamak için karsinom terimini kullanmıştır. Bu kelime Yunancada yengeç anlamına gelmektedir. Hipokrat'ın kanser dokusunda gördüğü parmaksı çıkıntıları yengeç şekline benzettiği için bu hastalığı böyle isimlendirdiği düşünülmektedir. Hastalık normal hücrelerin kanser hücresine dönüşmesi ile gelişmektedir. Bu dönüşüm ile hücreler aşırı çoğalma, apoptotik sinyallere direnç, yeni damar oluşturma, bağışıklık yanıtından kaçınma gibi özellikler kazanmaktadır. Hastalığın ileriki döneminde kanser hücreleri lenf ve/veya kan dolaşımına karışıp vücudun diğer bölgelerinde de çoğalabilmektedir(11). 2020 yılında kanser nedeniyle yaklaşık 10 milyon insan hayatını kaybetmiştir. Erkeklerde en sık görülen ilk üç kanser prostat, akciğer ve kolon kanseri iken, kadınlarda en sık görülen üç kanser meme, akciğer ve kolon kanseri olarak raporlanmıştır(12,13).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme neden olan kanser çeşididir (12). Bu hastalığa eski tıbbi kayıtlarda da rastlanmaktadır. MÖ 16. yüzyılda yazılan ve bilinen en eski tıbbi metinlerden biri olan Edwin Smith Papirüsünde memede sert, hareketsiz ve yaygın yumrular şeklinde ortaya çıkan bir hastalık tanımlanmış ve bu hastalığın tedavisinin mümkün olmadığı belirtilmiştir (14). Günümüzdeki durum Antik Mısır'a kıyasla çok daha iç açıcıdır. Gerek erken tanı yöntemleri gerekse yeni tedavi yöntemleri meme kanserinin tedavisi konusunda bize yardımcı olmaktadır. Bu tıbbi gelişmeler sayesinde günümüzde meme kanserlerinde beş yıllık ortalama sağkalım oranı %90'lara ulaşmaktadır (12).

Meme kanseri birçok alt tip içeren heterojen ve geniş bir hastalıktır. Kanser köken aldığı hücreye göre sınıflandırılabilir. Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre histolojik olarak 19 alt tipi vardır. Kanserlerin yaklaşık %75'i süt kanallarını döşeyen duktal epitel kökenlidir. Meme kanserleri barındırdığı reseptör tiplerine göre de sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmada kullanılan reseptörler: Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR) ve 'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2' (HER2) reseptörü olmak üzere üç tanedir. Bu reseptörler kanserin tedavisinde kullanılabilecek ilaçları belirlemekte, kanserin prognozu hakkında bize fikir vermektedir (15).

Barındırdığı reseptör tipine göre (ER, PR ve HER2) meme kanserleri Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif ve Üçlü Negatif olmak üzere dört ana moleküler alt tipe ayrılmıştır. Luminal A alt tipi en yaygın meme kanseri alt tipidir. Hastaların yaklaşık %60'ı bu alt tiptedir. Hormon reseptörleri pozitif HER2 reseptörü negatiftir ve kanser hücrelerinin

bölünme hızını gösteren Ki67 indeksi düşüktür. Prognozu diğer tiplere kıyasla en iyi olan bu alt tip, hormon tedavisine ve kemoterapiye olumlu cevap verir. Luminal B alt tipi Luminal A'ya göre daha nadir görülmektedir. Bu alt tip hastaların yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Luminal B alt tipinde hormon reseptörleri pozitiftir HER2 reseptörü ise pozitif veya negatif olabilmektedir. Bu alt tipin Ki67 indeksi ise yüksektir. Bu grubun prognozu Luminal A'ya göre daha kötüdür. HER2 pozitif alt tip meme kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Bu alt tipte hormon reseptörleri olan ER ve PR negatiftir. Dolayısıyla hormon tedavisine cevap vermezler. Adından da anlaşılabileceği gibi bu alt tip HER2 reseptörü pozitiftir. HER2 reseptörü pozitif olduğu için trastuzumab bu kanserlerde kullanılabilir. Prognozu Luminal alt tiplere göre daha kötüdür. Üçlü negatif alt tip hastaların yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Prognozu en kötü olan alt tiptir. Bu alt tipte östrojen, progesteron ve HER2 reseptörleri bulunmaz. Hormon reseptörü ve HER2 reseptörü bulunmadığı için bu kanserler hormon tedavisine ve trastuzumab tedavisine karşı cevapsızdır. Ayrıca bu alt tipin Ki67 indeksi de yüksektir. Tedavide kemoterapi ve cerrahi tedaviye ek olarak bazı hastalarda PARP inhibitörleri veya Pembrolizumab kullanılabilse de yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (2,16,17).

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ailesi hedef aldığı proteinlerin serin ve treonin amino asitlerini fosforile eden bir protein kinaz ailesidir. Bu ailedeki protein kinazlar: extracellular signal-regulated kinase (ERK) ailesi, c-Jun amino-terminal kinase (JNK) ailesi, p38 kinase ailesi ve Big MAP kinase 1 (BMK1) olmak üzere dört alt aile olarak sınıflandırılmaktadır. MAPK ailesi hücre büyümesi, mitoz bölünme, apoptozis gibi birçok hayati hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde görev almaktadır(18).

MAPK ailesi hücre dışı sinyallerden gelen bilgileri alıp çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden efektörlere bilgi aktarmaya hizmet eden yüksek oranda korunmuş bir kinaz ailesidir. MAPK'ler aktivasyon bölgelerindeki t-x-y motifinden fosforillenerek aktive olurlar. Hem treonin hem de tirozin rezidülerinden fosforile olurlar. Bu aktivasyon MAPK kinazlar tarafından yapılır. MAPK kinazları ise MAPK kinaz kinazlar fosforile ederler. MAPK aktiviteleri, kanser oluşumunda yer alan birçok süreci etkilediği için MAPK sinyal yollarındaki anormallikler, çok çeşitli insan malignileriyle ilişkilendirilmiştir(18,19).

ERK ailesi ERK1 ve ERK2 enzimlerinden oluşmaktadır. ERK yolağı büyüme sinyalleri, sitokinler, virüsler, G proteini kenetli reseptörler gibi çeşitli uyarıcılar ile aktive olabilmektedir. Bu yolakta bulunan Ras ve Raf proteinleri ERK sinyalindeki temel proteinlerdendir. ERK proteini, EGFR gibi reseptör tirozin kinazların büyüme faktörleri ile aktifleşmesi sonrasında, Ras, Raf, MEK proteinleri aracılığıyla aktive olur ve daha sonra

aktive edilmiş ERK proteini çekirdeğe giderek çeşitli transkripsiyon faktörleri üzerinden büyümeyi, farklılaşmayı veya mitozu teşvik etmek için gen ekspresyonunu değiştirir. İnsan tümörlerinin yaklaşık %30'unda ERK yolağında anormallik tespit edilmiştir (18,20).

JNK ailesi JNK1, JNK2 ve JNK3'ten oluşmaktadır. JNK1 ve JNK2 tüm hücrelerde yaygın olarak ifade edilirken JNK3 esas olarak sinir sisteminde ve kalpte ifade edilmektedir (21). UV radyasyon, hipoksi, inflamasyon gibi hücresel stres ile aktive olmaktadır. JNK yolağı aktivasyonu sonrasında hem apoptotik hem de proliferatif yolaklar tetiklenebilmektedir(18,21). Yapılan bir çalışmada JNK aktivitesinin baskılanmasının UV radyasyon ile tetiklenen apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (22). JNK'nın apoptotik aktivitesini bcl-2 ailesi üzerinden gösterdiği düşünülmektedir(23). TNF-α'nın apoptotik yanıt oluşturması JNK aktivitesi gerçekleşmektedir (24). JNK aktivitesinin artması IL-3 ile tetiklenen apoptozisi azaltmakta, bu aktivitenin inhibe edilmesi apoptozisi artırmaktadır (21). Ayrıca karaciğer tümörlerinde JNK'nın p53 aktivitesini baskılayarak proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir(25,26).

p38 ailesinde 4 enzim bulunmaktadır (α, β, γ ve δ). P38 α ve p38 β, memeli hücrelerinde yaygın olarak ifade edilmektedir (19). p38 yolağı UV radyasyon, ısı, osmotik stres, lipopolisakkaritler veya TNF-α gibi inflamatuar sitokinler ile aktive olabilmektedir . Aktivitesi sonucunda hücre döngüsünü durdurabilmektedir (18).

p38 proteininin tümör baskılayıcı etkilerinin p53 aktivitesi üzerinden olabileceği düşünülmektedir(19). Bir çalışmada "Aurora kinase A" inhibitörü olan Alisertib ajanının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde gösterdiği hücre döngüsünü durdurma ve apoptozis etkilerinin p38 aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (27). Ayrıca p38 Cdc42 üzerinden hücre döngüsünü durdurabilmektedir (28). Stres kaynaklı apoptoza aracılık etmekte oynadığı kilit rol nedeniyle özellikle JNK ve p38 yolaklarının, kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi cevaplarında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (19,21,29).

Protein fosforilasyonu protein kinazlar ve protein fosfatazlar ile kontrol edilen bir dengeye sahiptir. MAPK proteinleri, MAPK kinazlar tarafından treonin ve tirozin rezidüleri fosforile edilmek suretiyle aktive olurlar. Bu amino asit rezidülerinin defosforile olması ile inaktive olurlar. Bu proteinlerin aktivasyonları hücre fizyolojisinde önemli görevleri olduğu için inaktivasyonları da en az aktivasyonları kadar önemlidir (3).

MAPK sinyalinin süresi ve şiddeti bu sinyalin oluşturacağı cevabı şekillendirmektedir. Hücre bu etkiyi pozitif ve negatif düzenleyici mekanizmalar arasındaki dengeyi sağlayarak oluşturmaktadır. MAPK cevabının oluşmasında rol oynayan önemli regülasyon mekanizmalarından birisi de MAPK fosfotazlardır. MAPK aktivasyonu için hem treonin hem de tirozin rezidülerinin fosforile olması gerektiği için bu rezidülerin herhangi birisinde

gerçekleşen defosforilasyon bu enzimleri inaktive etmek için yeterlidir. Bu durum serin/treonin fosfatazlar, tirozin fosfatazlar veya çift spesifik fosfatazlar aracılığıyla olabilir. Yapılan çalışmalar bu üç gruptaki fosfatazların da MAPK'leri inaktive edebildiğini göstermiştir. MAPK aktivitesini düzenleyen ana fosfataz ailesi MAPK fosfataz (MKP) olarak adlandırılan çift spesifik fosfatazlardır(4).

Dual-specificity phosphatase (DUSP) ailesi Protein Tirozin Fosfataz (PTPs) ailesinin bir üyesidir. Hedef proteinlerinin hem tirozin hem de serin/treonin rezidülerini defosforile edebilme yeteneklerinden dolayı bu proteinlere Çift Spesifik (Dual-specificity) fosfataz ismi verilmiştir (3,30). DUSP ailesinin alt ailesi olan MKP ailesinin hedef proteinleri adından da anlaşılabileceği üzere MAPK proteinleridir. MKP enzimleri MAPK'lerin hem treonin hem de tirozin rezidülerini defosforile ederek MAPK'leri inaktive eder. Memelilerde on adet MKP enzimi tanımlanmıştır.

MKP'ler substrat afiniteleri, dokudaki dağılımları, hücre içi lokalizasyonları ve ekstrasellüler uyarılarla indüklenme özellikleri açısından farklılık göstermektedirler. Hücredeki lokalizasyonuna göre üç gruba ayrılırlar:

1) Çekirdekte lokalize olanlar DUSP1, DUSP2, DUSP4 ve DUSP5

2) Sitoplazmada lokalize olanlar DUSP6, DUSP7 ve DUSP9

3) Hem sitoplazma hem çekirdekte lokalize olanlar DUSP8, DUSP16 ve DUSP10

Bu proteinlerin MAPK'lere karşı afiniteleri değişkenlik göstermektedir.

Birinci grup DUSP1, DUSP2, DUSP4 ve DUSP5 içerir. Birinci grup MKP'ler hücre çekirdeğinde lokalize haldedirler ve MAPK'leri aktive eden sinyaller ile indüklenirler. Çekirdekteki MAPK sinyalinin geribildirim mekanizmasında önemli rol oynarlar. İkinci gruptakiler ERK 1/2 selektiftirler. Sitoplazmada lokalize olan bu enzimler DUSP6, DUSP7 ve DUSP9 dur. Üçüncü grup ise hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunabilen DUSP'ları içerir. DUSP8, DUSP16 ve DUSP10 üçüncü gruba dahil enzimlerdir (3,30).

Dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) MAPK aktivasyonunu düzenleyerek inflamasyon, apoptozis, hücre büyümesi, hücre proliferasyonu gibi birçok hücresel fonksiyonda rol alır. DUSP1 bağışıklık sisteminde, kas-iskelet sisteminde ve sinir sisteminde MAPK'lerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. DUSP1 dokularda farklı miktarlarda ifade edilmektedir. Bu protein kalp, akciğer ve karaciğerde yüksek oranda ifade edilir. Yapılan çalışmalar DUSP1 enziminin ERK, JNK ve p38'i defosforile etme kapasitesi olsa da substrat olarak p38 ve JNK'yi ERK 1/2 'ye tercih ettiğini göstermiştir (3,31).

DUSP1 proteininin ifadesi ve aktivitesi hücre dışı uyaranlar tarafından düzenlenebilmektedir. Birçok hücrede bazal DUSP1 ifadesi dışarıdan gelen büyüme faktörleri, stres gibi uyarılarla hızlı bir şekilde artabilmektedir (3). DUSP1 enziminin

aktivitesi MAPK proteinleri ile ilişkilidir. MAPK aktivitesi DUSP1 ifadesini artırmaktadır. Diğer bir deyişle MAPK ile DUSP1 arasında negatif feedback mekanizması mevcuttur (32). Bu protein transkripsiyonundaki artışla kontrol edildiği gibi mRNA stabilitesi üzerinden de dinamik olarak kontrol edilmektedir. Oksidatif stres durumunda DUSP1 proteininin mRNA stabilitesinin arttığı bilinmektedir. Bu stabilite artışı HuR ve NF90 proteinleri aracılığıyla olmaktadır (33). Kalsiyum gibi ikinci haberciler de DUSP1 ifadesini düzenleyebilmektedir. BAPTA ile kalsiyum şelasyonu sonrasında fibroblastların DUSP1 indüksiyon yetenekleri azalmaktadır (34). Hücrenin DUSP1 işlevi üzerindeki kontrolü protein stabilitesi üzerinden de sağlanabilmektedir. DUSP1 proteininin stabilitesi DUSP1 proteininin hangi bölgesinden fosforile edildiğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bazı fosforilasyon bölgelerinin proteini degredasyondan koruduğunu düşünülmektedir (35,36). Ayrıca kortikosteroidler de DUSP1 ifadesini artırmaktadır (37). Kassel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada glukokortikoit verilmiş mast hücrelerinde DUSP1 ifadesini artırdığını ve DUSP1'in proteozomal degredasyonun azaldığını göstermişlerdir. Bunun gibi çalışmalar DUSP1 enziminin ifadesinin düzenlenmesinin farklı mekanizmalar aracılığıyla olduğunu ortaya koymaktadır(36,37).

MAPK'lerin hücrede birçok fosforilasyon hedefi vardır. Bu sayede MAPK'ler birçok sinyal yolağında görev alırlar. DUSP1 proteini de MAPK defosforilasyonu yaparak MAPK aktivitesini düzenler ve bu sayede bu yolaklarda şöyle ya da böyle görev alır. Bu hücresel fonksiyonları nedeniyle DUSP1 proteininin kanser patofizyolojisindeki etkileri merak edilmektedir. Bu proteinin kanser oluşumu, hastalık prognozu ve kemoterapi direncindeki rolü çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (7,30).

Bozulmuş MAPK sinyalizasyonunun kanser gelişimindeki önemi göz önüne alındığında DUSP enzimlerinin de kanser gelişiminde rol oynaması beklenmektedir ve bu konu bilim insanları tarafından araştırılmaktadır. Literatürde DUSP1 ifadesindeki değişikliğinin direkt olarak kanser oluşumuna yol açtığına dair bir çalışma mevcut değildir. Fakat DUSP1 ifadesinin çeşitli kanser türlerinde nasıl değiştiği birçok çalışmada incelenmiştir(7). Bazı kanser türlerinde DUSP1 ifadesi antikanser etki gösterirken bazı kanser türlerinde kanserojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Pankreas, kolon, mesane, mide ve meme kanserlerinde DUSP1 ifadesinin arttığı hepatoselüler karsinomda ve skuamöz hücreli deri kanserinde DUSP1 ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir(7,30) . Bu proteinin kanser üzerindeki etkileri henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Prostat kanseri üzerinde yapılmış bir çalışmada DUSP1 ifadesinin malign prostat dokusunda azaldığı görülmüş fakat bu azalmış DUSP1 ifadesi ile klinik seyir veya patolojik derece arasında bir ilişki bulunamamıştır(6). Hepatoselüler karsinom hastalarında yapılan bir çalışmada azalmış

DUSP1 düzeyinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve DUSP1 ifadesindeki artışın farelerde hepatoselüler karsinom gelişmesini zorlaştırdığı gösterilmiştir (7). DUSP1 ifadesinin azaltılması küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde antikanser etkiye yol açmıştır. Yapılan çalışmada H460 akciğer kanseri hücre hattında DUSP1 ifadesinin azaltılması hücrelerin invazyon, migrasyon ve proliferasyon yeteneğinde azalmaya neden olmuştur (38). Osteosarkom üzerinde yapılan bir çalışmada, DUSP1 ifadesinin artışı kanser hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonda artışa yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca osteosarkom biyopsileri incelendiğinde kanser hücrelerinde DUSP1 ifadesinin normal dokuya göre daha yüksek olduğu görülmüştür (39). Over kanseri üzerine yapılmış bir çalışmada 90 adet biyopsi materyali incelenmiştir. Bu incelemenin sonunda DUSP proteininin, invaziv over karsinomlarının %57,6'sında yüksek seviyede ifade edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek DUSP1 ifadesinin bu hastalarda daha kısa sağkalıma yol açtığı belirtilmiştir (40). DU145 prostat kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, DUSP1 ifadesinin artırılmasının bu hücreleri Fas ligandı aracılı apoptoza karşı dirençli hale getirdiği görülmüştür. Bu durumun nedeninin artmış DUSP1 ifadesi nedeniyle azalmış JNK aktivitesi olabileceği düşünülmüştür(41). Ayrıca p53 proteininin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, p53'ün DUSP1 proteininin ifadesini artırarak MAPK proteinlerini inhibe ettiği düşünülmektedir (42).

DUSP1 proteinin kanser hücrelerinde kemoterapi direnci gelişiminde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada, DUSP1 proteininin ifadesinin artırılmasının sisplatine karşı hücresel direnci arttırdığı ve bunun nedeninin artmış DUSP1 aktivitesine bağlı düşük JNK seviyeleri ile ilişkili olabileceğini gösterilmiştir(43). Meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, DUSP1 ifadesinin artışı bu hücrelerde doksorubisin, mekloretamin ve paklitaksel direncine yol açmıştır. DUSP1 ifade artışının kaspaz aktivasyonunu azalarak DNA parçalanmasını azalttığı ve hücre canlılığını artırdığını göstermişlerdir. Daha sonra DUSP1 ifadesi siRNA ile azaltılmış ve bu ilaçların antikanser etkilerinde artış gözlenmiştir. İlaç direncinin gelişiminde JNK aktivitesinin baskılanmasının rol oynayabileceği düşünülmüştür (5). Akciğer kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifadesinin siRNA ile baskılanmasının, hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücrelerde sisplatin duyarlılığına yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca sisplatinin kanser hücrelerinde p38 ve JNK proteinlerinin fosforilasyonunu artırdığı ve bu artışın DUSP1 siRNA verilerek DUSP1 ifadesi baskılanan hücrelerde daha çok olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan hareketle, DUSP1 proteininin sisplatin üzerindeki etkilerinin p38 ve JNK aracılı olabileceği düşünülmüştür(44). Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifade artışının kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı görülmüş ve bu hücrelerde gemsitabin direncine yol açtığı

gösterilmiştir. Farelerde yaptıkları çalışmada, gemsitabin ile DUSP1 inhibisyonunun bir arada uygulanmasının, tek başına gemsitabin uygulaması ile karşılaştırıldığında sağkalımı artırdığı, anjiyogenezi azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü artırdığı görülmüştür(45). Glioblastoma hücrelerinde DUSP1 ifadesinin artışı çoklu ilaç direnci ile ilişkili bulunmuş ve bunun p38 üzerinden olabileceği düşünülmüştür(46). DUSP1 ifadesinin tedavi direnci ile olan ilişkisi sadece kemoterapi ile sınırlı değildir. Araştırmalar DUSP1 ifadesindeki artışın radyoterapi direncine yol açabildiğini de göstermektedir(47–50). U937 hücrelerinde DUSP1'in UV radyasyon ile indüklenen apoptoza karşı p38 ve JNK aktivitesini baskılayarak koruyucu bir rol oynadığı bulunmuştur (31). MEF hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, DUSP1 proteininin UV radyasyona karşı koruyucu olduğu gösterilmiş ve bu durumun p38 ve JNK ilişkili olduğu ortaya konmuştur(48).

