T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMT TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ ZEB2 VE HEDEF GENLERİNİN NÖROGENEZDEKİ ROLÜ

ARZU AYSAN KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMT TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ ZEB2 VE HEDEF GENLERİNİN NÖROGENEZDEKİ ROLÜ

ARZU AYSAN KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE

2021

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

THE ROLE OF EMT TRANSCRIPTION FACTOR ZEB2 AND ITS TARGET GENES IN NEUROGENESIS

ARZU AYSAN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAGCI

GEBZE

2021

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/01/2021 tarih ve 2021/02 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/01/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan ARZU AYSAN KILIÇ 'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE : Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAY

ÜYE : Prof. Dr. Erdem TÜZÜN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
…..…/…..…/..…… tarih ve ……/…….. sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Nöroblastoma çocukluk çağında ortaya çıkan malignant karakterde bir tür solid tümördür ve temelinde embriyonik dönemdeki nörogelişim esnasında görülen farklılaşma mekanizmasındaki bozukluk yatmaktadır. Retinoik asit, birçok hücresel sinyal yolağı aracılığıyla hücre döngüsünde tutulmaya neden olmakta ve hücrelerin farklılaşmasını indüklemektedir. Nöroblastoma tedavisinde, retinoik asit tümör hücrelerinin nöronlara dönüştürülmesi amacıyla kullanılmaktadır. ZEB2 geni bağlantılı olduğu BMP/SMAD sinyal yolağı aracılığıyla farklılaşma mekanizması üzerinde rol oynamaktadır. SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit ile tetiklenen farklılaşma mekanizmasına dair gen/protein seviyesindeki bilgiler literatürde çok azdır. Retinoik asitle farklılaşması indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde gerçekleşen moleküler değişimleri, ZEB2 geni ve ilişkili olduğu genler üzerinden incelemek ve ileri çalışmalara zemin hazırlamak bu tez çalışmasının amaçlarındandır. Bu amaçla, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin nörojenik farklılaşması retinoik asitle indüklenmiştir. Farklılaşan hücrelerde, NF-H, TH, TUBB3 ve NEUN belirteçleri protein seviyesinde western blotlama yöntemiyle, *GAP43, TUBB3, SYP* ve *MAPT* belirteçleri gen ifadesi seviyesinde qRT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca, farklılaşan hücrelerin mitokondri potansiyelleri TMRE boyaması ile belirlenmiştir. Tezin devamında, ZEB2 geninin nörojenik farklılaşmadaki rolünü incelemek amacıyla SH-SY5Y hücrelerinde ZEB2 ifadesi lentiviral shRNA kullanılarak baskılanmıştır. ZEB2 ifadesi kalımlı olarak baskılanan klonların farklılaşma potasiyelleri gen ve protein seviyesinde araştırılmıştır. Laboratuvarımızdaki ZEB2-ChIP-seq listesinden farklılaşma, gelişim/morfogenez, hücre iskeleti, hücresel sinyal iletimi, çoğalma/hücre döngüsü ve apoptoz/hücresel sağkalım ile ilişkili ZEB2 bağımlı değişen genler belirlenmiştir. Sonuç olarak, ZEB2 bağımlı olarak ifadesi değişen genlerin nöral farklılaşma sırasındaki değişimleri incelenmiştir. Böylece, ZEB2 ve ilişkili olduğu genlerin nörojenik farklılaşma mekanizmasındaki rolüne dair literatüre moleküler bilgi katkısı yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: SH-SY5Y hücreleri, ZEB2, Retinoik Asit, Nöroblastoma, Farklılaşma.

SUMMARY

Neuroblastoma is malignant solid tumor occuring in childhood and based on defect in differentiation observed during neurodevelopment in embryonic period. Retinoic acid causes arrest in cell cycle through cellular pathways and induces differentiation. In the treatment of neuroblastoma, retinoic acid is used to transform tumor cells into neurons. ZEB2 gene plays role in differentiation mechanism through BMP/SMAD pathway. There is little information at gene/protein level on SH-SY5Y cells' differentiation mechanism triggered by retinoic acid. One of this thesis' aims is to examine molecular changes in SH-SY5Y cells induced by retinoic acid through ZEB2 gene and its related genes and to lay groundwork for further studies. For this purpose, SH-SY5Y cells' neurogenic differentiation was induced by retinoic acid. In differentiated cells, NF-H, TH, TUBB3 and NEUN markers were investigated at protein level by western blotting method, GAP43, TUBB3, SYP and MAPT markers at gene expression level by qRT-PCR method. In addition, differentiated cells' mitochondrial potentials were determined by TMRE staining. In continuation of thesis, to examine ZEB2 gene' role in neurogenic differentiation, SH-SY5Y cells' ZEB2 expression was suppressed using lentiviral shRNA. Differentiation potentials of clones whose ZEB2 expression was permanently suppressed was investigated at gene/protein level. ZEB2-dependent varying genes associated with differentiation, developmental/morphogenesis, cytoskeleton, cellular signal transduction, proliferation/cell cycle and apoptosis/cellular survival were identified from the ZEB2-ChIP-seq list in our laboratory. As a result, during neural differentiation, changes of genes whose expression is changed depending on ZEB2 were investigated. Thus, molecular information has been contributed to literature on ZEB2's role and its related genes in neurogenic differentiation.

Key Words: SH-SY5Y cells, ZEB2, Retinoic Acid, Neuroblastoma, Differentiation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan ve akademik hayatıma yön veren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya en içten teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tez çalışmam öncesinde ve sırasında yanımda olan, deneylerin çıkmaza girdiği zamanlarda sorunları birlikte aştığımız, gerektiğinde haftanın her günü geç saatlere kadar benimle birlikte çalışan ve bundan sonraki akademik hayatımda hem hocam hem arkadaşım olarak yanımda olmasını istediğim Öğr. Gör. Dr. Metin ÇETİN'e ve onun kadar fedakar olan güzel ailesine yanımda oldukları için en sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar hayatımda her zaman birlikte olduğum ve bugün sahip olduğum bilgilere ulaşmamda bana yaptıkları katkılar için sevgili hocalarım Uzm. Biyolog Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN, Öğr. Gör. Dr. İrem YALIM CAMCI ve Araş. Gör. Görkem ODABAŞ'a; Laboratuvar arkadaşlarım Esma ERCİYAS, Şule ERDEMİR, Nazlı SALIK, Seyhan ÜNSAL, Maide ŞEKER, Şevval DİK, Melike BAHÇEKAPILI'ya yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Tüm bunların yanında yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hem hayat arkadaşım hem akademik yoldaşım olan Araş. Gör. K. Can KILIÇ'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi zorlu yüksek lisans eğitimim süresinde de tüm mesafeleri tek bir sözleri ile aşan, karşılaştığım her zorlukta hem maddi hem manevi olarak bana koşulsuz destek çıkan, bugünlere gelmemi sağlayan, beni bugün olduğum kişi yapan, her zaman doğru yolda olmamı sağlayacak erdemi bana aşılayan, taşıdıkları sevgi ve gösterdikleri destek ile asla yerleri doldurulamayacak olan anneme, babama, abime, ablama, kardeşime ve biricik yeğenime sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Nöroblastoma Kanseri	5
2.1.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı	7
2.2. Nöronal Farklılaştırma	8
2.3.1. Nöral Farklılaştırmanın Kullanım Alanları	10
2.3. ZEB2 Trankripsiyon Faktörü	10
2.3.1. Nörobiyolojide ZEB2	11
3. GEREÇLER	14
3.1. Genel Kimyasallar	14
3.2. Cihazlar	14
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler	15
3.4. Çözelti ve Tamponlar	15
3.5. Bakteriler ve Besiyerleri	16
3.6. Plazmitler	16
3.7. Primerler	16
3.8. Antikorlar, Boyalar ve Farklılaşma Ajanları	18
3.9. Kitler	18
4. YÖNTEMLER	19
4.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması	19
4.2. Hücre Stoklarının Oluşturulması	20

4.3. Transformasyon 20
4.4. shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarının Oluşturulması 21
4.4.1. Lentiviral Parçacıkların Eldesi 21
4.4.2. Transfeksiyon 21
4.5. Nöronal Farklılaştırma 22
4.6. Mitokondri Potansiyelinin Analizi 24
4.6.1. Akım Sitometrisi 24
4.7. Değişen Gene İfadelerinin Analizi 24
4.7.1. RNA İzolasyonu 25
4.7.2. cDNA Sentezi 25
4.7.3. qRT-PCR ile Gen İfadesi Analizi 26
4.8. Değişen Protein İfadelerinin Analizi 28
4.8.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması 28
4.8.2. Protein Miktar Tayini 29
4.8.3. Örneklerin Hazırlanması, Yüklenmesi ve Görüntülenmesi 29
4.9. İstatistiksel Analizler 29
5. BULGULAR 30
5.1. SH-SY5Y Hattında ZEB2 İfadesi 31
5.2. SH-SY5Y Hücre Hattının RA ile İndüksiyonu 31
5.3. SH-SY5Y Hücre Hattında ZEB2 İfadesinin Baskılanması 34
5.3.1. shZEB2 Plazmitlerinin Validasyonu 34
5.3.2. Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarının Oluşturulması 35
5.3.3. Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarında Nöral Farklılaşma Belirteçlerinin İncelenmesi 36
5.3.4. ZEB2-ChIP-seq Hedeflerinin shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarında Taranması 38
5.4. Nöral Farklılaşma Sürecinde ZEB2-Bağımlı Değişen Gen İfadelerin Saptanması 39
5.5. shZEB2-SH-SY5Y Klonu ve RA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinde Ortak Değişen ZEB2-ChIP-seq Hedeflerinin Analizi 40
6. TARTIŞMA VE SONUÇ 42

KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 57
EKLER 58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklamalar
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
L	: Litre
M	: Molar
ng	: Nanogram
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
NaCL	: Sodyum Klorür
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMT	: Epitel-Mezenkim Dönüşümü
FBS	: Fötal Dana Serumu
Gapdh	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GAP43	: Büyüme bağlı protein-43
MAPT	: Mikrotübül ilişkili protein tau
NB	: Nöroblastoma
NEAA	: Gerekli Olmayan Amino Asit
NF-kB	: Nüklear Faktör Kapa B
NF-H	: Nörofilament H
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PEI	: Polyethyleneimine
RA	: Retinoik asit

RT	: Oda sıcaklığı
SYP	: Sinaptofizin 1
TH	: Tiroksiz hihdroksilaz
TMRE	: Tetrametilhodamin, Etil Ester, Perklorat
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
TUBB3	: Beta-tübülin-III
ZEB1	: Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 1
ZEB2	: Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 2
WB	: Western Blot
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa**

2.1: ZEB2 geninin şematik gösterimi. 11

4.1: Tez kapsamında yapılan çalışmalara ait iş akış şeması. 19

4.2: Farklılaşma protokolüne ait iş akış şeması. 22

5.1: Hücre hatlarında ZEB2 protein ifadesinin gösterilmesi. 31

5.2: SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşma sürecinin karakterizasyonu. 32

5.3: Farklılaşan hücrelerdeki morfolojik değişimlerin 3., 6., ve 9. günde ters ışık mikroskobu kullanılarak gösterimi. 33

5.4: Mitokondriyel potansiyelinin 3., 6., ve 9. günde TMRE boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak belirlenmesi. 34

5.5: ZEB2 ifadesinin shRNA ile baskılanması. 35

5.6: SH-SY5Y hücre hattında ZEB2 ifadesinin baskılanması ve kalımlı klonların oluşturulması. 36

5.7: Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda farklılaşmanın karakterizasyonu. 37

5.8: ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin shZEB2-SY-SY5Y hücre klonunda taranması. 39

5.9: ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde taranması. 40

5.10: shZEB2-SH-SY5Y klonu ile ra uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ortak değişen ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin gösterimi. 41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:	Sayfa
2.1: Nöroblastoma evreleri.	6
3.1: İleri ve geri primer listesi.	16
4.1: 2X RT master karışımı.	26
4.2: PCR döngü şartları.	26
4.3: qRT-PCR reaksiyon tablosu.	27
4.4: qRT-PCR döngü şartları.	27
5.1: ZEB2-ChIP-seq listesindeki seçilen genlerin gruplandırılması.	38

1. GİRİŞ

Sağlık, çağlar boyunca insanoğlu ve yeryüzündeki tüm canlıların ihtiyaç duyduğu en büyük gereklilik olarak varlığını sürdürmüş ve günümüzde de hala sürdürmektedir. İnsanoğlu fiziksel ve düşünsel kabiliyetlerinin önemli bir bölümünü sağlıkları bozulduğunda iyileşme yollarını bulmak için kullanmaktadır. Bu süreçte yapılan araştırmalar tıp biliminin ilerlemesine katkı sağlamakla birlikte farklı tedavi alternatiflerinin gelişmesine de olanak sağlamaktadır.

Alman patoloji bilimcisi Rudolph Wirchow'un 1858 yılında ortaya attığı ''omnis cellula e cellula'' kuramında her hücrenin bölünerek yeni bir hücreyi oluşturduğu belirtilerek hücrelerin canlılığın temeli olduğuna dikkat çekmiştir. Bu kuramda da bahsedildiği üzere hücrelerin sahip oldukları fizyolojiye göre canlılığın devamı için farklılaşması, bölünmesi ve ölmesi gerekmektedir. Söz konusu bu hücresel faaliyetlerin çalışması ihtiyaç duyulan zamanda ve canlının gereksimine göre kontrol mekanizması ile incelikle ayarlanması gerekmektedir. Hücrelerde meydana gelen genetik mutasyonlar ise kontrol mekanizmalarının bozulmasına ve hücrede anomalilerin görülmesine neden olmaktadır.

Kanser, normal hücrelerin bölünmesi sırasında mutasyonların genomda birikmesi ve bunun sonucunda da kontrolsüz bölünen hücrelere dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin genotipinde ve fenotipinde meydana gelen bu değişimler sonucunda hücre ''metastaz'' adı verilen mekanizma ile orijin aldığı dokudan diğer dokulara da yayılabilmektedir.

Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşmesinde etkili olan mutasyonlar kanser hücrelerine moleküler ve biyokimyasal olarak bazı özellikler kazandırmaktadır. Buna göre kanser hücreleri, bölünmeye ve replikasyona sınırsız şekilde devam etme, otokrin ve parakrin sinyaller üreterek ileri büyümeyi teşvik etme, hücresel bölünmeyi kontrol eden sinyalleri devre dışı bırakma, apoptoza (kontrollü hücresel ölüm) karşı direnç geliştirme, kanser yapısının beslenebilmesi için yeni damar ağı oluşumun başlatılması (anjiyogenez) ve diğer doku ve/veya organlara yayılma (metastaz) kapasitesine sahiptir. Kanser hücreleri ve meydana getirdikleri tümör yapıları bahsi geçen bu özelliklerin genellikle hepsini ya da büyük bir kısmını sergileyerek vücut içinde gelişimlerine devam ederler [Hanahan and Weinberg, 2011].

Nöroblastoma, genellikle 5 yaş altı çocukları etkileyen, embriyonik dönemdeki nöroblast adı verilen primitif sempatik sinir hücrelerinden köken alan ve metastaz yapabilme özelliğine sahip bir tür solid tümördür [Tsubota and Kadomatsu, 2018]. Bunun yanı sıra, çocukluk dönemi kanserleri içerisinde morbidite ve mortalite oranının en yüksek olduğu kanser türlerinden biridir [Park et al., 2010], [Maris, 2010]. Nöroblastoma, kanser hücrelerinin nöroblastik farklılaşma düzeyi, risk seviyesi, sahip oldukları morfolojik özellikler ve lenf ve/veya kemik iliğine metastaz yapmış olma durumu dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır. Söz konusu bu sınıflandırma nöroblastoma hastaları için yapılan ve hastalığın şiddetine göre kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi seçeneklerini içeren tedavi planlamasında kullanılmaktadır.

Dünya çapında giderek artan hava kirliliği, sağlıksız beslenme, alkol ve/veya tütün tüketimi vb. gibi çevresel faktörler nedeniyle kanserin görülme sıklığı da her geçen gün ciddi oranda artmaktadır. Öyle ki, akut ve kronik kalp hastalıklarından sonra kanser insidansı ve kansere bağlı ölümler ikinci sırada yer almaktadır. Kanser tedavisinde başlıca tedavi seçenekleri kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve cerrahi girişimlerdir. Kansere neden olan mekanizmaların genom ve/veya hücresel boyutta aydınlatılması ve hücrelerin kontrolsüz bölünmesinin engellenmesine yönelik tedavi tasarımlarının ortaya koyulması gereklidir. Bu nedenle kanserli doku ve/veya organlardaki fizyolojik bozukluğu ortadan kaldırmak ve varılması hedeflenen hücresel tedavi seçenekleri açısından umut vaad etmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Sinirbilim alanındaki çalışmalarda karşılaşılan en büyük kısıtlılıklardan biri işlevi araştırılmak istenen hücre ve/veya dokunun canlılarda fizyolojik incelenmesinin zorluğudur. Bu nedenle, bilim insanları söz konusu bu zorluğu geliştirilen hücre modelleri ile aşabilmektedir. Hücre kültür çalışmalarının makro boyuttaki modellere kıyasla daha kontrollü, kolay tekrar edilebilir ve daha az zaman alan modeller olması araştırmacılar tarafından tercih sebebi olmaktadır. Bu nedenle, primer hücreler ve/veya hücre hatları ile yapılan hücre kültür çalışmaları literatürde geniş oranda yer sahibidir. Özellikle kanser ve/veya progenitör hücrelerin kullanıldığı hücre kültür çalışmalarının sağladığı avantajlardan bazıları da genetik, moleküler biyolojik ve kimyasal olarak kolay manipüle edilebilir olmalarıdır. Bahsi geçen bu avantajlar nedeniyle, sunulan bu tez çalışmasında en yaygın hücre modellerinden biri olan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri immatür neoplastik nöral krest hücrelerinden köken alan ve sempatik adrenerjik gangliondan türevlenmiş metastatik bir nöroblastoma türüne ait hücrelerdir. Bu özellikleri nedeniyle ilgili hücreler çeşitli farklılaşma ajanlarına karşı dopaminerjik, kolinerjik veya adrenerjik nöron benzeri yapılara farklılaşabilmektedir. Tez çalışması kapsamında, SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit varlığında farklılaşma özelliği kullanılmış olup ZEB2 transkripsiyon faktörünün düzenlediği genlerin nöral farklılaşma sırasında analizi hedeflenmiştir.

