

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEB2/SIP'İN HEPATOSSELÜLER KARSİNOMADA YARIŞMACI ENDOJEN
RNA (ceRNA) BAĞIMLI DÜZENLENMESİ**

İREM YALIM CAMCI
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEB2/SIP'İN HEPATOSSELÜLER KARSİNOMADA
YARIŞMACI ENDOJEN RNA (ceRNA) BAĞIMLI
DÜZENLENMESİ**

**İREM YALIM CAMCI
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI**

**GEBZE
2019**

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**COMPETING ENDOGENOUS RNA DEPENDENT
REGULATION OF ZEB2/SIP1 IN HEPATOCELLULAR
CARCINOMA**

İREM YALIM CAMCI
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAGCI

GEBZE
2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/04/2019 tarih ve 2019/18 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/05/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İrem YALIM CAMCI'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI



ÜYE

: Prof. Dr. Uygur H. TAZEBAY



ÜYE

: Prof. Dr. Sıdıka Ayşe ÖZER



ÜYE

: Doç. Dr. Nuri ÖZTÜRK



ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKÇAER KESKİN



ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararı.

ÖZET

Epitelyal-mezenkimal geçiş, kanserde yeniden aktive olan ve tümör hücrelerinin istila ve metastazını düzenleyen embriyonik bir programdır. ZEB2, EMT'i indükleyen transkripsiyon faktörlerinden biridir. Yarışmacı endojen mRNA veritabanına (ceRDB) göre ETS1'in ZEB2'nin ceRNA'sı olabileceğini ve ETS1'in hepatoselüler karsinoma hücrelerinde ZEB2 ile birlikte ifade edildiğini bulduk. Bu bulgular, hepatoselüler karsinoma (HCC) ve ZEB2 ile indüklenebilir hücre hatlarında, ZEB2 transkripsiyon faktörünün, promotor ve ceRNA seviyelerinde ETS1'i düzenleyip düzenlemediğini araştırmaya teşvik etti. Kromatin immünopresipitasyon ve lusiferaz raportör deneyleri, ZEB2'nin ETS1 promotorundaki E-box sekanslarına bağlandığını açıkça gösterdi. ZEB2 ifadesi indüklenebilen DLD-ZEB2 ve A431-ZEB2 hücrelerinde ETS1'in yüksek oranda ifade edildiği ve ZEB2'nin baskılandığı shZEB2-SNU398 ve shZEB2-SK-HEP-1 hücrelerinde ETS1 ifadesinin belirgin bir şekilde azaldığı bulundu. ZEB2'nin indüklendiği koşullarda ETS1 ifadesinin baskılanması DLD1 hücrelerinin gn ve istilacı kapasitelerini önemli ölçüde bozmuştur. ZEB2 ifade eden hücrelerde ETS1'in baskılanması, mekanik olarak ZEB2 hedefleri olan TWIST1 ve MMP9 ifadelerinin azalmasıyla sonuçlandı. ZEB2 ve ETS1 arasındaki ceRNA ilişkisini aydınlatmak amacıyla ETS1 ifadesi baskılanan SK-HEP-1 shETS1 hücresinde ZEB2 3'UTR lusiferaz aktivitesini ölçtük. ETS1 ifadesi baskılanan hücrede ZEB2 3'UTR lusiferaz aktivitesinde azalma, iki gen arasındaki ceRNA ilişkisini ortaya koymaktadır. Hepatoselüler karsinoma hücre hatları, kanser cDNA dizinleri ve TCGA RNA dizileme veri setindeki korelasyon analizleri, ZEB2 ve ETS1'in birlikte ifade edildiğini ve bunların insan tümörlerindeki ifadelerinin oldukça anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koydu. Sonuçlarımız, ZEB2'nin ETS1'in düzenleyicisi olarak görev yaptığını ve ETS1'in ZEB2 kaynaklı EMT'nin düzenlenmesinde rol oynadığını gösterdi. Bu bulgular, kanser hücrelerinin istila ve metastazlarında ZEB2'nin rolünün anlaşılmasına başka bir karmaşıklık düzeyi eklemekte ve ZEB2 / ETS1 eksenini, insan malignitelerinde yeni bir terapötik hedef olarak ortaya koymaktadır.

Bu tez alışması TÜBİTAK SBAG111S484 projesi kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ZEB2, ETS1, Hepatoselüler Karsinoma, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş, Kromatin İmmünopresipitasyon, Yönlendirilmiş Mutasyon, TWIST1, MMP9

SUMMARY

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is an embryonic program that is reactivated in cancer and regulates the invasion and metastasis of tumor cells. ZEB2 is one of the transcription factors that induce EMT. Our research through Competing Endogenous RNA Database (ceRDB) revealed that ETS1 is a ZEB2 ceRNA, and we found that ETS1 is co-expressed with ZEB2 in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. These findings stimulated us to investigate in HCC and ZEB2-inducible cell lines whether ZEB2 transcription factor regulates ETS1 at promoter and ceRNA levels. Chromatin immunoprecipitation and luciferase reporter assays clearly showed that ZEB2 binds to E-box sequences on the promoter of ETS1. Elevated expression of ETS1 was found in DLD-ZEB2 and A431-ZEB2 inducible systems, and knockdown of ZEB2 caused an explicit downregulation of ETS1 in shZEB2-SNU398 and shZEB2-SK-HEP-1 cells. Repression of ETS1 expression in ZEB2-induced conditions substantially impaired the migration and invasive capacities of DLD1 cells. Mechanistically, knockdown of ETS1 in ZEB2-expressing cells resulted in the downregulation of established ZEB2 targets TWIST1 and MMP9. To investigate the ceRNA interactions between ZEB2 and ETS1, we measured the luciferase activity of shETS1-SK-HEP-1 cells transfected with ZEB2 3'-UTR reporter vector. The decrease in luciferase activity upon repression of ETS1 indicated ceRNA-mediated regulation of ZEB2 by ETS1. Correlation analyses in hepatocellular carcinoma cell lines, cancer cDNA arrays and TCGA RNA-sequencing dataset revealed that ZEB2 and ETS1 are co-expressed, and their expressions in human tumors show a highly significant positive correlation. Our results demonstrated that ZEB2 acts as an upstream regulator of ETS1 and, in turn, ETS1 maintains ZEB2-induced EMT. These findings add another level of complexity to the understanding of ZEB2 in the invasion and metastasis of cancer cells, and put ZEB2/ETS1 axis as a novel therapeutic target in human malignancies

This thesis supported by TUBITAK SBAG111S484.

Key Words: ZEB2, ETS1, Hepatocellular carcinoma, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Chromatin Immunoprecipitation, Site-directed Mutagenesis, TWIST1, MMP.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince değerli bilgi ve görüşlerini esirgemeyen, saygıdeğer danışmanım Prof.Dr. Tamer Yağcı'ya en içten duygularıyla teşekkür ederim. Tez çalışmasına değerli katkılarından dolayı Dr. A. Emre SAYAN'a teşekkürlerimi sunarım. İmkanlarından yararlanmama izin verdiği için Prof.Dr. Uygur H. TAZEBAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, TY LAB ekibi; Dr. Pelin Balçık Erçin, Metin Çetin, Görkem Odabaş ve Arzu Aysan'a, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması sırasında dostlukları ile yanımda olan Dr. Mine Gül Şeker, Dr. Tuğrul Doruk, Dr. Hüseyin Balcı, Dr. Tuba Korkmaz, Dr. Hülya Akdemir Koç ve Zeynep Girgin Ersoy'a destekleri için teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan canım AİLEM ve sevgili eşim Haluk CAMCI'ya yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	ix
SUMMARY	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ	3
2.1. Hepatoselüler Karsinoma	3
2.3. Epitelyal-Mezenkimal Hücre Değişimi	4
2.3.1. Epitelyal-Mezenkimal Değişimi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörleri	6
2.4. ZEB2 Transkripsiyon Faktörü	7
2.4.1. ZEB2 ve kanser	9
2.4.2. Hepatoselüler Karsinoma’da ZEB2 İle İlgili Bulgular	10
2.5. ceRNA (Yarışmacı Endojen RNA) Hipotezi	11
2.5.1. ceRNA Hipotezini Destekleyen Çalışmalar	12
2.6. ETS1 Transkripsiyon Faktörü	13
2.6.1. ETS1 ve KANSER	16
2.7. ETS1 ve ZEB2	17
3. GEREÇLER	19
3.1. Kullanılan Kimyasallar	19
3.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	19
3.3. Kullanılan Kitler	20
3.4. Kullanılan Antikorlar	20
3.5. Kullanılan Hücre Hatları	21
3.6. Kullanılan Oligonükleotidler	21
3.7. Kullanılan DNA ve Protein Belirteçleri, Yükleme Tamponları ve Görüntüleme Substratı	21

3.8. Kullanılan Çözeltiler	22
3.9. Kullanılan Bakteriler	23
3.10. Kullanılan Plazmidler	23
4. YÖNTEMLER	26
4.1. Hücre Kültürü ve Büyütme Şartları	26
4.2. Gen İfadesi Çalışmaları	26
4.2.1. Kültüre Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu	26
4.2.2. RNA Örneklerinin Agaroze Jel Elektroforezi	27
4.2.3. cDNA Sentezi	27
4.2.4. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi	28
4.3. Protein İfadesi çalışmaları	29
4.4. Kromatin İmmünopresipitasyon	29
4.5. Lusiferaz Yöntemi ile ETS1 Promotor Aktivitesi Çalışmaları ve Yönlendirilmiş Mutasyon Deneyleri	30
4.6. shETS1 Lentiviral Transdüksiyon Partiküllerinin Üretimi	37
4.7. Yara Kapanma Deneyi	37
4.8. Matrigel invazyon Deneyi	37
4.9. Hücre Proliferasyon Deneyi	38
4.10. ZEB2-ETS1 ceRNA ilişkisinin Aydınlatılması	38
4.11. İnsan kanser örneklerinde ZEB2 ve ETS1 ifadelerinin Analizi	38
4.12. Atlas Veri Bankasından RNA Sekans Sonuçları	39
4.13. İstatistiksel Analizler	39
5. BULGULAR	40
5.1. Mezenkimal Fenotip Gösteren İnsan Tümör hücrelerinde ZEB2 ve ETS1 Transkripsiyon Faktörlerinin Birlikte İfadesi	40
5.2. ZEB2 Transkripsiyon Faktörünün ETS1 Promotoruna Bağlanması	43
5.3. ZEB2 ile İndüklenen ETS1 Aktivitesinin Tümör Hücrelerinin Migrasyon ve İnvazyonunu Düzenlemesi	45
5.4. ZEB2 ceRNA ilişkisi	50
5.5. İnsan Tümörlerinde ZEB2 ve ETS1 İfadeleri Pozitif Korelasyon Gösterir	50
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	53

KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kisaltmalar

Açıklamalar

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
APS	: Amonyum per sülfat
bHLH	: Basic helix-loop-helix
CCND1	: Siklin D1
CDH1	: E-kaderin
ceRNA	: Yarışmacı endojen RNA
ChIP	: Kromatin immunopresipitasyon
CLND4	: Klaudin4
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Dox	: Doksisisiklin
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EMT	: Epitel Mezenkim Geçişİ
ETS1	: Avian Erythroblastosis Virus E26 (V-Ets) Oncogene Homolog-1
FBS	: Fetal Bovine Serum
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
HEPES	: (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonikasit)
HSK	: Hepatoselüler Karsinoma
LB	: Luria Bertani
MMP	: Matriks Metallo Proteinaz
miRNA	: MikroRNA
MRE:	: mikroRNA yanıt elementi
NaCl:	: Sodyum Klorit
PBS:	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu

PCR:	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Real-time quantative polymerase chain reaction
SBD	: Smad Bağlanma Bölgesi
SCC	: Sküamöz Hücre Kanseri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE:	: Poliakrilamid jel elektroforezi
TBS:	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBS-T:	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi + Tween 20
TEMED:	: Tetrametiletildiamin
TERT:	: Telomeraz ters transkriptaz
TGF- β :	: Transforme Büyüme Faktörü-beta
TRIS:	: Hidroksimetilaminometan
ZEB2:	: Zinc finger homeodomain enhancer-binding protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: EMT Tipleri.	5
2.2: Epitelyal Mezenkimal Değişim.	5
2.3: ZEB ailesi transkripsiyon faktörlerinin iki üyesinin şematik gösterimi	8
2.4: ceRNA Hipotezi	11
2.5: Hücresel MRE konsantrasyonu ile belirlenen mikroRNA etkinliği	12
2.6: ETS1 protein yapısı	15
2.7: ETS1 ifadesinin transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel seviyede düzenlenmesi	15
2.8: ETS1 transkripsiyon faktörünün düzenlediği hücresel fonksiyonlar	16
2.9: EMT'i indükleyen TGF- β temelli transkripsiyon ağı	18
3.1: Firefly (pGL4.14) ve Renilla (pRL-TK) plazmidleri	23
3.2: pCMV-dR8.2 dvpr lentiviral paketleme plazmidi	24
3.3: pCMV-VSV-G lentiviral zarf plazmid	24
3.4: pLKO.1 boş plazmid	25
3.5: pCI-neo-RL-ZEB2 plazmidi	25
4.1: ETS1 geninin promotor bölgesinde bulunan olası E-box bölgeleri Ökaryotik promotor veritabanından alınmıştır.	31
4.2: ETS1 promotoru klonlanan pGL4.14 plazmidinin agaroz jel görüntüsü	33
4.3: Dizileme sonucunda elde edilen DNA dizisinin BLAST sonucu	34
4.4: İkinci olası E-box bölgesi için tasarlanan uzun primerler ile mutasyona uğratılan pGL4.14+ETS1 promotor plazmidi	36
5.1: HSK hücre hatlarında ZEB1, ZEB2 ve ETS1 ifadeleri.	41
5.2: SNU398 ve SK-HEP-1 HSK hücre hatlarında ETS1 ifadesinin ZEB2 tarafından düzenlenmesi.	42
5.3: ZEB2 ifadesi indüklenen DLD1 ve A431 hücrelerinde ETS1 ifade değişimi.	43
5.4: ZEB2'nin ETS1 promotor bölgesine bağlandığını gösteren ChIP-qPCR analizi.	44

5.5: ETS1 promotorunun lusiferaz raportör analizi ile fonksiyonel analizi.	45
5.6: ETS1'in ZEB2 ifadesi indüklenen hücrelerde hücre göçüne etkisi.	46
5.7: ETS1'in ZEB2 ifadesi indüklenen hücrelerin invazyonu üzerindeki etkileri.	47
5.8: ETS1, ZEB2 ile indüklenen EMT'de MMP9, EMT regülatörleri ve EMT belirteçlerinin ifadesini düzenlemesi	49
5.9: ZEB2 ve ETS1 arasında ceRNA ilişkisi	50
6.1: TGF- β transkripsiyon ağında ZEB2-ETS1 ilişkisi	56

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kullanılan Kimyasal Listesi	19
3.2: Kullanılan Çözeltiler	22
4.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.	27
4.2: Ters transkriptaz karışımı.	27
4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.	28
4.4: RT-qPCR’da kullanılan Primer Listesi.	28
4.5: RT-qPCR döngü şartları.	29
4.6: qPCR analizinde kullanılan primer listesi	30
4.7: ETS1 promotor primerleri	32
4.8: Reaksiyon koşulları	32
4.9: PCR koşulları	32
4.10: Uzun mutasyon primerleri	34
4.11: Reaksiyon Koşulları	35
4.12: PCR koşulları	35
5. 1: HSK hücre hatlarında ZEB1, ZEB2 ve ETS1 ifadelerinin korelasyon değerleri	40
5.2: İnsan Tümörlerinin cDNA dizinlerinde ZEB2 ve ETS1’in gen ifadeleri ve korelasyon analizleri	51
5.3: İnsan Tümörlerinde ZEB2 ve ETS1 TCGA RNA dizileme verilerinin analizi	52

1. GİRİŞ

Hepatoselüler karsinoma primer karaciğer kanserleri arasında ilk sırada yer alırken genel olarak kansere bağlı ölümlerde ise dördüncü sırada yer almaktadır. Solid tümörlerde hasta ölümlerinin yaklaşık olarak %90'ından metastaz sorumludur [1, 2]. Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümörden insan vücudundaki sekonder herhangi bir bölgeye yayılmasını sağlayarak hayati tehlike oluşturan patolojik bir olaydır. (i) tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılması, (ii) çevreleyen dokuya invazyonu, (iii) kan içine veya lenfatik damarlara intravazasyonu, (iv) kan akımında veya lenfatik sistemde yayılma ve son olarak (v) ikincil bir yerde ekstrasvazasyon ve büyüme basamaklarından oluşmaktadır.

Birincil tümörden ayrılmak ve çevreleyen dokuya nüfuz etmek için, tümör hücreleri hücre-hücre temaslarını parçalamak, hücre-matris yapışma bölgelerini yeniden şekillendirmek ve salgıladıkları proteinazlar ile hücre dışı matris boyunca ilerlemektedirler. Bu geçici ve geri dönüşümlü süreç, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılmaktadır. Bu süreç yaygın olarak, epitel hücrelerinin farklılaştığı, uzak bir yere taşındığı ve daha sonra yeni bir yapı oluşturmak üzere yeniden farklılaştığı, gastrulasyon veya nöral krest oluşumu gibi patolojik olmayan durumlarda gözlemlenmektedir. Bunun yanı sıra EMT kanser hücresi göçü, invazyon ve metastatik yayılımın başlangıcını oluşturan bir süreçtir [1, 2] EMT, gen mutasyonları gibi intrinsik sinyaller veya büyüme faktörü sinyalleme gibi ekstrinsik sinyaller ile uyarılabilir. EMT'yi indüklediği bilinen büyüme faktörleri arasında, büyüme faktörü β (TGF β) [3], hepatosit büyüme faktörü (HGF) [4], epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin üyeleri [5], insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) [6] ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) [7, 8] yer almaktadır. TGF β -Smad sinyalleme ile indüklenen DeltaEF1/ZEB1, ZEB2/SIP1, SNAIL1 ve ETS1 olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri TGF β -indüklü EMT'de kritik rol oynar.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

İnsan tümörlerinin %90'ından fazlası epitelyal kökenli kanserler olmakla birlikte, kanserden kaynaklı ölümlerin büyük bir çoğunluğu (%95) metastatik hastalık

nedeniyle gerçekleşmektedir. Metastaz gelişimine yol açan hücrel dönüşüm süreçlerinden en önemlisi E-kaderin proteininin baskılanmasıyla kendini gösteren ve epitel-mezenkim-değişimi (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) olarak tanımlanan yayılcı fenotiptir. Değişik kanser türlerinde yapılan çalışmalarla E-kaderin baskılayıcısı olarak ZEB2 transkripsiyon faktörü tanımlanmış ve bu transkripsiyon faktörünün artmış ifadesinin invazyon/metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Epitel mezenkim değişiminde ve metastazda önemli rol oynayan ZEB2 proteininin yine metastazda önemli yeri bulunan ETS1 transkripsiyon faktörü ile olan ilişkisi, literatüre göre ETS1'in ZEB2 transkripsiyonunu düzenlediği yönündedir.

ZEB2'nin, matriks metalloproteazların ifadesini arttırdığı ve HSK hücrelerinin invazyonunu düzenlediği belirlenmiştir. Ancak, MMP ailesinin promotor bölgesinde ZEB2 bağlanma bölgesi motifi CACCTG dizisini içeren E-box bulunmamaktadır. Bu durumda, ZEB2 MMP'in transkripsiyonunu direkt olarak düzenleyememektedir. Oysa, MMP ailesinin promotor bölgesinde ETS bağlanma bölgesi bulunduğu ve bu transkripsiyon faktörü tarafından gen ifadelerinin düzenlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer yandan, ZEB2 ifadesinin arttırıldığı koşullarda ETS1'in MMP promotoruna bağlanmasında artış görülmüştür. Bu veriler, MMP ifadelerinde ZEB2 ile ilişkili olduğu önerilen artışın ETS1 aracılığı ile olduğunu ve ZEB2'nin ETS1 ifadesini transkripsiyonel seviyede düzenleyebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, hepatoselüler karsinoma ve ZEB-2 indüklenebilir hücre hatlarında ZEB2 transkripsiyon faktörünün ETS1 ifadesini düzenleyip düzenlemediği promotor ve ceRNA düzeyinde araştırılacaktır.

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1. Hepatoselüler Karsinoma

Hepatoselüler karsinoma (HSK) Uzakdoğu Asya, Afrika kıtasının güney bölümleri gibi viral hepatit insidansı yüksek toplumlarda daha fazla görülen, yaklaşık % 80'i kronik hepatit B ve kronik hepatit C kaynaklı malign karaciğer tümörüdür [3]. 2018 yılı GLOBOCAN verilerine göre görülme sıklığı açısından altıncı kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Hepatoselüler karsinomaya erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanılmaktadır [2]. Hepatoselüler karsinomanın en büyük risk faktörü ise siroz olarak bilinen viral hepatit gelişiminin kontrol altına alınamaması durumudur. Siroz, HBV ve HCV dışında HSK risk faktörleri, aşırı alkol alımı, aflatoksin entoksikasyonu, non-alkolik karaciğer yağlanması, tip2 diabetes mellitus, sigara kullanımı, hemokromatozis, alfa-1-antitripsin eksikliğidir [4].