DUSP1 proteini ifadesi ile meme kanserinin prognozu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar farklı sonuçlar sunmaktadır. Malign dokudaki DUSP1 ifadesini artışının meme kanseri hastalarında sağkalımı azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (8–10). Tayvan'da yapılan bir çalışmada ise meme kanseri hastalarının %63,7'sinde kanserli dokudaki DUSP1 ifadesinin normal dokuya göre azaldığı saptanmış olup, azalmış DUSP1 ifadesi yüksek tümör evresi ve kötü sağkalım ile ilişkili bulunmuştur(51). Bir çalışmada malign doku örneklerinin %31'inde DUSP1 ifadesinin arttığı görülmüş, tümör boyutu ve hastalık relapsı, artmış DUSP1 seviyesi ile ilişkili bulunmuştur (9). Başka bir çalışmada meme kanseri hastalarının %45'inde DUSP1 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Artmış DUSP1 seviyesi relaps artışı ile ilişkili bulunmuştur (10). DUSP1 proteininin meme kanseri tedavisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalar, bu proteinin radyoterapi ve kemoterapi direnci gelişmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. HER-2(+) meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifadesinin artışının radyoterapi direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada siRNA ile DUSP1 ifadesinin baskılanmasının meme kanseri hücrelerinin sağkalımını azalttığı ve bu hücrelerin radyoterapiye duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (8). MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan bir çalışmada DUSP1 ifadesi artışının alkilleyici ajanlar, antrasiklinler ve mikrotübül inhibitörlerine karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını azaltırken, DUSP1 ifadesinin baskılanmasının kemoterapi ile tetiklenen apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (5). Başka bir çalışmada DUSP1 proteini ifadesinin artırılmasının MDA-MB-231 hücrelerinde doksorubisin ve dosetaksel direncine yol açtığı gösterilmiştir (9). DUSP1'in meme kanseri üzerindeki etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, doksorubisinin malign dokudaki DUSP1 ifadesini baskıladığı gösterilmiştir. Doksorubisin DUSP1 ifadesinin normale göre artmadığı hücrelerde DUSP1 ifadesini baskılarken, DUSP1 ifadesinin normal dokuya göre yüksek olduğu hücrelerde ise DUSP1 ifadesini baskılamamıştır (10).

DUSP1 proteininin hedeflediği MAPK proteinlerinin fosforilasyon ve ifade düzeyleri kanserden kansere değişmektedir. Kanserin türüne bağlı olarak, DUSP1 proteininin farklı MAPK enzimlerini defosforile etmesi beklenebilir. Ayrıca DUSP1 proteininin bağışıklık sistemi ve tümör mikroçevresi üzerinde de etkilerinin olduğu unutulmamalıdır (3). Kanser progresyonuna bu yönden de etki edebileceği unutulmamalıdır. Tüm bunlar DUSP1 proteininin kanser üzerindeki etkilerini değerlendirirken göz önünde tutulmalıdır. Kemoterapi direncine ve sağkalıma olan etkileri göz önüne alındığında DUSP1 proteininin ilaç direnci ve antikanser etkinlik açısından hedef olarak araştırmaya değer olduğu düşünülmektedir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1. Hücre kültürü

Bu çalışmada laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen ATCC'den temin edilmiş MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 75 cm^2'lik flasklarda Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi yerinde çoğaltılmıştır. Besi yerine ek olarak %10 fötal sığır serumu (FSS), 100 U/ml Penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin eklenmiş ve hücreler 37 ^0C sıcaklıkta %5 CO_2'li ortamda çoğaltılmıştır. Hücrelerin pasajlanması ve ekilmesi aşamasında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve 0.1% Tripsin içeren 10 µM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) kullanılmıştır.

5.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve antikorlar firma adları ve katalog numaraları ile birlikte EK 1'de verilmiştir.

5.2 Yöntem

5.2.1 CRISPR/Cas9 TRANSFEKSİYONU

6 kuyulu hücre kültür plaklarına hücreler ekildi ve %60-70 yoğunluğa ulaşmaları beklendi. Hücrelerin besi yeri transfeksiyondan 24 saat önce antibiyotiksiz besi yeri ile değiştirildi. Daha sonra firmanın önerdiği protokolüne uygun şekilde DUSP1 plazmidi ve Kontrol plazmid ile transfeksiyon gerçekleştirildi (52,53). Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra transfekte olmuş hücreleri seçmek için puromisin kullanıldı. Puromisin memeli hücrelerini genellikle 1–10 µg/ml konsantrasyonlarında öldürmektedir. CRISPR işlemi sonrasında bu hücrelere aynı zamanda puromisin direnç geni de transfekte edilmektedir. Seçim işlemi için uygun puromisin konsantrasyonu transfeksiyon işlemi uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinin hepsini 3-4 gün içinde öldüren minimum puromisin konsantrasyonu olacak şekilde verildi. Bu tez çalışmasında 2,5 µg/ml puromisin kullanıldı. Hücreler puromisinli besi yerinde 5 gün boyunca bekletildi ve her iki günde bir puromisinli besi yeri tazelendi. Seçim işlemi sırasında hücrelerin yeşil floresan protein (GFP) sinyali floresan mikroskopi görüntüsü sağlayan 'Incucyte live-cell analysis' sistemi ile takip edildi.

5.2.2 Hücre Proliferasyonu Deneyleri

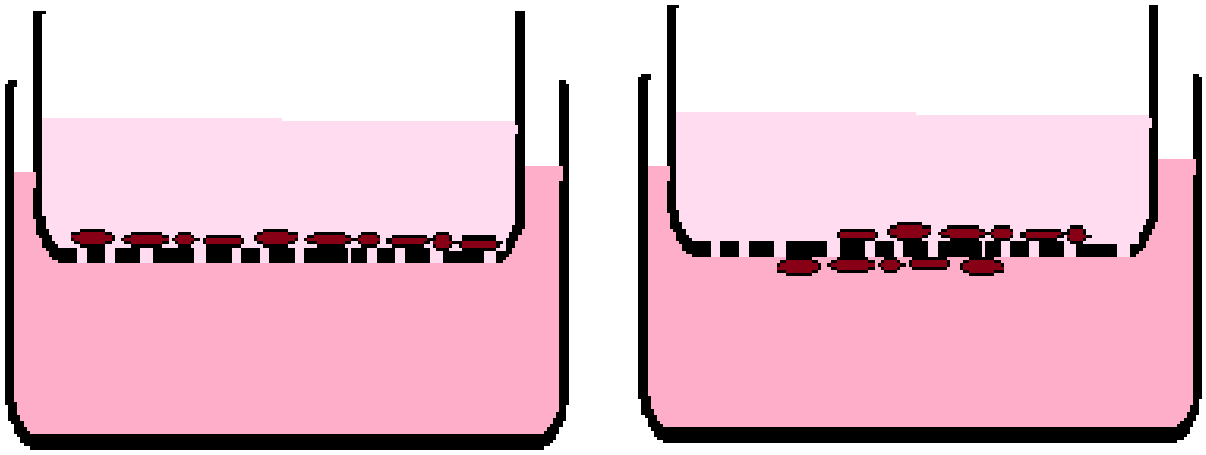
Hücre sayısı ölçümü için 'Incucyte live-cell analysis' sistemi kullanılmıştır. Bu cihaz, gerçek zamanlı olarak, plakalardaki canlı hücreleri faz kontrast görüntülemeye ve hücre sayılarının saptanmasına olanak sağlamaktadır. Hücreler sürekli izlenebilmekte, hücre çoğalması ve morfolojisini kaydedilebilmektedir (54,55). Hücreler 96 kuyulu plakalara 5000 adet ekildi ve hücrelerin plakaya yapışmaları için 24 saat beklendi. 24 saat sonra hücrelerin besi yeri değiştirildi, hücrelere kimyasal maddeler ve ilaçlar verilerek hücreler 'Incucyte live-cell analysis' cihazına yerleştirildi. Hücrelerin 6 saatte bir 10x büyütmedeki faz kontrast görüntüleri kaydedilerek 7 gün boyunca ölçüm yapıldı. Her kuyudaki ortalama hücre sayısı 'Incucyte live-cell analysis' sisteminin yazılımı ile hesaplanarak hücrelerin proliferasyon eğrileri oluşturuldu. BCI deneylerinde 50 nM, 500 nM, 1 µM ve 2µM konsantrasyonlarında BCI plakalara eklendi. Çözücü olarak %0,1 Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. BCI ve sisplatinin beraber verildiği deneylerde yukarıdaki BCI konsantasyonlarına ek olarak 0,05 µg/ml sisplatin kuyulara eklendi. Sisplatin deneylerinde 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml konsantrasyonunda sisplatin besi yerine eklendi. JNK ve p38 inhibitörlerinin kullanıldığı deneylerde kullanılan enzim inhibitörlerinin derişimleri bildirilen afinite ve/veya IC50 değerlerinin 10 katı olacak şekilde belirlendi. Çözücü olarak %0,1 DMSO kullanıldı. p38 inhibitörü 1 µM SB202190, JNK inhibitörü olarak 1 µM SP600125 uygulandı. JNK ve p38 inhibitörlerinin ve sisplatinin beraber verildiği deneylerde yukarıdaki konsantrasyonlara ek olarak 0,05 µg/ml sisplatin kuyulara eklendi. Hücrelerin ikiye katlanma zamanı hücreler logaritmik büyüme fazındayken hesaplandı. Hücreler; t1 zamanında q1 sayısında, t2 zamanında q2 sayısında olmak üzere aşağıdaki formül kullanıldı.

$$T_d = (t_2 - t_1) \cdot \frac{\ln(2)}{\ln(\frac{q_2}{q_1})}.$$

5.2.3 Hücre Motilitesi Deneyleri

Hücre motilitesi ölçümü için 'Incucyte live-cell analysis' sistemi kullanılmıştır. "Transwell migration assay" deneyi için iki hazneli 'Incucyte® Clearview 96-Well Plate' (Cat. No. 4582) plakası kullanılmıştır. Bu plakanın üst kuyusuna 150 µl fötal sığır serumu içermeyen besi yeri içerisinde 40.000 hücre ekildi, alt kuyusuna ise 100 µl %10 FSS içeren besi yeri eklendi. Daha sonra plaka 'Incucyte live-cell analysis' cihazına yerleştirildi. Plaka tabanının üst ve alt kısımlarının faz kontrast görüntüleri 6 saatte bir kaydedilerek hücreler 36 saat takip edildi. Plakanın üst kısmından alt kısmına geçen hücrelerin alanı 'Incucyte live-cell analysis' sisteminin yazılımı kullanılarak hesaplandı. Normalizasyon için deneyin başlangıcında üst kuyuya ekilen hücre sayısı kullanıldı. Hücre sayısı veya hücrelerin kapladığı

alan ölçümleri ‘Incucyte live-cell analysis’ sisteminin yazılım programı ile belirlendi. (Şekil 5.1)



Şekil 5.1 Transwell migration assay deneyinin şematik olarak gösterimi

“Yara İyileşmesi” deneyleri ‘Incucyte live-cell analysis’ sistemi kullanılarak yapılmıştır. Hücreler 96’lık plakalara ekilip konfluent olmaları beklendi. Daha sonra “The WoundMaker” cihazı protokolünde belirtildiği şekilde uygun olarak plakalarda yaklaşık 800 µm boyutunda yara oluşturuldu. Plaka ‘Incucyte live-cell analysis’ cihazına yerleştirilerek faz kontrast görüntüleri 6 saatte bir kaydedildi ve 24 saat ölçüm yapıldı. Başlangıçtaki yara boyutunun zamana bağlı değişimi, ‘Incucyte live-cell analysis’ sisteminin yazılımı kullanılarak incelendi. Elde edilen veriler ile yara boyu-zaman grafiği oluşturuldu.

5.2.4 Protein ifadesinin değerlendirilmesi

Hücreler 6’lık plakalara ekildi ve çoğalmaları beklendi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıkları zaman buz üstüne alındı ve üzerlerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Sonra kuyular 500 µl PBS ile yıkandı. Kuyu başına 120 µl lizis buffer (PBS içinde %1 nonidet p-40, 0.2 mM Na ortho-vanadat ve proteaz inhibitor karışımı) eklendi. Hücreler kazıyıcı kullanılarak kazındı ve hücre lizatı tüplere aktarıldı. Hücre lizatları 5.000 x g’de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatan alınarak -80 C’de saklandı.

Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford Yöntemi kullanılarak belirlendi. BSA (Bovine serum albumin) kullanılarak 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0.0625 mg/ml standart çözeltiler hazırlandı. Ölçümün yapılacağı 96’lık plakalara 190 µl Bradford çözeltisi + 10 µl standart veya örnek eklendi. Spektrofotometre kullanılarak 595 nm absorbansta ölçüm yapıldı.

Deneylerden elde edilen hücre lizatları çözüldükten sonra %10 ß-merkaptoetanol içeren tampon çözelti ile karıştırıldı ve 95 ^{0}C’de 3 dakika bekletildi. Örnekler elektroforez ile %10 poliakrilamid içeren jelin içinde yürütüldü. Daha sonra jeldeki proteinler elektro-transfer yöntemi kullanılarak *polyvinyliden diflouride* (PVDF) membrana transfer edildi. Membranlar

% 5 yağsız süt tozu ve %0,2 (v/v) tween-20 içeren *Tris-Buffered Saline* (TBS) bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Daha sonra uygun birincil antikor ile 16 saat boyunca +4 ^{0}C'de bekletildi. Membranlar sonraki gün HRP (*horse radish peroxidase*) ile konjuge uygun ikincil antikor ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. İstenilen protein bantları HRP substratı kullanılarak Biorad görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bantların lüminesans yoğunluğu İmagemax yazılım programı kullanılarak sayısal veriye dönüştürüldü. Normalizasyon için *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) proteini kullanıldı.

5.2.5. İstatistiksel değerlendirme

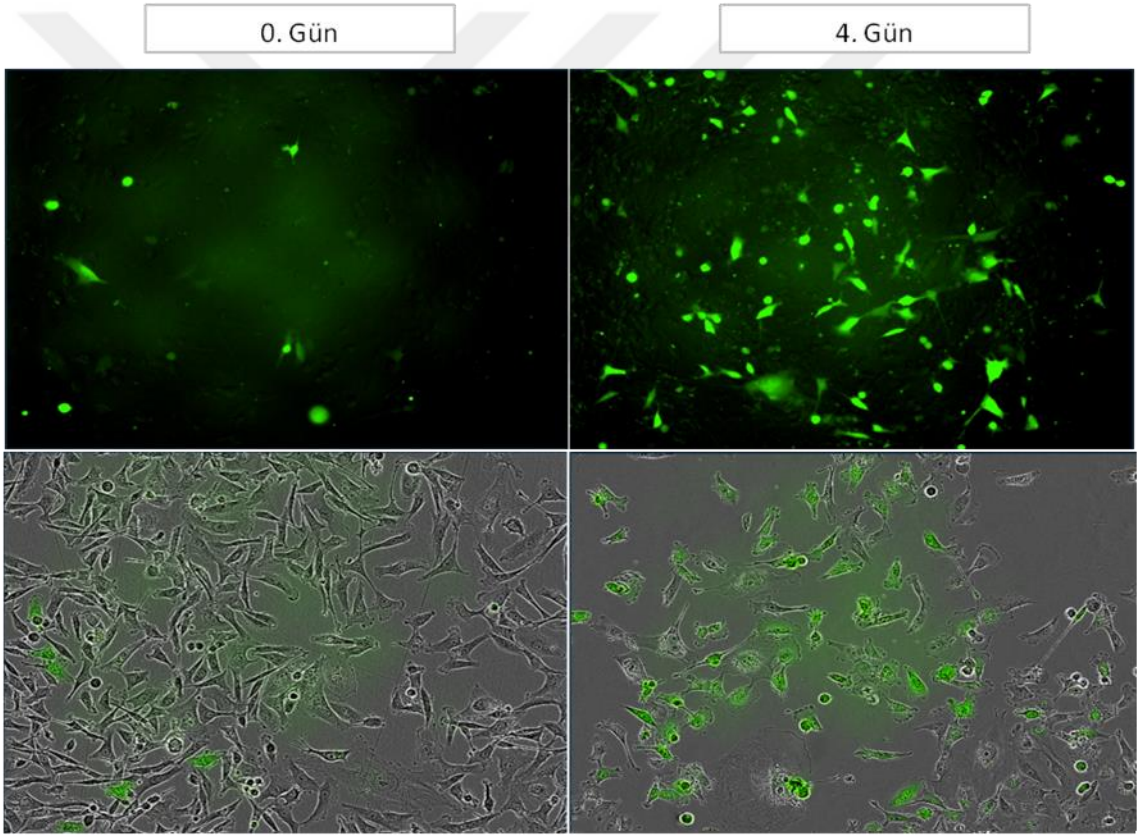
İkili karşılaştırmalarda Ortalamalar arası istatistiksel fark "Student's t-test" kullanılarak değerlendirildi. Birden fazla ikili karşılaştırma yapıldığı durumlarda bonferroni düzeltmesi kullanıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 20.0 Windows software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ile yapıldı.

6. BULGULAR

Bu tez çalışmasında üçlü negatif meme kanseri olan MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerine CRISPR/Cas9 uygulaması yapılarak bu hücrelerdeki DUSP1 proteini ifadesi azaltılmıştır. Bu yöntem ile protein sentezinin transkripsiyon basamağına müdahale ederek protein ifadesini kalıcı olarak azaltmak mümkündür. Transfeksiyonun stabil hale gelmesi için puromisin ile hücreler seçilmiş daha sonra GFP sinyali ile kontrol edilmiştir.

6.1 MDA-MB-231 Hücrelerine DUSP1 CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında hücrelerin GFP sinyaline göre seçilmesi.

Transfeksiyon sonrasında hücrelerin seçimi puromisin ile sağlanmıştır. Hücrelerin puromisin verilmeden önceki ve verildikten sonraki GFP sinyalleri gösterilmiştir (Şekil 6.1).