ZEB2 geni hem embriyonik gelişim hem de sonrasında önemli görevleri olan bir transkripsiyon faktörüdür. Embriyonik dönemde sinir sisteminin gelişiminde, nöral tüpün oluşumu ile kapanmasında, nöral krest hücrelerinin migrasyon yeteneği kazanmasında, epidermal ektoderm ile nöroektoderm arasındaki sınırın meydana gelmesinde ve gelişimin devamında ise hipokampus, serebral korteks ve talamus gibi beynin farklı bölümlerinin özelleşmesinde rol oynamaktadır [Van de Putte et al., 2007], [Hegarty et al., 2017]. Retinoik asit ile farklılaşması tetiklenen SH-SY5Y hücrelerinde nörotrofik reseptörlerin regülasyonuna, BMP/SMAD ve Wnt/Beta-Katenin sinyal yolaklarındaki değişime, kolin asetil transferaz gibi çeşitli intraselüler proteinlerin artmış sentezine bağlı olarak nöron benzeri yapıların oluştuğu literatürde gösterilmiştir [Xie et al., 2010], [Presgraves et al., 2004]. Retinoik asit molekülünün etkisiyle SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin geriye farklılaşarak (de-diferensiyasyon) nöronlara

dönüştüğünün bilinmesi ile retinoik asidin kemoterapötik bir ajan olarak kullanılabileceği fikri de ortaya çıkmıştır. Bahsi geçen tedavi yaklaşımı farklılaşma tedavisi ismiyle anılmaktadır. Literatürde bulunan çalışmalara rağmen, SH-SY5Y hücre hattının retinoik asit ile farklılaşma sürecinde hücre içerisinde meydana gelen moleküler değişimler tam olarak açıklanamamıştır. Sunulan bu tez çalışmasında SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşma mekanizmasında gözlenen değişimleri özellikle ZEB2 geni ve ilişkili olduğu genler dikkate alınarak incelemek ve böylece literatüre katkı sağlamak amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Nöroblastoma Kanseri

Yaşamsal önemi ve vücudun kontrol/komuta merkezi olması nedeniyle kanserlerin en ciddi seyrettiği anatomofizyolojik lokasyon beyin ve sinir sistemidir. Yüksek insidans ve embriyolojik döneme dayanan kökeni sebebiyle beyin ve sinir sistemi kanserlerinin en önemli tiplerinden biri nöroblastoma'dır. Nöroblastoma, erken çocukluk döneminde adrenal medulla ve paravertebral sempatik ganglionların normal gelişimini etkileyen embriyonal bir malignitedir [Tsubota and Kadomatsu, 2018]. Nöroblastoma bebekler ile çocuklarda en sık görülen ve nöral krestten kaynaklanan sempatik sinir sisteminde ortaya çıkan solid tümör tiplerinden biridir. Nöroblastoma, gangliyoblastoma, gangliyonöroma ve nodüler gangliyoblastoma türlerinin yer aldığı periferal nöroblastik tümörlerden oluşan bir grup hastalıktır.

Tüm çocukluk çağı tümörlerinin yaklaşık %8-10'u ve kansere bağlı tüm ölümlerin yaklaşık %15'i nöroblastoma kaynaklıdır [Park et al., 2010]. Hastaların %90'nına 5 yaşından önce nöroblastoma tanısı konulmakta ve bu hastalarında %30'u 1 yaşından önce teşhis edilmektedir [Esiashvili et al., 2009]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda nöroblastoma hastalarındaki 5 yıllık sağ kalımın ortalama %52 ile %74 arasında seyrettiği bildirilmiştir. Buna ek olarak, çalışmalara dahil edilen tüm hasta popülasyonunun yaklaşık %40'ını oluşturan düşük risk grubundaki bireylerdeki sağ kalımın ise %90'ın üzerinde seyrettiği de gösterilmiştir [Maris, 2010]. Nöroblastoma kanserinin klinik olarak belirlenmesinde tümörün vücut içindeki yerleşim yeri, boyutu, invazyon derecesi ve paraneoplastik semptomlar gibi pek çok etmen rol oynamaktadır. Hastalık vücut içerisinde lenf yollarını kullanarak yayılmaktadır. Nöroblastoma hastalarının %71'inde tümörün ortaya çıkış yeri adrenal bezlerin medulla bölgesidir. Bununla birlikte, hastaların %3'ünde boyunda, %15'inde göğüste ve %8'inda ise pelviste nöroblastik tümörlere rastlanmaktadır [Park et al., 2010], [Vo et al., 2014].

Nöroblastoma, nöroblastik farklılaşma derecesine (farklılaşmamış, düşük seviyede farklılaşmış veya farklılaşmakta olan), mitoz-karyorrhexis indeksine (düşük, orta veya yüksek riskli) ve morfolojik özelliklerine (nöronal tip, schwannian tip veya aracı tip) göre 3 alt sınıfa ayrılmaktadır [Joshi et al., 2006]. Uluslararası nöroblastoma evreleme

sistemine göre; nöroblastoma, primer tümörün cerrahi eksizyon derecesi, lenf nodu tutulumu, uzak organlara yayılımı, kemik iliği tutulum derecesi ve hastanın yaşı gibi birçok kritere göre evre 1, 2A, 2B, 3, 4 ve 4S olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.1), [Brodeur et al., 1993]. Bu sınıflandırma da hastanın tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Düşük risk grubundaki hastalar için genellikle cerrahi girişim tek başına etkili ve yeterli olmakta ve %95'lik sağ kalım gözlenmektedir. Orta risk grubundaki hastalara ise cerrahi operasyonun ardından bireyin evresine göre 4 ila 8 aylık bir kemoterapi ve sonrasında da radyoterapi uygulanmaktadır. Yüksek risk grubundaki hastalar için cerrahi müdehale sonrasında otolog kök hücre naklini de içeren indüksiyon kemoterapisini, anti-GD2 immünoterapisini, primer tümör bölgesine/metastatik bölgelere ışınlamayı ve retinoik asit tedavisini içeren kombine bir tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Orta ve yüksek risk grubundaki hastalarda ortalama sağ kalım %30 ila %40 arasında seyretmektedir (Whittle et al., 2017].

Tablo 2.1: Nöroblastoma evreleri.

Evre 1	Bu evrede cerrahi operasyon ile tümör tamamen çıkarılabilir. Ameliyat sırasında çıkarılan tümöre bağlı lenf düğümlerinde kanser hücrelerine rastlanabilir, ancak tümör mikroçevresindeki diğer lenf düğümlerinde kanser hücrelerine rastlanmaz.
Evre 2A	Tümör sadece orijinlendiği bölgede bulunur ve lenfatik yayılım nedeniyle cerrahi girişim sırasında tamamen çıkarılamaz. Tümör mikroçevresindeki lenf düğümleri kanser içermez.
Evre 2B	Tümör sadece orijin aldığı bölgede bulunur ve cerrahi operasyon sırasında tümör tamamen çıkarılabilir ya da çıkarılmayabilir, ancak mikroçevredeki lenf düğümlerinde kanser hücrelerine rastlanır.

Tablo 2.1: Devamı.

Evre 3	Tümörlü doku cerrahi operasyonla çıkarılamaz. Tümör mikroçevredeki lenf düğümlerine veya diğer dokulara metastaz yapar.
Evre 4	Tümör dokusu aşağıda 4S evresinde listelenenler dışındaki bölgelere uzak doku/organ metastazı yaparak vücudun diğer bölgelerindeki lenf düğümlerine, kemiklere, kemik iliğine, karaciğere, deriye ya da diğer organlara yayılım gösterir.
Evre 4S	Tümör dokusu yalnızca evre 1, 2A veya 2B'de olduğu gibi yalnızca köken aldığı dokuda/organda bulunur ve 1 yaşından küçük yenidoğan bebeklerde yalnızca deri, karaciğer ve/veya kemik iliğine yayılım gösterir.

2.1.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı, sempatik adrenerjik ganglial kökenli metastatik nöroblastom hastası 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği biyopsisinden izole edilen SK-N-SH hücre hattından elde edilmiştir [Biedler et al., 1973]. SK-N-SH hücreleri nöronal (N-tip), schwannian (S-tip) ve aracı (I-tip) olarak adlandırılan 3 farklı morfoloji gösterebilen hücrelerdir [Joshi et al., 2006]. SH-SY5Y hücreleri ise morfolojik ve nöronal hücrelere farklılaşabilme potansiyeli bakımından daha çok nöronal tip (N-tip) SK-N-SH hücrelere benzerlik göstermektedir. SH-SY5Y hücreleri karyotipik olarak 7. kromozom trizomizi içeren 47 kromozomlu hücreler olmalarına karşın, fizyolojik, genetik ve morfolojik anlamda stabil hücrelerdir [Xie et al., 2010]. Bununla birlikte, SH-SY5Y hücreleri norepinefrin sentezi ve dopamin β hidroksilaz, tiroksin hidroksilaz enzimleri açısından aktif hücreler olmalarının yanı sıra, sahip oldukları aktif yolaklar nedeniyle asetilkolinerjik, glutamerjik, katekolaminerjik ve adenosinerjik fenotipteki hücreler olarak da bilinmektedir [Nagatsu et al., 1964], [Ross and Biedler, 1985], [Levin et al.,

1960]. SH-SY5Y hücreleri sahip oldukları özelikler nedeniyle *in vitro* nöronal farklılaşma ve fonksiyon çalışmalarında model hücre hattı olarak kullanılmaktadır.

2.2. Nöronal Farklılaştırma

Nörogenez erken embriyonik dönemde başlayan, kök hücrelerin özelleşmiş bir grubu olan nöral kök hücrelerin farklılaşarak yeni nöron hücrelerini oluşturması anlamına gelen ve canlının yaşamıyla birlikte azalma göstermesinin yanı sıra memeli beyinlerinin belirli bölgelerinde yaşam boyu devam eden bir süreçtir [Urbán and Guillemot, 2014]. Bu sürecin sağlıklı bir şekilde devam etmesi için gereken elektrofizyolojik, morfolojik ve transkripsiyonel pek çok değişiklik hücresel sinyallerin sinerjistik ve/veya antagonistik biçimde çalışması ile sağlanmaktadır.

Nöral plaka ve nöral tüp oluşumu ile başlayan ve nöronal farklılaşmaları içeren nörogelişim süreci spesifik transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Moleküler teknolojilerin ve deneysel yaklaşımların geliştirilmesi, nörogelişimdeki spesifik genlerin ve mekanizmaların tanımlanmasına da olanak sağlamaktadır. Buna bağlı olarak, *in vitro* koşullarda nöronal farklılaşma mekanizması ve bu mekanizmada meydana gelebilecek bozuklukların ve sonuçlarının incelenebilmesi amacıyla kök hücreler (embriyonik, mezenkimal, nöronal ya da uyarılmış pluripotent kök hücreler vs.), model progenitör hücreler (SH-SY5Y vs.) ya da somatik hücreler kullanılmaktadır.

SH-SY5Y hücreleri, nöronal farklılaşma, metabolizma, nöroadaptif ve nörodejeneneratif süreçlerle ilişkili fonksiyonlar, nörotoksisite ve nöronal korunma gibi deneysel nörolojik çalışmalarda model hücre olarak kullanılmaktadır [Xie et al., 2010]. SH-SY5Y hücreleri immatür neoplastik nöral krest hücrelerinden köken aldığı için kök hücrelerin sahip olduğu özellikleri de içermektedir. Farklılaşabilme özelliğine sahip bu hücreler ilk olarak *in vitro* ortamda kültüre edilirken besiyerlerine ilave edilen esansiyel ve non-esansiyel amino asitlerin eklenmesiyle farklılaştırılmaya çalışılmıştır [Goldstein et al., 1964]. Ancak yeteri kadar etkin bir farklılaştırma elde edilemediği için araştırmacılar besiyeri ortamına ekledikleri farklı kimyasal ajanlar ile daha etkili bir farklılaştırma yapmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmaların sonucunda, retinoik asit (RA) [Singh and Kaur, 2007], forbol ester 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) [Påhlman S et al., 1981],

beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) [Cernaianu et al., 2008], dibütiril siklik AMP (dBcAMP) [Kume et al., 2008], pürin [Guarnieri et al., 2009] ya da storosporin [Mollereau et al., 2007] gibi kimyasal ajanlarla hücrelerin farklılaştırabildiği gösterilmiştir.

Bir tür vitamin A metaboliti olan retinoik asit nöronal farklılaşma mekanizmasını nörotrofik reseptörlere ait genlerin transkripsiyon seviyesinde regülasyonu ve Wnt/Beta-Katenin sinyal yolağı aracılığıyla uyarmaktadır [Xie et al., 2010]. Retionik asit ile farklılaşması tetiklenen SH-SY5Y hücrelerinin artmış seviyede kolin asetil transferaz sentezlemelerinin yanı sıra hücresel toksinlere karşı duyarlılığının da arttığı bildirilmiştir [Presgraves et al., 2004]. Retinoik asitle farklılaşan hücrelerde dopaminerjik reseptörlerin ifadesindeki artışa bağlı olarak nörit uzantılarının oluşmaya başladığı görülmüştür. Bu hücrelerde, normal sinir hücrelerindeki gibi hücre iskelet elemanlarının organizasyonu, spesifik enzimlerin, proteinlerin ve transmitter maddelerin sentezlendiği de gösterilmiştir [Melino et al., 1997]. Retinoik asit ile farklılaşma sürecine giren hücreler, hücre döngüsünün G1 fazında durmaktadır ve bölünme için gerekli genetik ve hücresel materyallerin sentezi baskılanmaktadır. Yapılan çalışmalarla, retinoik asit ile farklılaşması tetiklenen hücrelerin çeşitli transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak beyin kökenli büyüme faktörüne (BDNF) daha duyarlı hale geldiği de bulunmuştur [Jamsa et al., 2004]. Retinoik asit mualemesinin ve artmış BDNF duyarlılığının, farklılaşma ile birlikte SH-SY5Y hücrelerinin sahip oldukları yuvarlak şekilli morfolojiden nörit uzantıları oluşturmaya geçişini uyardığı da ortaya koyulmuştur [Kaplan et al., 2000]. Bunlara ek olarak, retinoik asit ile muamele edilerek farklılaştırılan hücrelerde hücre zarında lokalize olan sinaptofizin (syp1) ve büyüme bağlı protein-43 (GAP-43, neuromodulin) belirteçleri artar. Sitoplamazda lokalize olan tiroksiz hihdroksilaz (TH), mikrotübül ilişkili protein-2 (MAP-2), nöron spesifik belirteç (NSE), Tau, beta-tübülin-III (βIII-tübülin) ve nörofilament H (NF-H) belirteçleri artarken, nestin belirteci azalır; çekirdekte lokalize olan NeuN ile RBFox3 ve nörogenin belirteçleri de artar.

2.2.1. Nöral Farklılaştırmanın Kullanım Alanları

Nöroblastomanın tedavisindeki adımlar hastanın tıbbi durumuna ve hastalığın evresine göre cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin ayrı ayrı veya kombine şekilde kullanımı şeklindedir. Kültür ortamında, *in vitro* olarak SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırmasında kullanılan retinoik asit aynı zamanda nöroblastoma tedavisinde kemoterapötik ajan olarak da kullanılabilmektedir. Retinoik asit ile kanser hücrelerinin nöron hücrelerine farklılaşması yani geriye farklılaşma (de-diferensiyasyon) ile hastalığın tedavisinin ve/veya sağkalım süresinin uzatılması amaçlanmaktadır. Bu tedavi yaklaşımına farklılaştırma tedavisi ismi verilmektedir. Ancak, retonik asitin etkisi ile başlatılan farklılaştırma sonucunda hücrenin ne tür bir fenotipe ve genotipe sahip olacağı, farklılaşan hücrelerin hangi çevresel etmenlere karşı duyarlı ya da dirençli olduğuna dair bilgiler kısıtlı olduğundan farklılaşma tedavisinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında söz konusu soru işaretlerine cevap oluşturmak amacıyla SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşması esnasında meydana gelen değişimlerin ve ZEB2 ifadesine bağlı değişen genlerin saptanması ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2.3. ZEB2 Trankripsiyon Faktörü

ZEB ailesi üyelerinden ZEB2 proteini, insanlarda 1214 amino asitten ve farelerde 1215 amino asittten oluşan, 140 kDa ağırlığında bir proteindir [Nelles et al., 2003]. ZEB2 proteinin N-terminal çinko parmak kısmı üç adet CCHH tipi çinko parmak, bir adet CCCH tipi parmak, NIM (nükleozom yeniden şekillenmesi ve deasetilaz-etkileşim motifi), SBD (Smad bağlayıcı domain), HD (homeodomain), CID (CtBP-ilişkili domain) ve C-terminal çinko parmak kısmı ise üç adet çinko parmak içermektedir [Şekil 2.1]. ZEB2, N-terminal ve C-terminal uçlarındaki çinko-parmak motifleri aracığılıyla hedef genlerin düzenleyici bölgelerindeki CACCT(G) veya CACANNT(G) dizilerine bağlanabilen bir epitel-mezenkimal dönüşümü (EMT) indükleyicisi transkripsiyon faktörüdür [Remacle et al., 1999]. ZEB2 genellikle transkripsiyonel represör (baskılayıcı) olarak işlev göstermesinin yanı sıra, etkileştiği kofaktörler ile aktivatör fonksiyon gösterip hedef genlerin transkripsiyonunu da başlatabilmektedir [Conidi et al., 2011], [Weng et al., 2012].

Bununla birlikte, ZEB2 proteini CtBP ve p3000 ile kompleks oluşturmakta ve SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4 ve SMAD5 proteinlerinden oluşan bir dizi farklı SMAD proteine de bağlanmasından dolayı SMAD ile etkileşen protein 1 (SIP1, SMAD interacting Protein 1) olarak da adlandırılmaktadır [Verschueren K et al., 1999]. SMAD proteinleri hücre içerisinde TGFβ sinyal yolağında anahtar rol oynayan aracılar olup hücre zarına gelen sinyal mesajlarının hücre zarından çekirdeğe iletilmesinde görev alan transkripsiyonel kofaktörlerdir [Kretzschmar and Massague, 1998]. Bunlara ek olarak, ZEB2 BMP sinyal yolağı için represör transkripsiyon faktörü olarak da işlev gösterebilmektedir [Weng et al., 2012].

Şekil 2.1: ZEB2 geninin şematik gösterimi.

ZEB2, embriyonik gelişim boyunca birçok dokuda ifade edilmektedir. Erken embriyonik dönemde nöral tüp oluşumunda ve nöral krest hücrelerinde ifade edilirken, embriyonik gelişimin devamında ise hipokampus, serebral korteks ve talamus gibi ön beynin gelişmekte olan kısımlarında ifade edildiği bilinmektedir. ZEB2, hipokampus ve neokorteksin piramidal nöronları, göç eden kortikal internöronlar ve beyin sapındaki dopaminerjik nöronlar gibi çeşitli nöronal alt tiplerde yüksek oranda ifade edilmektedir. ZEB2 ayrıca kortikal nöronlarda görülen nörogenezden gliyogeneze geçişteki geribildirim sinyal mekanizmasını da kontrol etmektedir. Bunlara ek olarak, sindirim sistemine ait dokular, böbrek ve iskelet kasları gibi nöroektodermal kökenli olmayan dokularda da ifade edildiği gösterilmiştir [Miquelajauregui et al., 2007], [Nishizaki et al., 2014], [Parthasarathy et al., 2014].

2.3.1. Nörobiyolojide ZEB2

ZEB2 embriyonik gelişim esnasında gerçekleşen nöral tüp oluşumunda gerekli ve önemli genlerin düzenlemesinde başlıca rol oyanayan elemanlardan biridir. ZEB2 geninin baskılandığı farelerde, nöral tüpün kapanması ve nöral plaka ile ektodermin geriye kalan

kısmı arasında bir sınırın oluşmaması gibi durumlar gözlenmiştir [Van de Putte et al., 2007]. Nöral krest hücrelerinin gelişimi esnasında, ZEB2'nin epidermal ektoderm ve nöroektoderm arasındaki sınırın oluşması için BMP-SMAD sinyal yolağını düzenlediği gösterilmiştir [Hegarty et al., 2013]. ZEB2 proteinin başlattığı sinyal yolağının hedef moleküllerinden birisi de E-kaderin molekülüdür. Nöral krest hücrelerinin gelişiminde görülen önemli mekanizmalardan birisi de epiteliyal-mezenkimal geçiştir. ZEB2'nin söz konusu bu epiteliyal-mezenkimal geçişin ana kontrol edici/düzenleyici elemanlarından biri olduğu ve ZEB2'nin E-kaderin ifadesini baskılayarak nöral krest hücrelerinin migrasyon yeteneği kazanmasında etkili olduğu ortaya koyulmuştur [Rogers et al., 2013]. Bunlara ek olarak, özgül olarak nöral krest hücrelerinde ZEB2 geni baskılanmasının farelerde kranial ve vagal nöral krest öncü hücrelerinde defektlere yol açtığı da gösterilmiştir [Van de Putte et al., 2007].