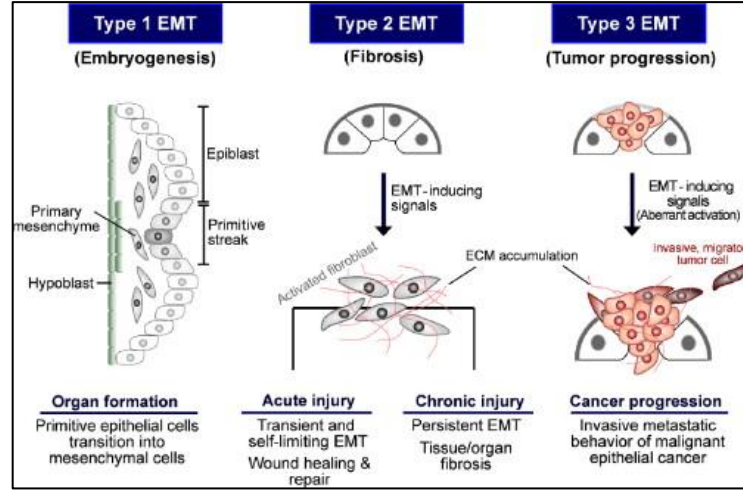
Kansere ilişkin semptomların ortaya çıkmasından sonra yapılan tedavi yaklaşımları ile yaşam süresi maksimum 5 yıla çıkarılabilmektedir. Bu 5 yıllık yaşam şansı, ancak erken tanı ile cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon gibi küratif tedavi seçeneklerinin uygulanması durumunda oluşmaktadır [5, 6]. HSK'nin erken tanısı bu nedenle önem taşımaktadır. Bu hastalığın tanısında görüntüleme yöntemleri, serolojik belirteçler ve biyopsi kullanılmaktadır. Serolojik belirteç olarak alfa fetoprotein (AFP) ifadesine bakılır. Görüntüleme yöntemleri olarak kontrast ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) kullanılmaktadır [7]. Bütün tetkiklere rağmen tanı konulamazsa biyopsi kullanılmaktadır. Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği'nin (AASLD) 2010 yılında güncellenen tedavi kılavuzu verilerine göre tam yanıt ve kür şansının olduğu bilinen tedaviler cerrahi rezeksiyon, transplantasyon ve perkütan ablasyon, transarterial embolizasyon (TAE), transarterial kemoembolizasyon (TACE) ve tirozin kinaz inhibitörleri (Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib) ile PD-L1 antikoru (Nivolumab) kapsamaktadır [6, 8, 9].

HSK sürecinde birçok genetik ve epigenetik bozukluklar, moleküler yollarda değişimler gözlenmiştir. Bu değişimler; Frizzled reseptörlerinde görülen mutasyonlar, HBV ve HCV enfeksiyonu ile MAPK yolağında meydana gelen değişiklikler [10], JAK-

binding proteinlerin inaktivasyonu ile JAK/STAT yolağının aktivasyonu [11], gen mutasyonları, viral proteinler ile postranskripsiyonel etkileşimler ve oksidatif stres nedeniyle p53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu, promotor metilasyonları ile p16INK4 ve retinoblastoma tümör baskılayıcı genlerde görülen değişiklikler, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) yolağında görülen değişimlerdir. Doku mikrodizinin ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada, TGF- β yolağında yer alan transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2'nin ifadesinde tümör olmayan dokulara göre HCC dokularında önemli şekilde artış gözlenmiştir [12]. TGF- β yolağında yer alan diğer bir transkripsiyon faktörü olan ETS1'in immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak klinik önemi incelendiğinde, hepatokarsinogenezin özellikle erken evrelerinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir [13]. Şimdiye kadar RAS, c-FOS, c-JUN, RHO, TGF- α , HGF, HER-2, NGL, MDM2, MMP ve IGF'i de içeren HSK ile ilişkili birçok onkogen bulunmuştur [14].

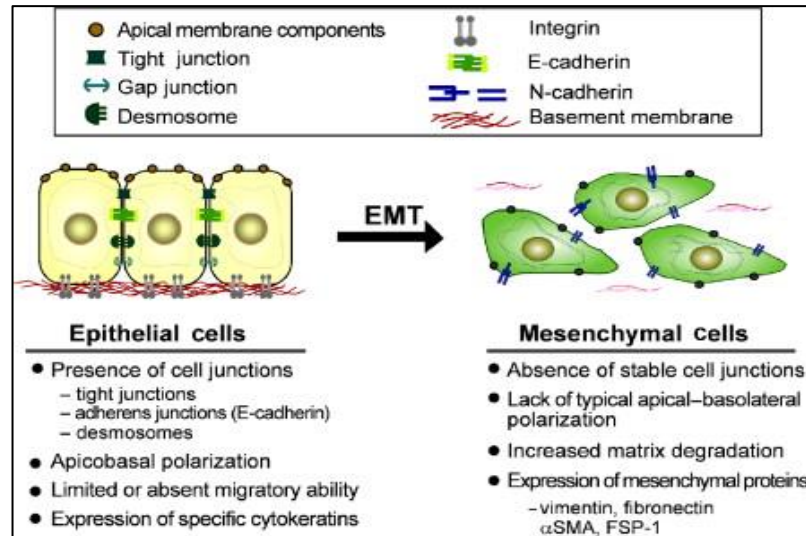
2.3. Epitelyal-Mezenkimal Hücre Değişimi

Epitelyal-mezenkimal hücre değişimi (EMT) birçok canlının embriyonik gelişimi sırasında önemli bir fazdır. Bu değişim sırasında mezenkimal hücreler ekstrasellüler alana göç ederek organ formasyonunu oluşturmaktadırlar. Birçok türde, mezenkimal hücrelerin göç edebilme yetenekleri sayesinde vücut formasyonu oluşmaktadır. Memelilerde, EMT ilk olarak blastula evresinde parietal endoderm oluşumunda gözlenmektedir. Parietal endoderm oluşumunda EMT ile E-kaderin ifadesinin durduğu bilinmektedir [15]. EMT'nin üç farklı çeşidi bulunmaktadır (Şekil 2.1). Tip 1 EMT gastrulasyon ile ilişkilidir ve mezoderm, endoderm ve nöral tüp oluşumunda görev alır. Tip 2 EMT fibroblastları oluşturarak doku tamirinde rol alır. Tip 3 EMT epitelyal kanser hücrelerinin oluşumunda meydana gelir ve onkogenler ve tümör baskılayıcı genleri etkileyerek invazyon ve göçün artmasını sağlamaktadır [16].



Şekil 2.1: EMT tipleri.

Epitelyal hücrelerde E-kaderin, hücreler arası güçlü etkileşimleri ve hücre polaritesini sağlayan yapışma kavşaklarında (adherens junction) yer almaktadır. Azalan E-kaderin ifadesi kavşak bağlantıların kırılmasına ve hücre polaritesinin kaybına yol açmaktadır. Bu duruma, yapışma kavşağı bileşeni olan β -kateninin stoplazmadaki artışı eşlik etmektedir. Wnt yolağından gelen sinyal ile birlikte β -katenin TCF/LEF ile birlikte transkripsiyonel bir kompleks oluşturarak gen ifadesinde önemli değişikliklere yol açmaktadır. EMT mekanizmasında, epitelyal hücreler E-kaderin anlatımını kaybetmekte, mezenkimal fenotip ve motilite özelliği dolayısıyla göç edebilir bir yapı kazanmaktadır (Şekil 2.2) [17].



Şekil 2.2: Epitelyal mezenkimal değişim.

2.3.1. Epitelyal-Mezenkimal Değişimi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörleri

Daha önce de belirtildiği gibi EMT’de anahtar moleküler değişim E-kaderin baskılanmasıdır [18]. E-kaderinin bir çok transkripsiyonel baskılayıcısı bulunmaktadır: Snail ailesi transkripsiyon faktörleri, bHLH (basic helix-loop-helix) ailesi ve çift çinko parmak E-box bağlanma (ZEB) transkripsiyon faktörleri [19]. Bu proteinler EMT ile indüklenen sinyal yollarının akış aşağısında fonksiyon göstermekte, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve diğerleri ile aktive edilmektedirler.

Vertebralarda, Snail ve Slug nöral tüp (crest) hücrelerinin göçünde [20] ve mezoderm oluşumunda [21] önemli rol oynamaktadırlar. Fibrotik insan böbrek dokusunda, vimentin ifadesi ve kollajen I çökmesinin yanında Snail yüksek seviyelerde tespit edilmiştir [22]. Snail ifadesi karaciğer fibrosisi sırasında artmaktadır [23]. E-kaderin baskılanmasına ilaveten, Snail ve Slug mezenkimal belirteçlerin ifadesini indüklerken epitelyal belirteçlerin ifadelerini baskılamaktadır [18, 24]. Snail transkripsiyon faktörleri ayrıca EMT sırasında hücre döngüsünü ve sağ kalımı düzenlemektedir [25, 26].

ZEB1 ve ZEB2, E-box elementlere bağlanabilen ve E-Kaderini negatif olarak düzenleyen C2H2 tip çinko parmak domainine sahiptir [27]. ZEB proteinlerinin artan ifadesi mezenkimal belirteçlerin eş zamanlı upregülasyonu ile epitelyal polarite, yapışma kavşakları ve dezmozomların kaybını kapsayan hızlı bir EMT ile sonuçlanmaktadır [28, 29]. Bunun bir sonucu olarak, ZEB proteinlerinin artmış ifadesi hücre yayılması ve hücre göçünü indüklemektedir [28, 30].

Twist bHLH ailesi transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir ve mezodermal gelişim sırasında [31], nöral tüp oluşumunda [32], doku fibrozisinde [33] ve tümör metastazında [34] ifadesi artmaktadır. Twist’in aşırı ifadesi, böbrek ve memeli epitelyal hücrelerinde kuvvetli bir şekilde EMT’i indüklemektedir [31, 33]. Twist1 invadopod oluşumunu ve invazyonu da başlatmaktadır [35]. İlaveten, Twist1 meme kanseri hücrelerinde, göç, invazivlik ve sağ kalımı indükleyen bir proto-onkogen olan AKT2’nin ifadesini arttırmakta [36] ve miR-10b’i de içeren prometastatik sinyaller ile ilişkili miRNA’ları aktive etmektedir [37].

E47, E2A geninin DNA bağlanma bölgesini kodlayan ekzonunun alternatif düzenlenmesi ile üretilen bir transkripsiyon faktörüdür. Memeli epitel dallanma morfogenez [24] ve renal fibrozis [38] sırasında EMT'ı başlatmaktadır. E2A E-box elementlerine bağlanan bHLH transkripsiyon faktörlerini kodlayan E-protein ailesinin bir üyesidir. Bu nedenle E2A'nın ifadesi E-kaderini baskılayarak invazyon ve hücre göçüne neden olmaktadır. E2A mRNA'sı olgun ve embriyonik epitelde bulunmazken, E-kaderin negatif invaziv karsinoma hücrelerinde yer almaktadır [39].

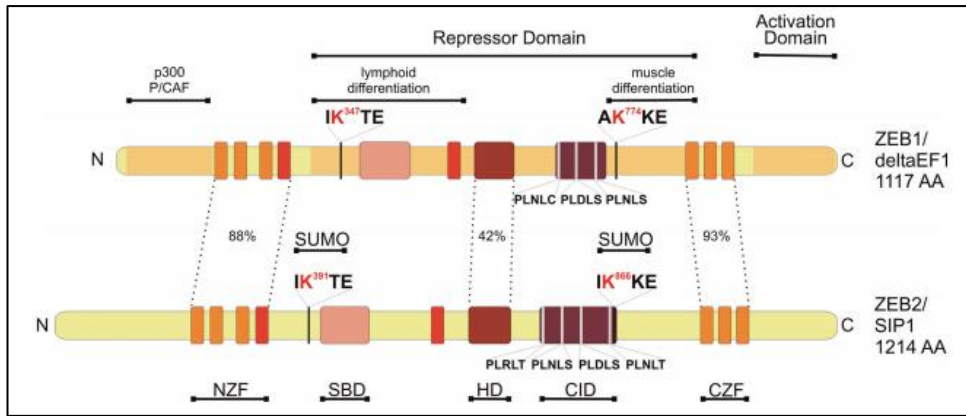
Forkhead box C2 (FOXC2) EMT'ı indükleyen bir diğer transkripsiyon faktörüdür. FOXC2, idrar yolları, böbrek ve kalpte anjiyogenez, muskulogenez ve organogenez için gereklidir [40]. FOXC2'nin ifadesi agresif bazal-benzeri insan meme kanseri ile korelasyon gösterir ve metastatik gelişim ile ilişkilidir [41].

2.4. ZEB2 Transkripsiyon Faktörü

Malignant geçiş sırasında tümör ve invazyon baskılayıcı görev yapan E-kaderin, Snail ailesi transkripsiyon faktörleri, bHLH faktörleri, Twist, CBF-A, HOXB7, KLF8 ve ZEB ailesi transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2 ile baskılanmaktadır [15]. ZEB (zinc finger homeodomain enhancer-binding protein) ailesi "two-handed zinc finger/homeodomain" taşıyan bir protein ailesidir [42]. Vertebralarda iki homolog ZEB proteini bulunmaktadır. ZEB1 (δ EF1, Nil-2-a, Tcf8, Bzp, Areb6, Meb1, Zfhx1a ve Zfhx1b) tavuklarda lens-spesifik δ 1-kristalin enhansır olarak lens hücrelerinde belirlenmiştir [43]. ZEB ailesinin diğer üyesi olan ZEB2 (ZEB2 ve Zfhx1a) proteini 1214 aa uzunluğunda ve moleküler ağırlığı yaklaşık 190 kDa olan bir proteindir. İlk olarak 1999 yılında Verschueren K. ve arkadaşları, ZEB2 proteinini TGF- β sinyal yolağı ile düzenlenen Smad proteinleri ile etkileşime girerek DNA'ya bağlanan ve hedef gen ifadesini baskılayan önemli bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlamıştır [44].

ZEB ailesine üye ZEB1 (δ EF1) ve ZEB2 (ZEB2) transkripsiyon faktörleri yapılarında iki çinko parmak kümesi bulundurmaktadırlar [27]. N terminal küme (NZF) dört çinko parmak motifi (üç tane CCHH ve bir CCHC) içerirken, proteinin C terminal (CZF) kısmında ise kümelenmiş üç CCHH çinko parmak motifi bulunmaktadır. ZEB1 ve ZEB2 proteinlerinin karşılaştırılması sonucunda NZF bölgesinde %88, CZF bölgesinde ise %93 benzerlik bulunmuştur. Bu bölgeler dışındaki alanlarda benzerlik daha az

oranda gözlemlenmektedir (Şekil 2.3). Her iki proteinin DNA'ya bağlandığı homeodomain ise %42 oranında benzerlik göstermektedir. Smad proteinleri ile bağlantı kurulan bölüm Smad Bağlantı Domain (SBD) olup, CID domain C-terminal bağlanan proteinine (C-terminal binding protein, CtBP) özgü PXLDS aminoasit dizisini içermektedir. CtBP proteini DNA'ya direkt olarak bağlanmamasına karşın, diğer proteinlerle etkileşim kurmakta ve eş-baskılayıcı (co-repressor) olarak birçok farklı genin transkripsiyonunda görev yapmaktadır [45].



Şekil 2.3: ZEB ailesi transkripsiyon faktörlerinin iki üyesinin şematik gösterimi.

ZEB ailesi üyesi her iki proteinde de TGF- β yolağıyla ilişkili Smad-bağlanma bölgesi belirlenmiştir (Smad-bağlanma bölgesi SBD). ZEB2 proteini TGF- β yolağıyla aktive olmaktadır. SMAD3 ve SMAD4 direkt olarak DNA'ya bağlanabilmelerine karşın, DNA'ya olan afiniteleri ve özgüllükleri sınırlıdır. Bu nedenle hedef gen ifadelerinin düzenlenmesi SMAD'larla birlikte bağlanan komplekste bulunan proteinler ve transkripsiyon faktörleri tarafından sağlanmaktadır. Verschueren ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, SMAD'lar ve ZEB2 etkileşimini TGF- β tip I reseptör aktivasyonunun gerçekleştirdiği belirlenmiş ve ZEB2 proteininin reseptör-SMAD'lardan SMAD1-3'e bu proteinlerin MH2 bölgesinden bağlandığı, buna karşın ZEB2 ile Co-SMAD proteini SMAD4 arasında direkt bir bağlantı olmadığı bulunmuştur (Verschueren ve ark., 1999). Postigo ve arkadaşları ise ZEB2'in SMAD1-3 ile bağlanabilmesi için fosforilasyonun gerekli olduğunu saptamışlardır [46].

ZEB2'in de tıpkı ZEB1 gibi hedef gen baskılanmasını promotor bölgede bulunan E-box dizilerine çinko-parmak motifleriyle bağlanarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

Minimal promotorunda konsensus dizisi CACCTG olan E2-box elementlerinden iki adet bulunan E-kaderin geninin (CDH1) baskılanması, ZEB2'in NH2 ve COOH uçlarındaki çinko-parmak motifleriyle her iki elemente de bağlanması yoluyla olmaktadır [28]. ZEB2'in baskıladığı hedef genler arasında CLDN4 (klaudin-4), CCND1 (siklin D1), TERT (Telomeraz revers transkriptaz), SFRP1 (secreted-frizzled-related protein1), ALPL (dokuya spesifik-olmayan alkalin fosfataz) ve miR-200 ailesi (miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-200c ve miR-141) üyelerinin de bulunduğu belirlenmiştir [30, 47-51]

ZEB2 ve ZEB1'in miR-200 ailesi üyeleriyle karşılıklı bir düzenlenme mekanizması gösterdikleri bulunmuştur. Başka bir deyişle, ZEB2 ve ZEB1 miR ailesi üyelerini baskılamakta, miR transkriptleri ise ZEB2 ve ZEB1'i negatif yönde regüle etmektedir [49]. miR-200 ailesi üyelerinin ektopik ekspresyonlarının mezenkimal hücreden epitelyal hücre fenotipine geri dönüşü sağladığı belirlenmiştir [52].

2.4.1. ZEB2 ve Kanser

Epitelyal hücrelerde E-kaderin, hücreler arası güçlü etkileşimleri ve hücre polaritesini sağlayan yapışma kavşaklarında yer almaktadır. E-kaderin baskılanması, tümör hücrelerinin yapışma bağlantılarını azaltarak göç edebilme yeteneklerini arttırdığından tümör metastazının önemli nedenlerinden biridir. Yapılan genetik ve epigenetik çalışmalarda E-kaderin'in transkripsiyonel olarak baskılandığı gösterilmiştir. E-kaderin ifadesini baskılayan transkripsiyonel faktörlerden ZEB1 ve ZEB2'nin kanser gelişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir. ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörleri E-kaderin promotorunda bulunan E2 kutularına bağlanarak E-kaderin transkripsiyonunu baskılamaktadır [28, 53]. ZEB2, vimentin ve N-kaderin gibi mezenkimal belirteçlerin yüksek şekilde düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [30, 54]. Ayrıca, matriks metalloproteinaz ailesi üyelerinin artan ifadesi, tersine farklılaşma (dedifferentiation), invazyon, metastaz ve tümör nüksü ile ilişkilidir. Hepatoselüler karsinoma kökenli hücre soylarında, MMP-1, MMP-2 ve MT-MMP mRNA'larının ZEB2'e bağlı artan ifadeleri görülmüştür [55]. ZEB1 ifadesinin tersine farklılaşmış meme kanseri hücrelerinde RNAi temelli metodla baskılanması hücre polaritesi ve bağlantıları ile ilgili genlerin yüksek ifadesi ile sonuçlanmaktadır. Özet

olarak, ZEB1 ve ZEB2'nin epitelyal hücreleri daha fazla mezenkimal özellik kazanmaları yönünde yeniden programlamaktadır.

2.4.2. Hepatoselüler Karsinoma'da ZEB2 İle İlgili Bulgular

ZEB2 ile HSK arasındaki ilişki ilk olarak 2004 yılında gösterilmiştir. HSK hücreleri ile yapılan çalışmada, ZEB2'nin SNAIL ile birlikte matris metalloproteazlarını (MMP-1, MMP-2, MMP-7 ve MTI-MMP) arttırdığı ve HSK hücrelerinin invazyonunu düzenlediği belirlenmiştir [55]. Kompleks hücre döngüsünün düzenlenmesi hücre-hücre adezyonuna, integrin sinyal yolağına, hücre yayılması ve aktomiyozin kasılmasına bağlıdır [56]. EMT, embriyonik gelişim ve kanserde hücre proliferasyonunu etkileyebilmektedir. Mejlvang ve ark., 2007'de yapmış oldukları çalışmada, ZEB2'nin epidermoid A431 hücrelerinin mezenkimal dönüşümünü regüle ettiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalar ise ZEB2 proteinin tümörögenез sürecinde tümör baskılayıcı rol oynadığını göstermektedir. ZEB2'nin direkt olarak siklin D1 geninin transkripsiyonel baskılanmasını sağlayarak hücrelerin hücre döngüsünün G1 fazında birikmesine neden olduğu gösterilmiştir [47]. Tümör hücreleri telomeraz aktivitesi göstererek immortal karakter kazanmaktadır [57]. ZEB2, hTERT baskılanması ile ilişkili üç tümör baskılayıcı yoldan birinde yer almaktadır. Meme kanseri hücrelerindeki hTERT baskılanmasının kısmen ZEB2'e bağlı olduğu ve bunun da TGF- β 'ya bağımlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Öztürk N.'nin 2006'da yayımlanan çalışmasında ZEB2'nin ektopik ifadesinin HSK hücrelerinde hTERT'i baskıladığı da gözlemlenmiştir [58].