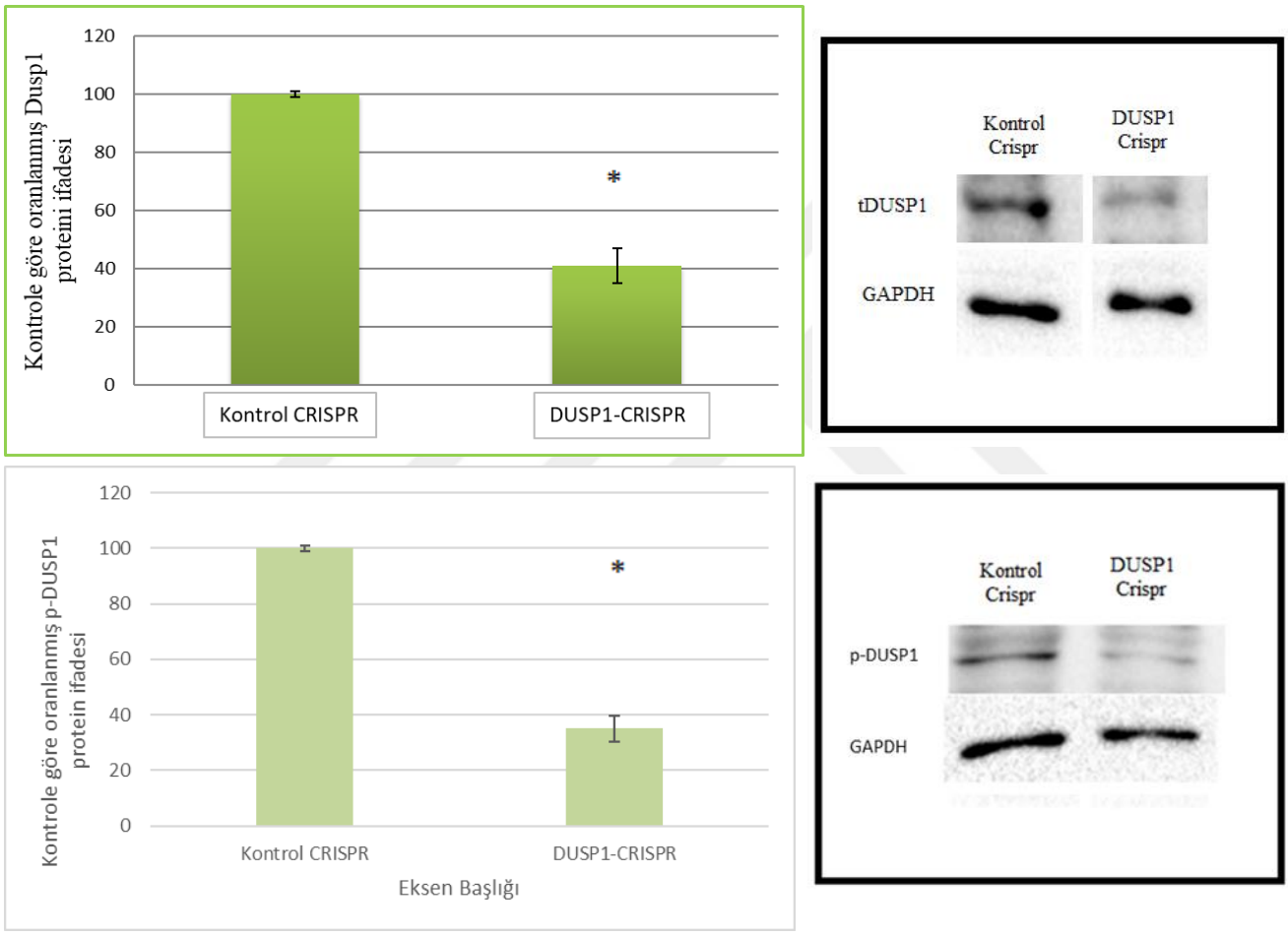


Şekil 6.1. DUSP*1-CRISPR uygulaması sonrasında GFP sinyalinin değerlendirilmesi*

Hücrelere 2,5 µg/ml puromisin verilerek hücreler 4 gün takip edilmiştir. 4. Gündeki yeşil floresan sinyalindeki artışın Floresans kanalı ve Faz kanalındaki görüntüsü şekilde gösterilmiştir.

6.1.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulaması ile DUSP1 proteini ifadesinin azaltılması

MDA-MB-231 hücrelerine CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında total ve fosforile DUSP1 proteini miktarı Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda CRISPR işlemi sonrasında total DUSP1 proteininde yaklaşık %60 azalma, fosforile DUSP1 ifadesinde ise yaklaşık %70 azalma tespit edilmiştir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. *CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde DUSP1 düzeyi*

Total ve fosforile DUSP1 proteini bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır. Grafik kontrole göre normalize edilmiş ve yüzde olarak sunulmuştur. (*) Kontrole göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (p<0.05), (n=4).

6.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında MAPK proteini ifadelerinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda DUSP1 proteini ifadesinin azaltılmasının MAPK yolağı proteinlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri Western Blot yöntemi ile incelenmiştir. Kontrol protein olarak GAPDH kullanılmıştır.

6.2.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında JNK proteini ifadesinin değişimi

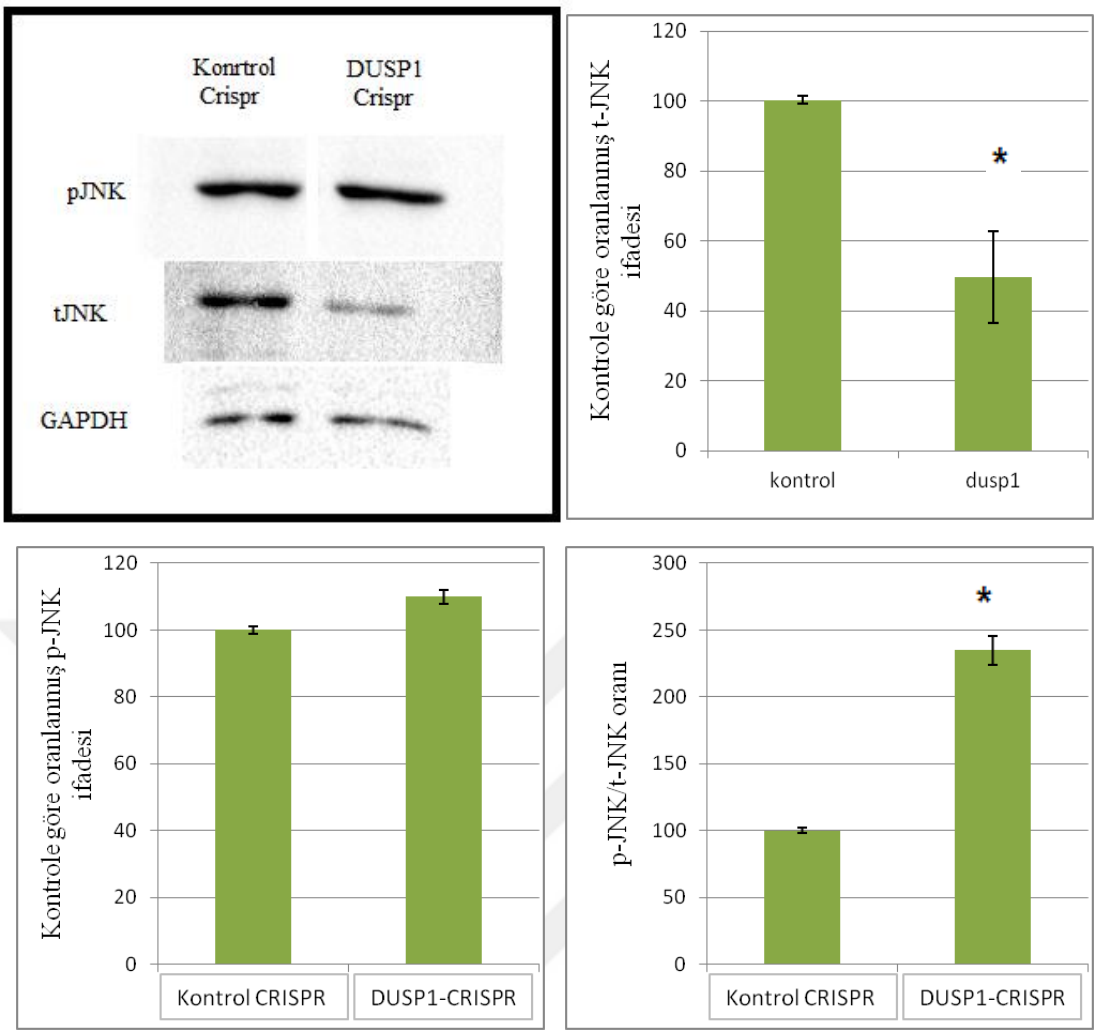
MDA-MB-231 hücrelerine DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında total ve fosforile JNK proteininin ifade miktarı Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında, DUSP1-CRISPR grubu ile kontrol hücreleri arasında fosforile JNK proteini miktarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Total JNK miktarında ise yaklaşık %50 azalma tespit edilmiştir. DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında, DUSP1-CRISPR grubu ile kontrol grubu arasında JNK proteininin fosforile/total oranında ise yaklaşık olarak 2,3 kat artış saptanmıştır (Şekil 6.3).

6.2.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında p38 proteini ifadesinin değişimi

MDA-MB-231 hücrelerine CRISPR uygulaması sonrasında total ve fosforile p38 proteininin ifade miktarı Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında, DUSP1-CRISPR grubu ile kontrol grubu arasında fosforile p38 proteini miktarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat total p38 miktarında yaklaşık %40 azalma tespit edilmiştir. DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında, DUSP1-CRISPR grubu ile kontrol grubu arasında p38 proteininin fosforile/total oranında ise yaklaşık olarak 2,4 kat artış saptanmıştır (Şekil 6.4).

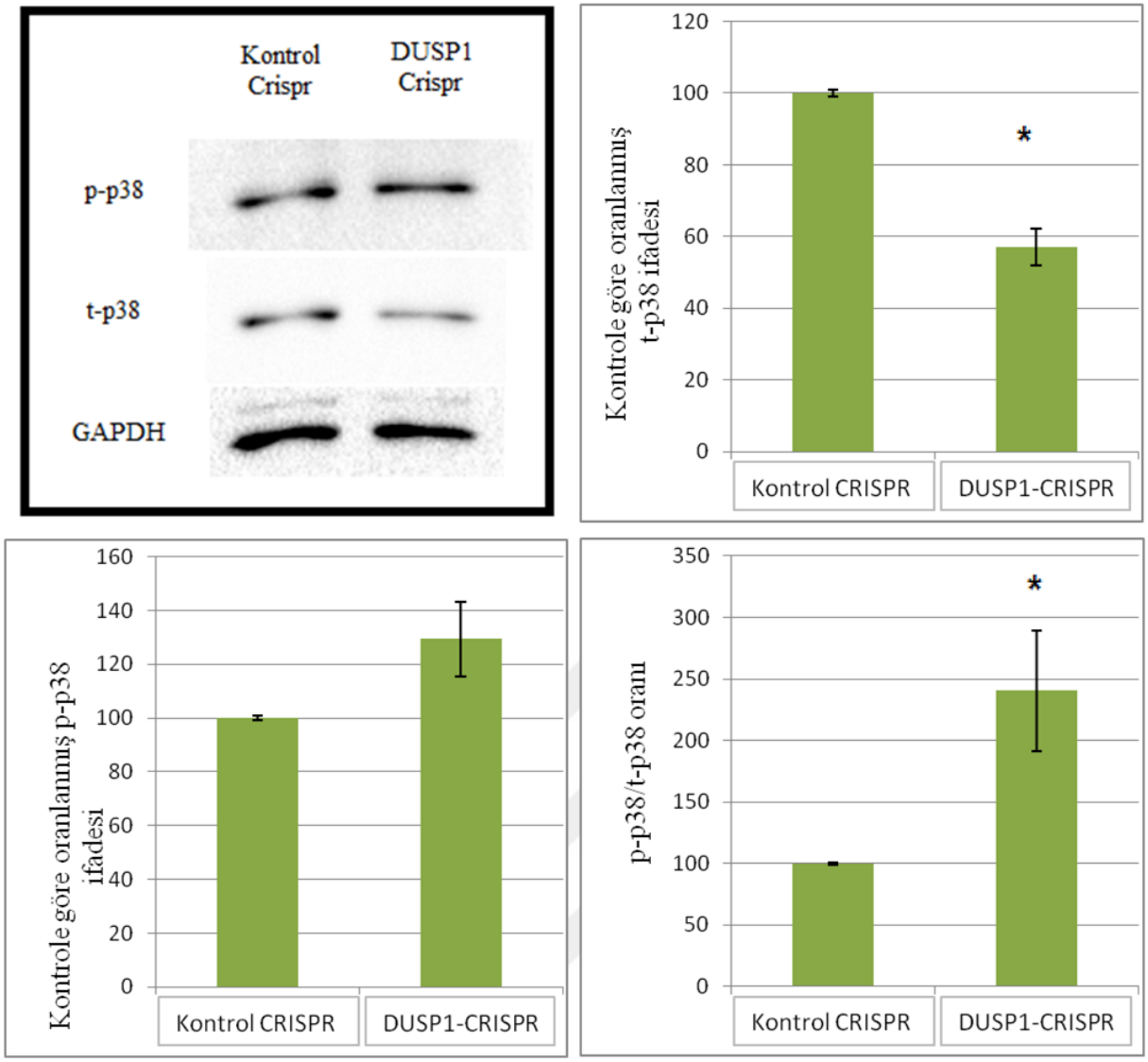
6.2.3 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında ERK proteini ifadesinin değişimi

MDA-MB-231 hücrelerine DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında total ve fosforile ERK proteininin ifade miktarı Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında, DUSP1-CRISPR grubu ile kontrol grubu arasında ERK proteininin fosforile ve total miktarı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 6.5).



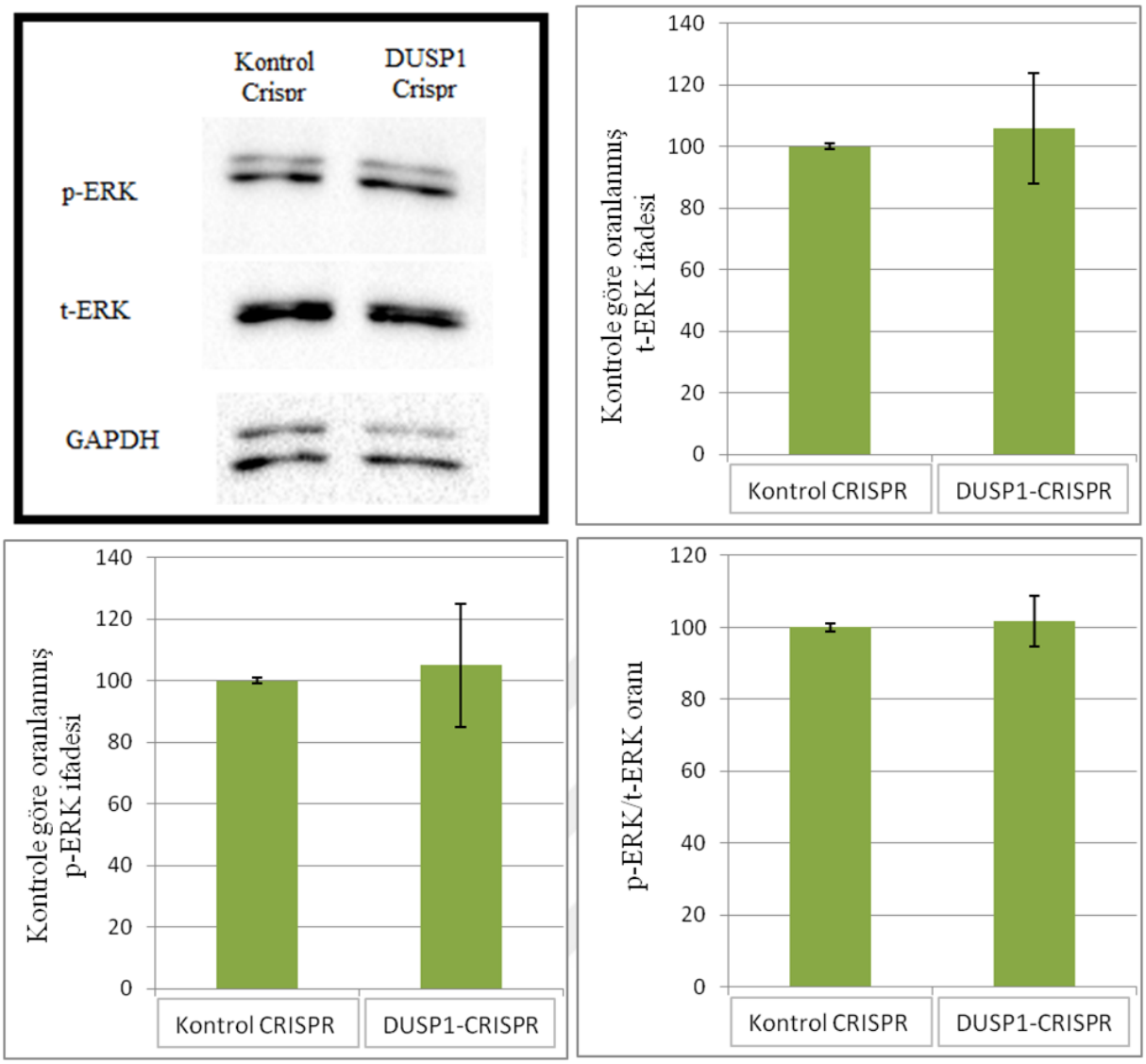
Şekil 6.3 *CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde JNK düzeyi*

Fosforile ve total JNK bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır. Grafik kontrole göre normalize edilmiş ve yüzde olarak sunulmuştur. (*) Kontrole göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (p<0.05), (n=3).



Şekil 6.4. *CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde p38 proteini düzeyi*

Fosforile ve total p38 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır. Grafik kontrole göre normalize edilmiş ve yüzde olarak sunulmuştur. (*) Kontrole göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (p<0.05), (n=7).



Şekil 6.5 *CRISPR uygulaması sonrasında MDA-MB231 kanser hücresinde ERK proteini düzeyi*

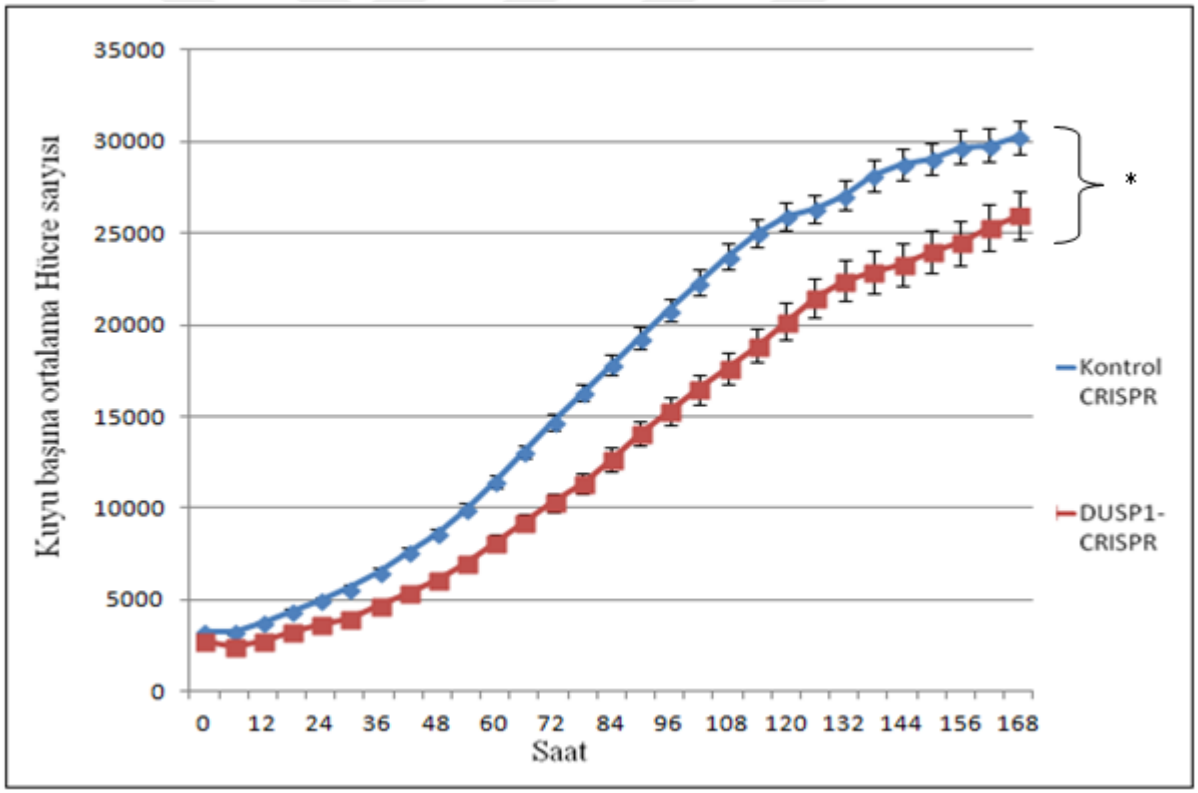
Fosforile ve total ERK bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır. Grafik kontrole göre normalize edilmiş ve yüzde olarak sunulmuştur. Kontrole göre istatiksel olarak fark bulunamamıştır (n=9).

6.3 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 proteini inhibisyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteini aktivitesi iki farklı yöntem ile inhibe edilmiştir. CRISPR/Cas9 yöntemi ile DUSP1 ifadesi azaltılmış veya allosterik bir DUSP1 inhibitörü olan BCI ajanı kullanılmıştır. DUSP1 proteininin hücre proliferasyona olan etkileri 'Incucyte live-cell analysis' sistemi ile incelenmiştir. Hücrelerin proliferasyon eğrileri çizilmiş ve bu eğrilerden hücrelerin ikiye katlanma zamanı hesaplanmıştır. Proliferasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar kanserin büyüme hızı hakkında bilgi vermektedir.