Nöral gelişim sırasında, ZEB2 geninin hipokampus ve neokorteksteki postmitotik hücrelerde yüksek seviyede ifade edildiği, ancak ventriküler bölgenin proliferatif kısmında ise düşük seviyede ifade edildiği bildirilmiştir. Çünkü nöral farklılaşma aşamasındaki hücrelerin ventriküler bölgede yer aldığı ve farklılaşmayla birlikte ZEB2 ifadesinin azaldığı ortaya koyulmuştur [Epifanova et al., 2019]. Tüm telensefalon boyunca ZEB2 geni baskılanmış mutant farelerle yapılan bir çalışmada ise, ZEB2 geninin WNT sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olması nedeniyle hipokampüs gelişiminin tümüyle ve ciddi şekilde etkilendiği gösterilmiştir [Miquelajauregui et al., 2007].

ZEB2 ayrıca serebral korteksteki glial öncü hücrelerin oluşumu ve postnatal astrositogenez mekanizmalarında da önemli bir rol oynamaktadır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, neokortikal postmitotik hücrelerdeki ZEB2 geninin baskılanmasının, Olig2 geni bakımından pozitif glial öncü hücrelerinin fazla sayıda çoğalmasına ve sonrasında da erken postnatal dönemde yüksek sayıda astrosit oluşumuna neden olan nörogenez mekanizmasının olması gerekenden önce sonlanmasına neden olduğu ortaya koyulmuştur [Seuntjens et al., 2009]. Ayrıca ZEB2 mutasyonunun dorsal telensefalonda yer alan kök hücrelerin postnatal gelişimini de etkilediği bildirilmiştir [Nityanandam A et al., 2012].

ZEB2 geninin aynı zamanda oligodendirosit farklılaşmasına ve farklılaşan oligodendirositlerin olgunlaşarak myelin kılıf oluşturmasına ve tamirine de katkıda bulunduğu bilinmektedir. ZEB2 geni baskılanmış farelerde, oligodendirosit öncü

hücrelerinin farklılaşmasında bozulmalar meydana geldiği, ZEB2'nin hedef proteinlerinden biri olan SMAD7 proteinin yüksek seviye ifade edilmesiyle bu etkinin ortadan kaldırılabildiği gösterilmiştir [Weng et al., 2012]. Myelin kılıf rejenerasyonundaki önemli rolünden dolayı, ZEB2 geninin baskılanmasının miyelin kılıf tamir mekanizmasında yol açtığı bozulmalar sebebiyle ciddi periferal nöropatilere neden olduğu da ortaya koyulmuştur [Quintes S et al., 2016]. Öte yandan, ZEB2 geninin göç etme kapasitesine sahip kortikal internöronlarda da ifade edildiği ve doğru zamanda doğru yere göç etmek için gerekli olduğu da ortaya koyulmuştur. Fare modelinde, ZEB2 geni baskılanmış internöronların neokorteks bölgesine göç edemediği ve ventral telensefalonda kaldığı gösterilmiştir [van den Berghe et al., 2013].

Yapılan bir çalışmada, ZEB2 geninin ifadesinin azaltılmasının sinir sisteminin gelişimi sırasında BMP sinyal yolağının baskılanmasıyla ilişkili olarak dopaminerjik nöronlarda hiperinervasyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, ZEB2 geninin SMAD sinyalini baskılaması aracılığıyla akson uzaması ve dopaminerjik nöronların hiperinervasyonunu negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir [Hegarty et al., 2017].

ZEB2 geni ayrıca başka bir önemli gelişim süreci olan neokortikal uzantıların oluşması mekanizmasını da kontrol etmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, ZEB2 geninin beynin her iki yarım küresini birbirine bağlayan korpus kallozum ve anterior komissür yapıları ve kortikospinal yolun oluşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, ZEB2 geni baskılanmış mutant nöronlarda mikrotübül dinamiğinin ve stabilitesinin de bozulduğu bildirilmiştir [Srivatsa et al., 2015]. ZEB2 geni baskılanmış hayvanlarda, akson uzantılarının oluşma oranının, doğru nöronal devreleri kurmasının ve neokortikal aksonların dallanmasının etkilendiği ortaya koyulmuştur [O'Leary and Terashima, 1988]. Turovskaya MV ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, ZEB2'nin neokortikal nöronlardaki NMDA (N-Metil D-Aspartik Asit) ve AMPA (Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik asit) reseptörlerinin aktivitesinin sürdürülmesinde önemli olduğu *in vitro* olarak ortaya koyulmuştur. ZEB2 geni baskılanmış mutant farelerden alınan nöronlarda ise reseptör agonistlerine karşı daha yüksek direnç geliştiği bildirilmiştir [Turovskaya et al., 2017].

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

EDTA (Merck), MBG Etanol (Riedel de Haen), Agaroz (Lonza), B-Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Gliserol (Fischer Scientific), Tris (Fischer Scientific), HCL (Fischer Scientific), RNase-ExitusPlus (AmpliChem), DMSO (Fischer Scientific), Polybren (Thermo Scientific), PEI (Sigma-Aldrich, Germany), Proteaz inhibitörü (Roche), Puromisin (InVivoGen), Metanol (Fischer).

3.2. Cihazlar

-80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer), -20°C Derin Dondurucu (Ariston), +4°C Buzdolabı (Ariston), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), QRT-PCR (Applied Biosystem, StepOnePlus), PCR Kabini (Lab Companion), Santrifüj (Nüve, NF400), Soğurmali Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs, MX-S), Termal Döngü Cihazı (Biorad, Mj Mini). Laminar Kabin, Class II Tip (PMV Clean Air), Soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Function Line), Soğutmalı Mikrosantrifuj (Beckman Coulter microfuge 22R), Minisantrifüj 96 kuyulu mikroplak rotorlu (Labogene), Mini Western Blot Sistem ve Transfer Tankı (BioRad), Floresan ataşmanlı ters ışık mikroskobu (Nikon TMS), Yatay Mini Jel Sistemi (BioRad), Floresan ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon), Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (Sartorius BL210S), Şarjlı pipetleyici (PipetAid, Biohit Midi Plus), Isıtıcılı blok (Denville Scientific), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), Sıvı Azot tankı (Arpege 140), Mikrobiyal İzolasyon Kabin (Nüve MN090), Orbital Çalkalayıcı (Denville Scientific), Termal-döngü cihazı (Biometra), Jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), Otoklav (Nüve), Accuri C6 Akım Sitometri Cihazı (Becton Dickinson), NanoDrop (Thermo Scientific), Bioruptur Pico (Diagenode), Qubit 3 (Thermo Scientific).

3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler

Hücrelerin kültüre edilmesinde besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco), %10 fötal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco) ve 1X non-essential aminoasit (NEAA) (Gibco) ile zenginleştirilerek kullanıldı.

Hücre farklılaştırma protokolünde besi yeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco), %1 fötal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco), 1X non-essential aminoasit (NEAA) (Gibco) ve 10 uM retinoik asit (RA) ile zenginleştirilerek kullanıldı.

Hücre kültürü deneylerinde 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ve 2X Tripsin (Gibco) kullanıldı.

3.4. Çözelti ve Tamponlar

Hücre kültürü çözeltileri

- 10X PBS: NaCl 80 g, KCl 2 g, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 17,8 g, KH_2PO_4 2,4 g belirli miktarda ddH_2O içerisinde çözülerek, elde edilen çözeltinin pH'sı 7.4'ye ayarlandıktan sonra final hacim ddH_2O ile bir litreye tamamlanır.
- Hücrelerin Dondurma Ortamı: %90 FBS ve %10 DMSO.

Western blotlama çözeltileri

- SDS Lizis Tamponu: 50 Mm Tris (pH=8), 150mM NaCl, %2 SDS ve proteaz inhibitörü.
- 4x Yükleme Tamponu: %40 Gliserol, %20 SDS, 800 mM β-merkaptoetanol, 200mM Tris (pH=6.8) ve %0,1 Bromofenol mavi.
- 10X TBS: 30g Tris, 88g NaCl, 2g KCl belirli miktarda ddH_2O içerisinde çözülerek, elde edilen çözeltinin pH'sı 7.5'ye ayarlandıktan sonra final hacim ddH_2O ile bir litreye tamamlanır.
- TBS-T: 1X TBS ve %5 Tween-20.
- %8'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli: 2,5 ml 1,5M Tris (pH:8,8), 100µl SDS (%10), 2 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 5.5 ml ddH_2O.

- %4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli: 2,5 ml 0,5M Tris (pH:6,8), 100µl SDS (%10), 1 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 6,4 ml ddH_2O.
- Elektroforez Yürütme Tamponu: 25 mM Tris base, 190 mM glycine ve 0.1% SDS ile hazırlanan tamponun pH'sı 8,3 ayarlanır.
- Transfer Tamponu: 190 mM glycine, 25 mM Tris base, 0.1% SDS ve %10 metanol.
- Western blotlama Bloklama Solüsyonu: %5 Yağsız süt tozu, 1X TBS-T.

3.5. Bakteriler ve Besiyerleri

E. coli DH5α bakterileri LB sıvı ve LB-agar katı besiyerlerinde çoğaltıldı ve ticari olarak temin edilen plazmidlerin çoğaltılmasında kullanıldı. Besiyerleri üzerinde çoğalan kolonilerin seçilimi amfisilin antibiyotiği ile gerçekleştirildi.

3.6. Plazmitler

Tez çalışması kapsamında lentiviral sistem için pLKO.1 boş vektör (Addgene; plazmit #8453) ve shZEB2 plazmitleri (Sigma-Aldrich; Mission shRNA; 0883 ve 0887) kullanıldı. Lentiviral sistemin paketlenmesi için, pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene, plazmit #8455) ve pCMV-VSV-G (Addgene #8454) plazmitleri kullanıldı.

3.7. Primerler

Tez çalışması sırasında kullanılan primerler ticari olarak temin edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: İleri ve geri primer listesi.

Gen Adı	İleri Primer (5'–3')	Geri Primer (5'-3')
MAPT	GCGGGAAGGTGCAGATAAT	CCCGGGACGTGTTTGATATT
TUBB3	CGAAGCCAGCAGTGTCTAAA	GGAGGACGAGGCCATAAATAC
SYN	CAATGCCTGCCTGAACAAAG	GGGTCCTAAACTGTCCTCTCTA
GAP43	GACGAGGGTAAAGAAGAGGAAC	TCAGAGTGGAGCTGAGAAGA
ZEB2	ACACAGCCATTATTTACCCAGA	CCAGGTGGCAGGTCATTT

Tablo 3.1: Devamı.

RIMS2	GCTCAGGGACCAAGTTCTTATG	CGCCTCAAGTCTGGTCTATCTA
EPCAM	GGATCTGGATCCTGGTCAAAC	GCTATCACCACAACCACAATAAC
KPTN1	TCCCGAGTGATTGTGTTCAGCC	TACACCACTGCTGGCTCCAACA
PCDH1	CACAGCCTTGGTCCATCTTTAT	CTGCTTGGAGCGCTCATATT
N4BP2	ATTCTCCTGTGCCAGAGTTTAG	CCTGCTCTGAGTTTCCTCTTT
FGF1	GTCTGGTTTGCTGCTGTATCT	GGGTTTCTGGGATTTGCTTTATTC
PSEN2	TCCTCATTGGCTTGTGTCTG	GGTTGTCCGTGGAGAAGTAAA
BMP5	GCTGGGTTCTAGTGGGTTATG	TCCCTTTGTATTTCCCGTCTTT
IRF6	CTGGTCCTGCTGGATAGATTTAG	GTGAAGGCAAGGGAGTAGAAG
MAGI1	CCACTCAGCCAGAACTCATAAC	CCTTGGGCTGTCAACAATCT
RIPK2	ACAGTTGGGATAGCACCATTT	CCTGCAGTTGAGAGTGGATTTA
TAF3	CATCTTTGTTGCCAGTGCTTC	CTTTCTCTCTTTCCTTCTCCTTCTT
KILLIN	AATGGCTGGCCCTATCTAAAC	GTGCTTGGAGACCAGTGTATT
RIPK4	TTATGCAACAAGGAACGAATGG	CACAAGGACTCACCCAAGTAATA
TWIST1	CGACGACAGCCTGAGCAACA	TGCAGCTCCTCGTACGACTG
CDK10	GAGAATATGCCAACACCCTTCT	CTTCAGGTCCCTGTGGATAATG
ARHGEF10	AACCACGCTCTACAGCCTGATG	GCCTTTGGAGGTGTTCTTCAGC
AZIN1	GGCTGGAGAAATTGGCTTTAC	ATCCAACAGAGGGCTGATAAC
RELN	GTCTACCTTCCACTCTCCACCA	GTCCAGCATCACAAATCCCTCG
GLMN	GATTGGAGCTGCTGGAGAATAG	AAGCCCTGAGGTACAGTAAGA
LRP5	CATTGGCATCATCCTCTCTCTC	TCCCGCTGACATACTCG
CCND1	GGGTTGTGCTACAGATGATAGAG	AGACGCCTCCTTTGTGTTAAT
BCL2L1	GCCACTTACCTGAATGACCACC	AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT
TUBA4A	GGCAAGGAGATCATTGACCCAG	CATCAGGAGTGAGGTGAAGCCA
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA

3.8. Antikorlar, Boyalar ve Farklılaşma Ajanları

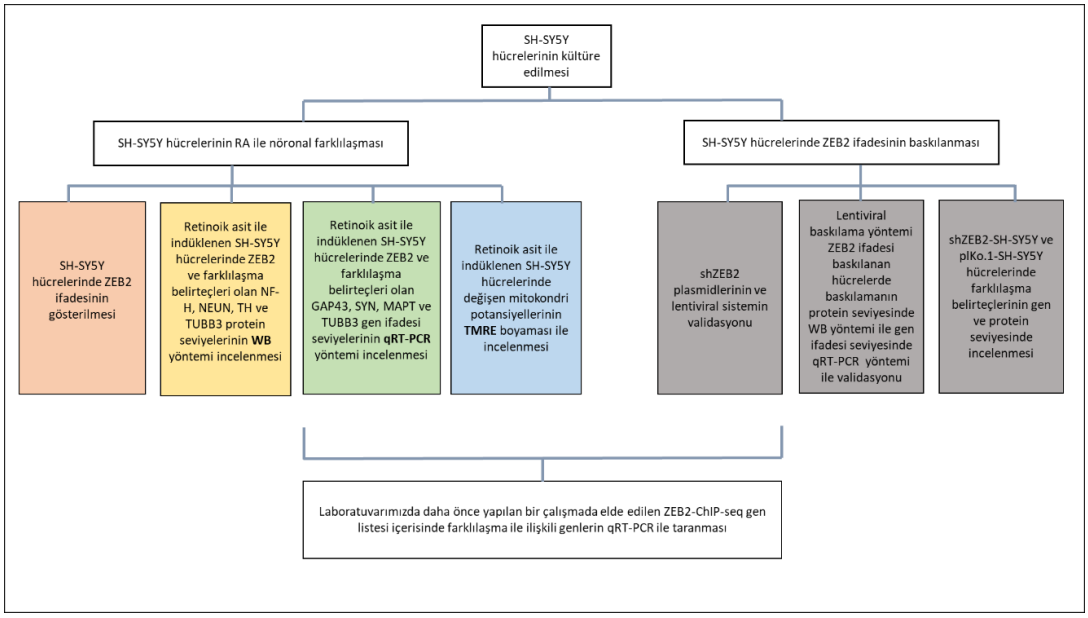
Western blotlamada Prof. Dr. Tamer YAĞCI'nın laboratuvarında geliştirilen ZEB2 (klon 6E5) ve ROR1 (klon 5B3) antikorları ile ticari olarak temin edilmiş β-aktin (Cell Signaling, 1/5000), TH (Cell Signaling, 1/200), NF-H (Cell Signaling, 1/200), NEUN (Cell Signaling, 1/200), TUBB3 (Cell Signaling, 1/1000), N-CAD (Cell Signaling, 1/1000) ve SOX2 (Cell Signaling, 1/500), antikorları ve sekonder antikor olarak da Antimouse-HRP ve Antirabbit-HRP sekonder antikorlar (Cell Signaling, 1/5000) kullanıldı. Boyalar; TMRE (Thermo Scientific), HOECHST (Thermo Scientific). Farklılaşma ajanı; All-trans retinoik asit, RA (SIGMA).

3.9. Kitler

Kültüre edilerek çoğaltılan hücrelerden total RNA izolasyonu yapmak için NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, ABD), izole edilen total RNA'lardan tek zincirli cDNA sentezi yapmak için High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, ABD), gen ifadesi analizinde Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific, ABD), protein ifadesi analizinde Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD) ve ZEB2 gen ifadesinin baskılanmasında ise Lentiviral shRNA partikülleri (Thermo Scientific) kullanıldı.

4.YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında, SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit ile farklılaştırılması sırasında, SH-SY5Y hücrelerinde ZEB2 ifadesinin ve ZEB2 hedef genlerinin değişiminin araştırılması hedeflenmektedir. Bu kapsamda yapılacak çalışmaları özetleyen akış şeması aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Tez kapsamında yapılan çalışmalara ait iş akış şeması.

4.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Kullanılan hücre hatları -196 ˚C'lik sıvı azot tankından çıkartılıp 37˚C'lik su banyosu içerisinde kısa sürede erimesi sağlandıktan sonra, hücreler içerisinde 5 mL yüksek-glukoz DMEM besiyeri (%10 Fetal dana serumu, %1 penisilin-stereptomisin ve %1 non-essential aminoasit) bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı ve 400 g'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildikten sonra hücre pelleti besiyeri ile çözüldü ve hücreler 60mm'lik hücre kültür plakalarına ekildi. Hücreler 37˚C sıcaklıktaki ve %5 CO_2 içeren inkübatörde büyütüldü. Hücre yoğunluğu %80-90 doluluğa (confluency) ulaştıkları zaman, besiyeri aspire edilip kültür kabı 3 ml 1X PBS eklenerek yıkandıktan sonra 1 ml %0.25 Tripsin/EDTA (2X) eklendi. Hücre kültür kabı inkübatöre koyularak 2-3 dk kadar

bekletildi. Tripsin muamelesinin ardından 3 ml DMEM besiyeri ortama eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik tüplerde toplanarak 5 dk boyunca 400 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti, hücrenin pasaj ihtiyacına ve hücre türüne bağlı olarak DMEM besiyeriyle birlikte resüspanse edilerek, 1/3-1/6 dilüsyon oranlarında hücre kültür kaplarına ekildi.

4.2. Hücre Stoklarının Oluşturulması

Hücre stoğu oluşturmak amacıyla, yukarıda anlatıldığı şekilde kültüre edilen hücreler ml'de 1-2x10^6 olacak şekilde %90 FBS/%10 DMSO varlığında 'Mr. Frosty' kabı içerisinde bir gece boyunca -80˚C'de bekletildikten sonra uzun süre muhafaza etmek için -196 ˚C'lik sıvı azot tankına aktarıldı.

4.3. Transformasyon

Lentiviral ZEB2 shRNA ile pLKO.1 plazmitleri E. coli DH5α'ya bakterisine transforme edildi. 10 ng plazmit 100 µl DH5α kompetana eklendi ve 30 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Ardından, 42˚C'de 1 dk ısı şokunun şokuna maruz bırakıldı ve bakterilerin üzerine 700 ml antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklenerek 37˚C'de 1 saat çoğalmaya bırakıldı. 1 saatin sonunda bakteriler 500 x g'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve yaklaşık olarak 50 µl LB içerisindeki çözülerek seçici antibiyotik içeren 10 mL LB-agar dökülmüş petrilere drigalski kullanılarak yayıldı. Bakteri büyütme kapları 37 ˚C'de 16-18 saat inkübe edildi. Ertesi gün tek düşen kolonilerden biri seçilerek antibiyotik içeren 5 mL LB besiyerine inoküle edildi ve inoküle edilen baktariler 37˚C'de gece boyu büyümeye bırakıldı.