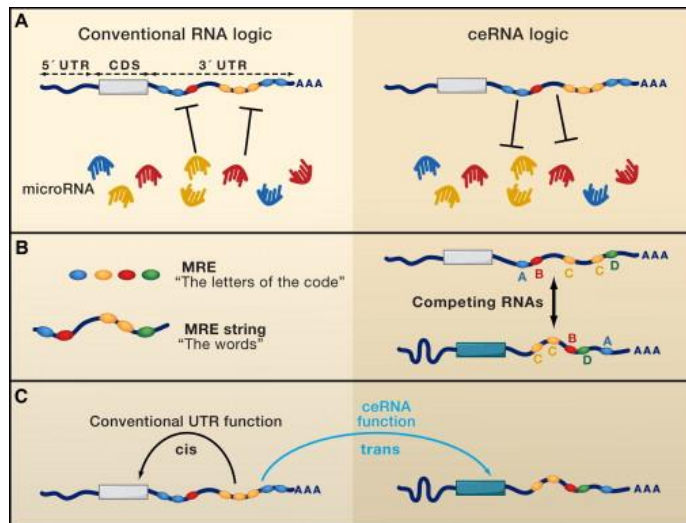
ZEB2 ifadesinin, miRNA'lar [52] ve doğal antisens transkript (NAT) [59] tarafından epigenetik olarak düzenlendiği belirlenmiştir. ZEB2'nin metastatik meme kanseri hücre soylarında [60] ve pankreatik kanserde [61] promotor metilasyonu ile hipermetile olarak ifadesinin baskılandığı rapor edilmiştir. Ladeiro Y. ve arkadaşlarının ZEB2'nin negatif regülatörü miR-200c'nin HSK'da normal karaciğere göre artmış olduğunu gösterdikleri çalışma ZEB2'nin HSK'daki önemini destekler niteliktedir [62].

Acun ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada, HSK hücre soyları ve tümörlerinde ZEB2'nin düşük ifadesinin promotor metilasyonundan

kaynaklandığı belirtilmiştir [63]. Bu nedenle ZEB2'nin epigenetik yollarla inaktivasyonu hepatokarsinogenezde önemli bir rol oynayabilmektedir.

2.5. ceRNA (Yarışmacı Endojen RNA) Hipotezi

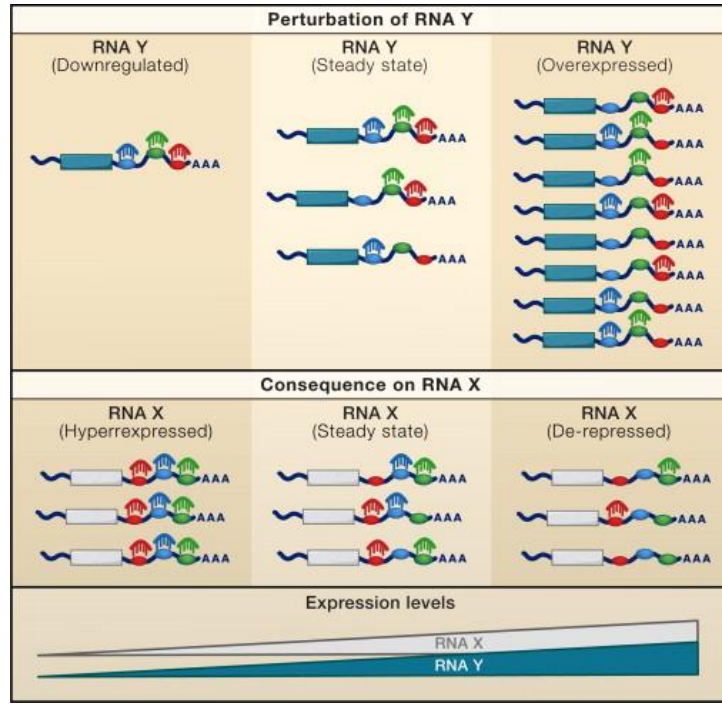
MikroRNA'lar 22 nükleotit uzunluğunda olup hedef mRNA transkripti üzerinde bulunan ve mikroRNA yanıt elementleri (MREs) olarak adlandırılan sekanslara kısmi olarak bağlanabilme yeteğine sahip kısa nükleotit dizileridir. MikroRNA'lar çok sayıda MRE bulunduran mRNA transkriptlerine çeşitli kombinasyonlarda bağlanmakta ve böylece her bir mikroRNA yüzlerce hedef transkriptin ifadesini düzenlemektedir. MikroRNA'ların hedef RNA'ların stabilitesini azaltarak ya da translasyonunu engelleyerek gen ifadesini negatif yönde düzenlediği yani baskıladığı gösterilmiştir [64, 65]. Bu şekilde, mikroRNA'lar transkriptomun önemli bir kısmını düzenleyebilme yeteneğine sahip olmakta ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta rol oynamaktadır [66, 67].



Şekil 2.4: ceRNA hipotezi.

ceRNA hipotezi, ortak miRNA yanıt element (MRE) bölgelerine sahip olan iki mRNA'nın birbirinin ifadesini miRNA'lar üzerinden dolaylı olarak düzenleyebileceğini savunmaktadır Şekil (2.4). X ve Y mRNA'larının (birbirinin ceRNA'sı olan mRNA'lar) dengede olduğu konsantrasyonlarda ortak mikroRNA'lar iki mRNA'yı da eşit olarak baskılamaktadır. Y mRNA'sının ifadesinin azaltıldığı durumda, ortak miRNA

havuzunda çok sayıda miRNA serbest kalmaktadır. Serbest kalan miRNA'lar, X mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanacak ve böylece X mRNA'sı için daha yüksek seviyede baskılama söz konusu olacaktır. Dolayısıyla, Y mRNA'sının ifadesinin azaltılması, ceRNA'sı olan X mRNA'sının ifadesini de miRNA'lar aracılığı ile azaltacaktır (Şekil 2.5) [68].



Şekil 2.5. Hüresel MRE konsantrasyonu ile belirlenen mikroRNA etkinliği.

2.5.1.ceRNA Hipotezini Destekleyen Çalışmalar

Bir lncRNA (uzun kodlama yapmayan RNA) olan HULC (highly up-regulated in liver cancer) hepatoselüler karsinomada yüksek şekilde ifade edilmektedir [69]. Wang ve arkadaşları, CREB'in (cAMP response element binding protein) HULC lncRNA'sının yüksek ifadesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [70]. HULC RNA'sı bir ceRNA fonksiyonu göstererek miR-372'nin ifadesini inhibe etmektedir. Bu sayede, miR-372'nin CREB'in fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlayan PRKACB geni üzerindeki baskısını kaldırarak dolaylı yoldan kendi ifadesini arttırmaktadır.

Fosfataz ve tensin homolog proteinini kodlayan PTEN, bir çok kanserde ifadesi sıklıkla değişen [71], ifadesindeki azalmanın in vivo'da tümör başlangıcı ve gelişimine neden olduğu gösterilmiş tümör baskılayıcı bir gendir [72, 73]. PI3K/AKT sinyal

yolağını baskılayarak hücrelerin sağ kalımını engellemektedir. İfadesi, proto-onkogenik miR-106b'nin içinde olduğu birçok mikroRNA tarafından düzenlenmektedir [74]. Tümör baskılayıcı gen PTEN'in 3'UTR bölgesinde bulunan birçok MRE bölgesi bu genin sözde geni PTENP1'de de bulunmaktadır, PTENP1'in 3'UTR bölgesinin aşırı ifadesi DICER'a bağlı olarak PTEN seviyesini ve büyüme inhibisyonunu arttırmaktadır. Sık rastlanmayan kolon kanserinde PTENP1 bölgesinin kopya sayısı kaybı PTENP1'in bir tümör baskılayıcı gen olduğunu düşündürmektedir [75]. Tay ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada PTEN'in ifadesinin endojen protein kodlayan RNA'lar ile düzenlendiğini göstermişlerdir [76]. PTEN'in ceRNA'lar tarafından düzenlenmesi sıklıkla melanomada da görülmektedir. Melanoma'nın fare modelinde 'Sleeping Beauty transposon insertional mutagenesis' tekniği kullanılarak PTEN'in olası ceRNA'ları aydınlatılmıştır [77]. Bu çalışmada ZEB2/ZEB2 transkriptinin PTEN protein seviyesini mikroRNA'ya bağlı olarak düzenlediği gösterilmiştir. ZEB2/ZEB2 ifadesinde görülen bir azalmanın, PTEN ifadesinde bir düşüşe neden olarak PI3K/AKT yolağını aktive ettiği ve hücre transformasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, melanomada ZEB2 bir PTEN ceRNA'sı olarak görev yapmaktadır.

2.6. ETS1 Transkripsiyon Faktörü

ETS transkripsiyon ailesi üyesi olan Ets1 (Avian Erythroblastosis Virus E26 (V-Ets) Oncogene Homolog-1) kendine özgü bir DNA bağlanma domainine sahiptir [78, 79] ETS domaini, GGAA/T dizisini tanıyan winged helix-turn-helix yapısı (wHTH) bulundurmaktadır. ets sekansı ilk olarak avian erythroblastosisretrovirus E26'in ets transdüksiyonu ile bulunmuş ve v(iral)-ets olarak adlandırılmıştır [80, 81]. Daha sonra, ETS1 proteinini kodlayan hücresel ets1 geni, v-ets1'in insan homoloğu, 11. kromozomda tanımlanmıştır [82]. Daha sonra, memeliler, ekinoidler, nematodlar ve böceklerde birçok ets geni tanımlanmıştır. Şimdiye kadar 28 insan *ETS* geni bulunmuştur. *ETS1*'in yanı sıra birçok ets geninin kanserde rol oynadığı bilinmektedir. ETS1 54 kDa ağırlığında nükleer protein, gen transkripsiyonunu baskılayabilse de çoğunlukla transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapmaktadır [83].

Ets transkripsiyon faktörü ailesinin üyesi olan ETS1 transkripsiyon faktörü korunmuş helix-turn-helix DNA bağlanma domaini (ETS domain) ile hedef genlerin promotorlarındaki GGAA/T içeren konsensus motiflere bağlanmaktadır [84]. ETS1 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma aktivitesi kinazlar ve diğer transkripsiyon faktörleri ile düzenlenmektedir.

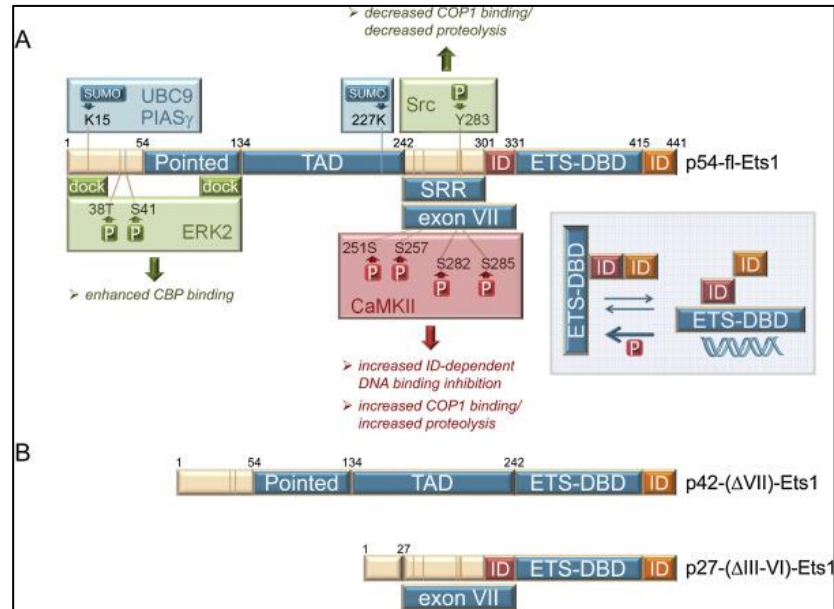
ETS1 protein yapısında bulunan domainler aktivitesinin düzenlenmesinde görevlidir (Şekil 2.6). Tam boy ETS1 proteinin 441 aa'den oluşmaktadır, 331-415. aa'ler arası DNA bağlanma domaini, 54-134. aa'ler arası Pointed domain, 135-142. aa'ler arası transaktivasyon domaini, 242-331. aa'ler arası ekzon VII domain ve oto-inhibitör modülünden oluşmaktadır. ETS1'in iki splay varyantı bulunmaktadır, biri ekzon VII domaininden yoksun olan ETS1 p42 [85], diğeri III ve VI. Ekzonlar arasından yoksun ETS1 p27'dir [86]. ETS1-p27 DNA bağlanma domaini içerirken, transaktivasyon domaininden yoksun olduğundan [87] ETS1'in trans dominant negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır [86]

ETS1 promotoru ile yapılan çalışmalar, TATA kutucuklarını içermediğini ve ETS proteinleri, AP-1, AP-2, Sp1 ve Oct proteinlerinin bağlanma bölgelerini içerdiğini göstermektedir [88-90]. -325 ve -365. nükleotidler arasındaki Ets bağlanma bölgelerine çok yakın olan bölgede iki AP-1 bağlanma bölgesi bulunmaktadır, bu sayede AP-1 (c-Fos/c-Jun) ve ETS1 bu bölgelere bağlanarak *ETS1* promotorunun güçlü ifadesini sağlamaktadır [91]. Dolayısıyla, ETS1 kendi ifadesini düzenleyebilmektedir [92].

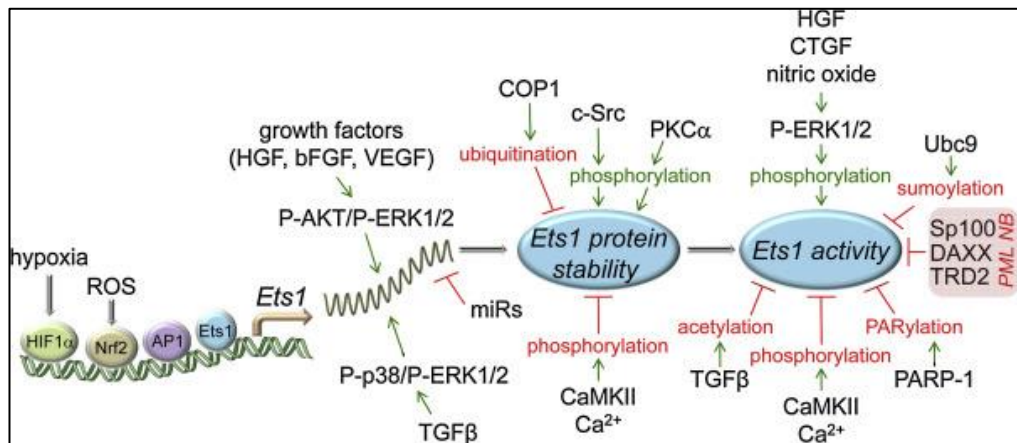
Ras/Raf/MEK/ERK1/2 yolağını aktive eden HGF (hepatosit büyüme faktörü), bFGF (temel-fibroblast büyüme faktörü) ve VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri *ETS1*'in mRNA düzeyinde ifadesini arttırmaktadırlar. HGF'ün insan endotelial, damar düz kas, hepatik stellat, karaciğer kanseri ve mide kanserinde [93-97], bFGF'ün insan sünnet derisi fibroblastlarında [98], VEGF'ün siğir retinal endotel hücrelerinde [99] *ETS1* ifadesini arttırdığı görülmüştür.

Büyüme faktörleri ayrıca PI3K (phosphoinositol-3-kinase) /AKT yolağını da aktive etmektedir. Endotelial hücrelerde VEGF indüklenmesi ile *ETS1* mRNA seviyesindeki artışta Akt yolağının aktivasyonunun rol oynadığı [100], akciğer kanserinde Akt yolağının *ETS1* ifadesini arttırdığı [101] görülmüştür. *ETS1* ifadesini arttıran bir diğer faktör de hipoksidir [102, 103]. Hipoksinin *ETS1* ifadesini arttırdığı

insan mesane kanseri ve kolorektal kanser hücrelerinde gösterilmiştir. *ETS1* promotor bölgesinde 424 ve 279. nükleotitler arasında hipoksiye duyarlı eleman (HRE) bulunmaktadır, bu sayede HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) *ETS1* promotorunu aktive edebilmektedir (Şekil 2.7) [102]



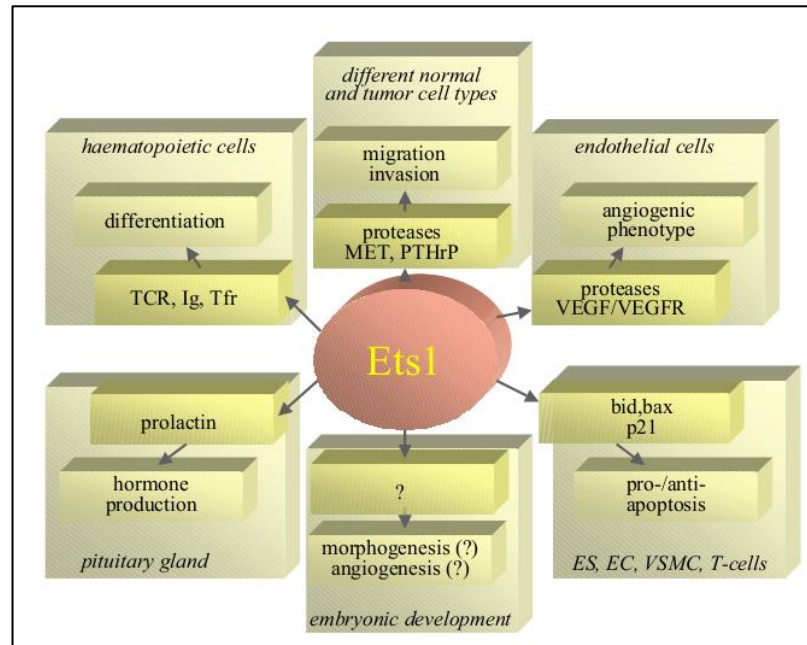
Şekil 2.6: ETS1 protein yapısı.



Şekil 2.7: ETS1 ifadesinin transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel seviyede düzenlenmesi.

Epitelyal mezenkimal değişime uğrayan epitelyal yapının yanında yer alan mezodermal hücrelerde sentezlenen ETS1 embriyogenez sırasında doku morfogenezini ile ilişkilidir [104]. ETS1 ifadesi, tümör oluşumu sırasında meydana gelen invaziv özellik ile ilişkilidir. ETS1'in MMP-1, MMP-3, MMP-9 matris metalloproteinazları ile

ürokinaz tip plasminojen (uPA) ifadelerini düzenlediği gösterilmiştir [105]. Proteaz ifadelerini indüklemesinin yanında, ETS1'in anjiyogenezdeki önemine de vurgu yapılmıştır. ETS1, VEGF ve VEGF reseptörlerinin aktivitesini düzenlemektedir [106]. Endotelial hücrelerde *ETS1* ifadesi baskılandığında VEGF ifadesi düşmektedir [95]. Dolayısıyla, epitelyal kanserlerde ETS1 hem damarlanmaya neden olarak kanser hücrelerine besin ve oksijen sağlamakta, hem de ECM'i degrade eden proteazları aktive ederek tümör invazyonunu başlatabilmektedir. Sonuç olarak, tümörlerde yüksek seviyede ETS1 ifadesi kötü prognoz ile korelasyon göstermektedir (Şekil 2.8) [107].



Şekil 2.8: ETS1 transkripsiyon faktörünün düzenlediği hücresel fonksiyonlar.

2.6.1. ETS1 ve KANSER

ETS1 proteini, transkripsiyon faktörleri, proteazlar, hücre döğüsünü düzenleyen genler, apoptoz ile ilgili genler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi bir çok genin ifade düzeyini kontrol etmektedir [105]. ETS1'in yüksek ifadesi mide [108], pankreas [109], safra kanalı [110], kolon [111], karaciğer [112], özofagus [113], ağız boşluğu [114], akciğer [115], tiroid [116] ve yumurtalık [117] karsinomaları ile birlikte habis menenjiyom [118] ve astroglial tümörler [119], deride oluşan anjiyosarkomayı [120] da içeren insan malignitelerinde, karsinogenez ve/veya tümör gelişiminde önemli rol

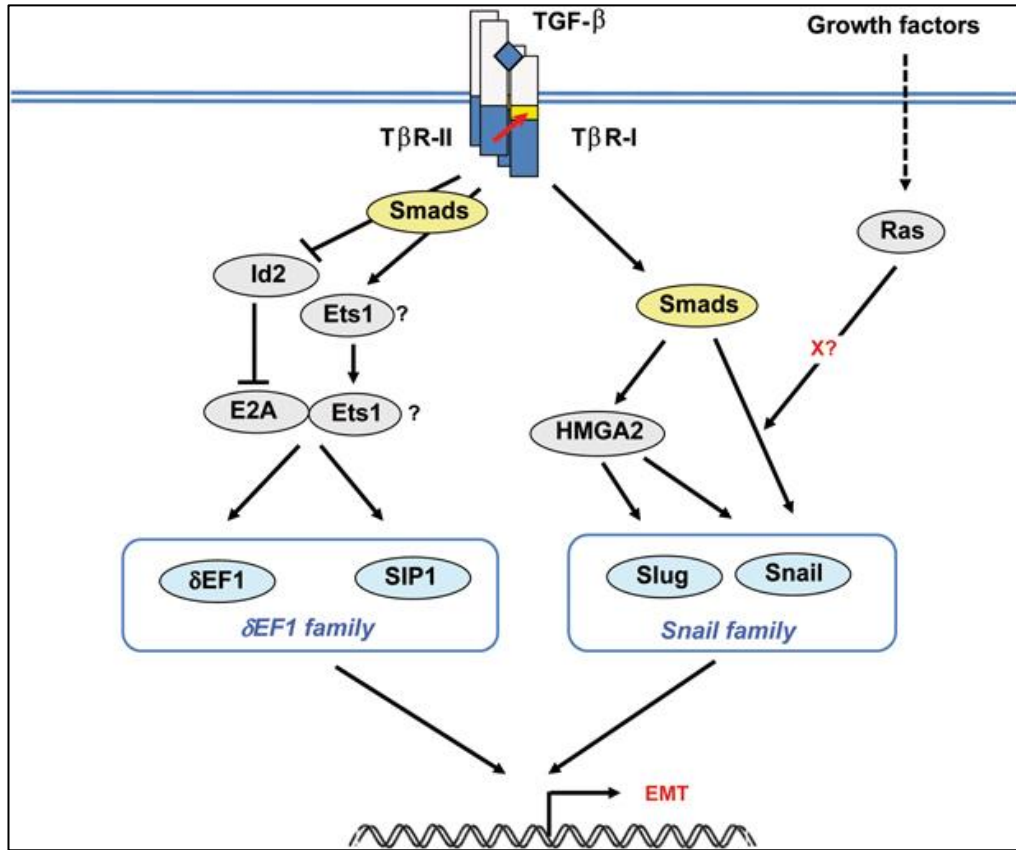
oynamaktadır [121]. ETS1'in meme kanserinde yüksek ifadesi, hastaların zayıf prognozu ile koreledir [122, 123].