6.3.1 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

Hücreler 96'lık plakalara ekildikten sonra 7 gün boyunca izlenmiştir. Hücrelerin proliferasyon eğrileri Şekil 6.6'da gösterilmiştir. Hücrelerin proliferasyon eğrilerinde deney sonunda ulaştıkları maksimum hücre sayısında azalma görülmüştür. İkiye katlanma zamanı



Kontrol grubunda 35,0±1,6 DUSP1-CRISPR grubunda ise 37,5±1,9 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 6.6 *MDA-MB231 hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi*

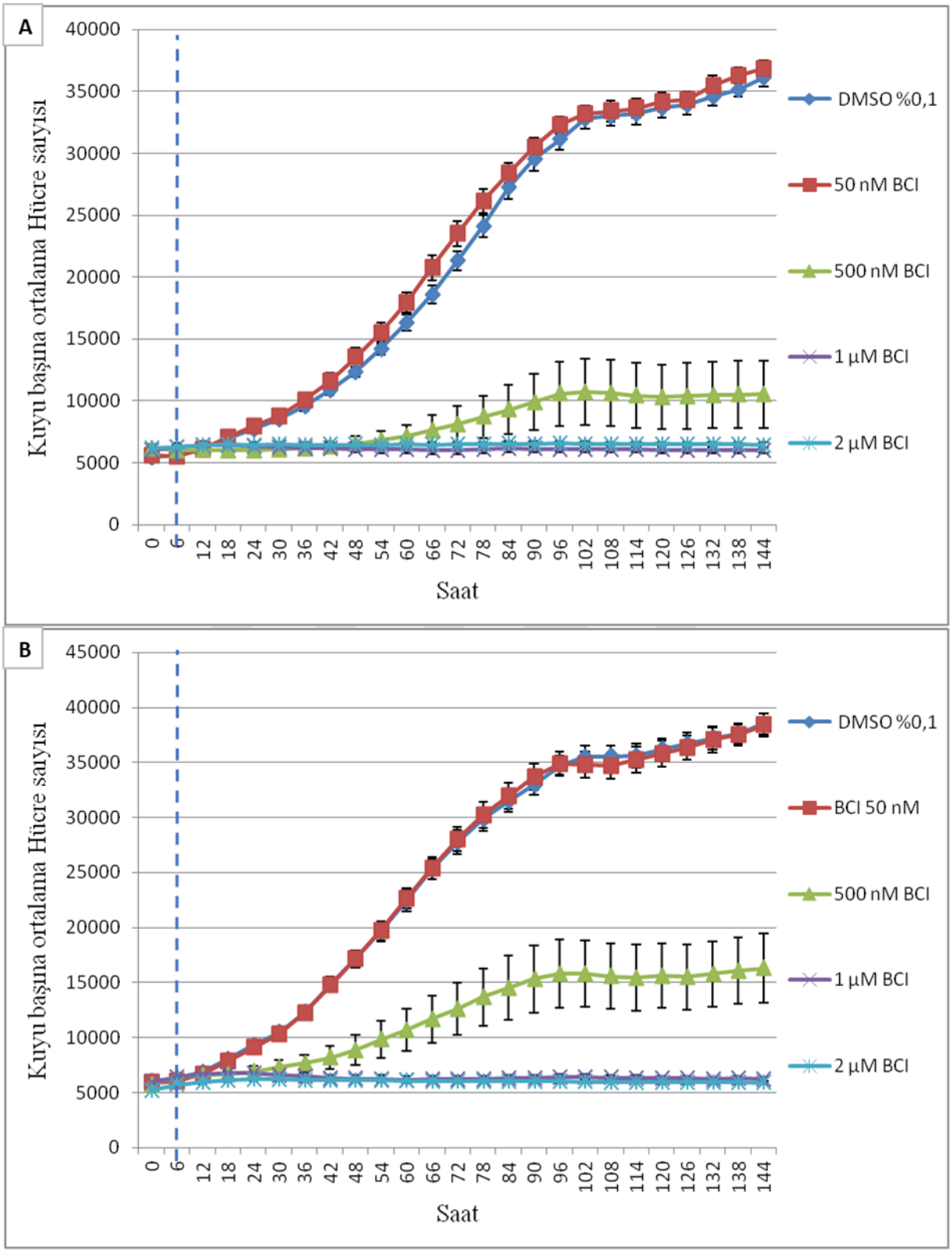
DUSP1-CRISPR uygulamasının hücre canlılığı olan etkisi incelenmiştir. Mavi Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerini, kırmızı DUSP1 CRISPR MDA-MB231 hücrelerini göstermektedir (n=8). (*) kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (p<0.05).

6.3.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde BCI uygulaması sonrasında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

Kontrol hücreleri ve DUSP1-CRISPR hücreleri 96'lık plakalara ekildikten sonra 50 nM, 500 nM, 1 μM ve 2μM konsantrasyonundaki BCI besi yerine eklenmiş ve hücreler 6 gün boyunca izlenmiştir. Hücrelerin proliferasyon eğrileri Şekil 6.7'de gösterilmiştir. Hücreler ikiye katlanma zamanları açısından değerlendirildiklerinde, 500 nM ve üzeri konsantrasyonlardaki BCI'nın her iki grupta da hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. İkiye katlanma zamanları Tablo 1'de gösterilmiştir. BCI'nın 1 μM ve 2μM konsantrasyonunda proliferasyonu tamamen durdurduğu gözlenmiştir. 500 nM konsantrasyonundaki BCI'nın antiproliferatif etkisinin kontrol hücreleri üzerinde daha fazla olduğu görülmüştür.

İkiye Katlanma Zamanı (saat)		BCI konsantrasyonu (nM)		
		0	50	500(*)
	Kontrol CRISPR (ortalama±standart hata)	34,2± 0,6	33,6± 0,6	109± 6,5
	DUSP1-CRISPR (ortalama±standart hata)	34,4± 0,6	33,4± 0,6	63,8± 4,0
	p değeri	*p>0.05*	*p>0.05*	*p*<0.05

Tablo 1. *BCI'nın MDA-MB231 kanser hücrelerinde ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin tablo olarak gösterimi.* (*) ilgili konsantrasyonun kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir (*p*<0.05)

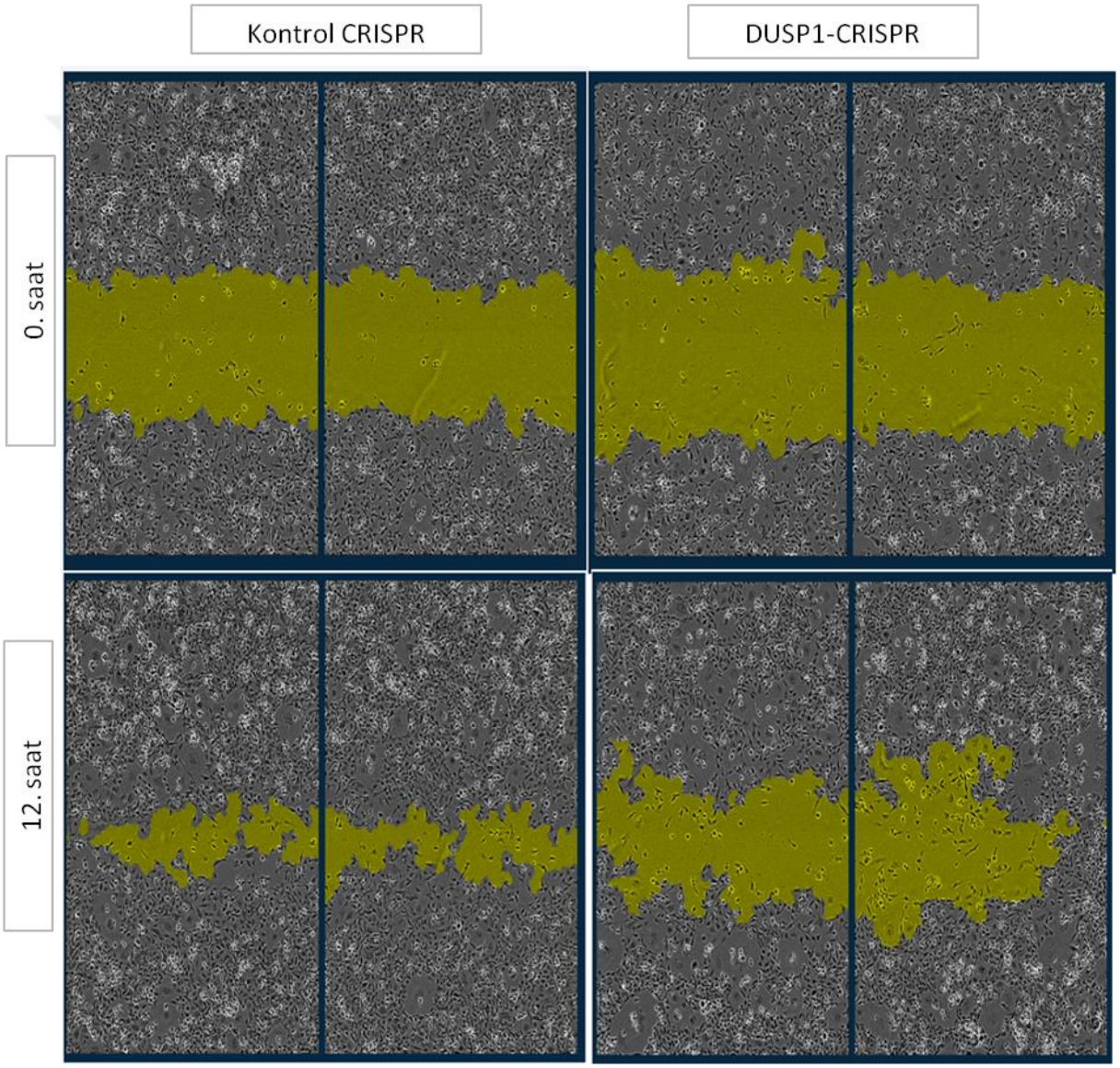


Şekil 6.7 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde BCI'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi*

BCI'nın proliferasyona olan etkisi incelenmiştir. BCI'nın verilme zamanı mavi çizgi ile gösterilmiştir A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin konsantrasyon yanıt grafiğini B.) DUSP1 CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin konsantrasyon yanıt grafiğini göstermektedir. (n=8)

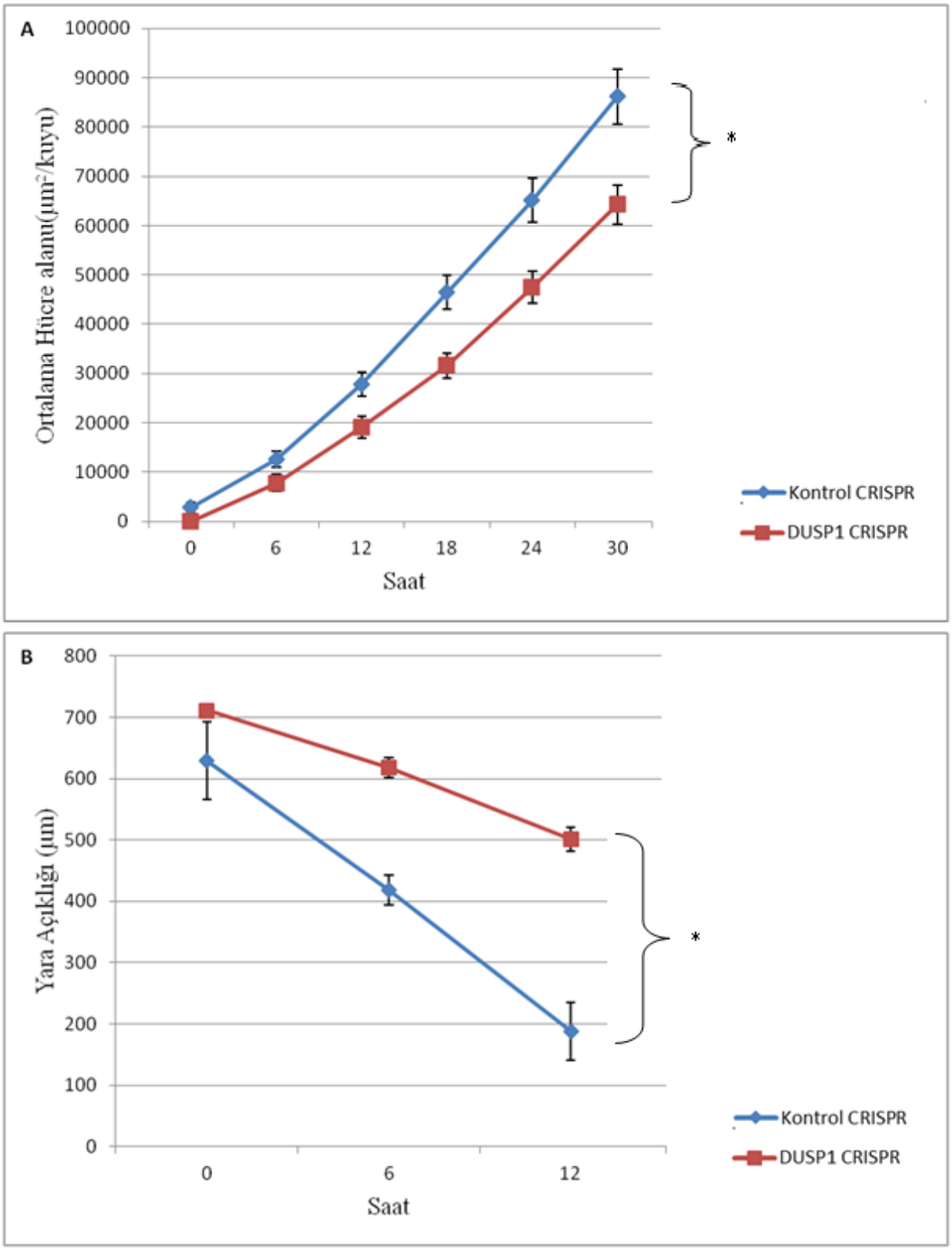
6.4 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında migrasyon kapasitesinin değerlendirilmesi

DUSP1 proteini silinmesinin hücre migrasyonuna olan etkileri "Incucyte live-cell analysis" sistemi ile incelenmiştir. DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini değerlendirmek için "transwell migration assay" ve yara iyileşmesi deneyleri yapıldı. Migrasyon deneyinde hücrelerin kemoatraktana verdikleri kemotaksis cevabı değerlendirildi. Yara iyileşmesi deneyinde ise hücrelerin migrasyon ve bölünme kapasiteleri değerlendirildi (şekil 6.8-9). Her iki deneyde de DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında hücrelerin migrasyon yeteneklerinin azaldığı görüldü.



Şekil 6.8 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında hücre göçünün Yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirilmesi*

Hücrelerin yara kapanma hızlarının faz görüntüleri üzerinden karşılaştırılması. Yara alanı sarı renk ile gösterilmektedir.



Şekil 6.9 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında hücre göçünün Yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirilmesi*

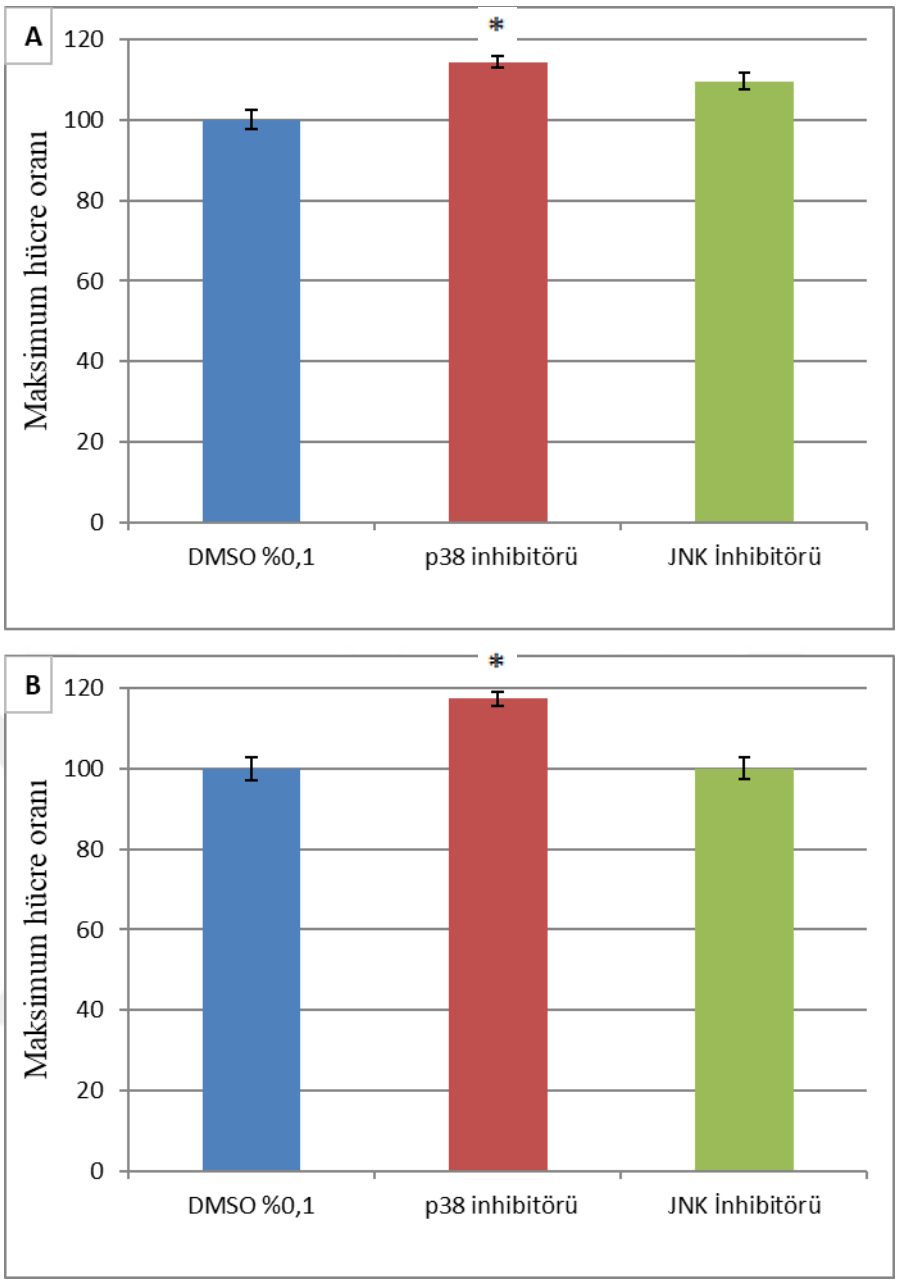
A.) Hücre göçü, bir plakadan diğer plakaya geçiş ile değerlendirildi. Üst plakaya hücreler ekildikten sonra üst yüzeyden alt yüzeye geçen hücrelerin alanı zamana bağlı olarak ölçüldü. (n=30) B.) Yaklaşık 700 µm olan yaranın genişliği 6 saat arayla ölçüldü. (n=16) (*) kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (p<0.05)

6.5 MDA-MB-231 Hücrelerinde DUSP1 CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında JNK ve p38 inhibitörlerine yanıtın değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin ifadesinin azaltılmasının sonucunda hücrelerin JNK ve p38 inhibitörlerine verdikleri yanıt incelendi. Hücrelere p38 inhibitörü olarak 1 μM SB202190, JNK inhibitörü olarak 1 μM SP600125 verildi ve hücreler 6 gün boyunca izlendi (Şekil 6.10-11). Hücrelerin ulaştığı maksimum hücre sayısına bakıldığında, p38 inhibitörü olan SB202190'un her iki grupta da maksimum hücre miktarını artırdığı görülmüştür (Şekil 6.10). Deney sonucunda elde edilen ikiye katlanma zamanları tablo 2'te gösterilmiş ve uygulanan ajanların ikiye katlanma zamanını değiştirmediği gözlenmiştir.