Bakterilerden plazmid izolasyonu NucleoSpin Plazmid miniprep (Macherey-Nagel) kiti ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

4.4. shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1 SHSY5Y Hücre Klonlarının Oluşturulması

4.4.1. Lentiviral Parçacıkların Eldesi

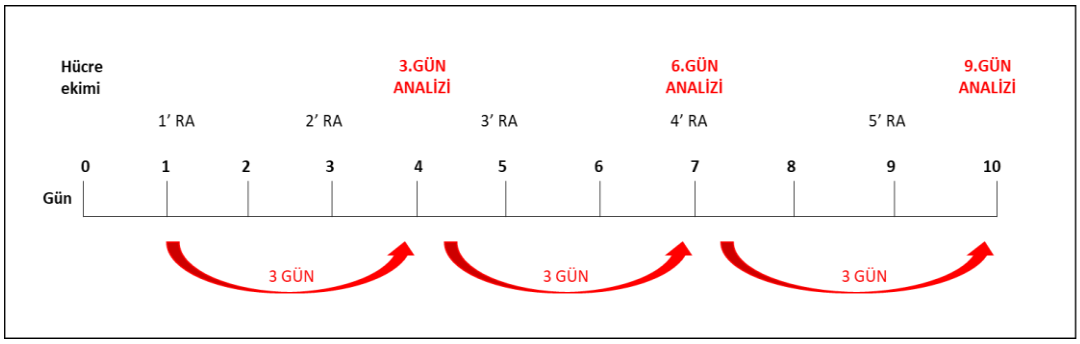
Lentiviral shRNA partikülleri HEK293T hücreleri kullanılarak elde edildi. HEK293T hücreleri kuyu başı $2x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün PEI transfeksiyon ajanı kullanılarak hücrelere plazmit transfeksiyonu gerçekleştirildi. Kısaca, birinci tüpte 1,5 µg shZEB2 veya kontrol pLKO.1 plazmidleri ile 1,5 µg pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene, plazmit #8455) ve 1 µg pCMV-VSV-G (Addgene #8454) paketleme plazmidleri 250 µl Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) içerisinde bir araya getirildi. İkinci tüpte 250 µl Opti-MEM içerisine 1:3 oranında (plazmid DNA (ağırlık): PEI (hacim)) transfeksiyon ajanı Polyethyleneimine'den (PEI) konuldu. Bu iki karışım bir araya getirildi ve 20 dk RT'de inkübe edildi. Transfeksiyonun kontrolü amacıyla RED plazmiti kulanıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin besiyeri çekildi, her bir kuyuya 1 ml %10 FBS içeren DMEM eklenerek hazırlanan karışım damla damla hücrelerin üzerine bırakıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler 100 mm petriye aktarıldı ve taze besiyeri eklendikten 48 saat sonra da hücrelerin üst-sıvı kesimi toplanarak 400 g 'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından üst sıvı toplandı ve 0.45µm por çaplı filtreden geçirilerek 80^oC'de saklandı.

4.4.2. Transfeksiyon

SH-SY5Y hücreleri %40 yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün, hücreler 8 µg/mL Polybren (Thermo Scientific, ABD) varlığında 1 mL viral partikül ile enfekte edildi. Bu işlemden 24 saat sonra, hücreler 60 mm petriye pasajlanarak 1 µg/mL Puromisin (InVivoGen, USA) ile klon seçilimine başlandı. 2 hafta süren antibiyotik seçiliminden sonra ZEB2-baskılanmış (shZEB2) ve kontrol hücre klonları oluşturuldu. shZEB2 klonlarındaki ZEB2'nin bakılanması kontrol hücrelere kıyasla gen ifadesi seviyesinde qRT-PCR ile ve protein ifadesi seviyesinde de western blotlama ile gösterildi.

4.5. Nöronal Farklılaştırma

SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşmasında hücreler retinoik asit ile muamele edildi. Farklılaşma süresince hücreler, jelatin kaplı hücre kültür kaplarında ve %1 FBS içeren DMEM besiyerinde 3, 6 ve 9 gün inkübe edildi. Daha sonra toplanan hücrelerin farklılaşma düzeyleri Western blotlama, qRT-PCR ve TMRE-akım sitometirisi ile incelendi. Tez boyunca gerçekleştirilen farklılaşma protokolüne ait aşamaların detayları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Farklılaşma protokolüne ait iş akış şeması.

0. Gün: SH-SY5Y hücreleri yaklaşık %80-90 yoğunluk oranına ulaşınca, hücreler 1 ml %0.25 Tripsin/EDTA (2X) varlığında 2-3 dk boyunca 37°C'de inkübe edilerek hücre kültür kabından kaldırıldı. Ardından 5 ml %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile tripsin aktivitesi inhibe edildi. Hücre çözeltisi 15 ml'lik tüplerde toplanarak 5 dakika boyunca 400 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, pellet istenilen hücre yoğunluğunu elde elde etmek için belirli miktarda %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile çözüldü ve önceden jelatinle kaplanan 35 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi.

1. Gün: Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapılmaksızın, %1 FBS DMEM + 10µM RA içeren farklılaşma besiyeri dikkatlice hücrelerin büyüme ortamına verildi. Eş zamanlı olarak, bu aşamada retinoik asit uygulanmayan negatif kontrol grubu da oluşturuldu. Retinoik asit ısı ve ışık gibi ortam koşullarından etkilenen bir kimyasal olduğu için çalışmalar uygun çalışma ortamında hızlı şekilde gerçekleştirildi.

2. Gün: Hücreler nöronal farklılaşma için 37˚C sıcaklıktaki ve %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildi.

3. Gün: Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapılmaksızın, %1 FBS eklentili DMEM + 10µM RA içeren farklılaşma besiyeri dikkatlice hücrelerin büyüme ortamına verildi.

4. Gün: 3 gün boyunca RA ile farklılaşmaya indüklenen hücreler analiz için toplandı.

- WB ve qRT-PCR deneyleri için; 1X PBS ile yıkanan hücreler tripsinle hücre kültür kabından kaldırılarak falkon tüplere aktarıldı. 500 x g'de 7 dk santrifüj edilen tüplerin üst-sıvı kesimi ortamdan uzaklaştırılarak, elde edilen hücre pelleti diğer analiz günleri ile birlikte işleme tabi tutulmak üzere -80˚C'de saklamaya alındı.
- TMRE; aynı gün içerisinde ilgili yöntem başlığının altında anlatıldığı şekilde işleme tabi tutuldu.

5. Gün: Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapılmaksızın, %1 FBS eklentili DMEM + 10µM RA içeren farklılaşma besiyeri dikkatlice hücrelerin büyüme ortamına verildi.

6. Gün: Hücreler nöronal farklılaşma için 37˚C sıcaklıktaki ve %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildi.

7. Gün: 6 gün boyunca RA ile farklılaşmaya indüklenen hücreler analiz için toplandı.

9. gün için ekilen hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapılmaksızın, %1 eklentili FBS DMEM + 10µM RA içeren farklılaşma besiyeri dikkatlice hücrelerin büyüme ortamına verildi.

8. Gün: Hücreler nöronal farklılaşma için 37˚C sıcaklıktaki ve %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildi.

9. Gün: Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapılmaksızın, %1 FBS eklentili DMEM + 10µM RA içeren farklılaşma besiyeri dikkatlice hücrelerin büyüme ortamına verildi.

10. Gün: 9 gün boyunca RA ile farklılaşmaya indüklenen hücreler analiz için toplandı.

4.6. Mitokondri Potansiyelinin Analizi

4.6.1. Akım Sitometrisi

Nöronal farklılaşmanın mitokondri potansiyeli üzerindeki etkisi Tetrametilhodamin, Etil Ester, Perklorat (TMRE) boyaması ile gösterildi. TMRE boyamasının kantitatif olarak gösterimi akım sitometrisi tekniği ile yapıldı. SH-SY5Y hücreleri %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde %20 yoğunlukta olacak şekilde 35 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 µM RA ve %1 eklentili FBS içeren DMEM besiyeri ile tazelenerek, hücreler 3, 6 ve 9 gün olmak üzere farklı sürelerde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre kültür kaplarındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılrak 1 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında hücreler 2X tripsinle 2-3 dk boyunca 37°C'de inkübe edilerek hücre kültür kabından kaldırıldı ve 15 ml'lik deney tüplerine toplanarak 400 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından elde edilen hücre pellet 1 ml DMEM besiyeri içersinde çözüldü ve hücre süspaniyonundan 200 µl alınarak, DMEM ile seyretilmiş 200 µl 1X TMRE boyası ile karıştırılıp 20 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası örnekler akım sitometrisi cihazında okutularak analiz edildi.

4.7. Değişen Gene İfadelerinin Analizi

RA uygulanan SH-SY5Y ile RA uygulanmayan SH-SY5Y hücrelerinde gen ifadesi analizleri için öncelikle hücreler %30 yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 µM RA içeren %1 eklentili FBS DMEM besiyeri ile tazelenerek 3, 6 ve 9 gün olmak üzere farklı sürelerde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre kültür kaplarındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılrak 1 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında hücreler 2X tripsinle 2-3 dk boyunca 37°C'de inkübe edilerek hücre kültür kabından kaldırıldı ve 15 ml'lik deney tüplerine toplanarak 400 x g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından elde edilen hücre pelletleri, RNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80˚C'de saklamaya alındı.

shZEB2-SH-SY5Y klonu ile plKo-SH-SY5Y hücre klonlarında gen ifadesi analizleri için öncelikle hücreler %40 dolulukta olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 60

mm hücre kültür kaplarına ekildi. %70-80 doluluğa ulaşınca hücreler 2X Tripsin ile kaldırılarak pelletler, RNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80˚C'de saklamaya alındı.

4.7.1. RNA İzolasyonu

Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, ABD) kullanılarak 0., 3., 6., ve 9. günlerde alınan örnekler ile üretici firmanın talimatlarına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, hücre pelleti re-suspension (RE) buffer ile çözdürüldü ve hücreler lizis tamponu kullanılarak ile lizis işlemine tabi tutuldu. Ardından elde edilen hücre içerikli çözelti filtrelendi ve hücre debrisi kolona tutturularak nükleik asitler kolondan geçirildi. Tüpte toplanan örneklere RNA-bağlama solüsyonu eklenerek total RNA'yı tutacak olan kolondan geçirildi. Daha sonra kolon yıkama solüsyonları ile yıkandı ve yüksek saflıkta RNA elde etmek için 30 µl dH_2O kullanılarak elüsyon işlemi gerçekleştirildi.

RNA izolatlarının bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla örnekler 65 ˚C'de 5 dakika boyunca su banyosunda inkübe edilerek, buz üzerine alındı. Ardından 1X DNA yükleme boyası ile karıştırılarak, %2'lik agaroz jele yüklendi. Agaroz jel elektroforezinde 1kb büyüklüğünde marker kullanıldı ve elektroforez işlemi100 V ve 300 mA'lik güç kaynağıyla 60 dakika boyunca sürdürüldü. Jelde yürütülen örneklerde 26S ve 18S bantlarının varlığı ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu, kalitesi ve saflıkları OD 260/280'de NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80˚C'de saklamaya alındı.

4.7.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, ABD) kiti kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapılmıştır. İlk olarak Tablo 4.1'de tek bir örnek için miktarları gösterilen 2X master karışımı örnek sayısınca hazırlandı. Hazırlanan 2X RT master karışımından 10 µl alındı ve içerisinde 10 µl total RNA örneği (2 µg total RNA) bulunan PCR tüpüne aktarıldı. Final hacmi 20 µl olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirilerek kitin önerdiği döngü koşullarında cDNA sentezi yapıldı (Tablo 4.2).

Sentezlenen cDNA'nın konsantrasyonu ve absorbans (OD 260/280 oranı) değerleri NanoSpec spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Son olarak, sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'lik soğutucuda saklamaya alınmıştır.

Tablo 4.1: 2X RT master karışımı.

10X RT tampon	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	2 µl
dH2O	4.2 µl
Toplam hacim	10 µl

Tablo 4.2: PCR döngü şartları.

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Basamak 1	25	10
Basamak 2	37	120
Basamak 3	85	5
Basamak 4	4	∞

4.7.3. qRT-PCR ile Gen İfadesi Analizi

Farklılaşma belirteci olarak kullanılan MAPT, TUBB3, SYN ve GAP43 ile ZEB2'ye yönelik primerler PrimerQuest Tool kullanılarak bu genlerin GC içeriği, kendi üzerine kapanma, 3' ucunda katlanma gibi primer özgüllüğünü etkileyen özellikler baz alınarak tasarlandı. Tasarlanan primerlerin hedefe olan özgüllüğü de NCBI-Blast programı kullanılarak kontrol edildi.

Gen ifadesi değişimlerini kantitatif olarak belirleyebilmek için 2 µl cDNA (25ng Cdna), 10 µl (2X) 2X Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific, ABD) , 0,4 µl primerler (10 µM) ve nuclease-free dH_2O kullanılarak 20 µl'lik qRT-PCR reaksiyon hacmi hazırlandı (Tablo 4.3). cDNA kalıbı olarak RA uygulanan SH-SY5Y ile RA uygulanmayan

SH-SY5Y ve shZEB2-SH-SY5Y klonu ile plKo-SH-SY5Y hücre klonlarından elde edilen cDNA'lar kullanıldı. qRT-PCR reaksiyonu kitin önerdiği döngü şartlarında gerçekleştirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.3: qRT-PCR reaksiyon tablosu.

2X master mix	10 µl
İleri primer (10 µM)	0,4 µl
Geri primer (10 µM)	0,4 µl
cDNA (40 ng)	2 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	7.2µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 4.4: qRT-PCR döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (ºC)	Süre
1 döngü	95	10 dk
45 döngü	95	20 sn
	60	30 sn
	72	30 sn
Erime eğrisi	55 - 95	Her 0.1ºC sıcaklık değişiminde ölçüm

qRT-PCR, okuma sonucunda her bir örnek için ayrı bir CT değeri olarak sonuç verir. Bu değer her bir örnekteki eşik değerini aşan SYBR ışıması ile ifade edilir.

Gen ifadesindeki değişim ise, $\Delta\Delta Ct$ formülü ile internal kontrol GAPDH'a göre normalize edildikten sonra, parental hücre hatlarına göre kalibre edilerek hesaplandı.

$$\Delta\Delta Ct = \frac{E_{gen}{}^{\Delta Ct}\ (kalibratör - örnek)}{E_{norm.}{}^{\Delta Ct norm.}\ (kalibratör - örnek)} \tag{4.1}$$

$$Relative\ ekspresyon = Log_2\ (\Delta\Delta Ct) \tag{4.2}$$

qRT-PCR reaksiyonu duplike olarak yapıldı ve deneyler 3'şer kez tekrarlandı. Kat değişiminin belirlenmesinde 0,5'in altı ya da üstündeki değerler baz alındı.

4.8. Değişen Protein İfadelerinin Analizi

RA uygulanan SH-SY5Y ile RA uygulanmayan SH-SY5Y hücrelerinde protein ifadesi analizleri için öncelikle hücreler %30 yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 µM RA içeren %1 eklentili FBS DMEM besiyeri ile tazelenerek 3, 6 ve 9 gün olmak üzere farklı sürelerde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre kültür kaplarındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılrak 1 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında hücreler 2X tripsinle 2-3 dk boyunca 37°C'de inkübe edilerek hücre kültür kabından kaldırıldı ve 15 ml'lik deney tüplerine toplanarak 400 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından elde edilen hücre pelletleri, protein izolasyonunda kullanılmak üzere -80˚C'de saklamaya alındı.

shZEB2-SH-SY5Y klonu ile plKo-SH-SY5Y hücre klonlarında gen ifadesi analizleri için öncelikle hücreler %40 yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. %70-80 doluluğa ulaşınca hücre kültür kaplarındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılrak 1 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında hücreler 2X tripsinle 2-3 dk boyunca 37°C'de inkübe edilerek hücre kültür kabından kaldırıldı ve 15 ml'lik deney tüplerine toplanarak 400 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından elde edilen hücre pelletleri, protein izolasyonunda kullanılmak üzere -80˚C'de saklamaya alındı.

4.8.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Hücre pelletlerin üzerine pelletlerin büyüklüklerine göre Proteaz inhibitor kokteyli (Roche) içeren 2x SDS lizis tamponu eklenerek pellet çözülene kadar vortekslendi. Ardından sırasıyla oda sıcaklığında 5 dk, buzda 20 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Bioruptor Pico (Diagenode) cihazı kullanılarak 30-saniye-on/30-saniye-off olacak şekilde 10 döngü sonike edildi. Son olarak, örnekler 10000 x g'de +4˚C'de 15 dk boyunca santrifüjlenerek hücre debrisi pellet haline getirildi ve üst-sıvı kesimi protein

lizatı olarak yeni etiketli bir ependorfa aktarıldı. Elde edilen protein lizatları kısa süreli -20˚C'de uzun süreli olarak -80˚C'de saklamaya alındı.

4.8.2. Protein Miktar Tayini

Elde edilen protein lizatlarındaki protein konsantrasyonları Qubit protein assay kiti (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlendi.

4.8.3. Örneklerin Hazırlanması, Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları belirlendikten sonra 50 µg total protein 5x yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 10 dakika boyunca 95˚C'de inkübe edilerek yüklemeye hazır hale getirildi. Örnekler ve protein ladder (marker) incelenecek proteinin büyüklüğüne ve deney planına uygun şekilde %8-10-12'lik SDS-PAGE jele yüklendikten sonra, elektroforez işlemi örnekler üst jelden geçene kadar 80 voltta devamında ise 120 voltta olacak şekilde gerçekleştirildi. Jelde yürütülen proteinlerin PVDF membrana aktarımını sağlamak için TransBlot (Biorad) cihazı yüksek moleküler ağırlığı programında, 50 dk boyunca kullanıldı. Membranlar %5 Tween-20 içeren yağsız süt tozu ile 1 saat kadar oda sıcaklığında bloklandı. Bloklanan membranlar primer antikorlar ile -4˚C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membranlar 3 kez, 5 dk boyunca TBS-T ile yıkandıktan sonra uygun sekonder antikorlar ile $1^{1/2}$ saat inkübe edildi. Ardından 3 kez, 5 dk boyunca TBS-T ile yıkanan membranlara Amersham ECL Select (GE Healthcare) kemilüminesan substratı uygulanarak proteinler Görüntü Analiz Sisteminde (Biorad) fotoğraflanarak, dosyalandı.