HeLa hücrelerinde ETS1'in yüksek ifadesi hücre göçü ve invazyonunu başlatmakta ve bağlanmadan (anchorage-independent) büyümeye neden olmaktadır [124]. E-kaderin ifadesinin azalması ve N kaderin ifadesinin artması ile karakterize epitelyal mezenkimal geçişde ETS1'in rolü pankreas kanser hücrelerinde çalışılmıştır. ETS1 gen ifadesi bu hücrelerde shRNA ile baskılanmış, *ETS1* mRNA ifadesinin N-kaderin ile pozitif, E-kaderin ile negatif bir şekilde korele olduğu, ETS1 ifadesinin baskılanması ile hücre göçünün azaldığı ve bu hücrelerde adezyonun arttığı görülmüştür [125]. 59 HSK hastasından, 41'inde (%70) ETS1 protein ifadesi saptanmıştır. Tümör bölgesinin periferinde ETS1 ifadesi daha yüksek olduğu belirtilmiştir [112]. Hepatosit büyüme faktörü reseptörü olan MET tirozin kinaz reseptörü, tümör gelişimi, apoptotik direnç ve yüksek metastatik potansiyel gibi birçok hücresel işlevi başlatmaktadır. Bu reseptörün promotor düzenleyicileri PAX ve ETS1'dir. İn vivo ve hücre kültürü çalışmalarında, melanoma hücrelerinde dominant negatif ETS1 ifadesinin melanoma hücrelerinin büyüme yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. ETS1'in PAX bağımlı ve bağımsız iki mekanizma ile MET ifadesini düzenleyerek, melanoma gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmiştir [126]. Chan ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada insan mikrovasküler endothelyal (HMECs) hücrelerinde hipoksiya durumunda miR-200b'nin azaldığı, bu azalma sonucunda ETS1 üzerindeki baskısının kalktığı dolayısıyla pro-anjiyogenik ETS1 ifade artışı ile anjiyogenezin arttığı gözlenmiştir [127].

2.7. ETS1 ve ZEB2

Shirakihara ve arkadaşlarının 2007 yılında fare meme epiteli NMuMG hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada, TGF- β ile indüklenen ETS1 ifadesinin *ZEB1* promotorunu aktive ettiği, ayrıca *ETS1* ifadesinin susturulması ile *ZEB1* ve *ZEB2* ifadelerinin baskılandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, ZEB ailesi proteinleri ZEB2 ve ZEB1'in TGF- β ile indüklenen EMT için gerekli olduğu ancak yeterli olmadığı, TGF- β ile indüklenen ETS1'in, *ZEB2* ve *ZEB1*'in transkripsiyonel düzenleyicisi olarak fonksiyon gösterebileceği belirtilmiştir (Şekil 2.9) [128]. Sinh ve arkadaşları, ETS1'in ZEB

ekspresyonunu indüklediğini ve *ZEB1* promotorunu, treonin 38 fosforilasyon durumundan bağımsız olarak aktive ettiğini göstermişlerdir. Meme kanseri hücrelerinin bazal-benzeri alt tipinde, ETS1'i hedef alan siRNA'lar ZEB'lerin ekspresyonunu bastırmış ve epitel fenotiplerini ve antitümör ilaçlara duyarlılıklarını kısmen geri kazandırmışlardır. Diğer yandan, Miyoshi ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada, ZEB2'nin matriks metalloproteazların ifadesini arttırdığı ve HSK hücrelerinin invazyonunu düzenlediği belirlenmiştir. Ancak, MMP ailesinin promotor bölgesinde ZEB2 bağlanma bölgesi motifi CACCTG dizisini içeren E-box bulunmamaktadır. Bu durumda, ZEB2 MMP'nin transkripsiyonunu direkt olarak düzenleyememektedir [55]. Oysa, MMP ailesinin promotor bölgesinde ETS bağlanma bölgesi bulunduğu ve bu transkripsiyon faktörü tarafından gen ifadelerinin düzenlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [129, 130]. Taki ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada da ZEB2 ifadesinin arttırıldığı koşullarda ETS1'in MMP promotoruna bağlanmasında artış görülmüştür [131].



Şekil 2.9: EMT'i indükleyen TGF-β temelli transkripsiyon ağı.

3. GEREÇLER

3.1.Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Listesi.

Kimyasal Adı	Markası
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Agaroz	Lonza
RNaz-ExitusPlus	AmpliChem
RnazA	Thermo Scientific
Proteinaz K	NEB
Proteaz inhibitörü	Roche
Poli (etilenimin) solüsyonu	Sigma
Polibren	Millipore
Doksisiklin	Abcam
Lipofektamin 3000	Thermo Fisher
Jelatin	Merck
Sodyum Deoksikolat	AppliChem
Amonyum persülfat	Fisher
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum azid	Fisher
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher
Gliserol	Fisher
Sodyum Bikarbonat	Fisher
Agaroz	Lonza
Sodyum Klorit	Fisher
Tris Baz	Fisher
HEPES	Fisher
Kalsiyum klorür susuz	BioWorld
Paraformaldehit	Fisher
Bacto Agar	BD
LB Broth	Acumedia
Amonyum Sülfat	Fisher
Glisin	BioFroxx
Hidroklorik Asit	J.T. Baker
İzopropil alkol	Fisher
Sodyum klorit	Fisher
Sodyum fosfat monobazik susuz	Fisher
Glasiyal Asetik Asit	Fisher
Sodyum Azid	Fisher

3.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre besiyeri olarak düşük-glikoz ve yüksek-glikoz içerikli DMEM ile RPMI 1640 (Gibco), besiyerleri, %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), 10X PenisilinStreptomisin

(Gibco), 1X Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ve 10X Tripsin (Gibco) kullanıldı.

3.3. Kullanılan Kitler

Kültüre edilip büyütülen hücrelerden total RNA izolasyonu için NucleoSpin RNAII izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanıldı. İzole edilen total RNA'lardan tek zincirli cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti (BioLabs) ile yapıldı. Gen ifadesi analizinde Maxima Syber Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) ile gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. ZEB2 gen ifadesinin SNU398 hücrelerinde baskılanmasında GIPZ Lentiviral shRNA partikülleri (Thermo Scientific) kullanıldı. Kromatin-immünopresipitasyon deneylerinde ise manyetik bilyeler (Dynabeads, Lifetechnologies) kullanıldı. ChIP deneylerinde ZEB2 antikoru ile elde edilen DNA izolasyonu QIAQuick PCR saflaştırma kiti (QIAGEN) ile gerçekleştirildi. Lusiferaz raportör çalışmalarında Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) kullanıldı. Kanseri doku ve normal insan cDNA'larında gen ifade analizleri TissueScan qPCR Cancer Survey cDNA arrays I (CSRT101- OriGene) ile gerçekleştirildi.

3.4. Kullanılan Antikorlar

Monoklonal anti-ZEB2 antikoru tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI tarafından geliştirilen 6E5 hibridoma hücre süpernatantlarından elde edildi. Tavşan poliklonal anti-MYC Tag (ab9106-Abcam), fare monoklonal TWIST1 (ab175430-Abcam) Abcam (Cambridge, UK)'dan temin edildi. Fare monoklonal anti-ETS1 klon C-4 (sc-55581), fare monoklonal anti-MMP9 (sc-12759), fare monoklonal anti-GAPDH (sc-47724) ve fare monoklonal anti-kalneksin klon AF18 (sc-23954), tavşan poliklonal anti-ZEB1 (H-102), fare monoklonal integrin $\alpha 3$ (A-3) antikorları Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)'den temin edildi. Western blot yönteminde yükleme kontrolü olarak α -tubulin (DM1A), fare monoklonal anti-kalneksin klon AF18 (sc-23954) ve fare monoklonal anti-GAPDH (sc-47724) kullanıldı. İkincil antikorlar olarak anti-fare HRP (Cell Signaling, 7076S) ve anti-tavşan HRP (Cell Signaling, 7074S) antikorları kullanıldı. Fare monoklonal E-kaderin antikoru (BD Biosciences, USA)

kullanıldı. Kromatin immünopresipitasyon deneylerinde kontrol antikoru olarak fare izotip IgG2a (ab18413; Abcam) antikoru kullanıldı.

3.5. Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada GTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde stoklu 8 hepatoma (SNU182, SNU398, SNU423, HEP3B, SK-HEP1, HUH7 ve PLC/PRF/5) ve 1 hepatoblastoma hücre hattı (HEPG2) kullanıldı. Ayrıca Southampton Üniversitesi'nden Dr. A. Emre Sayan tarafından laboratuvarımıza verilen ZEB2'nin doksisisiklin (Dox) ile indüklenilerek anlatımının gerçekleştirildiği epitel karakterli kolorektal kanser ve skuamöz karsinom hücre hatları DLD1-ZEB2 ve A431 kullanıldı.

3.6. Kullanılan Oligonükleotidler

Primerler Alpha DNA ve İontek firmasından temin edildi. TissueScan qPCR Cancer Survey cDNA Arrays I (CSRT101) dizinleri OriGene Technologies (Rockville, MD)'den satın alınmıştır.

3.7. Kullanılan DNA ve Protein Belirteçleri, Yükleme Tamponları ve Görüntüleme Substratı

Agaroz jel elektroforez için 100 – 1000 baz çifti aralığındaki (New England BioLabs) DNA boyut belirteci ve yükleme tamponu olarak da Gel Loading Dye Blue (6X) (New England BioLabs) kullanıldı. Nükleik asit boyanması için ise RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (Intronbio), protein belirteci olarak 180-10 kDa aralığındaki (#26616, Thermo Scientific) protein belirteci kullanıldı. Protein görüntülemelerinde kemilüminesan substratı Supersignal West Femto reagent Thermo Scientific firmasından alındı.

3.8. Kullanılan Çözeltiler

Tablo 3.2: Kullanılan Çözeltiler.

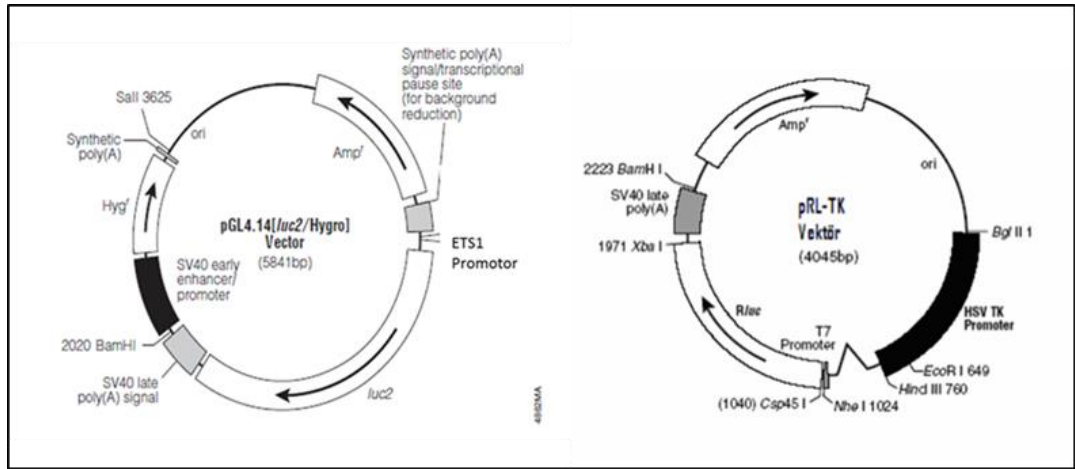
Çözelti Adı	İçerik
Nükleik Asit Çözeltileri	
Tris–EDTA (TE) Tamponu	10 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)
Tris – Asetik asit – EDTA (TAE)(50x)	121 g Tris – bazı, 18,6 g EDTA, 28,55 ml glasiyel asetik asit. Bu bileşenler, belirli miktar ddH ₂ O içinde çözülüp, pH 8,5 yapıldıktan sonra 500 ml'e ddH ₂ O ile tamamlandı.
Hücre Kültürü Çözeltileri	
Hücre Dondurma Ortamı	%10 DMSO, %90 FBS
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (10X)	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ . Bu bileşenler belirli miktar ddH ₂ O içinde çözülüp, pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye ddH ₂ O ile tamamlandı.
Western Blot Çözeltileri	
RIPA Lizis Tamponu	50mM Tris-cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoksikolat ve proteaz inhibitörü
NP40 Lizis Tamponu	50 mM HEPES (pH= ~8), 175 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , %10 Gliserol, %1 NP40 ve proteaz inhibitörü
SDS Lizis Tamponu	50 Mm Tris (pH=8), 150mM NaCl, %2 SDS ve proteaz inhibitörü.
4X SDS Yükleme Tamponu	%40 Gliserol, %20 SDS, 800 mM β-merkaptotanol, 200mM Tris (pH=6.8), %0,1 Bromofenol mavi.
%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 ultra saf su.
%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 ultra saf su.
Elektroforez Yürütme Tamponu	25 mM Tris base, 190 mM glycine, 0.1% SDS ve Tampon pH'ı 8,3 civarına getirildi.
Transfer Tamponu	25 mM Tris base, 190 mM glycine, 0.1% SDS ve %10 metanol.
1X TBS	50 mM Tris HCl (pH= 7.4), 150 mM NaCl.
TBS-T	TBS içerisinde %0,05 olacak şekilde Tween 20 çözüldü.
Bloklama Çözeltisi	1X TBS-T (%0,05) içerisinde %5 süt tozu
ChIP Çözeltileri	
PBS-BSA Tamponu	PBS içerisinde 5mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) olacak şekilde hazırlandı.
Formaldehit Solüsyonu	%37 formaldehit, 5M NaCl, 0,5M EDTA pH:8.0, 1M HEPES pH:7.9 distile suda çözüldü.
Glisin Stok Solüsyonu	2M olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı.
PBS-NP40 Tamponu	PBS içerisinde %0,5 olacak şekilde NP40 çözüldü
PIPES tampon	5 mM PIPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40 ve proteaz inhibitörü
Nükleer Lizis Tamponu	50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS proteaz inhibitörü
LiCl Yıkama Tamponu	100 mM Tris pH:7.5, 500 mM LiCl, %1 NP40, %1 sodyum deoksikolat ve proteaz inhibitörü.

3.9. Kullanılan Bakteriler

E. coli DH5α bakterisi promotor aktivitesi çalışmaları kapsamında kullanılan plazmidler ile lentiviral sistem plazmidlerinin transformasyon basamağında kullanıldı.

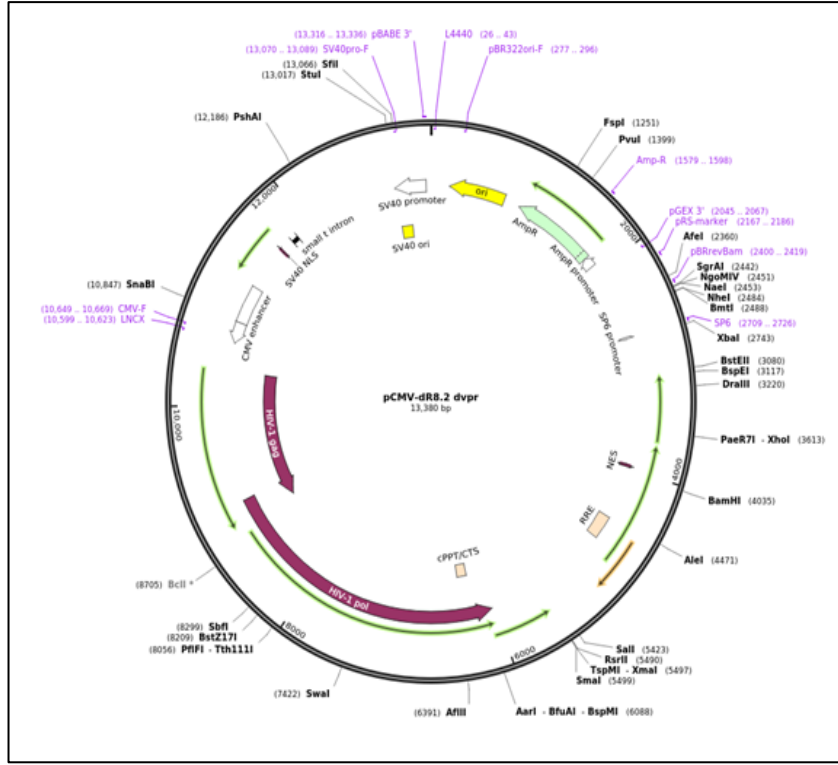
3.10. Kullanılan Plazmidler

ETS1 promotor aktivitesi çalışmaları ve yönlendirilmiş mutasyon deneyleri için pGL4.14 firefly lusiferaz ve pRL-TK renilla plazmidleri kullanıldı (Şekil 3.1).

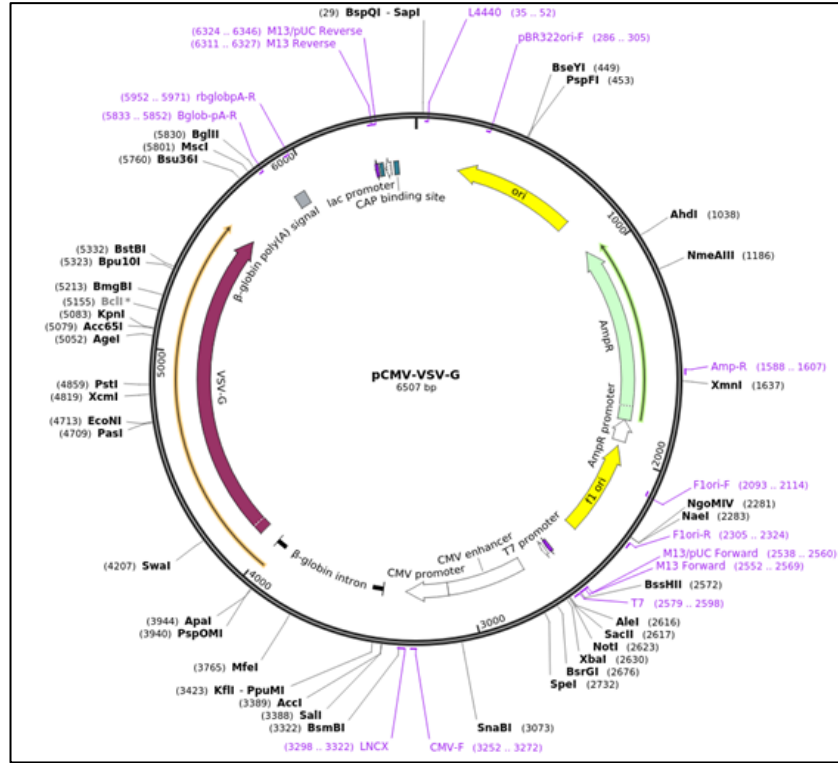


Şekil 3.1: Firefly (pGL4.14) ve Renilla (pRL-TK) plazmidleri.

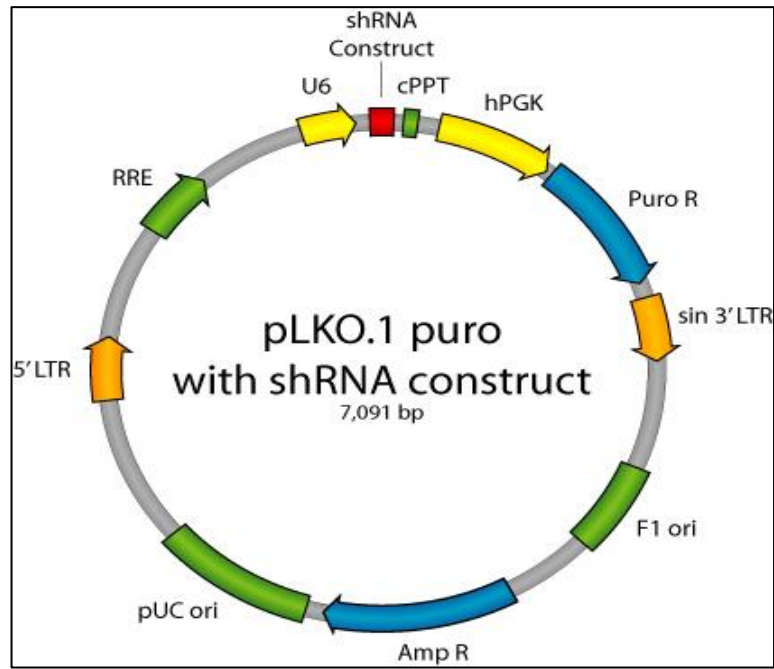
Lentiviral sistem için pLKO.1 boş vektör (Addgene; plasmid #8453) ve insan pLKO.1 shETS1 (TRCN0000005591 ve TRCN0000005592) vektörleri Sigma-Aldrich (St Louis, MO)'den satın alındı. Lentiviral sistemin paketlenmesi için, pCMV-dR8.2 dvprp (Addgene, plasmid #8455) ve pCMV-VSV-G (Addgene #8454) plazmidleri kullanıldı (Şekil3.2-4).