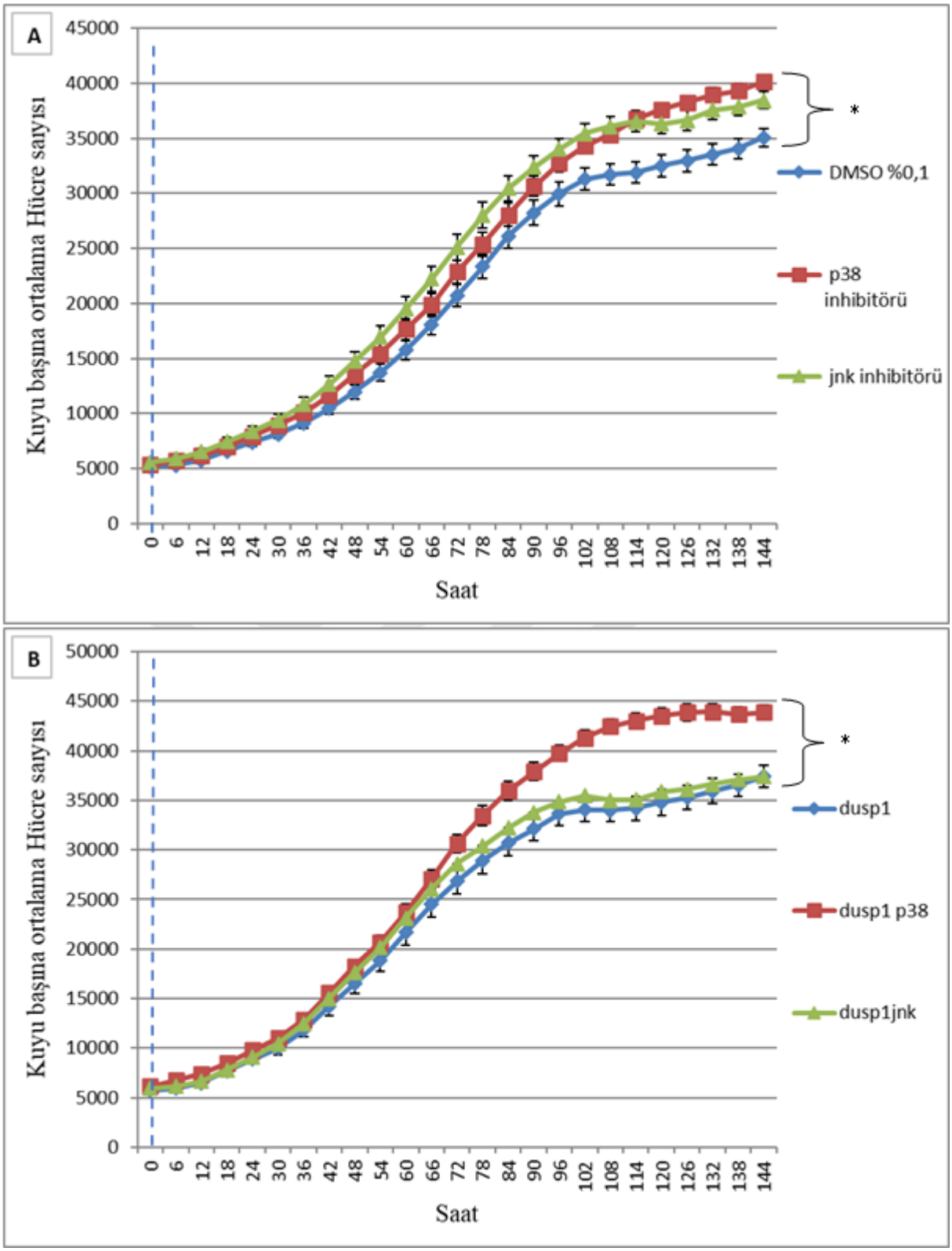
	DMSO %0,1	SB202190	SP600125
Kontrol CRISPR (ortalama±standart hata)	36,1±0,7	35,8±0,6	35,5±0,8
DUSP1-CRISPR (ortalama±standart hata)	35,9±1,0	35,3±0,5	35,9±0,9
p değeri	*p>0.05*	*p>0.05*	*p>0.05*

Tablo 2. *MDA-MB231 kanser hücrelerinde SB202190 ve SP600125'un ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin tablo olarak gösterimi.*



Şekil 6.10 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün Maksimum hücre sayısına etkisi*

1 µM SB202190 (p38 inhibitörü) ve 1 µM SP600125 (JNK inhibitörü) ajanlarının Maksimum hücre sayısına etkisi incelenmiştir. Ajan verilen hücrelerin ulaştığı maksimum hücre sayısı, ilgili hücrenin ajan verilmemiş grubunun maksimum hücre sayısına oranlanmıştır. A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin oranını B.) DUSP1-CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin oranını göstermektedir. (*) ilgili ajanın kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir ($p<0.05$), (n=8)



Şekil 6.11 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün proliferasyona etkisinin değerlendirilmesi*

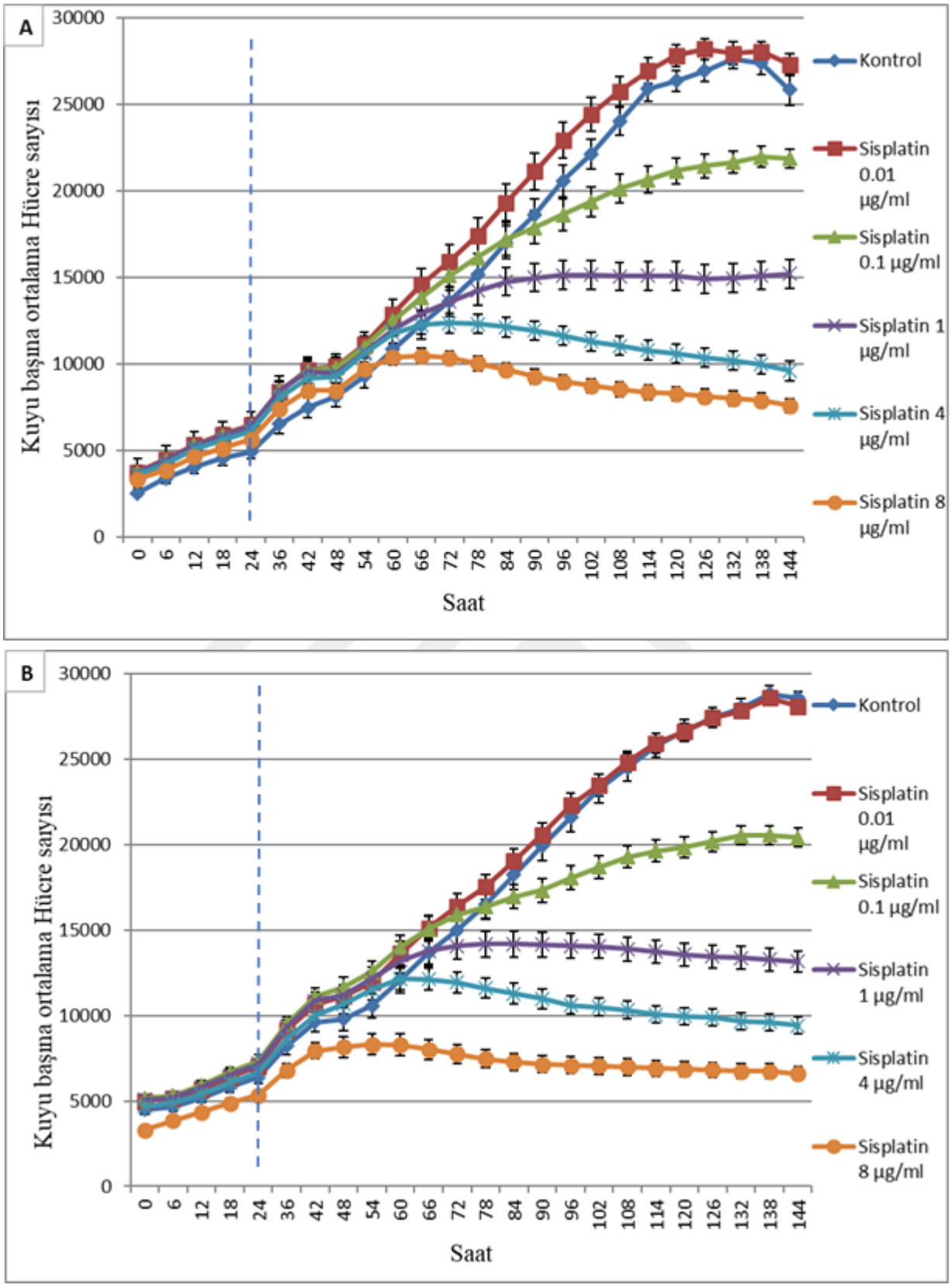
1 µM SB202190 (p38 inhibitörü) ve 1 µM SP600125 (JNK inhibitörü) ajanlarının proliferasyona olan etkisi incelenmiştir. Ajan verilme zamanı mavi çizgi ile gösterilmiştir A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini B.) DUSP1-CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini göstermektedir. (*) ilgili ajanın kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir ($p<0.05$), (n=8)

6.6 MDA-MB-231 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında sisplatin duyarlılığının değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücreleri 96'lık plakalara ekildikten sonra 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml konsantrasyonunda sisplatin besi yerine eklendi. Her iki hücre grubunda da 0,1 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda sisplatinin antiproliferatif etkisi olduğu görüldü (şekil 6.12). Proliferasyon eğrileri üzerinden hesaplanan ikiye katlanma zamanı incelendiğinde, sisplatin uygulanmış hücrelerin ikiye katlanma zamanının arttığı gözlendi. Aynı konsantrasyondaki sisplatinin DUSP1-CRISPR uygulanmış hücrelerde ikiye katlanma zamanını daha fazla artırdığı görüldü (şekil 6.13, Tablo 3). Konsantrasyonlara göre hesaplanmış ikiye katlanma zamanları tablo 3'te verilmiştir. 8 µg/ml konsantrasyonunda sisplatin verilen hücrelere baktığımızda, DUSP1-CRISPR uygulanmış hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla ulaşabildikleri maksimum hücre sayısının daha az olduğu görülmektedir (Şekil 6.14). Hücreler sisplatinin etkisinin başlama süresi açısından incelendiğinde (Sisplatin verildikten sonra proliferasyonun durduğu zaman veya proliferasyonun yavaşlamaya başladığı zaman), sisplatinin DUSP1-CRISPR hücrelerinde ortalama 13,5±4,3 saat daha erken etki ettiği görülmüştür.

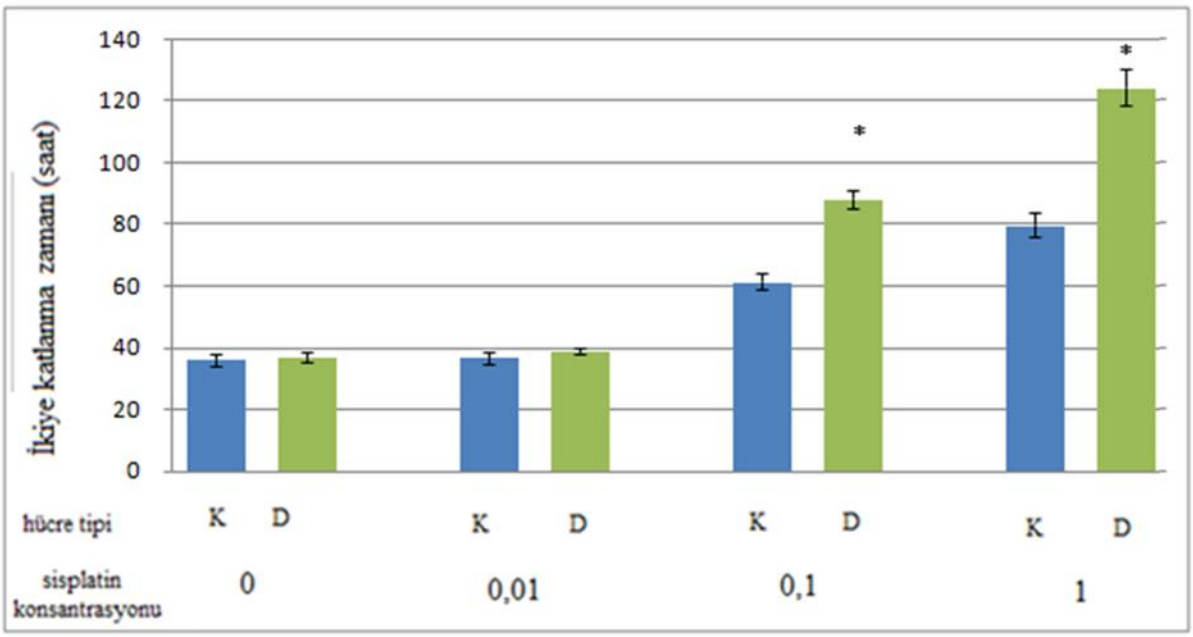
	Sisplatin konsantrasyonu (µg/ml)			
	0	0,01	0,1(*)	1(*)
Kontrol CRISPR (ortalama±standart hata)	35,8±1,9	36,6±2,1	61,1±2,7	79,4±3,9
DUSP1-CRISPR	36,7±1,6	38,6±1,1	87,8±2,6	124,1±5,1
p değeri	*p>0.05*	*p>0.05*	*p*<0.05	*p*<0.05

Tablo 3. *MDA-MB231 kanser hücrelerinde 48. Saatte verilen sisplatinin ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin tablo olarak gösterimi.* (*) ilgili konsantrasyonun kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir (*p*<0.05)



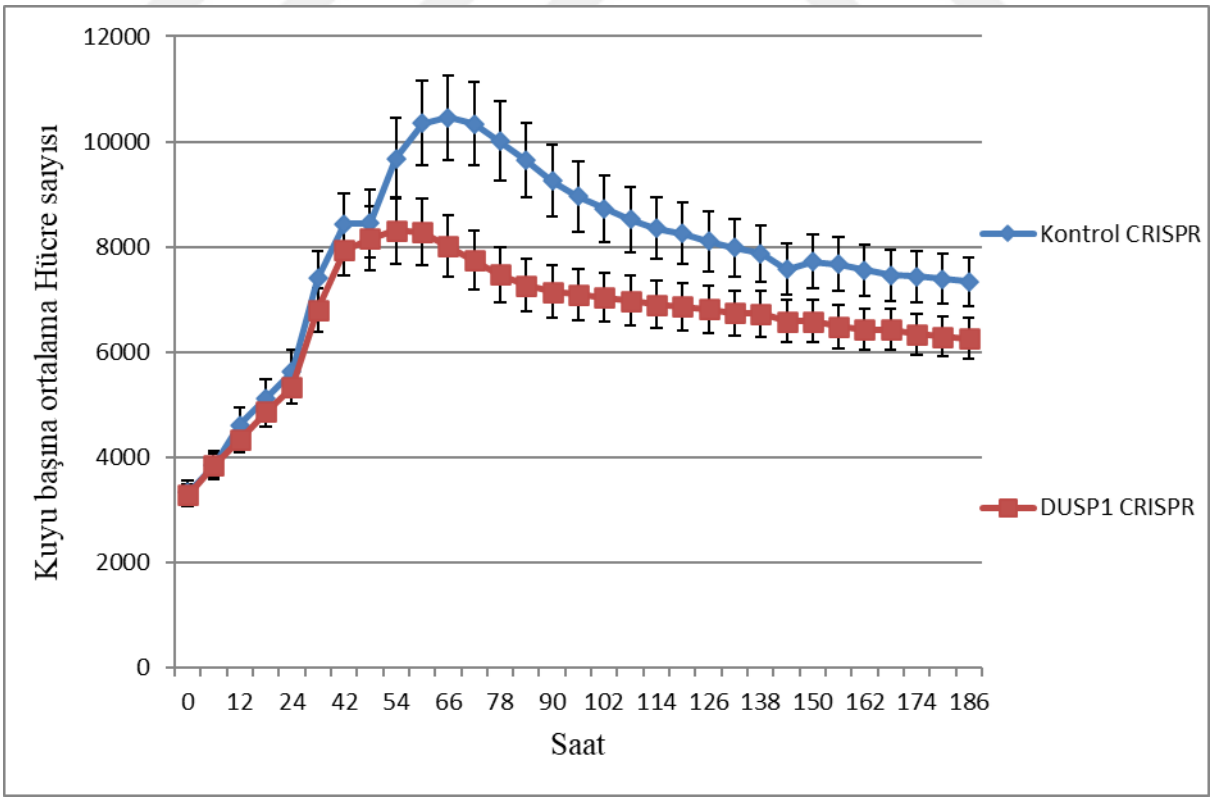
Şekil 6.12 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatin duyarlılığının değerlendirilmesi*

Sisplatinin proliferasyona olan etkisi incelenmiştir. Sisplatinin verilme zamanı mavi çizgi ile gösterilmiştir. A.) Kontrol MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini B.) DUSP1-CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman- hücre sayısı grafiğini göstermektedir. (n=8)



Şekil 6.13 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatinin ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin değerlendirilmesi*

Sisplatinin ikiye katlanma zamanına olan etkisi incelenmiştir. Mavi sütun Kontrol MDA-MB231 hücrelerinin ikiye katlanma zamanını yeşil sütun DUSP1-CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin ikiye katlanma zamanını göstermektedir. Verilen sisplatin konsantrasyonu µg/ml olarak grafikte belirtilmiştir. (*) ilgili konsantrasyonun kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir (p<0.05), (n=8).



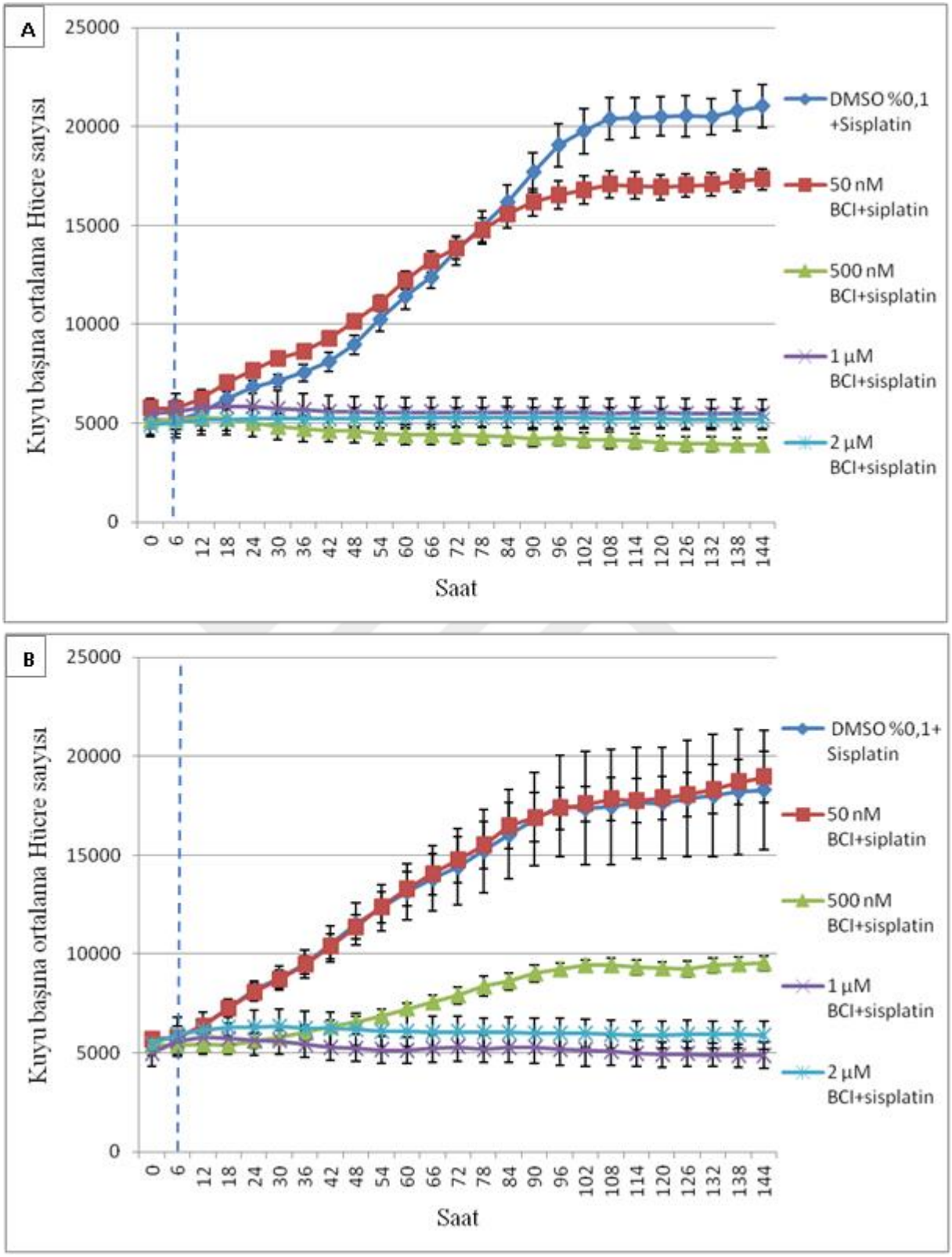
Şekil 6.14 *MDA-MB-231 kanser hücrelerinde 8 µg/ml sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi*

6.7 MDA-MB-231 Hücrelerinde BCI uygulaması sonrasında sisplatin duyarlılığının değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin CRISPR ile azaltılmasıyla görülen sisplatinin antiproliferatif etkisindeki artışın bu proteinin kimyasal bir ajanla inhibe edilmesi sonrasında da görülüp görülmeyeceği incelendi. Bunun için Dusp1/6 enzim inhibitörü olan BCI ajanı kullanıldı. 96'lık plakalara kontrol hücreleri ve DUSP1-CRISPR hücreleri ekildikten sonra 50 nM, 500 nM, 1 μM ve 2μM konsantrasyonundaki BCI ve 0,05 μg/ml sisplatin besi yerine eklenerek hücreler 6 gün boyunca izlendi. 50 nM BCI'nın tek başına verilmesinin Kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna bir etkisi olmazken (Şekil 6.7), sisplatin ile beraber verildiğinde, sisplatinin antiproliferatif etkisini artırdığı görüldü (Şekil 6.15-tablo3). Bu etki DUSP1-CRISPR hücrelerinde görülmedi (Şekil 6.15).