4.9. İstatistiksel Analizler

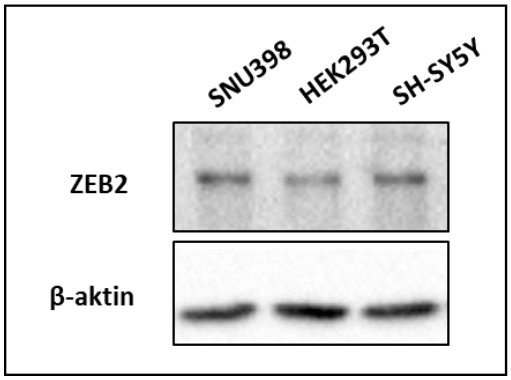
İstatistiksel analizler ise GraphPad Prism 6 programında Student's t-test yapılarak gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

Fare modelleri üzerinde yapılan bir çalışmada nöral farklılaşma sırasında ZEB2 ifadesinin düştüğü gösterilmiştir [Hegarty et al., 2017]. Bununla birlikte yine aynı çalışmada SH-SY5Y hücre hattında siRNA ile ZEB2 ifadesi baskılandığında nörit uzantılarının daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak, çalışmalarda kullanılan SH-SY5Y hücre hattının heterojen özellikte olduğu da göz önüne alınırsa, sunulan bu tez çalışmasında öncelikle SH-SY5Y hücre hattında ZEB2 ifadesinin varlığı qRT-PCR ve western blotlama yöntemleri ile incelendi. Ardından tez çalışması kapsamında SH-SY5Y hücreleri RA kimyasalı ile muamele edilerek hücrelerin nörojenik farklılaşması indüklenmiştir. Farklılaşma belirteci olarak GAP43, SYP, MAPT ve TUBB3 genlerinin ifadesi qRT-PCR tekniği ile, NF-H, TH, NEUN ve TUBB3 proteinlerinin ifadesi ise western blotlama tekniği ile incelendi. Farklılaşma sırasında mitokondri potansiyelindeki değişimler TMRE boyaması ile gösterildi. Hücrelerin morfolojik değişimleri ışık mikroskobu ile incelendi. Tezin devamında ise SH-SY5Y hücrelerinde ZEB2 ifadesi lentiviral shRNA tekniği ile baskılandı. ZEB2 ifadesi kalımlı olarak baskılanan klonların farklılaşma potansiyelleri gen ve protein seviyesinde araştırıldı. Daha sonra laboratuvarımızda daha önceden analiz edilen ZEB2 ChIP-seq hedef listesinden seçilen farklılaşma, gelişim/morfogenez, hücre iskeleti, hücresel sinyal iletimi, çoğalma/hücre döngüsü ve apoptoz/hücresel sağkalım ile ilişkili genlerin ifadesi shZEB2- SH-SY5Y ve kontrol SH-SY5Y hücre klonlarında qRT-PCR ile analiz edildi. Tez çalışmasının son adımı olarak ZEB2 bağımlı olarak ifadesi değişen genlerin nöral farklılaşma sırasındaki durumları da RA uygulanmış ve uygulanmamış SH-SY5Y hücrelerinde qRT-PCR ile incelendi. shZEB2-SH-SY5Y hücrelerinde ve RA uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde ortak değişim gösteren genlerin nöronal farklılaşma sürecinde ZEB2-bağımlı olarak değişen genler olabileceği öngörüldü.

5.1. SH-SY5Y Hattında ZEB2 İfadesi

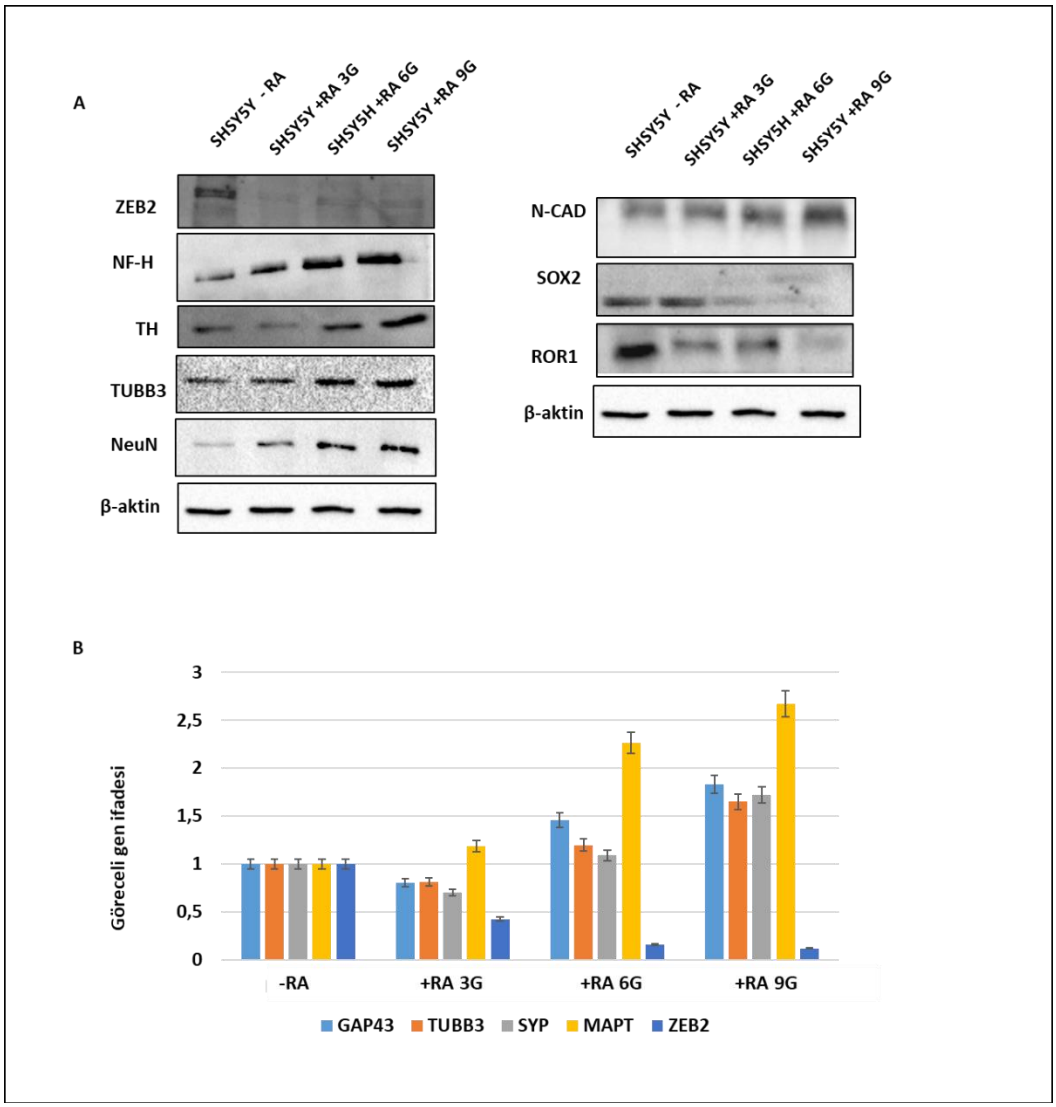
SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı, HEK293T insan embriyonik böbrek hücre hattı ve daha önce ZEB2 ifadesi gösterilmiş olan SNU398 hepatoselüler karsinoma hücre hattında ZEB2 protein ifadesi western blotlama yöntemi ile gösterildi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Hücre hatlarında ZEB2 protein ifadesinin gösterilmesi. SNU398, HEK293T ve SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen total hücre lizatlarında ZEB2 ifadesi western blotlama yöntemi ile analiz edildi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. İncelenen her 3 hücre hattında da farklı düzeylerde ZEB2 ifadesi saptandı.

5.2. SH-SY5Y Hücre Hattının RA ile İndüksiyonu

SH-SY5Y hücre hattında ZEB2 ifadesi gösterildikten sonra nöral farklılaşma sırasında ZEB2 protein ifadesindeki değişim incelendi. Nöral farklılaşma için, SH-SY5Y hücre hattı retinoik asit ile uyarıldı. Retinoik asit uygulanmasından 3, 6 ve 9 gün sonra retinoik asit uygulanmamış hücrelere göre ZEB2'nin gen ve protein seviyesindeki değişimleri incelendi. Farklılaşmanın karakterizasyonu için NF-H, TH, TUBB3 VE NeuN farklılaşma belirteçleri ve farklılaşma sürecinde değişim gösterdiği bilinen N-CAD, SOX2 ve ROR1 ifadeleri protein seviyesinde, GAP43, TUBB3, SYP ve MAPT farklılaşma belirteçleri gen ifadesi seviyesinde incelendi (Şekil 5.2).



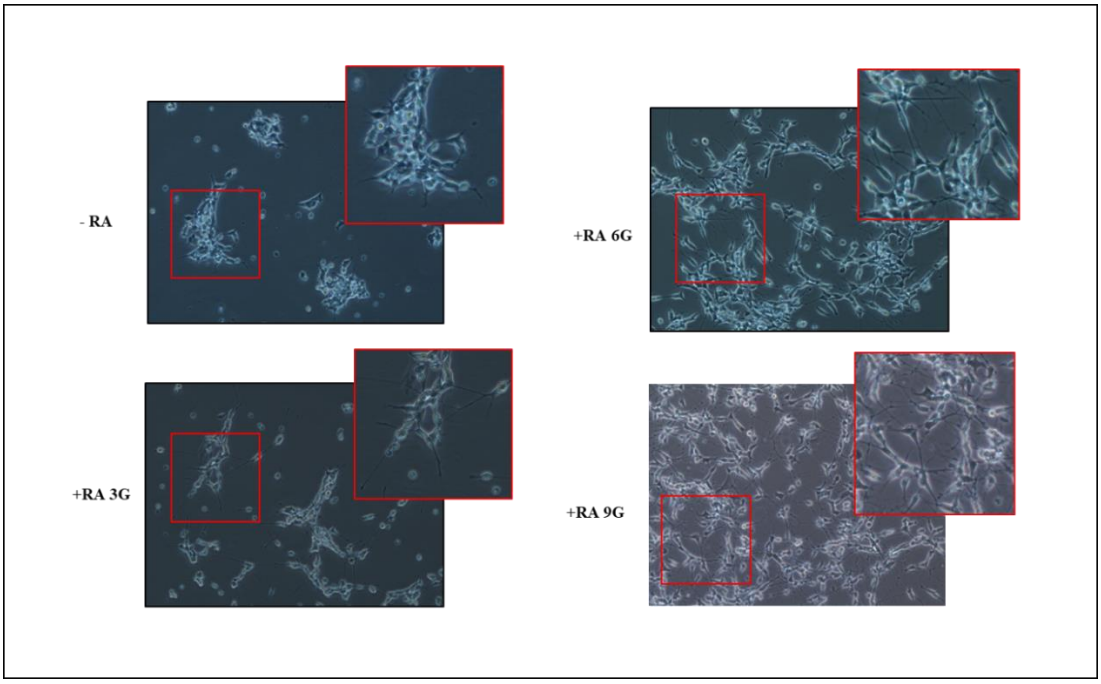
Şekil 5.2: SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşma sürecinin karakterizasyonu. A) NF-H, TH, TUBB3 ve TH farklılaşma belirteçlerinin ve ZEB2 ifadesinin 3., 6., ve 9. günde protein seviyesinde western blotlama yöntemi ile gösterimi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. B) GAP43, TUBB3, SYP ve MAPT ve ZEB2 gen ifadesinin 3., 6., ve 9. günde gen seviyesinde qRT-PCR ile belirlenmesi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri.

Western blotlama analizi ile NF-H, TH, TUBB3 ve NEUN belirteçlerinde özellikle 6. ve 9. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Retinoik asit muamelesi ile farklılaşması indüklenen hücrelerde farklılaşma belirteçlerinin arttığı ve ZEB2 ifadesinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Bununla beraber değişen ZEB2 ifadesi ile birlikte ZEB2-ChIP-seq hedeflerinden biri olan ROR1 proteinin ifadesindeki değişim incelendi ve ZEB2 ile beraber ROR1 protein ifade seviyesinde de azalma tespit edildi. Bunun yanısıra ZEB2 geninin epitel mezenkimal geçişi ve hücrenin

epitel/mezenkimal karakterini değiştirdiği göz önüne alınarak kök hücre belirteçlerinden biri SOX2 ve nöral hücrelerin epitelyal karakterini temsil eden N-CAD proteinlerinin ifadesindeki değişim incelendi ve SOX2 protein ifadesinin azalırken N-CAD protein ifadesinin farklılaşmanın ilerleyen günlerine bağlı olarak arttığı gözlendi. (Şekil 5.2a). qRT-PCR analizinde ise GAP43, TUBB3 ve SYP genlerinin ifadelerinin 3. günde azaldığı MAPT geninin ifadesinin ise kısmi olarak arttığı gözlenirken, tüm belirteçlerin ifadesinin 6. ve 9. günde arttığı tespit edildi. Bunun yanısıra ZEB2 ifadesinin ise farklılaşmanın ilerleyen günlerinde kademeli şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 5.2b).

Literatürdeki bilgiler dahilinde farklılaştırdığımız hücrelerin ileri validasyonu amacıyla hücre morfolojisi ve TMRE boyaması incelenmesi gerçekleştirildi.

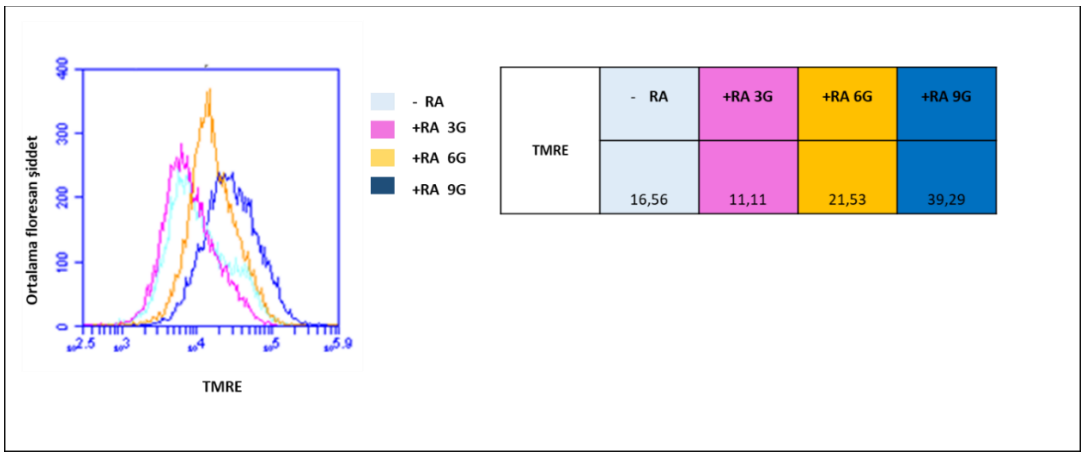
Retinoik asit uygulanmış ve kontrol hücrelerinin morfolojik değişimleri ters-ışık mikroskobu ile farklılaşmanın 3., 6., ve 9. gününde incelendi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Farklılaşan hücrelerdeki morfolojik değişimlerin 3., 6., ve 9. günde ters ışık mikroskobu kullanılarak gösterimi.

Retinoik asit uygulanmamış hücrelere göre, retinoik asit uygulanmış hücrelerde süreye bağlı olarak parental hücrenin yuvarlak-benzeri hücre tipinin aksine farklılaşan hücrelerin daha uzantılı ve iğsi bir hücresel morfoloji kazandığı gözlemlendi (Şekil 5.3).

Mitokondriyal aktivitenin önemli bir göstergesi olan, ATP üretimi ile ilişkili elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyon sürecini yansıtan mitokondriyal membran potansiyelindeki (ΔΨm) değişimler TMRE boyaması ile belirlenmektedir [Crowley L.C. et al., 2016]. Retinoik asit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde, uygulanmamış hücrelere göre mitokondri potansiyelindeki değişimler TMRE boyaması ile akım sitometresi kullanılarak analiz edildi (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: Mitokondriyel potansiyelinin 3., 6., ve 9. günde TMRE boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak belirlenmesi.

RA uygulanmayan hücrelere kıyasla, RA muamelesi ile farklılaşan hücrelerde 3. günde kısmı bir azalış gözlenirken, 6. ve 9. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oldugu belirlendi. TMRE ifadesi akım sitometrisi ile kantitatif olarak belirlendi (Şekil 5.4).

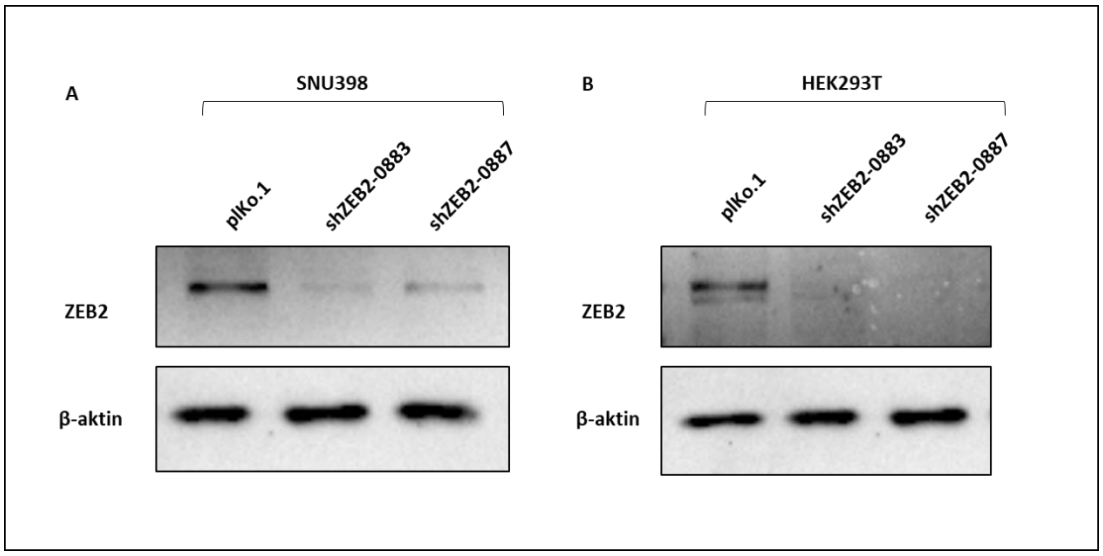
5.3. SH-SY5Y Hücre Hattında ZEB2 İfadesinin Baskılanması

SH-SY5Y hücrelerinde farklılaşma sırasında ZEB2 ifadesinin azaldığının gösterilmesinin ardından ZEB2'nin ChIP-seq hedef genlerinindeki değişiminin saptanması amacıyla ZEB2 ifadesinin kalımlı olarak baskılandığı SH-SY5Y ve kontrol klonları elde edildi.

5.3.1. shZEB2 Plazmitlerinin Validasyonu

Ticari olarak temin edilen shRNA'ların etkinliği SNU398 ve 293T hücre hatlarında valide edildi. Lentiviral shRNA vektörleri ve paketleme vektörleri kullanılarak elde edilen

lentiviral partiküller ile SNU398 ve HEK 293T hücre hatları enfekte edildi. Transdüksiyondan sonra hücreler puromisin ile seçildi ve ZEB2 ifadesi western blotlama analizi ile araştırıldı (Şekil 5.5).

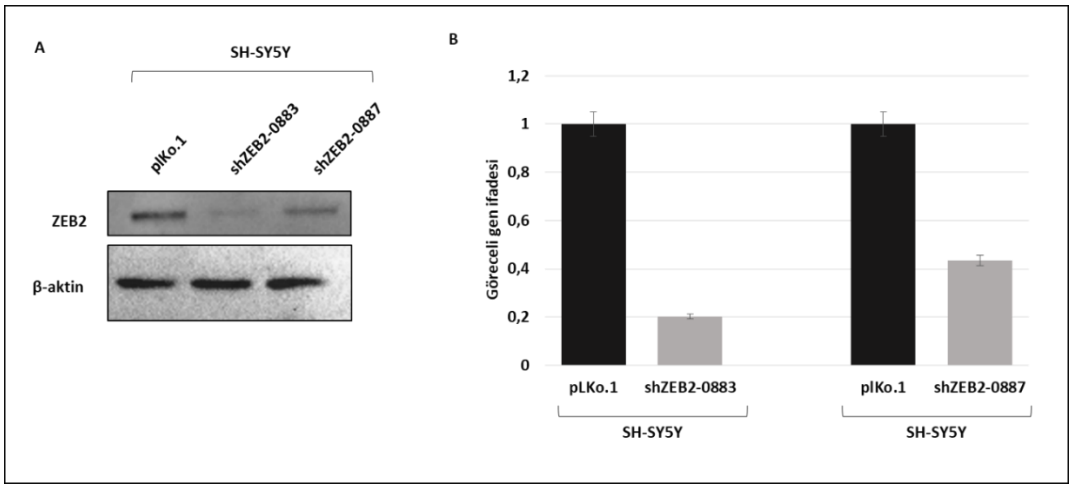


Şekil 5.5: ZEB2 ifadesinin shRNA ile baskılanması. A) SNU398 hücre hattında ZEB2 ifadesinin baskılanması, total hücre lizatlarında ZEB2 ifadesi western blotlama yöntemi ile analiz edildi. B) HEK293T hücre hattında ZEB2 ifadesinin baskılanması, total hücre lizatlarında ZEB2 ifadesi western blotlama yöntemi ile analiz edildi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

ZEB2 geninin baskılanması için kullanılan lentiviral vektörlerin genin susturulmasını sağladığı gösterildi (Şekil 5.5).