Şekil 3.2: pCMV-dR8.2 dvpr lentiviral paketleme plazmid.

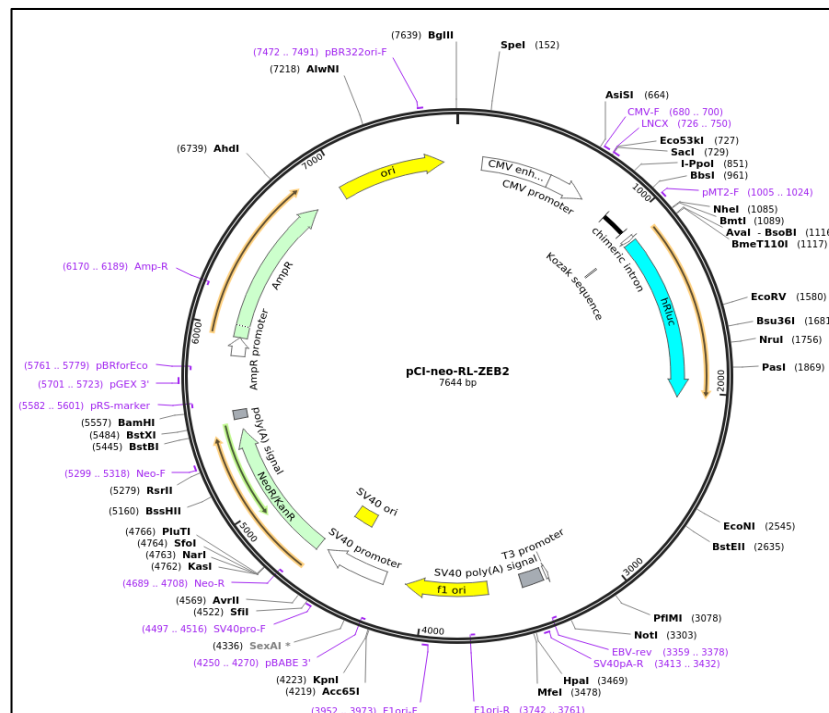


Şekil 3.3: pCMV-VSV-G lentiviral zarf plazmid.



Şekil 3.4: pLKO.1 boş plazmid.

ceRNA ilişkisini belirlemek için ZEB2 3'UTR lusiferaz plazmidi pCI-neo-RL-ZEB2 (Addgene #35536) kullanıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: pCl-neo-RL-ZEB2 plazmidi.

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü ve Büyütme Şartları

HSK hücreleri HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, HUH7 ve SK-Hep-1 düşük-glukoz içerikli DMEM besiyerinde, SNU182 ve SNU423 hücreleri RPMI1640 besiyerinde ve shZEB2-SNU398 and non-silencing control shRNA-SNU398 (NSC-SNU398) hücreleri de RPMI1640 besiyerinde büyütüldü.

ZEB2'nin doksisisiklin ile indüklenilerek anlatımının gerçekleştirildiği epitel karakterli kolorektal kanser hücre hattı DLD1-ZEB2 de yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü.

Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaşınca besiyeri aspire edildi. Hücreler 1X PBS ile yıkandı. Yıkanan hücreler 3X tripsin ile kaldırıldı. Hücreler gerekli oranlarda pasajlanarak kültüre edilmeye devam edildi. DLD1-ZEB2 hücreleri indükleneyeceği zaman besiyerine 2µg/ml doksisisiklin eklendi. Tüm besiyerlerine %10 FBS ve %1 Penisilin – Streptomisin antibiyotik karışımı eklendi.

Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelletinin üzerine hücre dondurma ortamı eklendi. 2ml tüplerde hücreler önce -80°C derin dondurucuya alındı ve takip eden gün sıvı azot tankına aktararak uzun süreli saklanmaları gerçekleştirildi.

4.2. Gen İfadesi Çalışmaları

4.2.1. Kültüre Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu

Kültüre edilen hücrelerden RNA, NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde gerçekleştirildi

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80°C derin dondurucuda saklandı.

4.2.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen total RNA örnekleri, 65°C’de 5 dakika inkübe edilerek buza alındı. Örnekler 6X DNA yükleme boyası ile son hali 2X olacak şekilde karıştırılıp %2’lik agaroz jelde 1X TAE tamponu kullanılarak yürütüldü. Jelde yürütülen nükleik asitler, ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

4.2.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’lardan cDNA sentezi, ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, -80°C derin dondurucudan alınan RNA’lar ile PCR tüpünde total RNA/Primer/dNTP karışımı (Tablo 4.1) hazırlandı. Bu karışım PCR cihazına yerleştirildi ve 70°C’de 5 dk ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Primerlerin bağlanmasının ardından üzerine RT karışımı (Tablo 4.2) eklendi. Hacmi 20 µl olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirilip 42°C’de 60 dk sentez işlemi ve 80°C’de 5 dk enzim inaktivasyonu işlemi yapıldı.

Tablo 4.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.

RNA / Primer / dNTP karışımı	Miktar (µl)
Total RNA (1 ug)	0,8-3,78
Primer	2
dNTP mix	2
N.F. dH ₂ O (Nuclease – free dH ₂ O)	2,22-5,2
Toplam	8

Tablo 4.2: Ters transkriptaz karışımı.

Bileşen	Miktar (µl)
M – MuIV Reaksiyon Karışımı	0,8-3,78
M – MuIV Enzim	2
Toplam	2

20 µl olan PCR hacmi reaksiyon sonunda N.F. dH₂O (Nuclease – free distile su) ile 100 µl'ye tamamlandı. cDNA konsantrasyonu ve OD_{260/280} oranı NanoSpec spektrometre ile ölçüldü. Sentezlenen cDNA, -20°C derin dondurucuda saklandı.

4.2.4. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi

RT-qPCR için kullanılan primerler, 'Primer 3' programı ile tasarlandı. RT-qPCR işlemlerinde total reaksiyon hacmi 20 µl olarak hazırlandı ve 200-300 ng cDNA kalıp olarak kullanıldı (Tablo 4.3). Primerler (Tablo 4.4) ile Maxima Sybergreen qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanılarak kitin önerdiği döngü şartlarında RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo4.5). Gen ifadesindeki değişim ise, $2^{-\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. Normalizatör olarak GAPDH housekeeping geni kullanıldı. Formül: $[\Delta Ct = Ct (ZEB2, ZEB1, ETS1) - Ct (GAPDH)]$

Tablo 4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

Bileşen	Miktar (µl)
2X SYBR master mix	10
İleri primer (10 µM)	0,4
Geri primer (10 µM)	0,4
Kalıp cDNA (50 – 100 ng)	1
N.F. dH ₂ O	8,2
Toplam	20

Tablo 4.4: RT-qPCR'da kullanılan Primer Listesi.

Gen Adı	İleri	Geri
ZEB2	5'CAAGGAGCAGGTAATCGCAAGT3'	5'GGAACCAGAATGGGAGAAACG3'
mZEB2	5'-ACCGACTCAAGGAGACAGAT-3'	5'-GAGTGGATATGCTGTGGTTCTC-3'.
GADPH	5'GGCTGAGAACGGAAGCTTGTCAT3'	5'CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA3'
ETS1	5'GCATGTCGTTCCAACTAACAC3'	5'GAAAGCCGTACACTTCTCTCTAC3'

Tablo 4.5: RT-qPCR döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 Döngü	95	10 dk
45 Döngü	95	15 sn
	60	30 sn
	72	30 sn
Erime Eğrisi	55-95	Her 0.1 °C sıcaklık değişiminde ölçüm

4.3. Protein İfadesi çalışmaları

Hücre peletleri Proteaz inhibitor kokteyli (Roche) içeren SDS lizis tamponunda (10% Gliserol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl) parçalandı. Protein konsantrasyonları Qubit 3 Flourometre (Thermo Fisher Scientific) ile ölçüldü. 50 µg total protein örnekleri %10'luk SDS-PAGE jelde yürütülerek, PVDF membrana Bio-Rad transfer cihazı ile transfer edildi. Membran %5 yağsız süt tozu içeren TBS (Tris Buffered Saline: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl) içinde bloklandı. Membranlar primer antikorda 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra membran TBS-T (Tris Buffered Saline: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl, %0,5 Tween-20) ile 3 kez yıkanarak ikincil olarak anti-fare veya anti-tavşan ile 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Membran tekrar TBS-T ile yıkandı ve Supersignal west femto ECL (Thermo Fisher Scientific) ile kaplanarak ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) cihazı ile görüntü alındı.

4.4. Kromatin İmmünopresipitasyon

Hücreler %80-90 büyüme oranına geldiklerinde %1 formaldehitte 10 dakika bekletilerek DNA-protein çapraz-bağı (crosslink) oluşturuldu. Çapraz bağlanma etkisi 125 mM glisin (5 dakika) ilavesiyle sonlandırıldı. Plazma membranı, proteaz inhibitörü karışımı ilave edilmiş PIPES tamponu ile buzda 10 dakika parçalandı, ardından Nüklei Lizis tamponu içinde 10 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. Tris-EDTA-SDS tamponunda (10 mM Tris-HCl, pH:8,0. 1 mM EDTA, 1% SDS) çözülen nükleer pelletler 30 sn. vuruş, 30 sn. buzda bekletme şeklinde 10 kez sonike edildi. Sonikasyon sonrası SDS'in ortamdan uzaklaştırılması için 14000 rpm 15 dakika +4°C'ta santrifüj yapıldı. Elde edilen lizattan DNA'nın parçalanma etkinliğini test etmek ve ChIP-qPCR işleminde input olarak kullanılmak amacıyla örnek alındı. PBS-BSA ve 6E5 üst-sıvısı ve

fare izotip kontrol IgG2a (ab18413; Abcam) antikorları ile doyurulan bilyeler 2 kere proteaz inhibitörlü NP40 Buffer ile yıkandı. Lizatlar ve bilyeler proteaz inhibitörlü NP40 Buffer içinde +4°C'ta gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün örnekler LiCl tampon (10 mM Tris pH:7,5, 500mM LiCl, 1%NP40, 1% sodium deoxycholate, 1mM EDTA) ile nazikçe yıkandı, DNA-protein karışımı Tris-EDTA tamponunda (10 mM Tris-HCl, pH:8,0. 1 mM EDTA) çözüldü. CHIP deneyinin başında oluşturulan protein-DNA kovalent bağının koparılması (reverse crosslink) için örnekler gece boyu 65°C'ta RNase A ve proteinaz K ile muamele edildi. CHIP-DNA ve input-DNA QIAQuick PCR saflaştırma kiti ile saflaştırıldı.

Tablo 4.6: qPCR analizinde kullanılan primer listesi

Gen Adı	İleri	Geri
LPCAT1_-22k promotor	5'CAAACCGGGAAGTCATCTTG3'	5'TGCACAAGGGTTCTGTTCTG3'
ETS1 promotor	5'TCACCTGAGACCTTGCCTA3'	5'CCTCATCATTTGCTGATGCATTTA3'

CHIP-qPCR (Tablo 4.6) verilerini normalize etmek amacıyla “% input” yöntemi kullanıldı [70]. Bu yöntemde CHIP ile çöktürülmüş DNA'dan gelen Ct değerleri, inputtan gelen Ct'lere göre değerlendirilmektedir. Input değeri CHIP'te kullanılan kromatin miktarını yansıttığından, %1 input ile qPCR yaptığımızda dilüsyon faktörü 100 olduğu için input ham Ct değerinden log2 tabanında 100'ün karşılığı olan 6,644 Ct değeri çıkartılarak %100 inputa tekabül eden Ct değeri bulundu. İzotip kontrol antikor ve 6E5 ZEB2 antikor ile indirilen DNA'dan elde edilen Ct değerleri aşağıdaki formüle yerleştirilerek antikorların indirdiği kromatin miktarı hesaplanırken, % Input: $100 \times 2^{[\%100 \text{ Input Ct} - \text{IP-Ct}]}$ formülü kullanıldı.

4.5. ETS1 Promotor Aktivitesi Çalışmaları ve Yönlendirilmiş Mutasyon Deneyleri

Lusiferaz raportör çalışmaları için pGL4.14 firefly lusiferaz ve pRL-TK renilla plazmidleri kullanıldı. Lusiferaz aktivitesi 'Dual-Glo Luciferase Assay System' (Promega) ile ölçüldü. Ökaryotik promotor veribankası'nda (Eukaryotic Promotor Database) ETS1 promotor bölgesi seçilerek (Şekil 4.1), bu bölgede ZEB2/SIP1

transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgeleri (CAGGTG) arandı. Transkripsiyon başlama noktasından itibaren -497. (1. E-box), -446. (2.E-box) ve -181. (3. E-box) nükleotidlerde ZEB2 bağlanma bölgeleri bulundu.

>FP017048 ETS1_2 :+U EU:NC; range -600 to 100.

ccaagtccatatccagtcagctctctccacaaaattattttctttcttttagaaaatatcacatt

1. E-box

tcatatcaagttattagagagaaacgggaagcctgagcaggtgactgggtggaggacgtcc

2. E-box

tgtgtttctaaagcaatccctttccctcacctgagacctgacctaggttaattgggggtccatt

gagaaagtcaaggaacatgaagcatgaatatttacatattcagcagagagtaaagcatca

gcaaagtatgaggtgagatacagtggtatcccactgaactagttcccttttgctcatctccctc

cctgttactctccaaggctgagttatattcagctgaagcacaatttgaagaatacgaataat

3. E-box

gtgtgatttggtgccaccactgtcaatcaacagtgctttcacctagactgctgtgcctgtgcc

agtggctgctgtcctgggtgccaggggcaagaggaagactgcctttttccagctttccctggc

ttgaccacaccccccaatttaaggaggcagctctattagaaacattatgggtctttgcacctc

ttaagctacggagcagaggattcccgaggtAGTTGGAAAGAGACCACAGACTT

TGAGGGAAGCTCACTCAGGATCTGCTCTCCGGCAAAGTAGTAAGTGAG

GTGTGTGTCAGTTTCTGCCTAAACTTTTC

Şekil 4.1: ETS1 geninin promotor bölgesinde bulunan olası E-box bölgeleri ökaryotik promotor veritabanından alınmıştır. Küçük harf: TSS'ın üst bölgesi, Koyu renk: klonlama primerleri.

Lusiferaz plazmidleri, DNA pürifikasyon kiti (Macherey-Nagel) ile üreticinin talimatına uygun şekilde izole edildi. gDNA SNU398 hücrelerinden GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep kiti (GenElute) kullanılarak izole edildi. ETS1 promotor bölgesinin çoğaltılması için yapılan PCR'da bu genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. ETS1 promotor primerleri (Tablo 4.7) ve izole edilen bu gDNA ile Taq polimeraz varlığında tablo 4.8 ve 4.9'daki koşullar uygulanarak PCR yapılmıştır.

Tablo 4.7: ETS1 promotor primerleri.

Primer adı	Primer dizisi
ETS1 promoter F	5'TACGCTCGAGCCAAGTCCATATCCAGTC3'
ETS1 promoter R	5'TACGAAGCTTCTCCTTAAATTGGGGGGTG3'

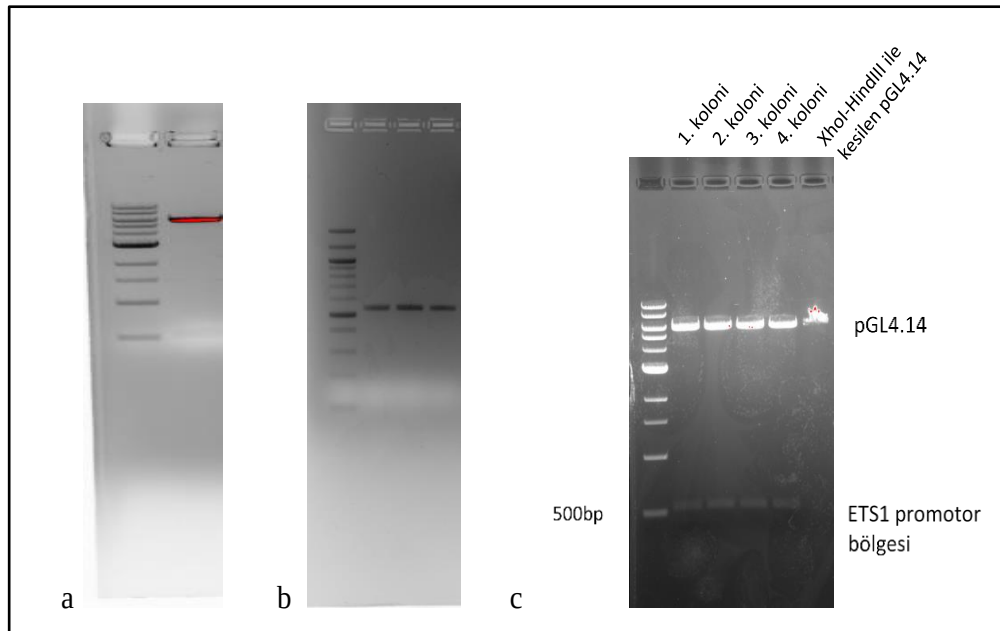
Tablo 4.8: Reaksiyon koşulları.

Bileşen	Miktar (μl)
10x Taq DNA polimeraz tamponu	5
dNTP (10mM)	1
MgCl ₂ (25mM)	3
ETS1 F (10 μM)	2,5
ETS1 R (10 μM)	2,5
gDNA (200 ng)	6
Taq DNA polimeraz (1,25U/μl)	1
dH ₂ O	29

Tablo 4.9: PCR koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 Döngü	95	3 dk
18 Döngü	94	30sn
	55	60 sn
	72	60 sn
1 Döngü	72	7 dk

Elde edilen PCR ürünü, pGL4.14 plazmidine aktarmak amacıyla HindIII ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Böylece yapışkan uçlu insert DNA elde edilmiştir. Elde edilen yapışkan uçlu plazmid ve PCR ürünleri T4 ligaz enzimi ile ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü, DH5α bakterisine transforme edildi. Transformasyon sonucunda elde edilen 4 koloniden miniprep plazmid izolasyon kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak plazmid izole edildi. Ligasyonun başarıyla gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla bu plazmidler XhoI ve HindIII enzimleri ile kesilerek, agaroz jelde gözlemlendi. Bu kesim sonucunda jelde ETS1 promotor bölgesi ~600 bp'da, pGL4.14 plazmidi de ~6000 bp'da görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: ETS1 promotoru klonlanan pGL4.14 plazmidinin agaroz jel görüntüsü a. XhoI ve HindIII ile kesilen pGL4.14 plazmidi, b. ETS1 promotor bölgesi, c. Ligasyon sonrasında elde edilen kolonilerin doğrulanması.

Restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanan 4 koloniden izole edilen ETS1 promotor bölgesini içeren pGL4.14 plazmidleri dizilemeye gönderilmiştir (Şekil 4.3). Dizileme hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonucunda 4 koloninin üçünde klonlamanın başarıyla gerçekleştiği görülmüştür.

Homo sapiens ETS proto-oncogene 1, transcription factor (ETS1), RefSeqGene on chromosome 11
Sequence ID: [efl|NG_029555.1](#) Length: 135798 Number of Matches: 1

Range 1: 4401 to 4932 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
960 bits(1064)	0.0	532/532(100%)	0/532(0%)	Plus/Plus
Query 66	CCAAGTCCATATCCAGTCAGCTCTCTCCACAAAATATTTCTTTCTTTAGAAAATAT	125		
Sbjct 4401	CCAAGTCCATATCCAGTCAGCTCTCTCCACAAAATATTTCTTTCTTTAGAAAATAT	4460		
Query 126	CACATTTTCATATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAGCCTGAGCAGGTGACTGGGTGGTG	185		
Sbjct 4461	CACATTTTCATATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAGCCTGAGCAGGTGACTGGGTGGTG	4520		
Query 186	GACGTCCTGTGTTCTAAAGCAATCCCTTCCCTCACCTGAGACCTTGCTTAGGTTAATG	245		
Sbjct 4521	GACGTCCTGTGTTCTAAAGCAATCCCTTCCCTCACCTGAGACCTTGCTTAGGTTAATG	4580		
Query 246	GGGGCTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACATATTCAGCAGAGA	305		
Sbjct 4581	GGGGCTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACATATTCAGCAGAGA	4640		
Query 306	GTAATGCATCAGCAATGATGAGGTGAGATACAGTGTTATCCCACTGAAGTTCCTT	365		
Sbjct 4641	GTAATGCATCAGCAATGATGAGGTGAGATACAGTGTTATCCCACTGAAGTTCCTT	4700		
Query 366	TTTGCTCATCTCCCTCCCTGTTACTCTCAAGGCTGAGTTATATTCAGCTGAAGCACAAT	425		
Sbjct 4701	TTTGCTCATCTCCCTCCCTGTTACTCTCAAGGCTGAGTTATATTCAGCTGAAGCACAAT	4760		
Query 426	TTGAAGAATACGAAATATGTGTGATTTGGTGCCACCACTGTCAATCAACAGTGCTTTCC	485		
Sbjct 4761	TTGAAGAATACGAAATATGTGTGATTTGGTGCCACCACTGTCAATCAACAGTGCTTTCC	4820		
Query 486	ACCTAGACTGCTGTGCTGTGCCAGTGGCTGTCTGGTGCCAGGGCAAGAGGAAGA	545		
Sbjct 4821	ACCTAGACTGCTGTGCTGTGCCAGTGGCTGTCTGGTGCCAGGGCAAGAGGAAGA	4880		
Query 546	CTGCCTTTTTTCCAGCTTCCCTGGCTTGACACACCCCAATTAAAGGAG	597		
Sbjct 4881	CTGCCTTTTTTCCAGCTTCCCTGGCTTGACACACCCCAATTAAAGGAG	4932		

Şekil 4.3: Dizileme sonucunda elde edilen DNA dizisinin BLAST sonucu.