İkiye Katlanma Zamanı (saat)		BCI konsantrasyonu (nM)		
		0 nM BCI + Sisplatin 0,05 μg/ml (*)	50 nM BCI + Sisplatin 0,05 μg/ml	500 nM BCI + Sisplatin 0,05 μg/ml (*)
	Kontrol (ortalama±standart hata)	46,7±1,6	56,9±2,1	-
	Dusp1 (ortalama±standart hata)	55,8±1,8	55,1±1,5	107,1±4,2
	p değeri	$p<0.05$	$p>0.05$	$p<0.05$

Tablo 3. *MDA-MB231 kanser hücrelerinde sisplatin ve BCI'nın ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin tablo olarak gösterimi.* (*) ilgili konsantrasyonun kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir ($p<0.05$)



Şekil 6.15 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde BCI ve sisplatinin antiproliferatif etkinsin değerlendirilmesi*

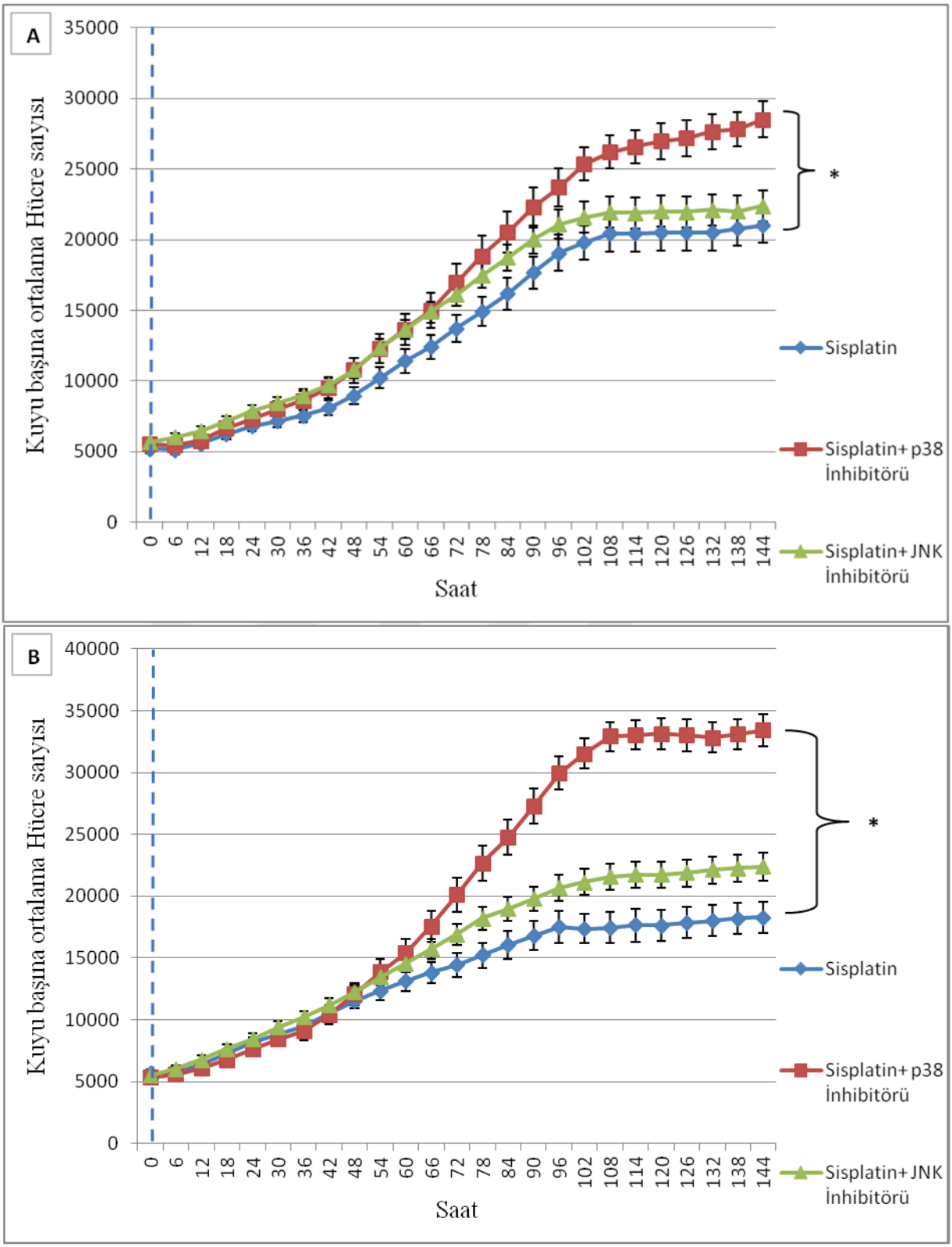
BCI ve sisplatinin proliferasyona etkisi incelenmiştir. BCI ve 0,05 µg/ml sisplatinin verilme zamanı mavi çizgi ile gösterilmiştir. A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini B.) DUSP1 CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini göstermektedir. (n=8)

6.8 MDA-MB-231 Hücrelerinde JNK ve p38 inhibitörleri uygulaması sonrasında sisplatin duyarlılığının değerlendirilmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin ifadesinin azaltılmasının sonucunda hücrelerin Sisplatin yanıtlarının, JNK ve p38 inhibitörleri ile nasıl değiştiği incelendi. 0,05 µg/ml sisplatin varlığında hücrelere p38 inhibitörü olarak 1 µM SB202190, JNK inhibitörü olarak 1 µM SP600125 uygulandı ve hücreler 6 gün boyunca izlendi (Şekil 6.16). Deney sonucunda elde edilen ikiye katlanma zamanları tablo 4'te gösterilmiştir. Yapılan deneyde p38 inhibitörü olan SB202190'un sisplatin ile birlikte verildiğinde her iki grupta da ikiye katlanma zamanını azalttığı görülmüştür. Sisplatin varlığında hücrelerin ulaştığı maksimum hücre sayısına bakıldığında, p38 inhibitörü olan SB202190'un her iki grupta da maksimum hücre miktarını artırdığı görülmüştür. DUSP1-CRISPR hücrelerinde bu artışın daha fazla olduğu izlenmektedir (Şekil 6.17).

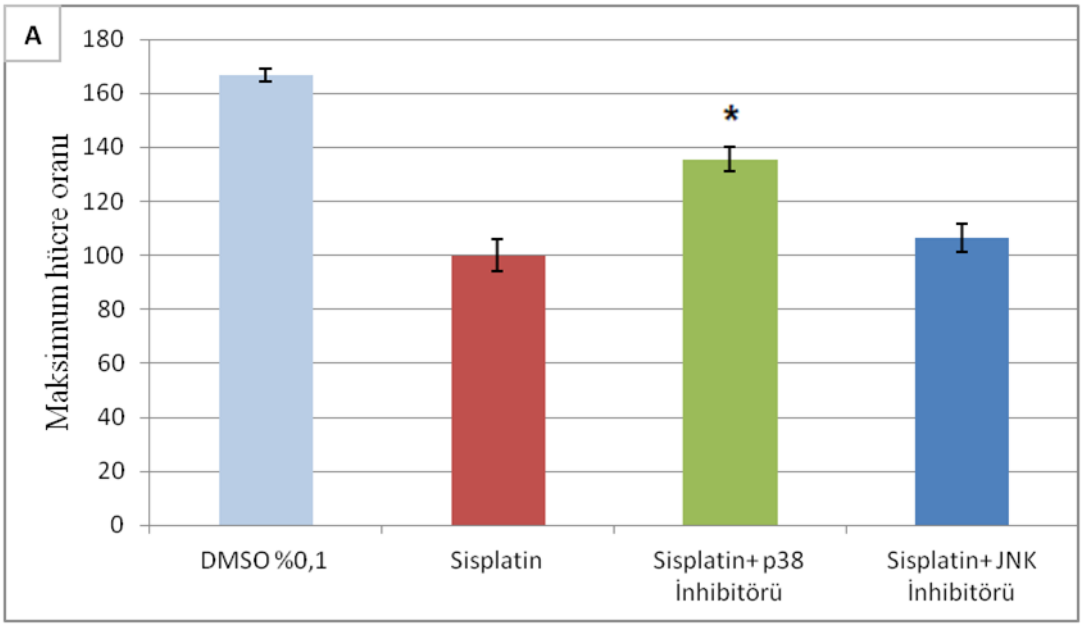
İkiye Katlanma Zamanı (saat)				
		DMSO %0,1 (*) +Sisplatin 0,05 µg/ml	SB202190 + Sisplatin 0,05 µg/ml	SP600125 + Sisplatin 0,05 µg/ml
	Kontrol (ortalama±standart hata)	48,0±1,8	41,1±1,9	49,2±2,0
	Dusp1 (ortalama±standart hata)	55,8±1,8	37,1±1,5	50,5±2,1
	p değeri	$p<0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$

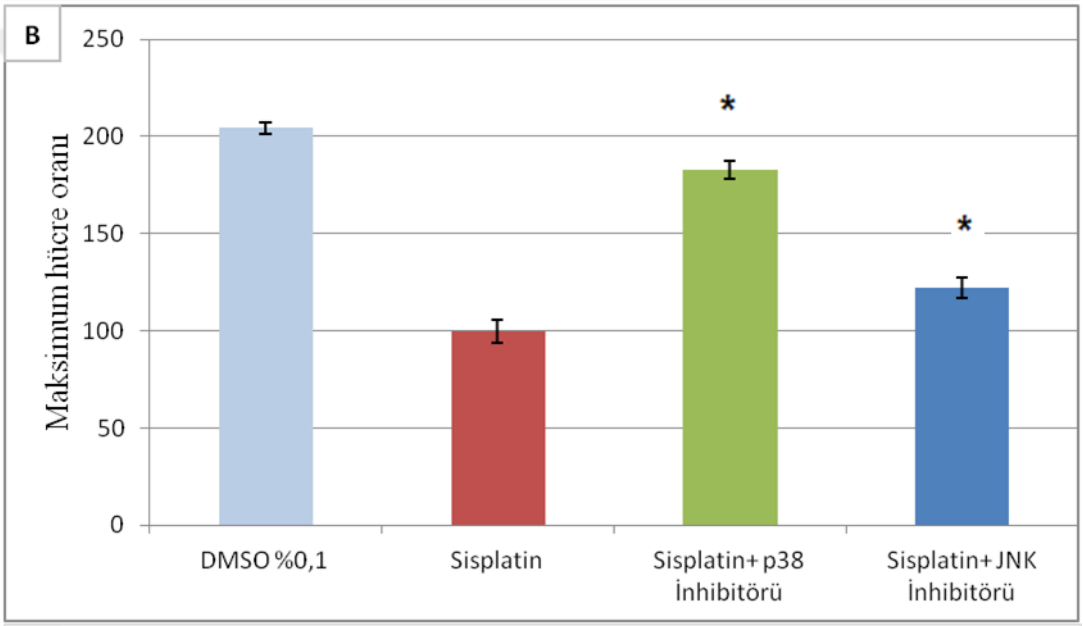
Tablo 4. *MDA-MB231 kanser hücrelerinde SB202190 ve SP600125'un ikiye katlanma zamanı üzerine etkisinin tablo olarak gösterimi.* (*) ilgili ajanın kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir ($p<0.05$)

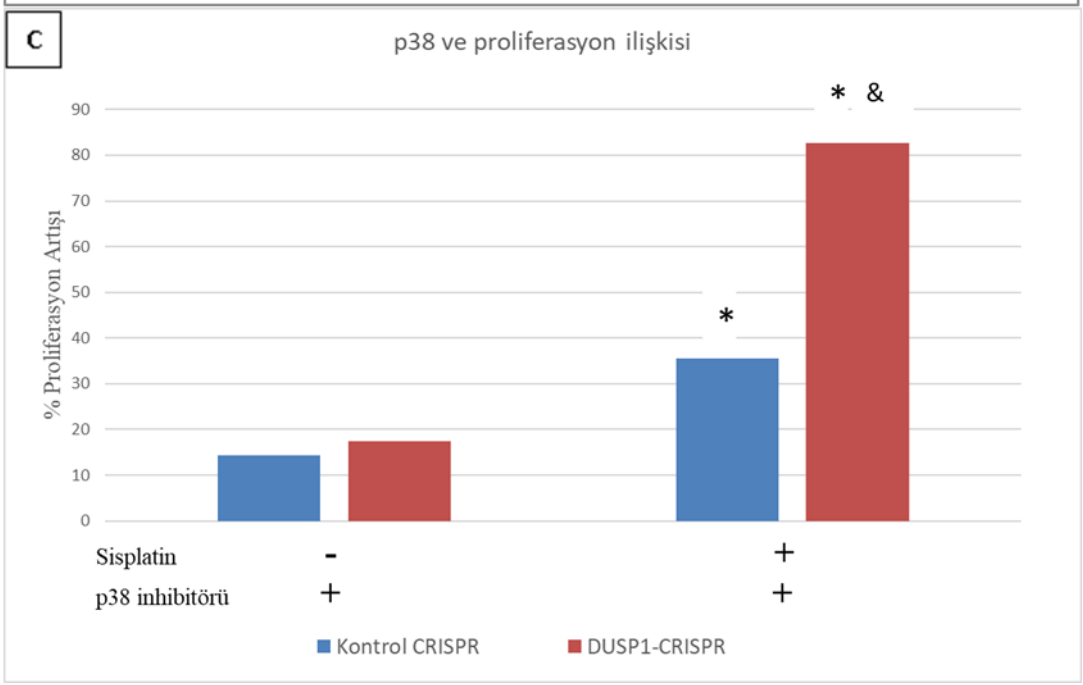


Şekil 6.16 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında p38 ve JNK inhibitörleri ve sisplatinin proliferasyona etkisinin değerlendirilmesi*

0,05 µg/ml Sisplatin, 1 µM SB202190 (p38 inhibitörü) ve 1 µM SP600125 (JNK inhibitörü) ajanlarının proliferasyona olan etkisi incelenmiştir. İlaç verilme zamanı mavi çizgi ile gösterilmiştir A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini B.) DUSP1 CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin zaman-hücre sayısı grafiğini göstermektedir. (*) ilgili ilacın, sadece sisplatin verilmiş grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir (p<0.05), (n=8)


A
Maksimum hücre oranı
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
DMSO %0,1
Sisplatin
Sisplatin+ p38 İnhibitörü
Sisplatin+ JNK İnhibitörü


B
Maksimum hücre oranı
250
200
150
100
50
0
*
*
DMSO %0,1
Sisplatin
Sisplatin+ p38 İnhibitörü
Sisplatin+ JNK İnhibitörü


C
p38 ve proliferasyon ilişkisi
% Proliferasyon Artışı
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
* &
*
Sisplatin - +
p38 inhibitörü + +
Kontrol CRISPR
DUSP1-CRISPR

Şekil 6.17 *MDA-MB231 kanser hücrelerinde DUSP1 CRISPR uygulaması sonrasında Sisplatin, p38 inhibitörü ve JNK inhibitörünün Maksimum hücre sayısına etkisi*

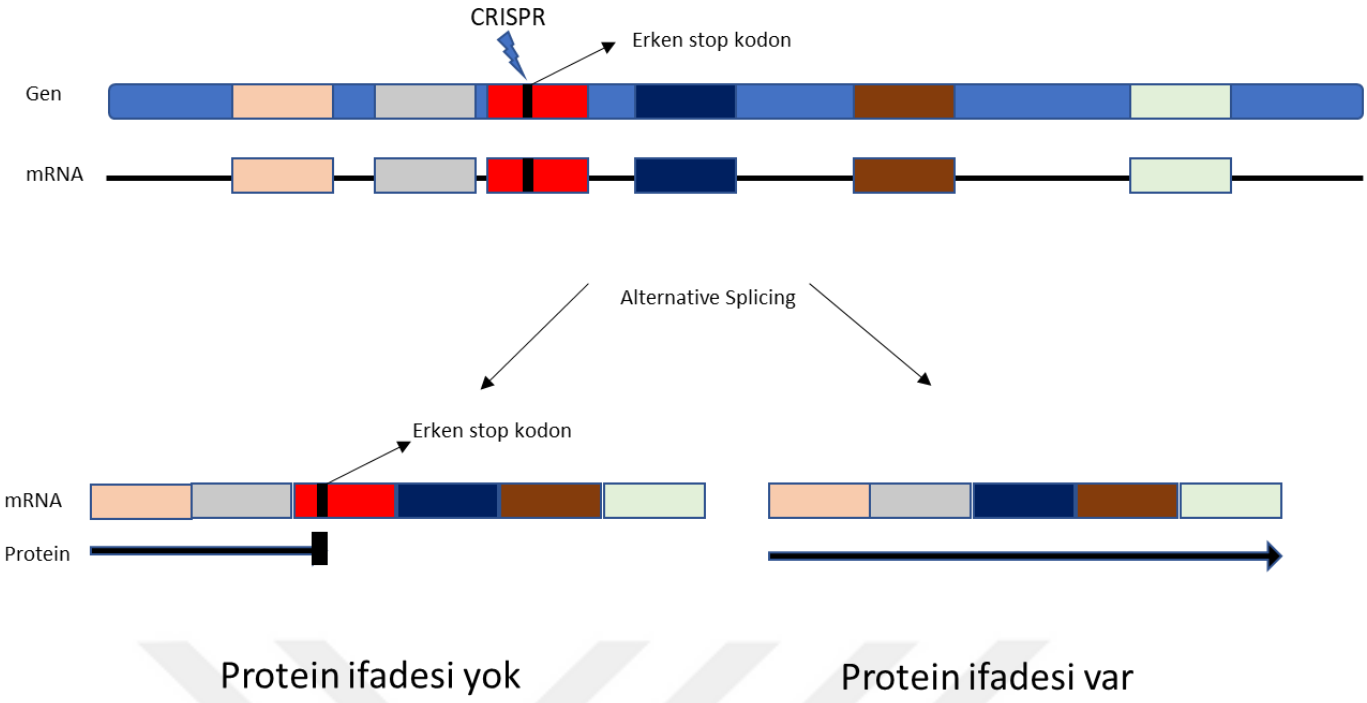
Hücrelerde, 0,05 µg/ml sisplatin varlığında 1 µM SB202190 (p38 inhibitörü) ve 1 µM SP600125 (JNK inhibitörü) ajanlarının Maksimum hücre sayısına etkisi incelenmiştir. İnhibitör ve sisplatin verilen hücrelerin ulaştığı maksimum hücre sayısı, ilgili hücrenin sadece sisplatin grubunun maksimum hücre sayısına oranlanmıştır. A.) Kontrol CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin oranını B.) DUSP1 CRISPR MDA-MB231 hücrelerinin oranını göstermektedir. B.) Proliferasyon artışının yüzde olarak karşılaştırılması. (*) ilgili inhibitörün sadece sisplatin verilmiş kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkını göstermektedir. (&) sisplatin ve p38 inhibitörünün beraber verildiğinde kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0.05$), (n=8)

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde DUSP1 proteininin hücre proliferasyonu ve hücre göçüne etkileri değerlendirilmiştir. DUSP1 proteini farklı kanser tiplerinde farklı etkiler göstermektedir. Prostat, over, pankreas ve meme kanserinde karsinogenezi artırırken, hepatoselüler karsinom ve Skuamöz hücreli deri karsinomunda karsinogenezi azaltmaktadır (7). Literatürdeki meme kanseri üzerindeki çalışmalar DUSP1 ifadesinin artışının daha yüksek tümör derecesine ve daha kötü prognoza yol açtığını göstermektedir (10). Ayrıca meme kanserinde görülebilen kemoterapi direncinde rol oynayabileceği düşünülmektedir(5,9). Bu çalışmanın amacı DUSP1 proteininin meme kanseri üzerindeki etkilerini daha iyi anlayabilmek ve bu etkilerin olası mekanizmaları hakkında fikir sahibi olmaktır. Ayrıca bu enzimin antikanser etkinlik açısından hedef olup olmayacağını açıklığa kavuşturmaktır.