5.3.2. Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarının Oluşturulması

Elde edilen lentiviral partiküllerin etkinlikleri gösterildikten sonra ZEB2 ifadesinin kalımlı olarak baskılandığı shZEB2 ve kontrol hücre klonlarının elde edilmesi amacıyla SH-SY5Y hücreleri lentiviral partiküller ile transfekte edildi. Daha sonra puromisin seçilimi ile ZEB2 ifadesinin baskılandığı kalımlı hücre klonları elde edildi. ZEB2 ifadesi hem protein hem de gen seviyesinde analiz edildi (Şekil 5.6).

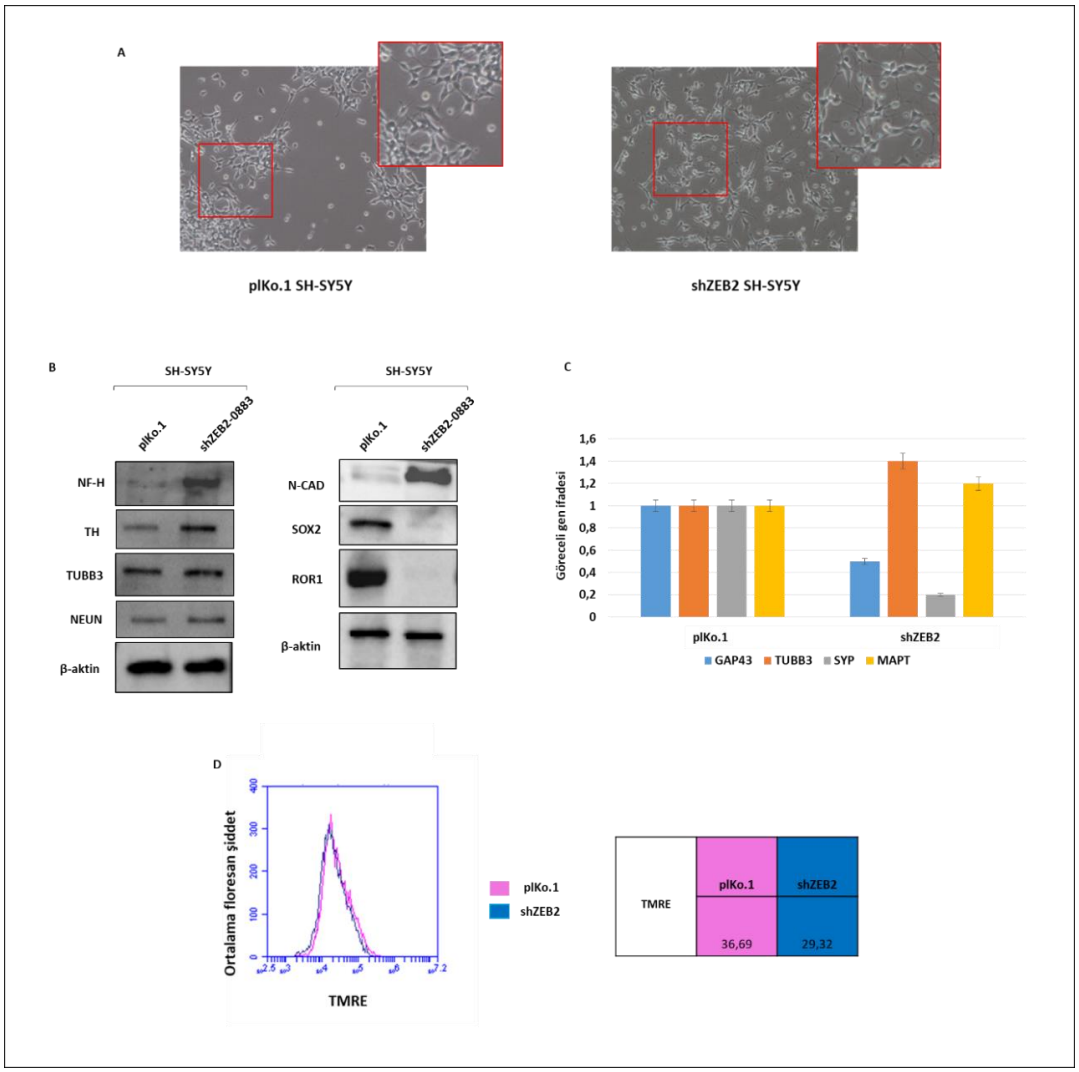


Şekil 5.6: SH-SY5Y hücre hattında ZEB2 ifadesinin baskılanması ve kalımlı klonların oluşturulması. A) SH-SY5Y hücre hattında ZEB2 ifadesinin baskılanması, total hücre lizatlarında ZEB2 ifadesi western blotlama yöntemi ile analiz edildi. B) ZEB2 gen ifadesinin gen seviyesinde qRT-PCR ile belirlenmesi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri.

Elde edilen hücre klonlarından shZEB2-0883 kodlu olan hücrelerde hem protein hem de gen seviyesinde ZEB2 ifadesinin daha fazla baskılandığı gözlendi. Tez çalışmasının devamında bu hücre klonu kullanıldı.

5.3.3. Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarında Nöral Farklılaşma Belirteçlerinin İncelenmesi

SH-SY5Y hücrelerinde farklılaşma sırasında ZEB2 ifadesinin azaldığı yukarıda gösterilmişti. Buradan yola çıkarak, ZEB2 ifadesinin baskılandığı hücrelerin farklılaşma durumlarının incelenmesi amacıyla SH-SY5Y hücrelerinde retinoik asit uygulanması sonrasında değiştiği belirlenen nöral farklılaşma belirteçlerinin ifadeleri elde edilen shZEB2 ve kontrol hücre klonlarında da araştırıldı (Şekil 5.7). Bununla birlikte ZEB2 ifadesinin baskılandığı hücrelerin morfolojik değişimleri de ışık mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 5.7a). Kalımlı klonlardaki mitokondri potansiyelindeki değişimler TMRE boyaması ile akım sitometresi kullanılarak analiz edildi (Şekil 5.7d).



Şekil 5.7: Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda farklılaşmanın karakterizasyonu. A) ZEB2 yokluğu durumunda SH-SY5Y hücrelerineki morfolojik değişimlerin ışık mikroskobu kullanılarak gösterimi. B) shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda farklılaşma belirteçlerinin incelenmesi, total hücre lizatlarında NF-H, TH, TUBB3, NEUN, N-CAD, SOX2 ve ROR1 western blotlama yöntemi ile analiz edildi. C) GAP43, TUBB3, SYP ve MAPT gen ifadesinin gen seviyesinde qRT-PCR ile belirlenmesi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri. D) Mitokondriyel potansiyelinin kalımlı klonlarda TMRE boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak belirlenmesi.

ZEB2 ifadesinin yokluğu durumunda hücrelerin shZEB2-SH-SY5Y klonunda, plKo.1-SH-SY5Y klonuna kıyasla daha uzantılı bir yapıda olduğu ve hücre-hücre etkileşimlerinin daha fazla olduğu görüldü. Gözlemlenen bu farkın retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücreleri ile benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 5.7a). shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda ZEB2 ifadesinin yokluğu durumunda NF-H ve TH proteinlerinin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterirken, TUBB3 VE NEUN proteinlerinin ifadesi kısmi bir artış gösterdi. Bunun yanısıra nöronlara özgü N-kaderin

ifadesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi. Ayrıca, SOX2 ve ROR1 ifadelerinin azaldığı saptandı (Şekil 5.7b). Gen ifadesi analizinde de GAP43 ve SYP genlerinin ifadelerinin ZEB2 ifadesinin yokluğunda azaldığı, MAPT ve TUBB3 genlerinin ifadelerinin ise kısmi olarak arttığı belirlendi (Şekil 5.7c). Kalımlı shZEB2-SH-SY5Y klonunda kontrol hücreye oranla TMRE ifadesinde azalış gözlendi. TMRE ifadesi akım sitometrisi ile kantitatif olarak belirlendi (Şekil 5.7d).

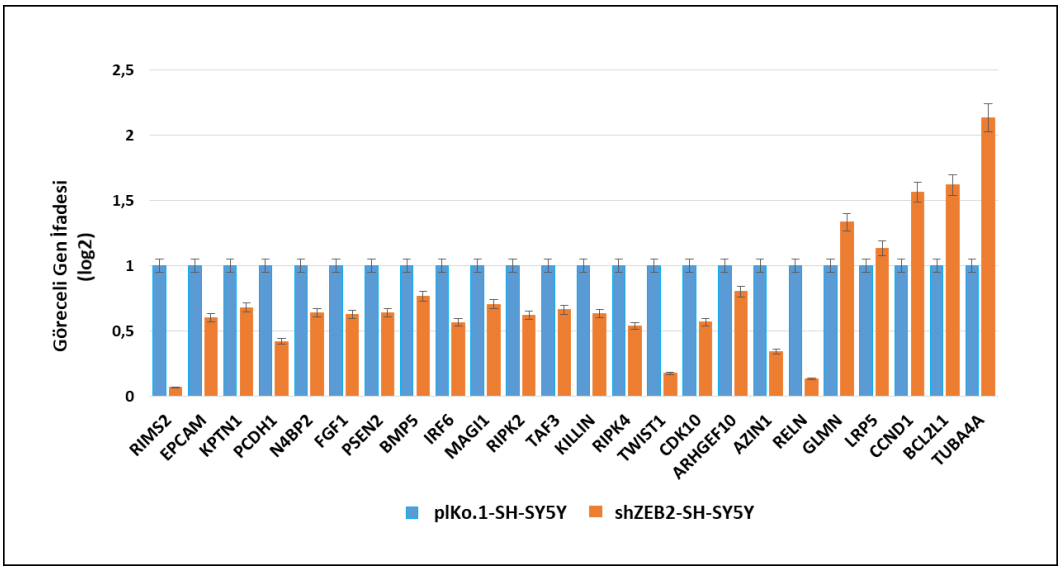
5.3.4. ZEB2-ChIP-seq Hedeflerinin shZEB2-SH-SY5Y ve plKo.1-SH-SY5Y Hücre Klonlarında Taranması

Laboratuvarımızda, karaciğer kanseri SNU398 hücre hattında ZEB2 antikoru ile daha önceden yapılmış olan ChIP-seq analiz sonuçları esas alınarak ZEB2'nin genom boyunca bağlandığı hedef gen listesinden farklılaşma, gelişim/morfogenez, hücre iskeleti, hücresel sinyal iletimi, çoğalma/hücre döngüsü ve apoptoz/hücresel sağkalım ile ilgili genler belirlendi (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: ZEB2-ChIP-seq listesindeki seçilen genlerin gruplandırılması.

	ZEB2 BAĞIMLI OLASI HEDEF GENLER
Farklılaşma	RIMS2, EPCAM, N4BP2, IRF6, TAF3, MAP7, ID2, FLNA, EZH2, MAPK1, ANKS1A, MAP3K5, CDK6, RTN4, RELN
Gelişim/Morfogenez	TWIST1, FGF1, RIPK4, KPTN, PCDH1, N4BP2, CDK10, ARHGEF10, LRP5, EMX1, EZH2, MAPK1, SIX1, CDK6, JAG2, RTN4
Hücre İskeleti	RIMS2, KPTN, TUBA4A, MAGI1, FLNA, MAPK1, CD63, CTNNA1
Hücresel sinyal iletimi	RIMS2, KPTN, PCDH1, TWIST1, FGF1, PSEN2, CDK10, BMP5, ARHGEF10, RIPK2, RIPK4, GLMN, LEMD3, MAP7, ID2, IL17C, DENND3, CALM3, FLNA, MAPK1, STX6, MESDC2, ANKS1A, CD63, PLXND1, RTN4, RELN, C1orf159, ROR1
Çoğalma/Hücre Döngüsü	IRF6, AZIN1, CDK10, CCND1, GSPT1, UHRF2, MNK2, CALM3, TFDP1, MAPK1, AKT1, CDK6
Apoptoz/Hücresel sağkalım	KILLIN, BCL2L1, TFDP1, MAPK1, CD63, MAP3K5, RIPK4, AKT1, STAT6

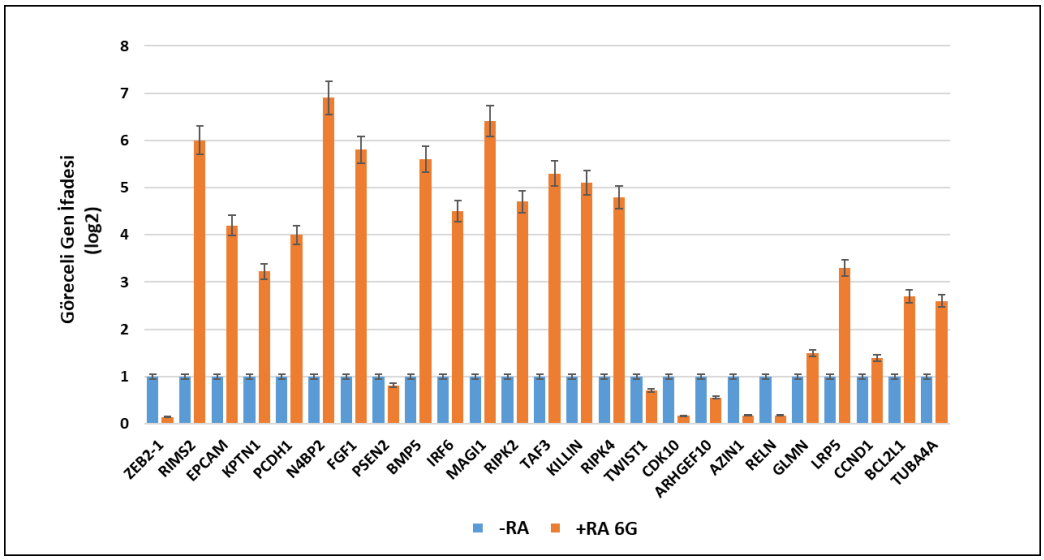
Seçilen genlere ait primerler ile qRT-PCR analizi yapıldı ve istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genlerin CT değerleri hesaplanarak, kantitatif bir veri elde edildi (Şekil 5.8).



Şekil 5.8: ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin shZEB2-SY-SY5Y hücre klonunda taranması. Belirlenen genlerin ifade seviyelerindeki değişim qRT-PCR ile belirlendi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri.

5.4. Nöral Farklılaşma Sürecinde ZEB2-Bağımlı Değişen Gen İfadelerin Saptanması

Tez çalışmasının temel amaçlarından biri de retinoik asit ile farklılaşan hücrelerde ZEB2 ifadesinin araştırılmasıdır. Farklılaşan hücrelerde ZEB2 ifadesinin düştüğü hem gen hem de protein seviyesinde gösterildi. Daha sonra ZEB2 hedef genlerinin değişimi ZEB2 ifadesinin baskılandığı ve kontrol SH-SY5Y hücre klonlarında gösterildi. Son basamakta, SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşması sırasında ZEB2 ifadesine bağlı değişimin belirlenebilmesi için hedef genlerin ifadesi qRT-PCR ile araştırıldı (Şekil 5.9).

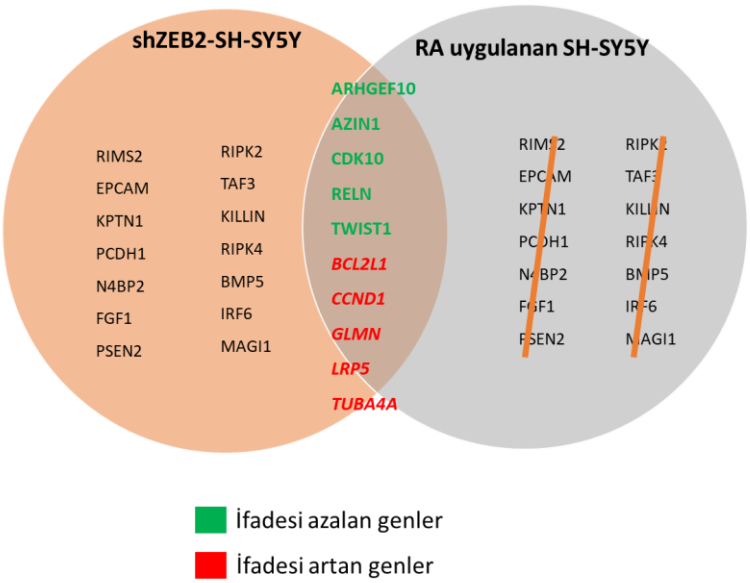


Şekil 5.9: ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde taranması. Belirlenen genlerin ifade seviyelerindeki değişim qRT-PCR ile belirlendi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri.

5.5. shZEB2-SH-SY5Y Klonu ve RA Uygulanan SH-SY5Y Hücrelerinde Ortak Değişen ZEB2-ChIP-seq Hedeflerinin Analizi

ZEB2 ifadesinin baskılandığı SH-SY5Y hücrelerinde kontrol hücrelerine göre 23 tane hedef genin değiştiği saptandı (Şekil 5.8). Daha sonra, bu 23 genin ifade değişimleri nöral farklılaşma sırasında incelendi (Şekil 5.9). Bu iki tarama sonucunda shZEB2-SH-SY5Y klonu ve RA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ortak olarak değişim gösteren 9 tane gen belirlendi (Şekil 5.10). Farklılaşma sırasında, belirlenen bu 9 tane genin ZEB2 geninin olası hedefleri olabileceği düşünülmektedir ve farklılaşma sırasında ZEB2 tarafından düzenlenip düzenlenmediklerinin ChIP yöntemi gibi özgül moleküler yöntemler kullanılarak ileri çalışmalarla valide edilmesi gerekmektedir.

	ZEB2 BAĞIMLI OLASI HEDEF GENLER
Farklılaşma	RIMS2, EPCAM, N4BP2, IRF6, TAF3,
Gelişim/Morfogenez	TWIST1, FGF1, RIPK4, KPTN, PCDH1, N4BP2, CDK10, ARHGEF10, LRP5,
Hücre İskeleti	RIMS2, KPTN, TUBA4A, MAGI1,
Hücresel sinyal iletimi	RIMS2, KPTN, PCDH1, TWIST1, FGF1, PSEN2, CDK10, BMP5, ARHGEF10, RIPK2, RIPK4, GLMN,
Çoğalma/Hücre Döngüsü	IRF6, AZIN1, CDK10, CCND1,
Apoptoz/Hücresel sağkalım	KILLIN, BCL2L1,



Şekil 5.10: shZEB2-SH-SY5Y klonu ile RA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ortak değişen ZEB2-ChIP-seq hedeflerinin gösterimi.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, sağlıklı hücrelerin içinde bulunduğu mikro-çevreden gelen sinyallere bağlı olarak gelişen mutasyonların tamir edilemeyecek seviyede genomda birikmesi neticesinde kontrollü bölünme mekanizmasından saparak kontrolsüz olarak bölünmesi ve büyümesini tanımlayan kompleks bir süreçtir. Nöroblastoma, çocukluk çağının erken dönemlerinde görülen, adrenal medulla ve paravertebral sempatik ganglionların normal gelişimini etkileyen ve nöral krestten köken alan embriyonal bir malignitedir [Tsubota and Kadomatsu, 2018]. Erken çocukluk döneminde tanı konulan kanserlerin yaklaşık %8 ila %10'u nöroblastomadır ve kansere bağlı ölümler içerisinde mortalite oranı ise %15'dir [Park et al., 2010]. Günümüzde nöroblastomanın tedavi seçenekleri arasında rezeksiyon cerrahisinin ardından uygulanan ve otolog kök hücre naklini de içeren indüksiyon terapisi, retinoik asidin yer aldığı kemoterapi, anti-GD2 immünoterapisi, primer tümör bölgesine/metastatik bölgelere yapılan radyoterapi yer almaktadır.