Literatüre göre E-box dizisinin -ACC- bölgesinde meydana gelen tek baz değişimleri ZEB2 proteinin bağlanmasını engellemektedir [28, 132]. Bu nedenle, ETS1 promotor bölgesinde bulunan üç dizinin -ACC- bazlarını -TTT- ile değiştirecek şekilde uzun mutasyon primerleri tasarlandı. *ETS1* promotor bölgesi klonlanan pGL4.14 plazmidinde yer alan ETS1 promotor bölgesindeki E-box'lar, uzun mutasyon primerleri (Tablo 4.10) ve Quik-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) kullanılarak sırasıyla mutasyona uğratıldı.

Tablo 4.10: Uzun mutasyon primerleri.

1.caggtg SDM F	5'-CGTCCACCACCCAGTCTTTTGCTCAGGCTTCCCGT-3'
1.caggtg SDM R	5'-ACGGAAGCCTGAGCAAAAGACTGGGTGGTGGACG-3'
2.cacctg SDM F	5'-CCATTAACCTAGGCAAGGTCTCTTTTGAGGAAAGGGATTGCTTTAG-3'
2.cacctg SDM R	5'-CTAAGCAATCCCTTCCCTCAAAAGAGACCTTGCTAGGTTAATGG-3'
3.cacctg SDM F	5'-CAGGCACAGCAGTCTTTTGAAAGCACTGTTGATTGACAGTGGT-3'
3.cacctg SDM R	5'-ACCACTGTCAATCAACAGTGCTTTCAAAAAGACTGCTGTGCCTG-3'

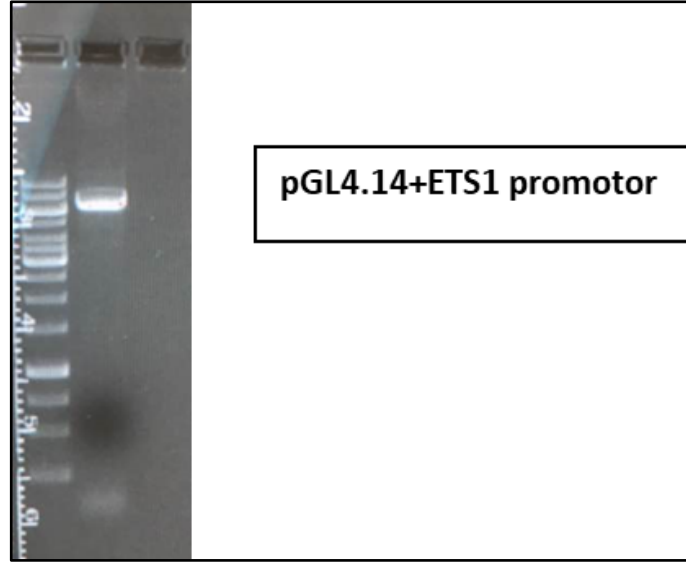
Mutasyon çalışmalarına 2. olası E-box dizisi ‘CACCTG’ mutasyona uğratılmaya çalışılarak başlandı. 2. bölgenin uzun primerleri ve ETS1 klonlanan pGL4.14 plasmidi kullanarak yönlendirilmiş mutasyon PCR’ı aşağıdaki reaksiyon koşullarında yapıldı (Tablo 4.11-12). Reaksiyonun 5  l’si agaroz jele y klendi (şekil 4.4).

Tablo 4.11: Reaksiyon Koşulları.

Bileşen	Miktar (�l)
10x Pfu Ultra DNA polimeraz tamponu	5 �l
dNTP (10 mM)	1 �l
ETS1-pGL4.14 plasmid (10ng/ �l)	4 �l
cacctg SDM F (10 �M)	1 �l
cacctg SDM R (10 �M)	1 �l
Pfu Ultra DNA polimeraz	1 �l
dH ₂ O	37 �l

Tablo 4.12: PCR koşulları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (�C)	Süre
1 Döngü	95	5 dk
18 Döngü	95 60 68	1 dk 1 dk 8 dk
1 Döngü	68	12 dk



Şekil 4.4: İkinci olası E-box bölgesi için tasarlanan uzun primerler ile mutasyona uğratılan pGL4.14+ETS1 promotor plazmid.

Reaksiyon ürünü 10 µl Cut smart buffer varlığında DpnI enzimi ile 37 °C'de 2 saat kesildi. Kesimin ardından 2 µl T4 DNA ligaz ve 4 µl T4 DNA ligaz buffer ile o/n 16°C'de inkübe edildi. Ertesi gün kompetan DH5α hücrelerine ligasyon ürününden 16 µl transforme edildi. Transformasyon sonucunda elde edilen kolonilerden plazmid izole edilerek, restriksiyon enzim kesimi ile doğrulama yapıldı. Daha sonra sırasıyla 1.+2. E-box, 2.+3. E-box ve 1.+3. E-box bölgelerinde mutasyonlar yapıldı. Bu bölgelerdeki mutasyonlar dizilemeye gönderilerek doğrulandı (EK-A). Doksisisiklin ile indüklenen ve indüklenmeyen (kontrol) DLD-ZEB2 ve shZEB2-SNU398 ve NSC-SNU398 (kontrol) hücreleri 96 kuyulu lüminesans plakalarına (Nunc™MicroWell™ plate with Nunclon™ Delta Surface treatment, Thermo Fisher Scientific) ekildi. 24 saat sonra pGL4.14-ETS1 plazmid ile pRL-TK plazmid Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) ile ko-transfekte edildi. Mutasyonun etkisini değerlendirmek için 1.+2. E-box, 1.+3. E-box ve 2.+3. E-box bölgelerinde mutasyona uğratılan plazmidler doksisisiklin ile indüklenen ve indüklenmeyen (kontrol) DLD-ZEB2 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) kullanılarak Varioscan luminometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçülmüştür. Lüminesans oranı, pGL4.14 plazmidinden gelen ışıma oranının (*Firefly*) normalizatör plazmidinden gelen ışıma oranına (*Renilla*) bölümü ile hesaplanmıştır.

4.6. shETS1 Lentiviral Transdüksiyon Partiküllerinin Üretimi

Lentiviral partikülleri oluşturmak amacıyla pLKO.1 shETS1 ve kontrol pLKO.1 plazmidleri, pCMV-dR8.2 dvpr (Addgene, plasmid #8455) ve pCMV-VSV-G (Addgene #8454) paketlenme plazmidleri ile 1,5:1,5:1 oranında 250 µl Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) içerisinde bir araya getirildi. Diğer yandan başka bir tüpte bulunan 250 µl Optimem'e transfeksiyon ajanı Poly (ethyleneimine)'den (PEI) (Cat# P 3143; Sigma-Aldrich, Germany) 1:3 (plazmid DNA (ağırlık): PEI (hacim)) oranında konuldu. Bu iki karışım, (plazmid DNA ve transfeksiyon ajan karışımı) bir araya getirilerek oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. HEK293T hücrelerine verildi. 36 saat sonra lentiviral shETS1 ve shpLKO.1 partikülleri üst sıvıdan toplanmıştır. 0.45µm por çaplı filtreden geçirilerek, -80'e kaldırılmıştır.

Daha sonra ETS1 ifadesi baskılanmak istenen DLD-ZEB2 ve SK-HEP-1 hücreleri 6 kuyulu plakalara ekilmiş, hücreler %80 yoğunluğa gelince viral partiküller 8 µg/ml Polybrene (Thermo Fisher Scientific) ile birlikte hücrelere verilmiştir. 8-10 saat sonra besiyeri tazelenmiş, 48 saat sonra da transdükte olan DLD-ZEB2 hücreleri 4 µg/ml ve SK-HEP-1 hücreleri 2,5 µg/ml puromisin varlığında seçilmiştir.

4.7. Yara Kapanma Deneyi

shpLKO.1-DLD-ZEB2 ve shETS1-DLD-ZEB2 hücreleri 12 kuyulu plakaya ekilmiş, %90 yoğunluğa ulaşınca hücre tabakası steril 0.2 mL pipet ucu ile çizilmiştir. Hücre tabakasında açılan bu yara 48 saat süre ile invert mikroskop ile gözlenmiş ve fotoğraf alınmıştır. 0., 16., 24. ve 48. saatlerin alanı ölçülmüştür.

4.8. Matrigel invazyon Deneyi

1.5×10^5 kontrol shpLKO.1-DLD-ZEB2 ve shETS1-DLD1-ZEB2 hücreleri BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences, Bedford, MA)'in üst kompartımanına serum içermeyen yüksek glukozlu DMEM içinde ekildi. Aşağıda bulunan kuyu 10% FBS içeren yüksek glukozlu DMEM ile dolduruldu. Bu çalışmada FBS kemoreaktan olarak kullanıldı. 48 saat sonra, matrijelin üst kısmında kalan ve invazyon yapmayan hücreler ıslatılmış pamuk ile temizlendi. Matrijelin diğer yüzeyine

geçen invazyon yapan hücreler %0,1 kristal viole ile fikse edilerek boyandı. İnvazyon yapan ve boyanan bu hücreler Leica DM IL LED mikroskop (Leica Microsystems, NJ) ile fotoğraflandı. İnvazyon kapasitesi membranın yüzeyinde boyanan hücreler sayılarak hesaplandı.

4.9. Hücre Proliferasyon Deneyi

Hücre proliferasyonu, %5 CO₂ ile 37 °C'de xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) DP cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak izlendi. Gerçek zamanlı olarak çoğalmasını ölçmek için sh pLKO.1 DLD-ZEB2 ve shETS1 DLD1-ZEB2 hücreleri 4.0 x 10³ hücre /kuyu yoğunluğunda 16 kuyulu mikropalaklara (E-plakalar; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) ekildi.

4.10. ZEB2-ETS1 ceRNA İlişkisinin Aydınlatılması

ZEB2-ETS1 ilişkisini gösterebilmek için SK-HEP-1 shPLKO.1 ve SK-HEP-1 shETS1 hücrelerinde ZEB2 3'UTR lusiferaz aktivitesi ölçüldü. SK-HEP-1 shPLKO.1 ve SK-HEP-1 shETS1 hücreleri 96 kuyulu lüminesans plakalarına (Nunc™MicroWell™ plate with Nunclon™ Delta Surface treatment, Thermo Fisher Scientific) 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra pCI-neo-RL-ZEB2 (Addgene #35536) ve pGL8C plazmidleri Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) ile ko-transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) kullanılarak Varioscan luminometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçülmüştür. Lüminesans oranı, pCI-neo-RL-ZEB2 plazmidinden gelen ışımaya oranının (Renilla) normalizatör plazmidinden gelen ışımaya oranına (Firefly) bölümü ile hesaplanmıştır.

4.11.İnsan kanser örneklerinde ZEB2 ve ETS1 ifadelerinin Analizi

ZEB2 ve ETS1 ifadeleri, meme, kolon, böbrek, karaciğer, ovaryum, tiroid, akciğer ve prostat dokularından elde edilen cDNA'ların yer aldığı 'TissueScan cancer cDNA dizinleri' kullanılarak belirlendi. Her bir kanser tipi, 9 tümör ve 3 kontrol örneği

içermektedir. RT-qPCR, *ZEB2* ve *ETS1* primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Normalizatör olarak üretici firmanın sağladığı *ACTNB* primeri kullanıldı. Tümör dokularındaki *ETS1* ve *ZEB2* ifadeleri normal dokudaki ifadelerine göre kalibre edilerek $\Delta\Delta C_t$ metod ile hesaplandı [133].

4.12. Atlas Veribankasından RNA Sekans Sonuçları

21 alt kanser tipi ve 17 kanser tipinin TCGA RNA-Seq datası “Human Protein Atlas” veritabanından (www.proteinatlas.org) alınarak *ZEB2* ve *ETS1* ifadelerinin analizi yapıldı. Her bir genin FPKMs (number Fragments Per Kilobase of exon per Million reads) değerleri kullanılarak korelasyon hesaplandı. Örneklerin ID’lerine göre FPKM değerleri yeniden düzenlenerek R paket "corrplot" analiz aracı ile korelasyon hesaplandı.

FPKM levels were rearranged according to sample IDs and R package was used as an analysis tool to determine the correlation between *ETS1* and *ZEB2*.

4.13. İstatiksel Analizler

ETS1, *ZEB1* ve *ZEB2*'nin gen ifadesi seviyeleri arasındaki çift yönlü korelasyonlar Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. Hücre proliferasyon verilerinin istatistiksel önemi, iki yönlü ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücrelerde ve TissueScan cDNA dizinlerinde gen ifadelerinin istatistiksel analizi Stutetnt’s t-test’i kullanılarak hesaplandı. Anlamlı farklılık şu şekilde belirtildi: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

HSK hücrelerinde, tümör cDNA dizinlerinde ve TCGA datasında *ZEB2* ve *ETS1* ifadelerinin korelasyonu ‘R package corplot’ kullanılarak hesaplandı. Negatif ve pozitif r -değerleri aşağı veya yukarı doğru yönelen doğrusal çizgi ile gösterildi.

5. BULGULAR

5.1. Mezenkimal Fenotip Gösteren İnsan Tümör hücrelerinde ZEB2 ve ETS1 Transkripsiyon Faktörlerinin Birlikte İfadesi

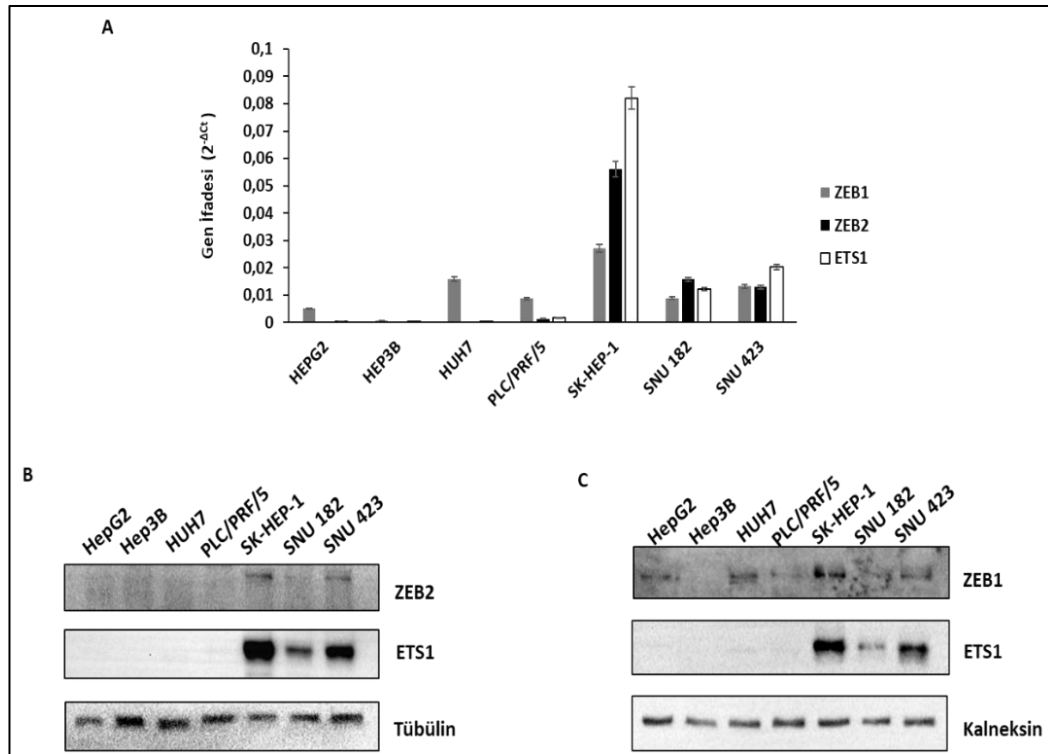
Hepatoselüler Karsinoma hücre hatları, E-kaderin ifade edenler ve vimentin ifade edenler şeklinde iki ana gruba ayrılırlar. E-kaderin ifadesi bulunan hücreler epitelyal hücre özelliği gösterirken vimentin ifade edenler mezenkimal hücre özelliği göstermektedirler [134]. Yaptığımız çalışmalarda, daha önceki çalışmalar ve morfolojik değerlendirmelerle tutarlı olarak HepG2, Hep3B, Huh7 ve PLC/PRF/5 hücreleri epitelyal, SK-HEP-1, SNU182 ve SNU423 hücreleri de mezenkimal özellik göstermektedir [135, 136]. Öncelikle bu hücre hatlarında ETS1 ve homolog transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon seviyelerini belirledik. Mezenkimal hücreler bu üç transkripsiyon faktörünü iyi ifade ederken, bu transkripsiyon faktörlerinin en yüksek ifadeleri SK-HEP-1 hücresinde görülmektedir. ZEB2 ve ETS1 ifadeleri mezenkimal fenotiple ayrılabilirken, ZEB1 transkripsiyon faktörü HepG2, Huh7 ve PLC/PRF/5 gibi epitelyal özelliğe sahip hücrelerde de görülmektedir (Şekil 5.1a). Pearson çift yönlü korelasyon katsayılarına dayanarak ZEB ailesi genleri ve ETS1 arasında önemli bir ilişki bulunurken ($*P<0.05$), ZEB2 ve ETS1 gen ifadesi arasında ilişkinin oldukça anlamlı olduğu görülmektedir ($*** P<0.001$) (Tablo 5.1).

Tablo 5. 1: HSK hücre hatlarında ZEB1, ZEB2 ve ETS1 ifadelerinin korelasyon değerleri. ($*P<0.05$, $*** P<0.001$)

Gen	ZEB1	ZEB2	ETS1
ZEB1	1		
ZEB2	0,823*	1	
ETS1	0,841*	0,990***	1

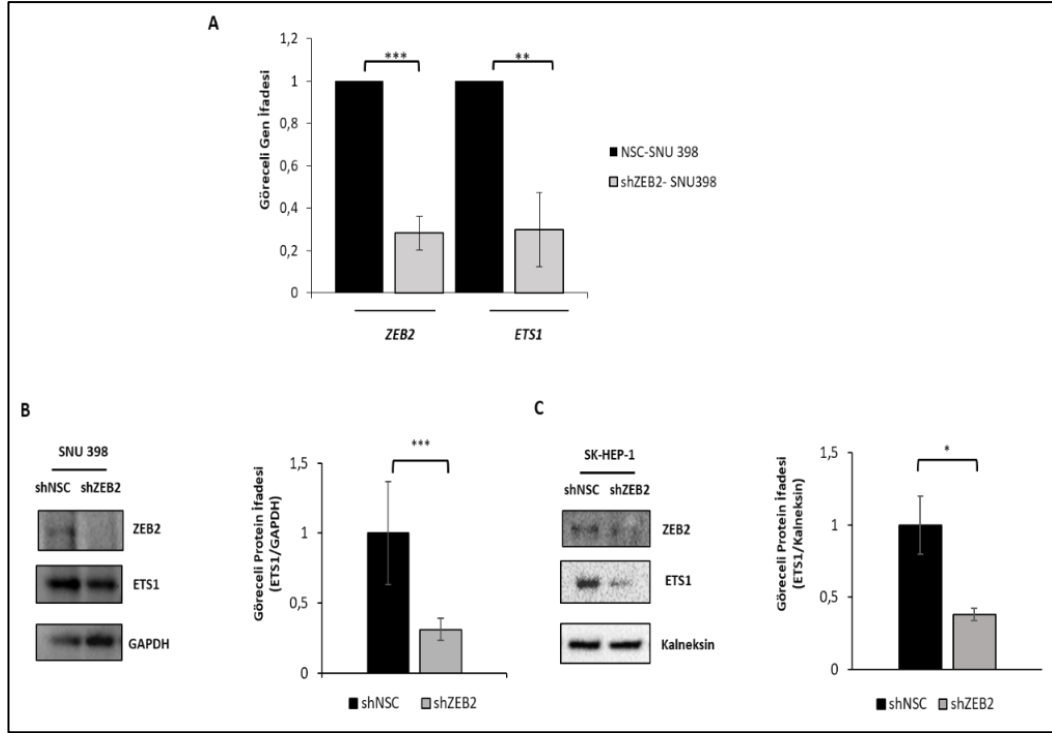
Aynı HSK hücre hatlarında ZEB2 ve ETS1 protein ifadeleri değerlendirdiğinde her iki transkripsiyon faktörünün de sadece mezenkimal fenotip gösteren hücre hatlarında iyi şekilde ifade edildiği görüldü (Şekil 5.1b). ZEB1 ifadesinin mezenkimal

hücre hatlarında güçlü ifadesinin yanı sıra gen ifadesi profilinde olduğu gibi epitelyal hücrelerde de protein düzeyinde ifade edildiği görüldü (Şekil 5.1c).