CRISPR UYGULAMASI SONRASINDA DUSP1 İFADESİNDEKİ DEĞİŞİMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MDA-MB-231 hücrelerinde CRISPR işlemi sonrasında DUSP1 proteini miktarında yaklaşık %60'lık bir azalma görüldü (Şekil 6.2). CRISPR işlemi DUSP1 geninde çerçeve kayması mutasyonu oluşturarak translasyon sırasında erken stop kodonu oluşturmaktadır. Bu sayede protein sentezini engellemektedir. CRISPR uygulaması sonrasında ilgili genin ifade seviyesi değişiklik gösterebilmektedir. Bazı genlerin ifadesi tamamen susturulabilirken bazı genlerin CRISPR sonrasında ifade edilebildiği görülebilmektedir. Yapılan çalışmalar bu durumun "alternative splicing" kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir(56). Bizim çalışmamızda gördüğümüz rezidüel DUSP1 ifadesinin nedeni olarak bu hücresel mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir.



Şekil 7.1 Alternative Splicing işleminin şematik gösterimi

Hücredeki protein ifadesinin azalması, aynı zamanda protein aktivitesinin de azaldığı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle protein ifadesinin azalışının fonksiyonel olup olmadığını ayrıca değerlendirmek gerekmektedir. DUSP1 proteininin hedefi olan MAPK proteinlerinin ifade düzeylerine baktığımızda, bu proteinlerin bu ifade paternlerindeki değişimin DUSP1 proteininin azalması ile uyumlu olduğu görülmektedir (şekil 6.3-4). Ek olarak DUSP1 fosforilasyonu bu enzimin aktivitesi ile ilişkilidir ve CRISPR/Cas9 uygulaması ile DUSP1 fosforilasyonu da belirgin olarak azalmıştır (Şekil 6.2). Bu bulgular bize CRISPR/Cas9 uygulaması sonrasında DUSP1 proteini aktivitesinin fonksiyonel olarak azaldığını göstermektedir.

MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE DUSP1 CRISPR/CAS9 UYGULAMASI SONRASINDA MAPK PROTEİNİ İFADELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DUSP1 proteini MAPK ailesindeki proteinlerin hem treonin hem de tirozin rezidülerini defosforile ederek inaktive eden bir fosfatazdır. CRISPR/Cas9 işlemi sonrasında hücrelerde DUSP1 ifadesi ve aktivitesi azalmaktadır (Şekil 6.2). DUSP1 aktivitesinin azalması sonucunda hücrede beklenen değişim, fosfatazın hedef proteinlerinin fosforile formlarının total formlarına oranının artması olarak öngörülebilir. Çalışmamızda fosforile/total oranındaki artma JNK (Şekil 6.3) ve p38 (Şekil 6.4) proteinlerinde gözlemlenirken ERK (Şekil 6.5) proteininde tespit edilmemiştir. DUSP1 proteininin hedef

seçiciliğinin p34,JNK>ERK şeklinde olması göz önüne alındığında bulduğumuz sonuç literatür ile uyumludur(31).

DUSP1 proteini üzerinde siRNA kullanılarak yapılan çalışmalarda fosforile/total oranının arttığı gözlenmektedir. siRNA kullanılan deneylerde bu oran fosforile formun artması sonucunda gözlenirken, çalışmamızda biz bu orandaki artışın total formdaki azalma ile kendini gösterdiğini gözlemledik. 1-3 gün arasında değişen sürelerde protein ifadesini azaltan siRNA uygulaması ile protein ifadesinin kalıcı olarak azaltıldığı CRISPR/Cas9 uygulaması arasında çeşitli proteinlerin ifadesi farklılık gösterebilmektedir. Literatürde CRISPR uygulaması sonrasında hücrelerin gösterdiği cevabın siRNA uygulamasından farklı olabileceğini gösteren yayınlar mevcuttur (56–59). Bunun nedeninin CRISPR uygulamasının kalıcı olarak protein ifadesini azaltması ve hücrenin bu kalıcı duruma karşı verdikleri adaptif yanıt olduğu düşünülmektedir.

DUSP1-CRISPR UYGULAMASI SONRASINDA HÜCRE PROLİFERASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

DUSP1-CRISPR uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna olan etkisini incelendiğinde hücre çoğalmasının azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlara uygun olarak laboratuvarlarımızda Dusp1 siRNA kullanılarak yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar görülmüştür. Ayrıca DUSP1/6 inhibitörü olan BCI kullanılmış ve BCI 500nM ve üstü konsantrasyonlarda antiproliferatif etki oluşturmuştur (Şekil 6.7). BCI'nın antiproliferatif etkisi daha önce yayınlanan çalışmaların sonuçları ile uyumludur (60,61). Tüm bu sonuçlar MDA-MB231 hücrelerinde DUSP1 inhibisyonunun antikanser etkinlik gösterebileceği yönündedir.

Tablo 1'deki İkiye katlanma zamanlarındaki değişime baktığımızda BCI'nın antiproliferatif etkisinin DUSP1-CRISPR hücrelerinde daha az olduğu görülmüştür. Bu sonuç, DUSP1 miktarının ve aktivitesinin CRISPR/cas9 uygulanan hücrelerde daha az olması ve bu doğrultuda BCI ile DUSP1 inhibisyonunun daha az olması ile açıklanabilir.

DUSP1-CRISPR UYGULAMASI SONRASINDA HÜCRE GÖÇÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hücre göçü, kemoatraktan sinyalin hücreye ulaşması, bu sinyalin işlenmesi, hücrenin adezyonu, hücre iskeletindeki dinamik değişikliklerin rol oynadığı ve hücre hareketliliğinde önemli olan karmaşık bir süreçtir. Kanser hücrelerinin metastazında hücre göçü önemli bir rol oynamaktadır. Kansere bağlı ölümlerin %90'ı metastatik yayılıma bağlanmaktadır (62,63). Çalışmamızda hücre göçü hem "transwell migration assay" hem de yara iyileşmesi deneyleri

ile incelenmiştir. “transwell migration assay” sonucunda DUSP1-CRISPR uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunu azalttığı görülmüştür (Şekil 6.9). Transwell migration assay deneyi hücrelerin kemotaksis kapasitelerini incelemek için kullanılmaktadır. Yara iyileşmesi deneyinde hesaplanan yara kapanma süresi ise hem hücre proliferasyonu hem de hücre göçünün birlikte olduğu bir süreci göstermektedir. Çalışmamızda DUSP1-CRISPR hücrelerinde yara iyileşmesinin yavaşladığı görüldü (Şekil 6.8). Proliferasyon ve hücre göçü deneyleri birlikte değerlendirildiğinde, DUSP1 proteininin azalması hücrelerin büyüme ve göç kapasitelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Literatürde DUSP1 aktivitesinin metastatik kanserlerde arttığı gösterilmiştir dolayısıyla bu bulgu bizim çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur (38,61,64,65).

MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE DUSP1-CRISPR/CAS9 UYGULAMASI SONRASINDA p38 ve JNK İNHİBİTÖRLERİNE YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bir fosfataz olan DUSP1 proteininin hücresel etkilerini MAPK proteinleri üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. DUSP1 proteini JNK, p38 ve ERK aileleri üzerinde fosfataz aktivitesi göstermektedir. Hedef seçiciliği açısından değerlendirildiğinde DUSP1 proteininin JNK ve p38 aileleri üzerindeki etkileri daha belirgindir(4,31).

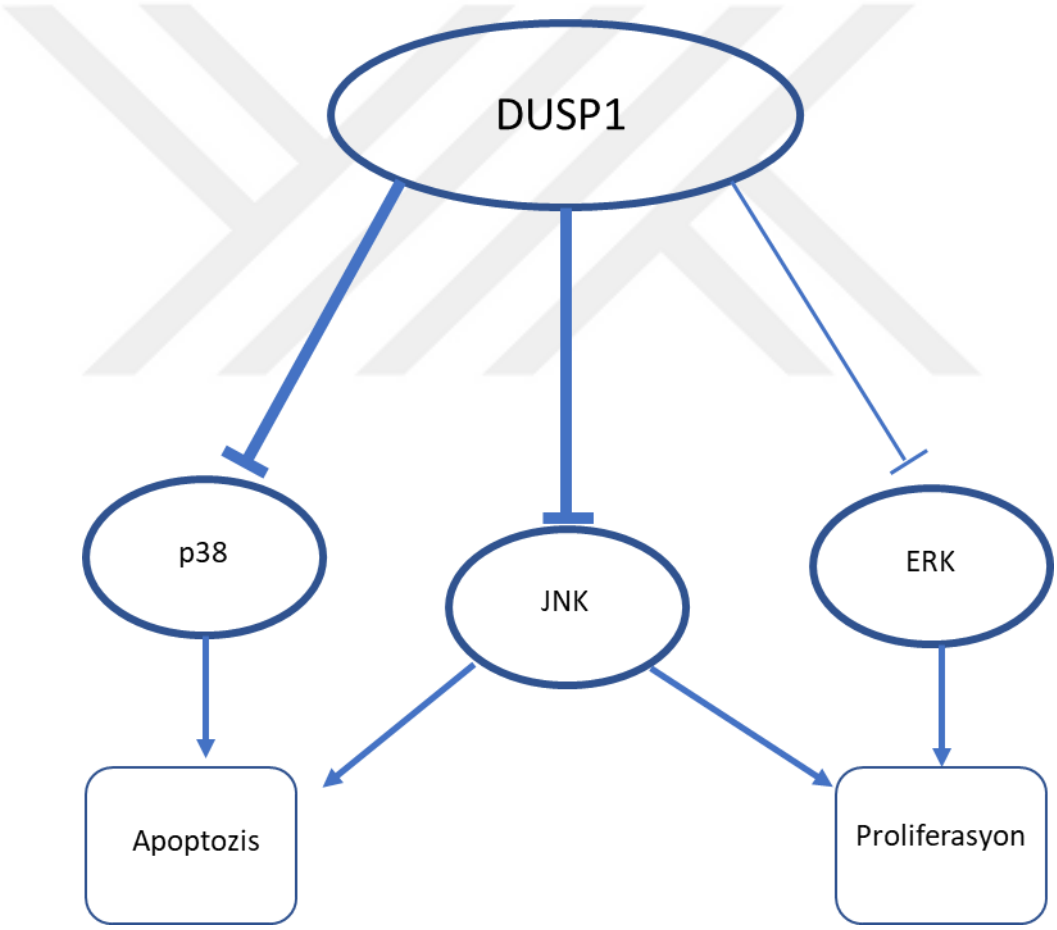
ERK ailesi, JNK ailesi ve p38 ailesi MAPK proteinlerine dahil olup hücre büyümesi, mitoz bölünme, apoptozis gibi birçok hayati hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu proteinlerin aktivasyonu sonucunda oluşan hücresel değişiklikler değerlendirildiğinde, ERK aktivasyonu sonucunda genellikle hücre büyümesi ve proliferasyon artışı görülmektedir. p38 aktivitesi sonucunda genellikle mitoz bölünmenin durması ve apoptozis görülürken JNK aktivitesi sonrasında hem proliferatif hem de antiproliferatif sinyaller görülebilmektedir (Şekil 7.2). p38 proteini aktivasyonu sonucunda Bcl-2 ve p53 gibi proteinler aktive olarak apoptozisi tetikleyebilmektedir. Ayrıca p21 proteini üzerinden hücre döngüsünü G1-S fazında durdurabilmektedir. JNK proteini Hem Ras yolağı üzerinden proliferatif sinyaller hem de kaspaz aktivasyonu ile apoptotik sinyaller oluşturabilmektedir (18,66,67). Çalışmamızda bu proteinlerin inhibitörleri kullanılarak hücre proliferasyonuna olan etkilerinin DUSP1 proteininin ifadesinin azalması ile nasıl değiştiği incelenmiştir.

Çalışmamızda p38 inhibitörü olarak 1 μM SB202190, JNK inhibitörü 1 μM olarak SP600125 kullanılmıştır. Proliferasyon deneylerinde p38 inhibitörünün hem kontrol hücrelerinde hem de DUSP1-CRISPR hücrelerinde maksimum hücre miktarını artırdığı görülmüştür. (Şekil 6.10). Bu artış kontrol hücrelerinde yaklaşık %17, DUSP1-CRISPR

hücrelerinde yaklaşık %14 olarak hesaplanmıştır. Bu durumun, p38 proteininin yukarıda bahsedilen işlevlerinin p38 inhibitörü ile engellenmesi sonucunda olduğu düşünülmektedir.

Literatürde p38 inhibitörleri kullanılan çalışmalara baktığımızda, p38 inhibitörlerinin proliferasyonu artırıcı etkileri görülmektedir(68). Bu proliferasyonu artırıcı etki 1-5 µM konsantrasyonlarında görülürken 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda antiproliferatif etki görülmektedir. Kullanılan SB202190 kimyasalının IC_{50} değeri (p38α: 50 nM p38β: 100 nM) göz önüne alındığı zaman yüksek konsantrasyonlarda görülen bu antiproliferatif etkinin SB202190'ın non-selektif etkileşimleri nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Özet olarak bizim sonuçlarımız ve literatür sonuçları, p38 protein aktivitesinde artışın MDA-MB-231 hücrelerinde antikanser etkinlik oluşturabileceği ve bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin/ azalmasının kanser proliferasyonunu artırabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.2 DUSP1 proteini MAPK proteinlerinin aktivitesini düzenleyerek proliferasyon ve apoptozis sinyallerine yol açabilir.

MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE CRISPR/CAS9 UYGULAMASI SONRASINDA SİSPLATİN DUYARLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sisplatin, Meme kanseri üzerine yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötiktir (69–71). Sisplatin sitotoksik etkisini DNA'daki pürin bazlarına bağlanarak göstermektedir. Bu sayede DNA onarımını ve replikasyonunu engeller ve hücrelerde apoptozisi tetikler (72).

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde 0,1 μg/ml ve üzerindeki sisplatin konsantrasyonlarında antiproliferatif etki görülmektedir (Şekil 6.12). Hücrelerin ikiye katlanma zamanındaki değişim incelendiğinde, aynı konsantrasyondaki sisplatinin DUSP1-CRISPR hücrelerinin ikiye katlanma zamanını daha fazla artırdığı ve bu hücrelerin maksimum hücre sayısını daha fazla azalttığı görülmektedir (Şekil 6.13-14). Benzer şekilde DUSP1 aktivitesini BCI ile azalttığımızda da sisplatinin etkisinde artış görmekteyiz (Şekil 6.15). Bu iki sonuç beraber değerlendirildiğinde, CRISPR işlemi sonrasında hücrelerin sisplatine daha duyarlı hale gelmesinin nedeninin CRISPR işlemi sonrasında ortaya çıkan bir yan sonuç (off-target effect) olmadığını, bu durumun DUSP1 düzeyinin azalması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu konuda literatürdeki çalışmalara baktığımızda: DUSP1 ifadesinin artışının çeşitli kemoterapötiklere direnç gelişimine yol açtığına dair olan çalışmalar (8,73,74) ve DUSP1 ifadesinin azalmasının kemoterapi duyarlılığına yol açtığı çalışmalar (5,44) bize bu proteinin kemoterapi duyarlılığında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. DUSP1 proteini ve kemoterapi cevabı arasındaki ilişkinin MAPK ailesi aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda yaptığımız Western Blot sonuçlarında ERK proteini ifadesinde bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 6.5). JNK ve p38 proteinlerinin ifadelerinde değişiklik görülmüştür (şekil 6.3-4). Dolayısıyla DUSP1 proteini ifadesinin azalması ile görülen sisplatin duyarlılığının ERK proteini ile ilişkili değil de daha çok p38 ve JNK proteinleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

50 nM BCI'nın hücre proliferasyonuna bir etkisi olmadığı şekil 6.7'de görülmektedir. Kontrol hücrelerinde 50 nM BCI, sisplatinle beraber verildiğinde sisplatinin etkisini artırmaktadır (şekil 6.15). Kontrol hücrelerinde görülen 50 nM BCI ve sisplatinin sinerjik etkisi DUSP1-CRISPR hücrelerinde görülmemiştir ve 500 nM BCI ve sisplatinin birlikte verildiği durumda DUSP1-CRISPR hücrelerinin daha az öldüğü şekil 6.15 ve tablo-3'te görülmektedir. Bu sonucun sisplatin duyarlılığındaki değişmeden kaynaklanmadığı, DUSP1-CRISPR hücrelerinde DUSP1 düzeyindeki azalmaya bağlı olarak BCI'nın antiproliferatif etkisinin daha az olması (Şekil 6.7) nedeniyle karşımıza çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca CRISPR uygulaması protein ifadesini kalıcı olarak azaltmaktadır. Bu durum protein aktivitesini kimyasal ajanlar ile engellemekten daha farklı adaptif fenotipik değişikliklere yol açabilmektedir (57–59,75).

1 μM ve 2 μM BCI konsantrasyonlarında hücre büyümesi tamamen durduğu için BCI'nın bu konsantrasyonlardaki etkileri hakkında yorum yapılamamaktadır. Her iki hücre grubunda da proliferasyonun tamamen durması BCI'nın bu konsantrasyonlardaki antiproliferatif etkisinin DUSP1 inhibisyonundan farklı olarak nonspesifik toksik etkiler ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (76).

MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE JNK VE P38 İNHİBİTÖRLERİ UYGULAMASI SONRASINDA SİSPLATİN DUYARLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sisplatinin hücrelerde JNK ve p38 proteinlerinin aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalar bu proteinlerin sisplatinin antiproliferatif etkilerinden sorumlu bir mekanizmada rol oynayabileceğini düşündürmektedir (77,78). Sisplatin ve p38 proteininin ilişkisi çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (43,70–72). Apoptozisin tetiklenmesinin p38 proteini ile yakın ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada çeşitli hücre hatlarında sisplatin, doksorubisin ve paklitaksel kemoterapötiklerinin ve uv radyasyonun etkisi incelenmiştir. Sisplatin tüm hücre hatlarında p-p38 miktarını artırırken diğer ajanlarda bu etki görülmemiştir. Hücrelere p38 inhibitörü verilmesinin sisplatin direncine yol açtığı görülmüştür (77). Ayrıca p38 inhibitörleri sisplatinin nefrotoksik etkilerini de azaltmaktadır (79). Tüm bu çalışmalar sisplatinin antiproliferatif etkisini göstermesinde p38 proteininin önemli rolünün olduğunu düşündürmektedir. Bu durumu daha iyi anlayabilmek için MDA-MB-231 hücrelerine ilgili proteinlerin inhibitörlerini sisplatin ile birlikte vererek hücre proliferasyonunun nasıl değiştiği incelenmiştir.

p38 inhibitörü olan SB202190 sisplatinle beraber verildiği zaman proliferasyonu artırıcı bir etki göstermiş ve sisplatinin etkinliğini azaltmıştır (Şekil 6.16-Tablo 4). Maksimum hücre sayıları incelendiğinde bu etkinin DUSP1-CRISPR hücrelerinde daha fazla olduğu görülmektedir. Şekil 6.17 incelendiğinde Kontrol hücrelerinde, p38 inhibitörünü maksimum hücre sayısını yaklaşık olarak %35 artırırken DUSP1-CRISPR hücrelerinde yaklaşık %80 artırmaktadır. Artışlar arasındaki bu fark p38 inhibitörünün tek başına verildiği zaman görülmemiştir (Şekil 6.10). Bu durum DUSP1-CRISPR uygulaması sonrasında görülen sisplatin etkisindeki artışın p38 proteini üzerinden olabileceğini düşündürmektedir.