Nörobiyoloji alanındaki araştırmalarda karşılaşılan en büyük kısıtlılık işlevi incelenecek dokulara/organlara fizyolojik devamlılık halindeyken ulaşılamamasıdır. Sinirbilim araştırmacıları bu durumuna çözüm olarak gelişmiş teknolojik araçların ve ilerlemiş bilgi birikiminin de yardımıyla çeşitli deney modelleri geliştirmiştir. Günümüzde kullanılan deney modelleri arasında primer, kök ya da progenitör hücre kültürleri, beyin doku kültürleri ve *Drosophila Melonagaster*, *Caenorhabditis Elegans* ya da *Sea Urchin* gibi çeşitli hayvan modelleri yer almaktadır. Ancak moleküler boyuttaki bilgiler olmadan makro boyuta geçişin anlamsız ve zor olacağı da göz önüne alındığında hücre kültürleri en temel deney modelleri olarak karşımızda durmaktadır. Temel bilgiye ulaşım kolaylığı sayesinde sunulan bu tez çalışmasında çeşitli farklılaşma uyaranlarına karşı farklılaşabilen SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Retinoik asit ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde nörotrofik genlerin regülasyon trafiğinde, BMP/SMAD ve Wnt/Beta-Katenin sinyal yolaklarında aktifleşmesinde ve nöronal farklılaşmaya özgü hücre içi enzimlerin ve proteinlerin üretiminde değişiklik olduğu ve nörit uzantılarının oluştuğu ortaya koyulmuştur [Xie et al., 2010], [Presgraves et al., 2004]. Retinoik asit uygulanarak SH-SY5Y hücrelerinin nöronlara döndürülmesi (de-diferensiyasyon) ve böylece nöronal kazanımı amaçlayan hücresel tedavi yaklaşımı ise

‘’farklılaşma tedavisi’’ olarak geçmektedir. Ancak, tez çalışması dahilinde yapılan literatür taramalarında retinoik asit ile uyarılan SH-SY5Y farklılaşmasına dair hücresel ve hücre altı gen/protein seviyesinde bilgilere çok az rastlanmaktadır. Literatürde yer alan bu boşluğun doldurulmasına katkı sağlamak amacıyla SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaşması esnasında meydana gelen moleküler biyolojik/genetik, morfolojik ve fizyolojik düzeydeki değişimleri nörogelişim mekanizmasında düzenleyici rolü olan ZEB2 geni [Van de Putte et al., 2007], [Hegarty et al., 2017] ve bağlantılı olduğu diğer düzenleyici genler özelinde incelemek ve olası *in vitro/in vivo* çalışmalara zemin hazırlamak bu tez çalışmasının amaçlarındandır. ZEB2 ifadesinin farelerin embriyonik gelişiminde doğrusal olarak azaldığı ve ZEB2 ifadesinin baskılanmasıyla SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farkılılaşmaya indüklenerek nörit benzeri yapılar oluşturduğu Hegarty ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada gösterilmiştir [Hegarty et al., 2017].

Sunulan bu tez çalışması kapsamında yapılan araştırmalar, ZEB2’nin nöronal farklılaşmadaki önemine vurgu yapan Hegarty ve arkadaşlarının 2017 yılındaki ilgili makalesi zemininde şekillenmiştir. Literatür taramaları sonucunda SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaştırma protokollerinde db-cAMP (Kuramoto, Werrbach-Perez, Perez-Polo, & Haber, 1981; Tojima, Kobayashi, & Ito, 2003), TPA (Guarneri, Cascio, Piccoli, Piccoli, & Guarneri, 2000; Jalonen & Akerman, 1988; Pahlman ve ark., 1981; Presgraves ve ark., 2004), RA (Pahlman ve ark., 1984), BDNF (Spina, Squinto, Miller, Lindsay, & Hyman, 1992), NGF (Lavenius, Gestblom, Johansson, Nanberg, & Pahlman, 1995; Oe ve ark., 2005) gibi moleküllerin kullanıldığı görüldü. Ancak bu eklentiler içerisinde proliferasyonu etkileyerek nörit uzamasını tetiklediği gösterilen RA en yaygın kullanıma sahip farklılaşma ajanıdır (Nicolini ve ark., 1998; Pahlman ve ark., 1984).

Bu araştırmalardan yola çıkılarak, tez çalışmasında öncelikle SH-SY5Y hücreleri 10 µM RA ile nöronal farklılaşmaya indüklendi. Farklılaşmaya indüklenen hücrelerde ZEB2 ifadesindeki değişim incelendi. ZEB2 ifadesinin baskılanmasının Wnt/Beta-Katenin ve BMP-SMAD sinyal yolakları aracılığı ile nöronal akson uzantılarının oluşmasına katkı sağladığı bilinmektedir [Hegarty et al., 2017]. RA ile farklılaşması indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde ZEB2 ifadesinde azalma olduğu gen seviyesinde qRT-PCR yöntemiyle ve protein seviyesinde de western blotlama yöntemiyle ortaya koyuldu. Ardından, bu hücrelerde 9 günlük farklılaşma periyodu boyunca nöron spesifik NF-H, TH, TUBB3 ve

NeuN belirteçlerindeki ifade değişimleri protein seviyesinde incelendi. Nöroflament (NF-H) sitoplamazda yer alan nöron hücrelerine özgü tip IV ara filament yapılarıdır ve nöroflament ifadesi nöronal farklılaşma ile karakterize edilmektedir (Chiu, Feng, Chan, Padin, & Federoff, 1995). Tiroksin hidroksilaz (TH) nöron hücrelerinde katekolaminlerin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak işlev göstermektedir. Bu nedenle TH nöronlara özgü belirteç olarak kabul edilmektedir (Gates, Torres, White, Fricker-Gates, & Dunnett, 2006). Beta-Tübülin III (TUBB3) azalan proliferasyon ve farklılaşma belirteci olarak kullanılan ve nöronlara özgü bir tür tübülindir (Katsetos, Legido, Perentes, & Mork, 2003). Nöronal çekirdekler (NeuN) çekirdekte lokalize olan ve yalnızca nöron hücrelerinde ifade edilen nöronal nükleer bir proteindir (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Literatürle uyumlu olarak, NF-H [Forster et al., 2016], TH [Khawanraj et al., 2015], TUBB3 ve NeuN [Chalatsa et al., 2017] farklılaşma belirteçlerinin ifadesinde artış olduğu gösterildi.

Tavuk embriyoları üzerinde yapılan çalışmada embriyonik gelişimin erken evrelerinde nöroektodermal hücrelerde E-kaderin ifadesinde azalma olduğu ve buna karşın farklılaşmayla bağlantılı olarak nöronal sistemin oluşmaya başlamasıyla birlikte nöronal yapılara özgü adezyon molekülü olan N-kaderin ifadesinin arttığı gösterilmiştir [Hatta and Takeichi, 1986]. N-kaderin ifadesinin *in vitro* ortamda nörit uzamasında etkili ve gerekli olduğu [Bixby et al., 1990] ve nöronal farklılaşmayla birlikte N-kaderin ifadesinde artış gözlendiği de bildirilmiştir [Gao et al., 2001]. Bu bilgiler paralelinde, farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde N-kaderin ifadesi seviyesi incelendi ve kontrol hücrelerine kıyasla farklılaşan hücrelerde N-kaderin ifadesinin anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. *Xenopus* embriyoları ile yapılan bir diğer çalışmada, SOX2 ifadesinin nöronal farklılaşmayı baskıladığı ve proliferasyon karakteristiği gösteren progenitör hücrelerin varlığını desteklediği gösterilmiştir. SOX2 ifadesinin baskılanmasının ise nöronal progenitör hücrelerinde hücre döngüsünde tutulmaya neden olduğu ve hücrelerin farklılaşarak ventriküler bölgeden subventriküler bölgeye göç ettiği ortaya koyulmuştur [Graham et al., 2003]. SOX2 ifadesinin farklılaşma mekanizması ile olan güçlü ilişkisi nedeniyle, RA ile farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinde SOX2 ifadesi incelendi ve farklılaşmayla birlikte dikkat çekici oranda azaldığı gözlendi. Bunun yanı sıra, nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada da ROR1 ifadesinin nöronal farklılaşmayla birlikte azaldığı gösterilmiştir. ROR1 ifadesi PI3K/AKT sinyal yolağı ile

bağlantılı olarak SH-SY5Y hücrelerinin proliferatif fazda devamlılığını sürdürmesine neden olurken, ifadesinin baskılandığı ve/veya azaldığı durumda ise hücrelerin proliferatif fazdan çıkarak farklılaşma sürecine girdiği gösterilmiştir [IIlendula et al., 2020]. ROR1 ifadesinin farklılaşma mekanizması üzerindeki düzenleyici rolü düşünülerek, RA ile farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinde ROR1 ifadesi incelendi ve kontrol hücrelerine kıyasla ROR1 ifadesinde azalma olduğu belirlendi.

RA ile farklılaşması indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde nöronlara özgü GAP43, TUBB3, SYP ve MAPT belirteçlerindeki değişim gen seviyesinde analiz edildi. Aksonal oluşum ve uzama ile ilişkili GAP43 (Neuron Growth-Associated Protein 43) ve nörogenez ve aksonal yönelim ile ilişkili TUBB3 [Dwane et al., 2013], nörotransmitter madde trafiğinde görevli sinaptofisin (SYP) [Teppola et al., 2015], nöronal polarite ve sitoiskelet ile ilişkili MAPT (microtubule-associated protein TAU) [Mendsaikhan et al., 2019] genlerinin ifade seviyelerinde literatürle uyumlu olarak farklılaşma sürecinin 6. ve 9. günlerinde artış gözlendi. Ancak, ilginç olarak farklılaşmanın 3. gününde MAPT geninin ifadesinde kısmi bir artış gözlenmesine karşın, GAP43, TUBB3 ve SYP genlerinin ifadelerinde kontrole kıyasla azalma olduğu gözlendi.

Farklılaşan hücrelerin morfolojilerindeki değişim ışık mikroskobu altında takip edildi ve nörit benzeri yapıların oluştuğu, dallanma ve hücreler arası bağlantıların meydana geldiği tespit edildi.

Bunlara ek olarak, RA ile farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinin mitokondri potansiyelleri TMRE boyaması yapılarak flow sitometri tekniği ile incelendi. Farklılaşan hücrelerin mitokondri potansiyelinde artış olduğu literatürde gösterilmiştir [Forster et al., 2016]. Gen ve protein seviyesindeki incelemelere ek olarak, RA ile farklılaştırılan hücrelerde TMRE boyaması ile yapılan mitokondri potansiyeli analizinde farklılaşmanın 3.günde kısmi bir azalma olmakla birlikte, 6. ve 9. günde literatürle uyumlu olarak artış olduğu gözlendi. Gen ifadesi analizleri ve mitokondri potansiyeli incelemesi neticesinde farklılaşmanın 3. gününde hücrelerin kendini koruma mekanizmasıyla bağlantılı olarak RA ajanına karşı direnç geliştirdiği ve kısmi bir azalış olduğu gözlendi, ancak farklılaşmanın 6. ve 9. günlerinde meydana gelen hücresel metabolizmadaki değişime adapte olduğu düşünüldü. Tüm bu genetik, morfolojik ve mitokondri potansiyeli ile alakalı değişimler dikkate alındığında SH-SH5Y hücrelerinin nörojenik farklılaşması karakterize edildi.

Fare embiyoları üzerinde yapılan bir çalışmada embriyonik gelişiminin 12. ila 16. günler arasında ZEB2 ifadesinin düştüğü gösterilmiştir [Hegarty et al., 2017]. Bu tez kapsamında retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde, ZEB2 ifadesinin retinoik asit uygulanmayan SH-SY5Y hücrelerine kıyasla düştüğü gözlemlendi. Literatürle uyumlu olarak elde ettiğimiz bu bulgu göz önüne alındığında ZEB2 ifadesinin farklılaşma sürecinde ana ya da ara düzenleyici eleman olabileceği düşünüldü. Bu nedenle ZEB2 ve hedef genlerinin farklılaşma sürecine olan etkilerinin aydınlatılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, SH-SY5Y hücre hattında shRNA kullanılarak ZEB2 geninin ifadesinin baskılandığı kalımlı shZEB2 klonları oluşturuldu. shZEB2 klonlarının kültüre edilmesi sürecinde baskılama yapılmayan kontrol plKo.1-SH-SY5Y grubuna kıyasla morfolojik fark gözlendi. Bu morfolojik fark ışık mikroskobu altında incelendi. ZEB2 ifadesinin baskılandığı shZEB2-SH-SY5Y klonundaki hücrelerin, kontrol plKo.1-SH-SY5Y klonuna kıyasla daha uzantılı bir yapıda olduğu ve hücre-hücre etkileşimlerinin daha fazla olduğu görüldü. Gözlemlenen bu farkın retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücreleri ile de benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu açıdan retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenen SH-SY5Y hücreleri ile shZEB2-SH-SY5Y klonunun benzerliği oldukça dikkat çekicidir.

shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda, kontrol plKo.1-SH-SY5Y klonuna kıyasla NF-H ve TH proteinlerinin ifadesi anlamlı şekilde artış gösterirken, TUBB3 VE NEUN proteinlerinin ifadesi ise kısmi bir artış gösterdi. Bunun yanısıra nöronlara özgü N-kaderin ifadesinde de anlamlı bir artış olduğu gözlendi. SH-SY5Y hücre hattının heterojenitesi göz önüne alındığında bu heterojen popülasyon içerisinde kanser kök hücrelerin varlığını düşünmemek pek de olası değildir. Farklılaşmaya yönelen hücrelerde ise kanser kök hücrelerinin sayıca azalması beklenmektedir. Bu nedenle, kanser kök hücre belirteci olan SOX2'nin ifadesi shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda incelendi ve anlamlı bir azalış gözlendi. Aynı zamanda shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda ZEB2 geninin ChIP-seq hedeflerinden biri olan ROR1 proteininin ifadesinde de azalma olduğu belirlendi. shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda, kontrol plKo.1-SH-SY5Y klonuna kıyasla GAP43 ve SYP genlerinin ifadesinde azalış gözlenirken, TUBB3 VE MAPT genlerinin ifadesinde ise artış gözlendi. Bunula birlikte, shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda, kontrol hücre klonuna kıyasla TMRE ifadesinde azalma tespit edildi.

shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda, gen ve protein seviyesinde ulaşılan sonuçlar ile, ZEB2 ifadesinin baskılanmasının hücreleri kısmi olarak nöronal farklılaşmaya yönlendirdiği görüldü. Ancak TMRE ifadesi analizinde, RA indüksiyonu ile artan TMRE ifadesinin shZEB2-SHS-SY5Y hücre klonunda gözlemlenememesi dikkat çekmektedir.

Elde edilen bulgular neticesinde, ZEB2'nin farklılaşma mekanizmasında majör ya da minör seviyede düzenleyici rolü olabileceği, fakat bu rolünü bağlantılı olduğu diğer gen ve/veya proteinler aracılığıyla ortaya koyabileceği düşünüldü. Bunu belirleyemek amacıyla shZEB2-SH-SY5Y hücre klonlarında, ZEB2-ChIP-seq hedeflerinde farklılaşma, gelişim, hücresel sinyal iletimi, çoğalma, hücre iskeleti ve hücresel sağkalım ile ilişkili değişen gen ifadeleri araştırıldı. ZEB2 ifadesinin RA uygulamasından sonra düştüğü göz önüne alındığında, shZEB2-SH-SY5Y hücre klonunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genler RA ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde de incelendi. shZEB2-SH-SY5Y hücre klonlarında ve RA ile farklılaşması indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde yapılan gen ifadesi incelemesi sonrasında ortak değişim gösteren genler belirlendi. İlgili bu genler ise ARHGEF10, AZIN1, CDK10, RELN, TWIST1, BCL2L1, CCDN1, GLMN, LRP5 ve TUBA4A'dır. ARHGEF10 (Rho GEF), periferal sinir hücrelerinin miyelinizasyonunda görevli olan ve sinir iletim hızında rol oynayan genlerden biridir [Stankiewicz et al., 2014]. Ancak bu genin bağlantılı olduğu moleküler mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılamamıştır [Aoki et al., 2009]. AZIN1, hücre içine poliamin moleküllerinin alınmasında ve ornitin dekarboksilaz enzimlerinin aktive edilmesinde görevli bir gendir [Mäkitie et al., 2010]. Poliaminlerin ifade seviyesi nörogelişim esnasında yüksek olmasıyla birlikte yetişkinlik döneminde azalmaktadır [Greenwood et al., 2015]. AZIN1 bağımlı artmış hücre içi poliamin seviyesi ve ornitin dekarboksilaz enzim aktivitesi nöroblastoma ve alzheimer gibi pek çok sinir sistemi hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [Mäkitie et al., 2010]. BCL2L1, yetişkin ve gelişmekte olan nöron hücrelerinin sağkalımıyla ilişkili anti-apoptotik bir gendir [Harder et al., 2012]. CCND1, hücre döngüsünün G0/G1 ve S evrelerindeki kontrol noktasında görevli olan genlerden biridir ve serebral korteksin erken embriyonik gelişimi esnasında rol oynayan trasnkripsiyonel düzenleyicilerdendir [Borello et al., 2018]. CDK10, vertebra nöral progenitör hücrelerin sağkalımında görevlidir [Yeh et al., 2013]. RELN, sinir iletiminde gerekli olan akson ve dendrit uzantılarının oluşmasında, nöron hücreleri arasındaki sinaptik bağlantıların kurulmasında ve nörotransmitter madde salımında rol oynamaktadır [Lakatosova et al., 2012]. GLMN, Ras/Raf/MAPK sinyal

yolağına bağlı olarak nörit uzamasında etkili genlerden biridir [Price et al., 2003]. LRP5, nöronal sağkalımda ve uzantıların oluşmasında işlev göstermektedir [Lee et al., 2013]. TWIST1, nöronal plastisitede ve dendritik morfogenezde etkili genlerden biridir. Olgun nöron hücrelerinde, TWIST1 ifadesinin düşük olduğu da bilinmektedir [He et al., 2019]. TUBA4A, mikrotübül dinamiğinde ve sitoiskelet kararlılığında önemli genlerden biridir [Clark et al., 2016]. RA ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde ARHGEF10, AZIN1, CDK10, RELN, TWIST1 ifadeleri kontrole kıyasla azalırken, BCL2L1, CCDN1, GLMN, LRP5 ve TUBA4A genlerinin ifadeleri ise arttığı gözlendi. Tez kapsamında elde edilen bu 10 genin ifade seviyesindeki değişim literatür ile uyumluluk göstermektedir [Li et al., 2015], [Dodurga et al., 2013], [Zhu et al., 2013], [Price et al., 2003]. İlgili bu genlerin ZEB2'nin farklılaşma sürecindeki olası hedef genleri olabileceği ön görüldü.

Sunulan bu tez çalışmasında ZEB2'nin nöronal farklılaşma mekanizmasının düzenleyicisi olarak tanımlanmasına ve RA ile indüklenen farklılaşma sürecinin altında yatan moleküler mekanizmalara dair bilgiler ortaya koyuldu. RA ile farklılaşan hücrelerde ZEB2 ifadesinin azalması ve diğer yandan ZEB2 ifadesinin baskılanmasıyla birlikte hücrelerin farklılaşmaya yönlendirilmesi neticesinde ZEB2 ve hedef genlerinin nörojenik farklılaşma mekanizmasında etkili elemanlardan olabileceği belirlendi. Bunun yanısıra, farklılaşma tedavisi öncesi ve sırasında ZEB2 ifadesinin değerlendirilmesinin prognostik değeri olabileceği düşünüldü. Tüm bu bulgular paralelinde hücresel boyuttaki çalışmalardan doku boyutundaki çalışmalara geçişin önü açılması ve yapılacak ileri çalışmalara zemin hazırlanması da sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

Aoki T., Ueda S., Kataoka T., Satoh T., (2009), ''Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10'', BMC Cell Biol., 10:56.

Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A., (1973), ''Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture'', Cancer Res., 33(11), 2643-52.

Bixby J.L., Zhang R., (1990), ''Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth'', J Cell Biol., 110(4):1253-60.

Borello U., Berarducci B., Delahaye E., Price D.J., Dehay C., (2018), ''SP8 Transcriptional Regulation of Cyclin D1 During Mouse Early Corticogenesis'', Front Neurosci., 12:119.

Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castelberry R.P., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M., Hedborg F., (1993), ''Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment'', J Clin Oncol., 11(8), 1466-77.

Cernaianu G., Brandmaier P., Scholz G., Ackermann O.P., Alt R., Rothe K., Cross M., Witzigmann H., Tröbs R.B., (2008), ''All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit'', 43(7), 1284-94.

Chalatsa I., Arvanitis D.A., Koulakiotis N.S., Giagini A., Skaltsounis A.L., Papadopoulou-Daifoti Z., Tsarbopoulos A., Sanoudou D., (2019), ''The Crocus sativus Compounds trans-Crocin 4 and trans-Crocetin Modulate the Amyloidogenic Pathway and Tau Misprocessing in Alzheimer Disease Neuronal Cell Culture Models'', Front Neurosci., 13:249.

Chiu F.C., Feng L., Chan S.O., Padin C., Federoff J.H., (1995), ''Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells'', Brain Res Mol Brain Res, 30(1), 77-86.

Clark J.A., Yeaman E.J., Blizzard C.A., Chuckowree J.A., Dickson T.C., (2016), ''A Case for Microtubule Vulnerability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Altered Dynamics During Disease'', Front Cell Neurosci., 10:204.

Conidi A., Cazzola S., Beets K., Coddens K., Collart C., Cornelis F., Cox L., Joke D., Dobreva M.P., Dries R., Esguerra C., Francis A., Ibrahimi A., Kroes R., Lesage F., Maas E., Moya I., Pereira P.N., Stappers E., Stryjewska A., van den Berghe V., Vermeire L., Verstappen G., Seuntjens E., Umans L., Zwijsen A., Huylebroeck D., (2011), ''Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and

action modes in TGFβ/BMP signaling in vivo'', Cytokine Growth Factor Rev., 22(5-6), 287-300.

Crowley L.C., Christensen M.E., Waterhouse N.J., (2016), ''Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining'', Cold Spring Harb Protoc, 2016(12).

Dodurga Y., Gundogdu G., Koc T., Yonguc G.N., Kucukatay V., Satiroglu-Tufan N.L., (2013), ''Expression of URG4/URGCP, Cyclin D1, Bcl-2, and Bax genes in retinoic acid treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells'', Contemp Oncol (Pozn), 17(4):346-9.

Dwane S., Durack E., Kiely P.A., (2013), ''Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration'', BMC Res Notes, 6:366. doi: 10.1186/1756-0500-6-366.

Epifanova E., Babaev A., Newman A.G., Tarabykin V., (2019), ''Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development'', Brain Res., 1705, 24-31.

Esiashvili N., Anderson C., (2009), ''Katzenstein HM. Neuroblastoma. Curr Probl Cancer'', 33(6), 333-60.

Forster J.I., Koglsberger S., Trefois C., Boyd O., Baumuratov A.S., Buck L., Antony PM., (2016), ''Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability'', J Biomol Screen, 21(5), 496-509.

Gao L., McBeath R., Chen C.S., (2010), ''Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin'', Stem Cells. 31;28(3):564-72.

Gates M.A., Torres E.M., White A., Fricker-Gates, R.A., Dunnett S.B., (2006), ''Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons'', Eur J Neurosci, 23(5), 1384-1390.

Goldstein M.N., Burdman J.A., Journey L.J., (1964), ''Long-Term Tissue Culture of Neuroblastoma Morphologic Evidence for Differentiation and Maturation'', J Natl Cancer Inst, 32, 165-199.

Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L., (2003), ''SOX2 functions to maintain neural progenitor identity'', Neuron, 39(5):749-65. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00497-5. PMID: 12948443.

Greenwood M.P., Greenwood M., Paton J.F., Murphy D., (2015), ''Control of Polyamine Biosynthesis by Antizyme Inhibitor 1 Is Important for Transcriptional Regulation of Arginine Vasopressin in the Male Rat Hypothalamus'', Endocrinology, 156(8):2905-17.

Guarneri P., Cascio C., Piccoli T., Piccoli F., Guarneri R., (2000), ''Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization'', J Neurosci Res, 60(5), 656-665.

Guarnieri S., Pilla R., Morabito C., Sacchetti S., Mancinelli R., Fanò G., Mariggiò M.A., (2009), ''Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation

markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells'', Int J Dev Neurosci, 27(2), 135-47.

Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E., (2015), ''NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker'', Acta Naturae, 7(2), 42-47.

Hanahan D., Weinberg R.A., (2011), ''Hallmarks of cancer: the next generation'', Cell, 4;144(5):646-74.

Harder J.M., Ding Q., Fernandes K.A., Cherry J.D., Gan L., Libby R.T., (2012), ''BCL2L1 (BCL-X) promotes survival of adult and developing retinal ganglion cells'', Mol Cell Neurosci, 51(1-2):53-9.

Hatta K., Takeichi M., (1986), ''Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development'' Nature, 3-9;320(6061):447-9.

He J.G., Zhou H.Y., Xue SG., Lu J.J., Xu J.F., Zhou B., Hu Z.L., Wu P.F., Long L.H., Ni L., Jin Y., Wang F., Chen J.G., (2020), ''Transcription Factor TWIST1 Integrates Dendritic Remodeling and Chronic Stress to Promote Depressive-like Behaviors'', Biol Psychiatry, 3223(20)31906-5.

Hegarty S.V., O'Keeffe G.W., Sullivan A.M., (2013), ''BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system'', Prog Neurobiol, 109, 28-41.

Hegarty S.V., Wyatt S.L., Howard L., Stappers E., Huylebroeck D., Sullivan A.M., O'Keeffe G.W., (2017), ''Zeb2 is a negative regulator of midbrain dopaminergic axon growth and target innervation'', Sci Rep., 7(1), 8568.

Illendula A., Fultang N., Peethambaran B., (2020), ''Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements'', Oncol Rep, 44(3):1013-1024.

Jalonen T., Akerman K.E., (1988), ''Single transient potassium channels in human neuroblastoma cells induced to differentiate in vitro'', Neurosci Lett, 86(1), 99-104.

Jamsa A., Hasslund K., Cowburn R. F., Backstrom A., Vasange M. (2004), ''The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation'', Biochem Biophys Res Commun., 319(3), 993-1000.

Joshi S., Guleria R., Pan J., DiPette D., Singh U.S. (2006), ''Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells'' Oncogene, 25(2), 240-247.

Kaplan D.R., Miller F.D., (2000), ''Neurotrophin signal transduction in the nervous system'', Curr Opin Neurobiol., 10(3), 381-391.

Katsetos C.D., Legido A., Perentes E., Mork S.J. (2003), ''Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology'', J Child Neuro.l, 18(12), 851-866; discussion 867.

Khwanraj K., Phruksaniyom C., Madlah S., Dharmasaroja P., (2015), ''Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP'', Neurol Res Int., 2015:734703.

Kretzschmar M., Massagué J., (1998), ''SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling'', Curr Opin Genet Dev. 8(1), 103-11.

Kume T., Kawato Y., Osakada F., Izumi Y., Katsuki H., Nakagawa T., Kaneko S., Niidome T., Takada-Takatori Y., Akaike A., (2008), ''Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype'', Neurosci Lett., 443(3), 199-203.

Kuramoto T., Werrbach-Perez K., Perez-Polo J.R., Haber B. (1981), ''Membrane properties of a human neuroblastoma II: Effects of differentiation'', J Neurosci Res., 6(4), 441-449.

Lakatosova S., Ostatnikova D., (2012), ''Reelin and its complex involvement in brain development and function'', Int J Biochem Cell Biol., 44(9):1501-4.

Lavenius E., Gestblom C., Johansson I., Nanberg E., Pahlman S., (1995), ''Transfection of TRK-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor'', Cell Growth Differ., 6(6), 727-736.

Levin E.Y., Levenberg B., Kaufman S., (1960), ''The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine'', J Biol Chem., 235, 2080-2086.

Li J., Ma Z., Shi M., Malty R.H., Aoki H., Minic Z., Phanse S., Jin K., Wall D.P., Zhang Z., Urban A.E., Hallmayer J., Babu M., Snyder M., (2015), ''Identification of Human Neuronal Protein Complexes Reveals Biochemical Activities and Convergent Mechanisms of Action in Autism Spectrum Disorders'', Cell Syst., 1(5):361-374.

Mäkitie L.T., Kanerva K., Polvikoski T., Paetau A., Andersson L.C., (2010), ''Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's disease'', Brain Pathol., 20(3):571-80.

Maris J.M., (2010), ''Recent advances in neuroblastoma.'', N Engl J Med., 362(23), 2202-11.

Melino G., Thiele C.J., Knight R.A., Piacentini M., (1997), ''Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines'', J Neurooncol., 31(1-2), 65-83.

Mendsaikhan A., Takeuchi S., Walker D.G., Tooyama I., (2019), ''Differences in Gene Expression Profiles and Phenotypes of Differentiated SH-SY5Y Neurons Stably Overexpressing Mitochondrial Ferritin'', Front Mol Neurosci., 11:470.

Miquelajauregui A., Van de Putte T., Polyakov A., Nityanandam A., Boppana S., Seuntjens E., Karabinos A., Higashi Y., Huylebroeck D., Tarabykin V., (2007), ''Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation'', Proc Natl Acad Sci U S A., 104(31), 12919-24.

Mollereau C., Zajac J.M., Roumy M., (2007), ''Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors'', Peptides, 28(5),1125-8.

Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. (1964), ''Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis'', J Biol Chem., 239, 2910-2917.

Nelles L., Van de Putte T., van Grunsven L., Huylebroeck D., Verschueren K., (2003), ''Organization of the mouse Zfhx1b gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1'' Genomics, 82(4), 460-9.

Nicolini G., Miloso M., Zoia C., Di Silvestro A., Cavaletti G., Tredici, G. (1998), ''Retinoic acid differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells: an in vitro model to assess drug neurotoxicity'', Anticancer Res., 18(4A), 2477-2481.

Nishizaki Y., Takagi T., Matsui F., Higashi Y., (2014), ''SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse'', Genesis, 52(1), 56-67.

Nityanandam A., Parthasarathy S., Tarabykin V., (2012), ''Postnatal subventricular zone of the neocortex contributes GFAP+ cells to the rostral migratory stream under the control of Sip1'', Dev Biol., 366(2), 341-56.

Oe T., Sasayama T., Nagashima T., Muramoto M., Yamazaki T., Morikawa N., Kita Y. (2005), ''Differences in gene expression profile among SH-SY5Y neuroblastoma subclones with different neurite outgrowth responses to nerve growth factor'', J Neurochem., 94(5), 1264-1276.

O'Leary D.D., Terashima T., (1998), ''Cortical axons branch to multiple subcortical targets by interstitial axon budding: implications for target recognition and waiting periods", Neuron, 1(10), 901-10.

Påhlman S., Odelstad L., Larsson E., Grotte G., Nilsson K., (1981), ''Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate'', Int J Cancer., 28(5), 583-9.

Pahlman S., Ruusala A.I., Abrahamsson L., Mattsson M.E., Esscher T., (1984), ''Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbolester-induced differentiation'', Cell Differ., 14(2), 135-144.

Park J.R., Eggert A., Caron H., (2010), ''Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment'', Hematol Oncol Clin North Am., 24(1), 65-86.

Parthasarathy S., Srivatsa S., Nityanandam A., Tarabykin V., (2014), ''Ntf3 acts downstream of Sip1 in cortical postmitotic neurons to control progenitor cell fate through feedback signaling'', Development., 141(17), 3324-30.

Presgraves S.P., Ahmed T., Borwege S., Joyce J.N., (2004), ''Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists'', Neurotox Res., 5(8), 579-598.

Price R.D., Yamaji T., Matsuoka N., (2003), ''FK506 potentiates NGF-induced neurite outgrowth via the Ras/Raf/MAP kinase pathway'', Br J Pharmacol., 140(5):825-9.

Pugh T.J., Morozova O., Attiyeh E.F., Asgharzadeh S., Wei J.S., Auclair D., Carter S.L., Cibulskis K., Hanna M., Kiezun A., Kim J., Lawrence M.S., Lichenstein L., McKenna A., Pedamallu C.S., Ramos A.H., Shefler E., Sivachenko A., Sougnez C., Stewart C., Ally A., Birol I., Chiu R., Corbett R.D., Hirst M., Jackman S.D., Kamoh B., Khodabakshi A.H., Krzywinski M., Lo A, Moore R.A., Mungall K.L., Qian J., Tam A., Thiessen N., Zhao Y., Cole K.A., Diamond M., Diskin S.J., Mosse Y.P., Wood A.C., Ji L., Sposto R., Badgett T., London W.B., Moyer Y., Gastier-Foster J.M., Smith M.A., Guidry Auvil J.M., Gerhard D.S., Hogarty M.D., Jones S.J., Lander E.S., Gabriel S.B., Getz G., Seeger R.C., Khan J., Marra M.A., Meyerson M., Maris J.M., (2013), ''The genetic landscape of high-risk neuroblastoma'', Nat Genet., 45(3), 279-84.

Quintes S., Brinkmann B.G., Ebert M., Fröb F., Kungl T., Arlt FA., Tarabykin V., Huylebroeck D., Meijer D., Suter U., Wegner M., Sereda M.W., Nave K.A., (2016), ''Zeb2 is essential for Schwann cell differentiation, myelination and nerve repair'', Nat Neurosci., 19(8), 1050-1059.

Remacle J.E., Kraft H., Lerchner W., Wuytens G., Collart C., Verschueren K., Smith J.C., Huylebroeck D., (1999), ''New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites'', EMBO J., 18(18), 5073-84.

Rogers C.D., Saxena A., Bronner M.E., (2013), ''Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT'', J Cell Biol., 203(5), 835-47.

Ross R.A., Biedler J.L., (1985), ''Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro'', Cancer Res., 45(4), 1628-1632.

Seuntjens E., Nityanandam A., Miquelajauregui A., Debruyn J., Stryjewska A., Goebbels S., Nave K.A., Huylebroeck D., Tarabykin V., (2009), ''Sip1 regulates

sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors'', Nat Neurosci., 12(11), 1373-80.

Singh J., Kaur G., (2007), ''Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures'', Brain Res., 1154, 8-21.

Spina M.B., Squinto S.P., Miller J., Lindsay R.M., Hyman C., (1992), ''Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system'', J Neurochem., 59(1), 99-106.

Srivatsa S., Parthasarathy S., Molnár Z., Tarabykin V., (2015), ''Sip1 downstream Effector ninein controls neocortical axonal growth, ipsilateral branching, and microtubule growth and stability'', Neuron, 85(5), 998-1012.

Stankiewicz T.R., Linseman D.A., (2014), ''Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration'', Front Cell Neurosci., 8:314.

Szemes M., Greenhough A., Melegh Z., Malik S., Yuksel A., Catchpoole D., Gallacher K., Kollareddy M., Park J.H., Malik K., (2018), ''Wnt Signalling Drives Context-Dependent Differentiation or Proliferation in Neuroblastoma'' , Neoplasia, 20(4):335-350.

Teppola H., Sarkanen J.R., Jalonen T.O., Linne M.L., (2016), ''Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol'', Neurochem Res., 41(4), 731-747.

Tojima T., Kobayashi S., Ito E., (2003), ''Dual role of cyclic AMP-dependent protein kinase in neuritogenesis and synaptogenesis during neuronal differentiation'', J Neurosci Res., 74(6), 829-837.

Tsubota S., Kadomatsu K., (2018) , ''Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma'', Cell Tissue Res., 372(2), 211-221.

Turovskaya M.V., Babaev A.A., Zinchenko V.P., Epifanova E.A., Borisova E.V., Tarabykin V.S., Turovsky E.A., (2017), ''Sip-1 mutations cause disturbances in the activity of NMDA- and AMPA-, but not kainate receptors of neurons in the cerebral cortex'', Neurosci Lett., 650, 180-186.

Urbán N., Guillemot F., (2014), ''Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles'', Front Cell Neurosci., 8, 396.

Van de Putte T., Francis A., Nelles L., van Grunsven L.A., Huylebroeck D., (2007), ''Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of

neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome'', Hum Mol Genet., 16(12), 1423-36.

van den Berghe V., Stappers E., Vandesande B., Dimidschstein J., Kroes R., Francis A., Conidi A., Lesage F., Dries R., Cazzola S., Berx G., Kessaris N., Vanderhaeghen P., van Ijcken W., Grosveld F.G., Goossens S., Haigh J.J., Fishell G., Goffinet A., Aerts S., Huylebroeck D., Seuntjens E., (2013), ''Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1'', Neuron., 77(1), 70-82.

Verschueren K., Remacle J.E., Collart C., Kraft H., Baker B.S., Tylzanowski P., Nelles L., Wuytens G., Su M.T., Bodmer R., Smith J.C., Huylebroeck D., (1999), ''SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes'', J Biol Chem., 274(29), 20489-98.

Vo K.T., Matthay K.K., Neuhaus J., London W.B., Hero B., Ambros P.F., Nakagawara A., Miniati D., Wheeler K., Pearson A.D., Cohn S.L., DuBois S.G., (2014), ''Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project'', J Clin Oncol. , 32(28), 3169-76.

Weng Q., Chen Y., Wang H., Xu X., Yang B., He Q., Shou W., Chen Y., Higashi Y., van den Berghe V., Seuntjens E., Kernie S.G., Bukshpun P., Sherr E.H., Huylebroeck D., Lu Q.R., (2012), ''Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system'', Neuron., 73(4), 713-28.

Whittle S.B., Smith V., Doherty E., Zhao S., McCarty S., Zage P.E., (2017), '' Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma'', Expert Rev Anticancer Ther.,17(4), 369-386.

Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y., (2010), ''SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease'', Chin Med J (Engl).,123(8), 1086-92.

Yeh C.W., Kao S.H., Cheng Y.C., Hsu L.S., (2013), ''Knockdown of cyclin-dependent kinase 10 (cdk10) gene impairs neural progenitor survival via modulation of raf1a gene expression'', J Biol Chem., 288(39):27927-39.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu AYSAN KILIÇ, 13 Mayıs 1994'de Kocaeli'nin İzmit ilçesinde doğdu. 2012 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2017 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam eden Arzu AYSAN KILIÇ, 2018 yılından beri Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi ve Gebze Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı'na bağlı Hayvan Refah Birimi'nde Sorumlu Öğretim Elemanı/Araştırmacı olarak çalışmaya devam etmektedir.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Aysan Kılıç A., Çetin M., Yağcı T., ''Investigation of the Effects of ZEB2 in Neural Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line.'', 6-10 December 2020, 9th International Molecular Biology and Biotechnology, Kars, TURKEY.

EK B: Tez Çalışması Dışında Yapılan Yayın

Balçık Erçin P,Yalım Camcı İ, Çetin M, Odabaş G, Aysan A, Yağcı T, ''Cell free miRNA-2110 is negatively regulated by ZEB2.'', 3-5 May 2018, 11th International Symposium on Minimal Residual Disease, France.