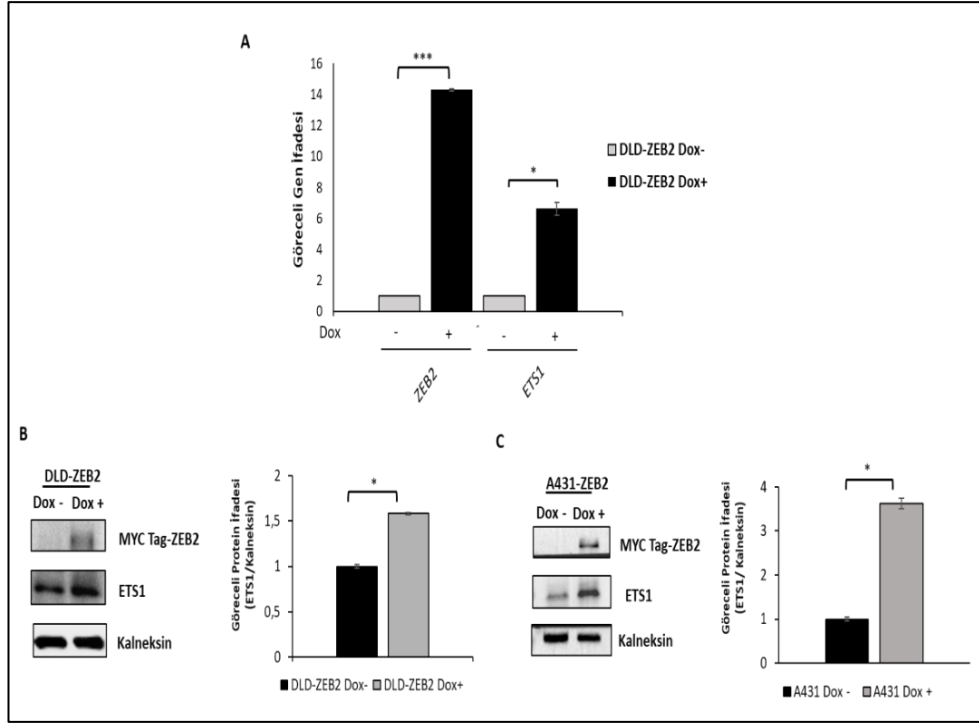
Şekil 5.1: HSK hücre hatlarında ZEB1, ZEB2 ve ETS1 ifadeleri. a) ZEB2 ve ETS1'in göreceli gen ifade seviyeleri. b) HSK hücre hatlarında ZEB2 ve ETS1'in protein ifadesi. c) HSK hücre hatlarında ZEB1 ve ETS1'in protein ifadesini.

Bu sonuçlar, ZEB2 ve ETS1 arasındaki korelasyonun, ZEB1 ve ETS1 arasındaki ilişkiden daha yakın olduğunu göstermiş ve HSK'da ETS1 ifadesinin ZEB2 bağımlı değişip değişmeme durumunu araştırmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla, daha önce yüksek endojen ZEB2 transkript ve protein seviyeleri içerdiği gösterilmiş olan SNU398 ve SK-HEP-1 hücrelerinde shZEB2 lentiviral partikülleri ile ZEB2 ifadesi baskılanmıştır [135]. shZEB2-SNU398 hücrelerinde ZEB2 ($p < 0.001$) ve ETS1 ($p < 0.01$) transkript seviyelerinde yaklaşık %70 azalma gözlemlendi (Şekil 5.2a). ETS1 proteininin ifadesi, kontrol klonuna kıyasla SNU398 hücrelerinin shZEB2 klonunda 3 kattan fazla ($P < 0.001$) azaldı (Şekil 5.2b). Benzer şekilde, ZEB2 baskılanan SK-HEP-1 hücrelerinde ETS1 protein ifadesinde 2,6 kat azalma ($P < 0.05$) tespit edildi (Şekil 5.2c).



Şekil 5.2: SNU398 ve SK-HEP-1 HSK hücre hatlarında ETS1 ifadesinin ZEB2 tarafından düzenlenmesi. a) shZEB2-SNU398 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in göreceli gen ifadesi. b) shZEB2-SNU398 ve shNSC-SNU398 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in protein seviyeleri. c) shZEB2-SK-HEP-1 ve shNSC-SK-HEP-1 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in protein seviyeleri.

ZEB2 ifadesi baskılanan hücrelerde ETS1'in ZEB2'ye bağımlı düzenlenmesi, ZEB2 ifadesinin doksisisiklin ile indüklenebildiği DLD1 ve A431 hücrelerinde ETS1 ifadesini araştırmamızı sağlamıştır. Doksisisiklin ile indüklenen DLD-ZEB2 hücrelerinin uyarılması, ZEB2 ($p < 0.001$) ve ETS1 ($p < 0.05$) transkriptlerinde sırasıyla 14,3 ve 6,6 kat artışa neden olmuştur (Şekil 5.3.a). Western blot ile protein ekspresyonunun analizi, Dox ile indüklenen DLD1 ve A431 hücrelerinde sırasıyla 1,6 kat ($P < 0,05$) ve 3,6 kat ($P < 0,05$) ETS1 proteini artışını ortaya çıkartmıştır (Şekil 5.3b-c).



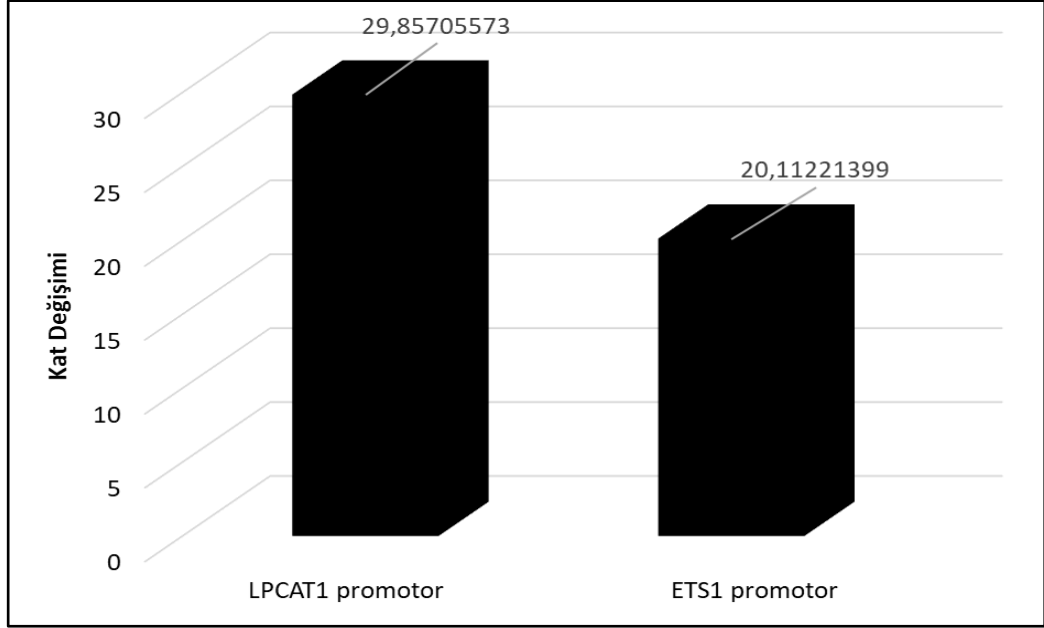
Şekil 5.3: ZEB2 ifadesi indüklenen DLD1 ve A431 hücrelerinde ETS1 ifade değişimi. a) ZEB2 ifadesi indüklenen ve indüklenmeyen DLD1 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in göreceli gen ifadesi. b) ZEB2 ifadesi indüklenenve indüklenmeyen DLD1 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in protein ekspresyonu. c) ZEB2 ifadesi indüklenenve indüklenmeyen A431 hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in protein ekspresyonu.

5.2. ZEB2 Transkripsiyon Faktörünün ETS1 Promotoruna Bağlanması

ZEB2/SIP1 transkripsiyon faktörünün ETS1 geninin promotoruna bağlanıp bağlanmadığını göstermek için kromatin immünopresipitasyon çalışması yapılmıştır. Bu yöntemle ZEB2/SIP1 antikoru ile çöktürülen genomik DNA bölgelerinde ETS1 promotor bölgesi aranmıştır. Bu nedenle, Prof. Dr. Tamer Yağcı tarafından üretilen ChIP'e uyumlu anti-ZEB2 monoklonal antikor 6E5'i kullanılarak kromatin immünopresipitasyon analizi gerçekleştirildi. Bunun için ETS1 geninin promotor bölgesinde bulunan ZEB2/SIP1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesine (GACCTG) uygun qPCR primerleri kullanılmıştır. ChIP sonucunda elde edilen immüno-çökeltiilmiş DNA fragmanları ve ETS1 promotor bölgesini hedefleyen primerler ile qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

ChIP deneyi sonucunda 6E5 antikorumun, ETS1 geninde yer alan ZEB2 bağlanma bölgelerini içeren DNA fragmanlarını inputa göre yaklaşık 20 kat zenginleştirdiği

görüldü (Şekil 5.4). Bu zenginleşme daha önceden ZEB2 hedefi olarak bilinen LPCAT1 geninin zenginleşmesi ile kıyaslandı [135].

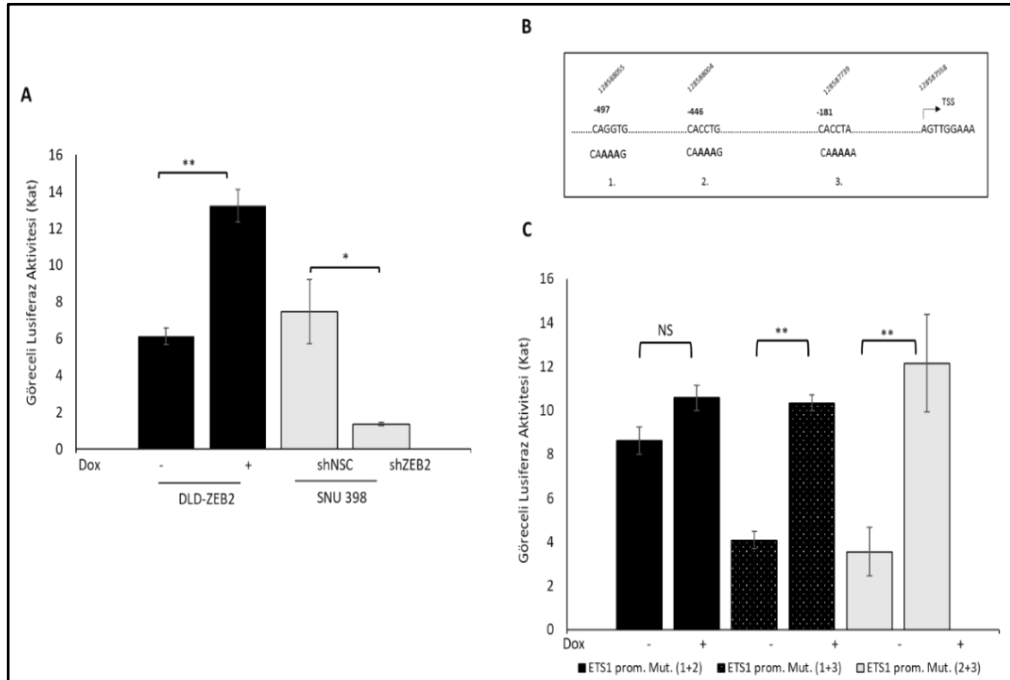


Şekil 5.4: ZEB2'nin ETS1 promotor bölgesine bağlandığını gösteren ChIP-qPCR analizi.

Ayrıca, ChIP sonuçlarını ZEB2 ifadesi indüklenebilen DLD1 ve ZEB2 ifadesi baskılanmış SNU398 hücrelerinde lusiferaz aktivitesi deneyleri ile konfirme ettik. Bu amaçla DLD1-ZEB2 ve shZEB2-SNU398 hücrelerine ETS1 promotor bölgesini içeren pGL4 plazmidini transfeke ettik. DLD-ZEB2 hücrelerinde ZEB2 indüksiyonu, ETS1 promotor-lusiferaz aktivitesinde 2 kat artışa neden oldu. Bunun yanında, ZEB2 ifadesi baskılanan shZEB2-SNU398 hücrelerinde ETS1 promotor-lusiferaz aktivitesinde yaklaşık üç kat azalma görüldü (Şekil 5.5a).

ETS1 promotor bölgesinde, transkripsiyon başlangıç kodonundan -497 (1. E-box), -446 (2. E-box) ve -181 (3. E-box) nükleotid uzaklıkta üç adet olası ZEB bağlanma bölgesi (GACCTG) bulunmaktadır. Bu bölge ile yapılan daha önceki çalışmalarda GG veya CC sekanslarında meydana gelen tek nükleotid mutasyonunun ZEB2 bağlanmasını engellediği gösterilmiştir [28, 132]. Bu nedenle, ETS1 promotorunda bulunan üç E-box bölgesinde yönlendirilmiş mutasyon tekniği ile mutasyon gerçekleştirilmiş (Şekil 5.5b), iki E-box bölgesinde aynı anda mutasyon yapılan promotor bölgelerinin lusiferaz aktivitesine DLD1-ZEB2 hücrelerinde bakılmıştır.

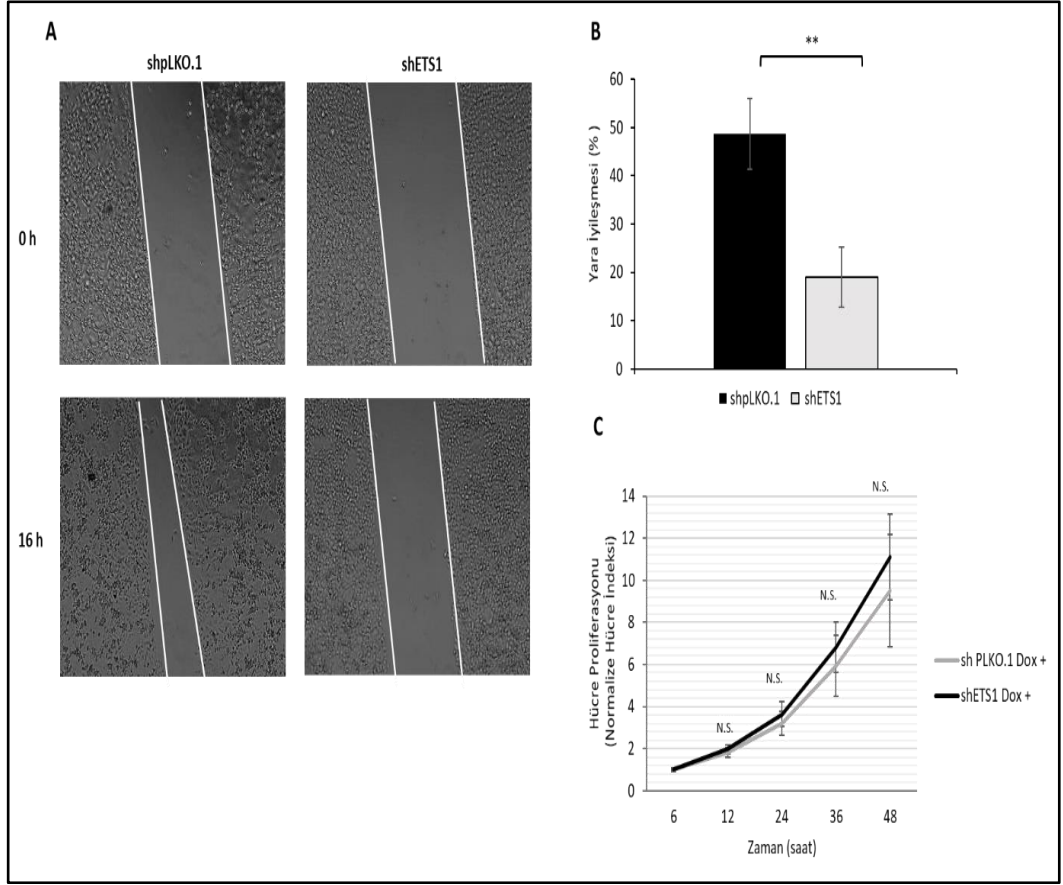
ZEB2'nin indüklendiği ve indüklenmediği şartlar kıyaslandığında yalnızca 1. ve 2. E-box bölgelerinden mutasyona uğrayan promotor bölgesinin ZEB2 bağımlı lusiferaz aktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 5.5c).



Şekil 5.5: ETS1 promotorunun lusiferaz raporör analizi ile fonksiyonel analizi. a) ETS1 promotor aktivitesi. b) ETS1 promotorunun ZEB2 bağlanma bölgelerinde gerçekleştirilen mutasyonlar, C) İkili mutasyon yapılan promotor bölgelerinin lusiferaz aktivitesi. **p<0.01

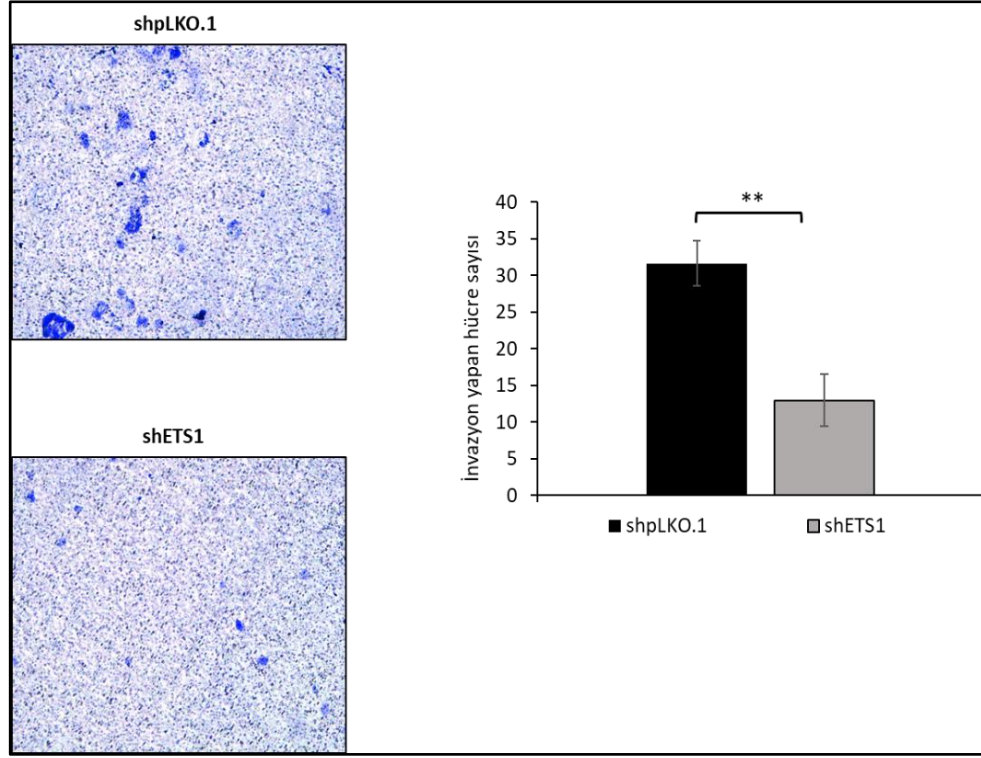
5.3. ZEB2 ile İndüklenen ETS1 Aktivitesinin Tümör Hücrelerinin Migrasyon ve İnvazyonunu Düzenlemesi

Yara iyileşme deneyi ile ETS1 varlığı ve yokluğu durumunda DLD-ZEB2 hücrelerinin göç etme yeteneği değerlendirildi. ZEB2'nin indüksiyonu, DLD1-ZEB2 hücrelerinin göçünü önemli ölçüde artırırken, aynı hücrede ETS1 aktivitesinin lentiviral shRNA aracılı baskılanması, ZEB2 ile indüklenen koşullarda yara kapanmasını önemli ölçüde inhibe etti (Şekil 5.6a-b). ETS1 ifadesi baskılanan ve ETS1 ifadesi bulunan hücrelerin proliferasyon analizlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir, bu durum ETS1'in ZEB2'nin indüklendiği DLD1 hücrelerinin göç kapasitesinin önemli bir oyuncusu olduğunu düşündürmektedir (Şekil 5.6c).



Şekil 5.6: ETS1'in ZEB2 ifadesi indüklenen hücrelerde hücre göçüne etkisi. a) ZEB2 ifadesi indüklenen DLD1-ZEB2 hücrelerinde ETS1-pozitif ve ETS1-susturulmuş koşullarda hücre göçü. b) yara iyileşme yüzdesi. ** $p < 0.01$ c) ETS1 ifadesi olan ve olmayan doksisisiklin indüklü DLD-ZEB2 hücrelerinin proliferasyonunu N.S.: Önemli değil.

Trans-well hücre invazyon analizinde, matrijelden geçen invaziv hücre sayısı, ZEB2 ile indüklenen shETS1-DLD1 hücrelerinde ETS1 ifadesi baskılanmayan hücrelere göre önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 5.7).