Hücrelerdeki DUSP1 proteini ifadesi sıcak, UV radyasyon, oksidatif stress, kemoterapötik ilaçlar gibi çeşitli hücresel stres faktörleri ile indüklenebilmektedir (3,80,81). Bu sonuçlar bize DUSP1-CRISPR hücrelerinde gördüğümüz sisplatinin etkisindeki artışının nedeninin DUSP1 proteininin bu hücrelerde stress durumunda yeterince ifade edilememesi ve

bunun sonucu olarak p38 aktivitesini baskılayamaması olabileceğini ve dolayısıyla DUSP1 proteini aktivitesindeki azalmanın p38 aracılığı ile antiproliferatif etkinlik gösterebileceği ve bu etkinin p38 inhibisyonu ile engellenebileceğini düşündürmektedir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 ifadesinin azaltılmasının hücre hareketliliğini ve proliferasyonunu azaltarak antikanser etki oluşturduğu görülmektedir. DUSP1 ifadesinin azaltılması ve sisplatin arasındaki ilişki ayrıntılı bir incelemeyi hak etmektedir. Bu ilişkide p38 proteininin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılacak olan çalışmalar ile DUSP1, p38 ve sisplatin arasındaki ilişkinin aydınlatılmaya çalışılabilir. DUSP1 proteini, kanserlerde kemoterapi direnci gelişiminin önlenmesi için umut vadeden bir hedef protein olarak gözükmektedir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu tez çalışmasında MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin CRISPR/Cas9 uygulaması ile ifadesinin azaltılmasının, hücreler üzerinde antiproliferatif etkileri olduğu izlenmiştir.

2. MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin ifadesinin azaltılmasının, bu hücrelerde sisplatinin antiproliferatif etkisinde artışa yol açtığı gözlenmiştir.

3. MDA-MB-231 hücrelerinde DUSP1 proteininin BCI ajanı ile inhibe edilmesi sonucunda hücrelerde sisplatinin antiproliferatif etkisinde artışa yol açtığı gözlenmiştir.

4. DUSP1-CRISPR uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde BCI'nın antiproliferatif etkisini azalttığı gözlenmiştir.

5. DUSP1-CRISPR uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinin motilitelerini azalttığı gösterilmiştir.

6. p38 inhibitörü olan SB202190 ajanının MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir.

7. DUSP1-CRISPR uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde JNK ve p38 proteinlerinin fosforile protein/total protein oranını artırdığı görülmüştür.

9. KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May 4;71(3):209–49.
2. Yersal O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World J Clin Oncol. 2014;5(3):412.
3. Lawan A, Shi H, Gatzke F, Bennett AM. Diversity and specificity of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 functions. Cellular and Molecular Life Sciences. 2013 Jan 14;70(2):223–37.
4. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. Cancer and Metastasis Reviews [Internet]. 2008 Jun 11 [cited 2023 Feb 28];27(2):253–61. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-008-9123-1
5. Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Is a Mediator of Breast Cancer Chemoresistance. Cancer Res [Internet]. 2007 May 1 [cited 2023 Feb 28];67(9):4459–66. Available from: https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/9/4459/534706/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Phosphatase-1-Is
6. Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TLJ, Visakorpi T. Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. Int J Cancer [Internet]. 2005 Dec 10 [cited 2023 Feb 28];117(5):738–45. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.21270
7. Shen J, Zhang Y, Yu H, Shen B, Liang Y, Jin R, et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy. Cancer Med [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Feb 28];5(8):2061. Available from: /pmc/articles/PMC4884638/
8. Candas D, Lu CL, Fan M, Chuang FYS, Sweeney C, Borowsky AD, et al. Mitochondrial MKP1 is a target for therapy-resistant HER2-positive breast cancer cells. Cancer Res [Internet]. 2014 Dec 12 [cited 2023 Mar 5];74(24):7498. Available from: /pmc/articles/PMC4267894/
9. Rincón R, Zazo S, Chamizo C, Manso R, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, et al. C-Jun N-terminal kinase inactivation by mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 determines resistance to taxanes and anthracyclines in breast cancer. Mol Cancer Ther [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Mar 5];15(11):2780–90. Available from:

https://aacrjournals.org/mct/article/15/11/2780/138024/c-Jun-N-Terminal-Kinase-Inactivation-by-Mitogen

10. Rojo F, González-Navarrete I, Bragado R, Dalmases A, Menéndez S, Cortes-Sempere M, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. Clinical Cancer Research [Internet]. 2009 May 15 [cited 2023 Mar 5];15(10):3530–9. Available from: https://aacrjournals.org/clincancerres/article/15/10/3530/73504/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Phosphatase-1-in
11. Bukhtoyarov O v, Samarin DM, Bukhtoyarov O v, Samarin DM. Pathogenesis of Cancer: Cancer Reparative Trap. J Cancer Ther [Internet]. 2015 [cited 2023 Feb 28];6:399–412. Available from: http://www.scirp.org/journal/jcthttp://dx.doi.org/10.4236/jct.2015.65043http://dx.doi.org/10.4236/jct.2015.65043http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
12. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Feb 28];71(1):7–33. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21654
13. Cancer Statistics - NCI [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics
14. Ekmektzoglou KA, Xanthos T, German V, Zografos GC. Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 28];145(1):3–8. Available from: /pmc/articles/PMC3997531/
15. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers. 2019 Sep 23;5(1):66.
16. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis. 2018 Jun;5(2):77–106.
17. Eliyatkin N, Yalcin E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. Journal of Breast Health. 2015 Apr 7;11(2):59–66.
18. Wei Z, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Research 2002 12:1 [Internet]. 2002 [cited 2023 Feb 28];12(1):9–18. Available from: https://www.nature.com/articles/7290105

19. Braicu, Buse, Busuioc, Drula, Gulei, Raduly, et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. Cancers (Basel). 2019 Oct 22;11(10):1618.
20. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). Exp Ther Med [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2023 Feb 28];19(3):1997–2007. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8454/abstract
21. Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. Cell Research 2005 15:1 [Internet]. 2005 [cited 2023 Feb 28];15(1):36–42. Available from: https://www.nature.com/articles/7290262
22. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. Science (1979) [Internet]. 2000 May 5 [cited 2023 Feb 28];288(5467):870–4. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.288.5467.870
23. Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003 Mar 4 [cited 2023 Feb 28];100(5):2432–7. Available from: https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0438011100
24. Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis. BioEssays [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2023 Feb 28];25(1):17–24. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.10204
25. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene 2007 26:22 [Internet]. 2007 May 14 [cited 2023 Feb 28];26(22):3279–90. Available from: https://www.nature.com/articles/1210421
26. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, et al. Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell [Internet]. 2003 Jan 24 [cited 2023 Feb 28];112(2):181–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12553907/
27. Li JP, Yang YX, Liu QL, Pan ST, He ZX, Zhang X, et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. Drug Des Devel Ther [Internet]. 2015 Mar 16 [cited 2023 Feb 28];9:1627. Available from: /pmc/articles/PMC4365748/
28. Molnár Á, Theodoras AM, Zon LI, Kyriakis JM. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring

p38/RK. J Biol Chem [Internet]. 1997 May 16 [cited 2023 Feb 28];272(20):13229–35. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9148940/

29. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. Microbiology and Molecular Biology Reviews [Internet]. 2004 Jun [cited 2023 Feb 28];68(2):320. Available from: /pmc/articles/PMC419926/
30. Haagenson KK, Wu GS. Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. Cancer Biol Ther [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2023 Mar 5];9(5):337–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20139719/
31. Franklin CC, Kraft AS. Conditional Expression of the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase MKP-1 Preferentially Inhibits p38 MAPK and Stress-activated Protein Kinase in U937 Cells. Journal of Biological Chemistry. 1997 Jul 4;272(27):16917–23.
32. Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. J Biol Chem [Internet]. 2001 May 11 [cited 2023 Feb 28];276(19):16491–500. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278799/
33. Kuwano Y, Kim HH, Abdelmohsen K, Rudolf Pullmann Jr, Martindale JL, Yang X, et al. MKP-1 mRNA Stabilization and Translational Control by RNA-Binding Proteins HuR and NF90. Mol Cell Biol [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2023 Feb 28];28(14):4562. Available from: /pmc/articles/PMC2447119/
34. Scimeca JC, Servant MJ, Dyer JO, Meloche S. Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression. Oncogene [Internet]. 1997 [cited 2023 Feb 28];15(6):717–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9264412/
35. Brondello JM, Pouysségur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. Science [Internet]. 1999 Dec 24 [cited 2023 Feb 28];286(5449):2514–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10617468/
36. Lin YW, Chuang SM, Yang JL. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. J Biol Chem [Internet]. 2003 Jun 13 [cited 2023 Feb 28];278(24):21534–41. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676937/

37. Kassel O, Sancono A, Krätzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato ACB. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. EMBO J [Internet]. 2001 Dec 17 [cited 2023 Feb 28];20(24):7108–16. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/emboj/20.24.7108
38. Moncho-Amor V, de Cáceres II, Bandres E, Martínez-Poveda B, Orgaz JL, Sánchez-Pérez I, et al. DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. Oncogene 2011 30:6 [Internet]. 2010 Oct 4 [cited 2023 Feb 28];30(6):668–78. Available from: https://www.nature.com/articles/onc2010449
39. Fan MK, Zhang GC, Chen W, Qi LL, Xie MF, Zhang YY, et al. Siglec-15 Promotes Tumor Progression in Osteosarcoma via DUSP1/MAPK Pathway. Front Oncol [Internet]. 2021 Jul 16 [cited 2023 Feb 28];11:710689. Available from: /pmc/articles/PMC8322944/
40. Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer [Internet]. 2002 Dec 10 [cited 2023 Feb 28];102(5):507–13. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.10746
41. Srikanth S, Franklin CC, Duke RC, Kraft AS. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. Mol Cell Biochem [Internet]. 1999 [cited 2023 Feb 28];199(1–2):169–78. Available from: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006980326855
42. Li M, Zhou JY, Ge Y, Matherly LH, Wu GS. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. J Biol Chem [Internet]. 2003 Oct 17 [cited 2023 Feb 28];278(42):41059–68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12890671/
43. Sánchez-Pérez I, Martínez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. Oncogene 2000 19:45 [Internet]. 2000 Oct 26 [cited 2023 Feb 28];19(45):5142–52. Available from: https://www.nature.com/articles/1203887
44. Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-García C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. Oncogene 2006 25:23 [Internet]. 2006 Feb 6 [cited 2023 Feb 28];25(23):3335–45. Available from: https://www.nature.com/articles/1209364

45. Liu F, Gore AJ, Wilson JL, Korc M. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. PLoS One [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2023 Feb 28];9(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24409315/
46. Lane R, Cilibrasi C, Chen J, Shah K, Messuti E, Mazarakis NK, et al. PDGF-R inhibition induces glioblastoma cell differentiation via DUSP1/p38MAPK signalling. Oncogene 2022 41:19 [Internet]. 2022 Apr 7 [cited 2023 Feb 28];41(19):2749–63. Available from: https://www.nature.com/articles/s41388-022-02294-x
47. Franklin CC, Srikanth S, Kraft AS. Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1998 Mar 17 [cited 2023 Feb 28];95(6):3014–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9501207/
48. Staples CJ, Owens DM, Maier J v., Cato ACB, Keyse SM. Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. J Biol Chem [Internet]. 2010 Aug 20 [cited 2023 Feb 28];285(34):25928–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20547488/
49. Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, et al. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. J Biol Chem [Internet]. 2000 Jan 7 [cited 2023 Feb 28];275(1):322–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10617621/
50. Sharma AK, Khan SA, Sharda A, Reddy D v., Gupta S. MKP1 phosphatase mediates G1-specific dephosphorylation of H3Serine10P in response to DNA damage. Mutat Res [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Feb 28];778:71–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111828/
51. Hou MF, Chang CW, Chen FM, Wang SN, Yang SF, Chen PH, et al. Decreased total MKP-1 protein levels predict poor prognosis in breast cancer. World J Surg [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2023 Mar 5];36(8):1922–32. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00268-012-1608-y
52. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2023 Mar 5];157(6):1262. Available from: /pmc/articles/PMC4343198/
53. Santa Cruz Biotechnology I. CRISPR / Cas9 KO Plasmid and HDR Plasmid Transfection protocol.
54. Caenepeel S, Cooke K, Wadsworth S, Huang G, Robert L, Moreno BH, et al. MAPK pathway inhibition induces MET and GAB1 levels, priming BRAF mutant melanoma

for rescue by hepatocyte growth factor. Oncotarget [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2023 Mar 5];8(11):17795. Available from: /pmc/articles/PMC5392287/

55. Lee MS, Youn C, Kim JH, Park BJ, Ahn J, Hong S, et al. Enhanced Cell Growth of Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemically-Defined Serum-Free Media. International Journal of Molecular Sciences 2017, Vol 18, Page 1779 [Internet]. 2017 Aug 16 [cited 2023 Mar 5];18(8):1779. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1779/htm

56. Smits AH, Ziebell F, Joberty G, Zinn N, Mueller WF, Clauder-Münster S, et al. Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. Nature Methods 2019 16:11 [Internet]. 2019 Oct 28 [cited 2023 Mar 5];16(11):1087–93. Available from: https://www.nature.com/articles/s41592-019-0614-5

57. Peretz L, Besser E, Hajbi R, Casden N, Ziv D, Kronenberg N, et al. Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. Sci Rep [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Mar 5];8(1). Available from: /pmc/articles/PMC5758708/

58. Morgens DW, Deans RM, Li A, Bassik MC. Systematic comparison of CRISPR-Cas9 and RNAi screens for essential genes. Nat Biotechnol [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Mar 5];34(6):634. Available from: /pmc/articles/PMC4900911/

59. Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, vanImpel A, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. Dev Cell [Internet]. 2015 [cited 2023 Mar 5];32(1):97–108. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533206/

60. Benito-León M, Gil-Redondo JC, Perez-Sen R, Delicado EG, Ortega F, Gomez-Villafuertes R. BCI, an inhibitor of the DUSP1 and DUSP6 dual specificity phosphatases, enhances P2X7 receptor expression in neuroblastoma cells. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2022 Dec 15 [cited 2023 Mar 5];10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36589747/

61. Wu QN, Liao YF, Lu YX, Wang Y, Lu JH, Zeng ZL, et al. Pharmacological inhibition of DUSP6 suppresses gastric cancer growth and metastasis and overcomes cisplatin resistance. Cancer Lett. 2018 Jan 1;412:243–55.

62. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. Front Cell Dev Biol. 2019 Jun 14;7(JUN):107.

63. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2013 Jan 1;752(1):10–24.
64. Wu F, McCuaig RD, Sutton CR, Tan AHY, Jeelall Y, Bean EG, et al. Nuclear-Biased DUSP6 Expression is Associated with Cancer Spreading Including Brain Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jun 2 [cited 2023 Mar 5];20(12). Available from: /pmc/articles/PMC6627630/
65. Boulding T, Wu F, McCuaig R, Dunn J, Sutton CR, Hardy K, et al. Differential Roles for DUSP Family Members in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Regulation in Breast Cancer. PLoS One [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Mar 5];11(2):148065. Available from: /pmc/articles/PMC4747493/
66. Waetzig V, Wacker U, Haeusgen W, Björkblom B, Courtney MJ, Coffey ET, et al. Concurrent protective and destructive signaling of JNK2 in neuroblastoma cells. Cell Signal [Internet]. 2009 Jun [cited 2023 Mar 5];21(6):873–80. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19385049/
67. Du L, Lyle CS, Obey TB, Gaarde WA, Muir JA, Bennett BL, et al. Inhibition of Cell Proliferation and Cell Cycle Progression by Specific Inhibition of Basal JNK Activity: EVIDENCE THAT MITOTIC Bcl-2 PHOSPHORYLATION IS JNK-INDEPENDENT. Journal of Biological Chemistry. 2004 Mar 19;279(12):11957–66.
68. Düzgün ŞA, Yerlikaya A, Zeren S, Bayhan Z, Okur E, Boyacı İ. Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. Cytotechnology [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Mar 5];69(4):711–24. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10616-017-0079-2
69. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol [Internet]. 2014 Oct 10 [cited 2023 Mar 5];740:364. Available from: /pmc/articles/PMC4146684/
70. Zhang J, Xie T. Ghrelin inhibits cisplatin-induced MDA-MB-231 breast cancer cell apoptosis via PI3K/Akt/mTOR signaling. Exp Ther Med [Internet]. 2020 Dec 31 [cited 2023 Mar 5];19(3):1633. Available from: /pmc/articles/PMC7027091/
71. Wang B, Zhang Y, Ye M, Wu J, Ma L, Chen H. Cisplatin-resistant MDA-MB-231 Cell-derived Exosomes Increase the Resistance of Recipient Cells in an Exosomal miR-423-5p-dependent Manner. Curr Drug Metab [Internet]. 2019 Aug 19 [cited 2023 Mar 5];20(10):804–14. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424364/

72. Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. Biomedical and Pharmacology Journal. 2019 Mar 1;12(1):7–15.
73. Teng F, Xu Z, Chen J, Zheng G, Zheng G, Lv H, et al. DUSP1 induces apatinib resistance by activating the MAPK pathway in gastric cancer. Oncol Rep [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Mar 5];40(3):1203–22. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6520/abstract
74. Fang J, Ye Z, Gu F, Yan M, Lin Q, Lin J, et al. DUSP1 enhances the chemoresistance of gallbladder cancer via the modulation of the p38 pathway and DNA damage/repair system. Oncol Lett [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Mar 5];16(2):1869. Available from: /pmc/articles/PMC6036466/
75. Peretz L, Besser E, Hajbi R, Casden N, Ziv D, Kronenberg N, et al. Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. Sci Rep [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Mar 5];8(1). Available from: /pmc/articles/PMC5758708/
76. Thompson EM, Patel V, Rajeeve V, Cutillas PR, Stoker AW. The cytotoxic action of BCI is not dependent on its stated DUSP1 or DUSP6 targets in neuroblastoma cells. FEBS Open Bio [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Mar 5];12(7):1388. Available from: /pmc/articles/PMC9249316/
77. Losa JH, Cobo CP, Viniegra JG, Sánchez-Arevalo Lobo VJ, Ramón y Cajal S, Sánchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. Oncogene 2003 22:26 [Internet]. 2004 Jun 24 [cited 2023 Mar 5];22(26):3998–4006. Available from: https://www.nature.com/articles/1206608
78. Sánchez-Perez I, Murguía JR, Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. Oncogene 1998 16:4 [Internet]. 1998 Feb 3 [cited 2023 Mar 5];16(4):533–40. Available from: https://www.nature.com/articles/1201578
79. Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. Am J Physiol Renal Physiol [Internet]. 2005 [cited 2023 Mar 5];289(1 58-1):166–74. Available from: https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00401.2004
80. Bermúdez-Muñoz JM, Celaya AM, García-Mato Á, Muñoz-Espín D, Rosa LR de la, Serrano M, et al. Dual-specificity phosphatase 1 (Dusp1) has a central role in redox homeostasis and inflammation in the mouse cochlea. Antioxidants [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Mar 5];10(9). Available from: /pmc/articles/PMC8467085/

81. Liu YX, Wang J, Guo J, Wu J, Lieberman HB, Yin Y. DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. Mol Cancer Res [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2023 Mar 5];6(4):624–33. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18403641/

10. EKLER

EK1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Madde adı	Firma	Katalog No
DMEM/F-12	Biowest	L0094-500
Fötal Sığır Serumu	Sigma	F7524
Penisilin/Streptomisin 100x	Sartorius	03-031-1B
BCI hydrochloride	Sigma	B4313
Sisplatin	Koçak Farma	19115261
SB 202190	Sigma	S7076
SP600125	Gibco	10270
ERK 1/2	Santa Cruz	sc-514302
p-ERK	Santa Cruz	Sc-7383
JNK Antibody	Santa Cruz	Sc-7345
p-JNK	Santa Cruz	Sc-6254
p38α	Santa Cruz	Sc-136210
p-p38α	Santa Cruz	Sc-166182
GAPDH Antibody	Santa Cruz	Sc-166545
MKP-1 Antibody	Santa Cruz	Sc-373841
Pdusp1	Santa Cruz	
m-IgGκ BP-HRP	Santa Cruz	Sc-516102
Mouse Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	Sc-2357
Control Double Nickase Plasmid	Santa Cruz	Sc-437281
MKP-1 Double Nickase Plasmid	Santa Cruz	Sc-400243
Puromycin dihydrochloride	Chem Cruz	Sc-108071A
L-Glutamine 200nM	Capricorn scientific	GLN-B