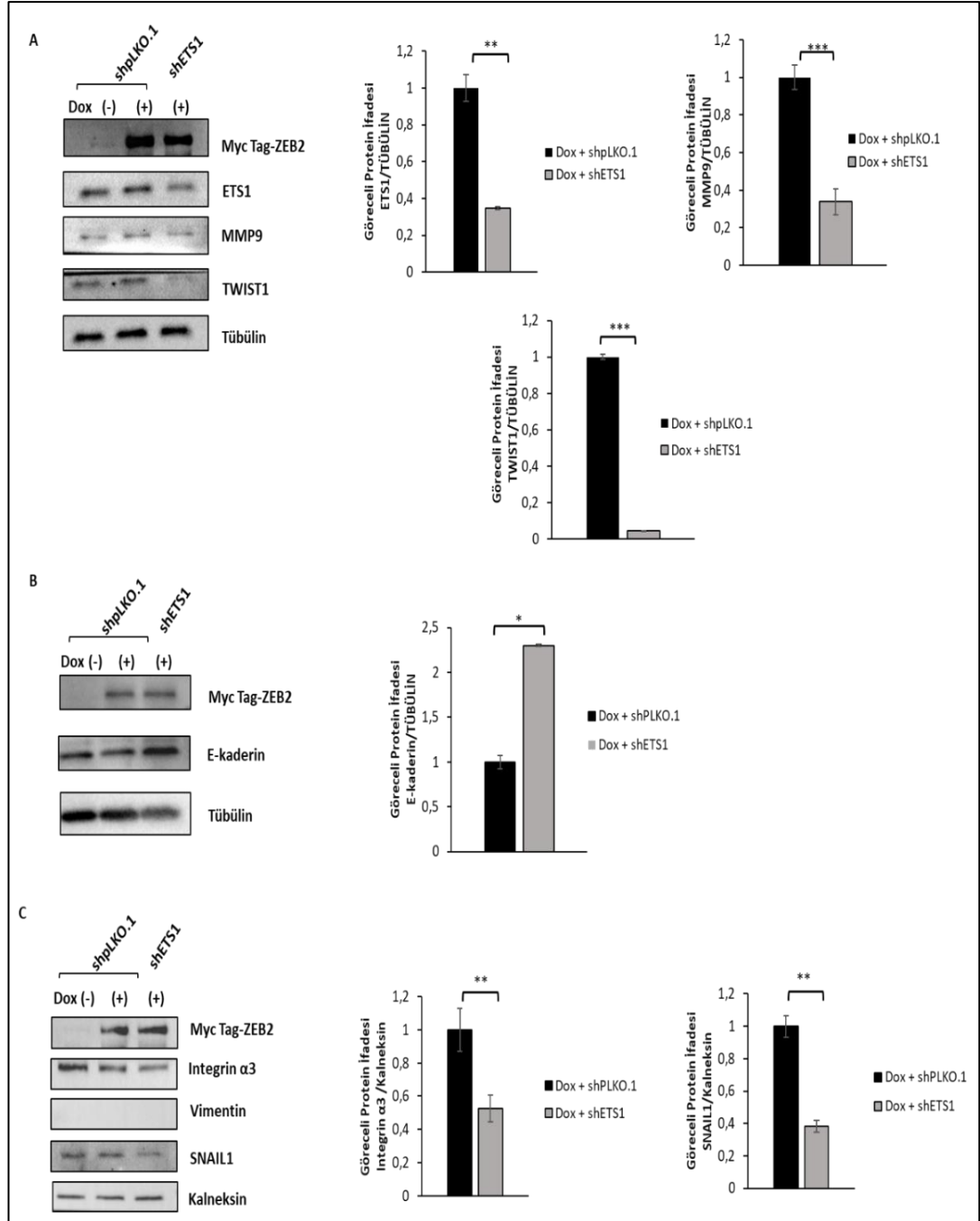


Şekil 5.7: ETS1'in ZEB2 ifadesi indüklenen hücrelerin invazyonu üzerindeki etkileri. a) ZEB2 ifadesi indüklenen shpLKO.1 DLD-ZEB2 ve shETS1 DLD-ZEB2 hücrelerinin 48. saate invazyonu. b) İnvazyon yapan hücrelerin sayısı, + SE (n=3). **p<0.01

ZEB2 ile indüklenmiş ve ETS1 baskılanmış koşullarda, daha önce rapor edilen iki ZEB2 hedefi, MMP9 ve TWIST1'in ifade profili araştırıldı [137, 138]. DLD1 hücrelerinde ZEB2'nin indüklenmesi ile hem MMP9 hem de TWIST1 protein ifadeleri artarken, aynı ZEB2-indüklenmiş hücrelerde ETS1 ifadesinin baskılanması MMP9 ve TWIST1 proteini seviyelerinde keskin bir düşüşe neden olmuştur ($P < 0.01$) (Şekil 8A). shETS1-ZEB2-DLD hücrelerinde ETS1 protein ekspresyonunun % 65 oranında azaltılması, TWIST1 ($P < 0.001$) ve MMP9 ($P < 0.001$) proteinlerinin ekspresyonunda sırasıyla, % 95 ve % 66 oranında bir azalmaya neden oldu (Şekil 8AB). Ek olarak, EMT belirteçlerinin de ZEB2 ifadesinin indüklendiği DLD1 hücrelerinde ETS1 ifadesinin baskılanması durumundan etkilendiğini gösterdik. E-Kaderin protein ifadesi, ZEB2 ifadesi indüklenen shETS1-DLD1 hücrelerinde shpLKO.1-DLD1 hücrelerine kıyasla 2,3 kat ($P < 0.05$) arttı (Şekil 8B). Daha önce DLD1 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, SNAIL1 ifadesinin, E-Kaderin'in görünür bir şekilde baskılanması ile birlikte N-kaderin, fibronektin ve vimentin ekspresyonunda bir artış olmadan istilacı özelliklerin kazanılmasıyla sonuçlandığını göstermiştir [139]. Buna paralel olarak, ZEB2'nin indüklendiği DLD1

hücrelerinde vimentin ekspresyonunu tespit edemedik ve bu hücrelerde ETS1 yıkımına yanıt olarak EMT regülatörü SNAIL1 ve bir mezenkimal belirteç olan integrin $\alpha 3$ ifadelerinin azaldığını gösterdik [139, 140]. Integrin $\alpha 3$ ve SNAIL1, shPLKO.1-DLD1 hücrelerine kıyasla ZEB2 ifadesi indüklenmiş shETS1-DLD1 hücrelerinde sırasıyla 2 kat ($P < 0.01$) ve 2,6 kat ($P < 0.01$) azaldı (Şekil 8C).

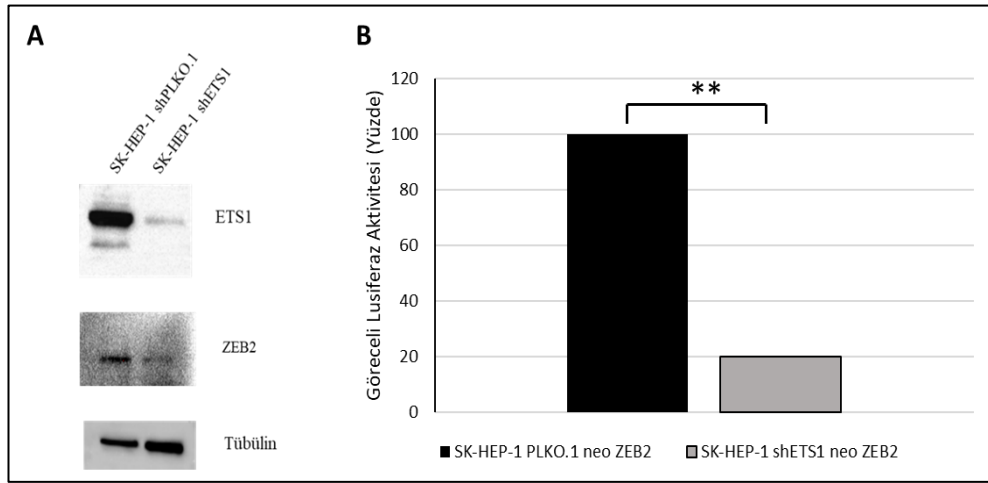
Hem MMP9 hem de TWIST1 protein ekspresyonu, DLD1 hücrelerinde ZEB2 indüksiyonu üzerine artmıştır, bununla birlikte, bu ZEB2 ile indüklenen hücrelerde ETS1 ifadesinin baskılanması MMP9 ve TWIST1 proteinlerinin seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olmuştur (Şekil 5.8). Sonuçlarımız açıkça ETS1'in ZEB2 ile indüklenen EMT fenotipinin önemli bir oyuncusu olduğunu göstermiş ve çalışmamızı ZEB2 ve ETS1'in in vivo ifadelerinin araştırılmasına yönlendirmiştir.



Şekil 5. 8: ETS1, ZEB2 ile indüklenen EMT'de MMP9, EMT regülatörleri ve EMT belirteçlerinin ifadesini düzenler. a) ZEB2 ifadesi indüklenen DLD1 hücrelerinde, MMP9 ve TWIST1 proteinlerinin ifade analizi. b) ZEB2 ifadesi indüklenen shpLKO.1 DLD-ZEB2 ve shETS1 DLD-ZEB2 hücrelerinin E-kaderin protein ifadesi. c) Aynı hücrelerin Vimentin, Integrin α3 ve SNAIL1'in protein ifadeleri. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

5.4. ZEB2 ceRNA ilişkisi

Lentiviral sistemle ETS1 ifadesi baskılanan SK-HEP-1 hücrelerinde ZEB2-ETS1 ceRNA ilişkisi araştırıldı (Şekil 5.9A). ceRNA hipotezine göre birbirinin ceRNA'sı olabilecek ortak miRNA bağlanma bölgesine sahip iki mRNA'dan birinin ifadesi baskılandığında, ortak miRNA'lara bağlı olarak diğerinin ifadesinin de baskılanması beklenmektedir. ETS1 ifadesi SK-HEP-1 hücresinde baskılandığında ZEB2 3'UTR bölgesine bağımlı lusiferaz ifadesinde baskılanma görülmüştür (Şekil 5.9B).



Şekil 5.9: ZEB2 ve ETS1 arasında ceRNA ilişkisi. A) shPLKO.1 SK-HEP-1 ve shETS1 SK-HEP-1 hücrelerinin ETS1 ve ZEB2 protein ifadeleri. b) pCI-neo-RL-ZEB2 transfekte edilen SK-HEP-1 shPLKO.1 ve SK-HEP-1 shETS1 hücrelerinin lusiferaz aktivitesi. ** P <0.01

5.5. İnsan Tümörlerinde ZEB2 ve ETS1 İfadeleri Pozitif Korelasyon Gösterir

İlk olarak insan tümörlerinin cDNA panelinde ZEB2 ve ETS1'in göreceli ifadesi RT-qPCR ile incelendi. Kontrol dokuları ile karşılaştırıldığında hem ZEB2 hem de ETS1 ifadelerinin meme kanserinde belirgin şekilde yüksek ifade edildiği, akciğer ve tiroid kanserlerinde ise düşük şekilde ifade edildiği gözlenmiştir.

Kolon ve karaciğer tümörlerinde ise her iki genin ifadesinin de orta derecede azaldığı, böbrek, yumurtalık ve prostat kanserlerinde ise ZEB2 ve ETS1'in ifadelerinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5.2). Korelasyon analizleri, her bir tümör tipi için ZEB2 ve ETS1 ifadeleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya çıkartmıştır;

bunların meme, akciğer ve yumurtalık tümörlerinden elde edilen veriler anlamlıdır (Supplement Şekil 1). Bu sınırlı sayıda tümör örneğinden elde edilen sonuçlar, ZEB2 ve ETS1'in birlikte ifade edildiği hücre hatlarındaki ilk gözlemimizi doğrular niteliktedir, ayrıca İnsan Protein Atlası veritabanındaki TCGA veri kümesinde yer alan ZEB2 ve ETS1 ifadeleri kullanılarak korelasyon analizi genişletildi. Hasta sayısı ve kanser tip ve alt tipleri Supplement Tablo 1'de verildi. Toplam 7932 örnekte 17 farklı kanser tipinin analizinde hasta sayısı ve kanser tip ve alt tiplerine bakıldı. Tüm kanserlerde ZEB2 ve ETS1 arasında anlamlı derecede pozitif korelasyon bulundu. Karaciğer kanseri en yüksek ($r = 0.84$) iken gliomalar en düşük ($r = 0,38$) pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 5.3)

Tablo 5.2: İnsan Tümörlerinin cDNA dizinlerinde *ZEB2* ve *ETS1*'in gen ifadeleri ve korelasyon analizleri.

Kanser Tipi	N	Gen	$\Delta\Delta Ct$ Ortalama	Korelasyon Katsayısı r
Meme	9	ZEB2	0.70	0,84*
		ETS1	2,6	
Kolorektal	9	ZEB2	-0.90	0,36
		ETS1	-1,06	
Böbrek	9	ZEB2	0.10	0,67
		ETS1	-0,7	
Over	9	ZEB2	-2.63	0,7*
		ETS1	-0,02	
Akciğer	9	ZEB2	-3.10	0,77*
		ETS1	-3,2	
Prostat	9	ZEB2	-0.54	0,18
		ETS1	0,2	
Karaciğer	9	ZEB2	-1.10	0,29
		ETS1	-0,47	
Tiroid	9	ZEB2	-2.6	0,65
		ETS1	-0,9	

ZEB2 ve ETS1 için ortalama göreceli gen ifadesi değerleri, tümörlerin ortalama Ct değerleri, her kanser tipinde 3 normal dokudaki ortalama Ct değerlerine kalibre

edilerek hesaplandı. Gen ekspresyonu verileri ACTNB1'e normalize edildi. Korelasyon katsayısı r , Pearson korelasyon testi kullanılarak hesaplandı. * $P < 0.05$

Tablo 5.3: İnsan Tümörlerinde ZEB2 ve ETS1 TCGA RNA dizileme verilerinin analizi.

Kanser Tipi	N	ZEB2'nin FPKM ortalaması	ETS1'in FPKM ortalaması	r	P-Değeri
Meme	1075	1,827	15,75	0,62	7,1592E-116
Gliyom	153	6,1	9,831	0,38	1,64022E-06
Tiroid	501	0,9802	18,67	0,65	8,69341E-61
Akciğer	994	1,857	14,2	0,67	1,0685E-123
Karaciğer	365	0,5699	5,836	0,84	4,43979E-98
Pankreas	176	2,249	19,3	0,62	7,71965E-20
Baş ve Boyun	499	1,052	14,11	0,60	4,59267E-51
Mide	354	2,109	15,6	0,68	2,49246E-49
Kolorektal	597	0,9608	8,738	0,65	2,28392E-74
Ürotelyal	406	0,9303	13,2	0,50	7,12812E-28
Böbrek	877	3,789	30,96	0,74	9,78819E-15
Prostat	494	1,063	6,903	0,63	6,04093E-56
Testis	134	1,828	11,32	0,57	9,99377E-13
Servikal	291	0,6629	8,996	0,44	6,07821E-15
Ovaryum	373	0,9088	4,372	0,70	1,16804E-55
Endometriyal	541	0,7	6,509	0,50	1,39291E-35
Melanoma	102	6,209	24,32	0,59	7,35726E-11

N , kanser türleri başına numune sayısını gösterir. ZEB2 ve ETS1 için ortalama FPKM değerleri verilmiştir. ZEB2 ve ETS1 ifadeleri arasındaki korelasyon katsayısı r değerleri, ZEB2 ve ETS1'in örnek-tabanlı yeniden düzenlenmiş FPKM (sample-based rearranged FPKM) değerleri ile hesaplanır.

6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Epitelyal kökenli malign tümörleri olan hastalarda kansere bağlı ölümler metastatik hastalıktan kaynaklanmaktadır [141]. EMT, gelişim sırasında hücrelerin göçünü düzenleyen ve yetişkinlerde kanser metastazı ve doku onarımı sırasında aktive olan embriyonik bir programdır [142]. EMT, kanser hücresinin istila ve metastaz yapmasına izin veren E-kaderin ifadesinin baskılanması ile karakterize edilmektedir [143]. Kompleks bir ağ yolu ve transkripsiyon faktörleri, tümörlerin metastatik yayılmasını başlatmak için hücresel yapışıklıkları ve sıkı bağlantıları azaltır [30, 144, 145]. EMT-indükleyici bu transkripsiyon faktörlerinden, ZEB2'nin, tümörlerin invazyon ve metastazına aracılık ettiği ve hastalığın progresyonu ve kötü prognozla ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [146-148]

ETS1, ETS domaini bulunduran transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. İnsan tümörlerinde aşırı ifade edilen ve invaziv ve zayıf prognozla ilişkili olan başka bir transkripsiyon faktörüdür [111, 149-151].

Çalışmamızda, ZEB2 ve ETS1 arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmak için, ilk önce HSK hücre hatlarında ETS1 transkripsiyon faktörünün ifade paternini mRNA ifadesi ve protein ifadesi düzeyinde analiz ettik, analiz sonucunda mezenkimal fenotip gösteren az farklılaşmış HSK hücrelerinde ZEB2 ile birlikte ko-ekspresyon gösterdiğini bulduk. Bu sonuç, az farklılaşmış HSK hastalarında ETS1 ifade oranının arttığını gösteren daha önce gerçekleştirilen bir çalışma ile uyumluluk göstermektedir [112]. HSK hücre hatlarında yaptığımız ifade çalışmaları da ZEB2 ve ETS1 arasında da pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya çıkardı. Bu korelasyon, ZEB2 ifadesi indüklenen hücrelerde ETS1 ifadesinde görülen artma ve ZEB2 ifadesi baskılanan hücrelerde ETS1 ifadesinde görülen azalma ile doğrulanmıştır. ZEB2'nin ETS1 ile ilişkisi ilk olarak Miyoshi ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [55]. HSK hücrelerinde ZEB2 ve SNAIL'in birlikte MMP'lerin ifadelerini arttırarak hücrelerin invaziv kapasitesini birlikte arttırdıklarını göstermişlerdir. Bununla birlikte, MMP'lerin promoter bölgelerinin ZEB2 ve SNAIL için bağlanma bölgesi olan kanonik E-box CACCTG bölgesinden yoksun olduklarını fark etmişlerdir. Bu gözlemlere uygun olarak, MMP'lerin promotorunda AP1 ve ETS için bağlanma bölgelerinin gösterildiği ve bu

transkripsiyon faktörleri ile MMP'lerin regülasyonunun gerçekleştiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır [129, 130]. Daha sonra, Taki ve arkadaşları skuamöz karsinom hücrelerinde ZEB2 ve ETS1 arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir [131]. Hem ZEB2 hem de SNAIL'in, ETS1'in ifadesini indüklediğini ve bunun da MMP2'nin aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Ancak, ZEB2'nin düzenleyici bölgeyle fiziksel olarak etkileşerek doğrudan ETS1'i düzenleyip düzenlemediği henüz araştırılmamıştır. Çalışmamızda, ETS1 promotor bölgesinde bulunan ZEB2 bağlanma alanlarını açıkça tanımladık ve ZEB2'nin ETS1'in aktivitesini doğrudan ETS1 promotoruna bağlanarak düzenlediğini kromatin immünopresipitasyon çalışması ve lusiferaz raportör analizleri ile gösterdik. ETS1 gen düzenleyici bölgesinde üç adet ZEB2 bağlanma motifinin bulunduğunu belirledik ve bu bağlanma motiflerini içeren ETS1 promotor bölgesini lusiferaz raportör plazmidine klonladık. ZEB2 ifadesi indüklenen DLD1 hücrelerine bu raportör plazmidini transfekte ettik, ZEB2 ifadesinin arttığı durumda ETS1 promotorunun klonlandığı raportör plazmidinin lusiferaz aktivitesinde artış görüldü. ZEB2 transkripsiyon faktörünün bağlandığı motiflerde mutasyonlar gerçekleştirildiğinde 1. ve 2. motiflerdeki mutasyon sonucunda lusiferaz sinyalinde anlamlı bir artış gözlemlenmedi. Bu durumda 1. ve 2. E-box bölgelerinin ZEB2 proteinin bağlandığı bölgeler olduğu anlaşıldı. Ayrıca, mutasyon içermeyen ETS1 promotoru klonlanan raportör plazmid shZEB2-SNU398 hücrelerine transfekte edildiğinde, ZEB2 ifadesi baskılanan bu hücre klonunda ETS1 promotor aktivitesinde önemli bir düşüş tespit edildi. Bu sonuçlar, ZEB2'nin ETS1'in transkripsiyon regülatörü olarak davrandığını göstermektedir. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada TGF- β ile indüklenen EMT'de, ETS1'in ZEB1 ve ZEB2 ifadesini düzenlediği önerilmiştir [128].

Bulgularımız birlikte ele alındığında, ZEB2 ve ETS1 arasındaki pozitif geri besleme döngüsünün, TGF- β varlığında EMT'nin sürdürülmesi için güvenceli bir mekanizma oluşturduğu çıkarımı yapılabilmektedir. Taki ve arkadaşlarının SCC hücrelerinde EMT'yi indüklemek için ETS1'in doğrudan bir rolü olduğunu tespit edememişlerdir [131]. Ancak çalışmamızda, ZEB2 ile indüklenen kolorektal karsinoma DLD1 hücrelerinde ETS1'in EMT fenotipini korumak için gerekli olduğunu hem mekanik hem de fonksiyonel olarak göstermiş olduk. Fonksiyonel olarak, gerçekleştirilen yara iyileşmesi ve trans-well invazyon deneyleri ile ETS1 ifadesinin baskılanmasının ZEB2-DLD hücrelerinin göç ve invazyon yeteneklerini önemli ölçüde

azalttığı görülmüştür. Mekanik olarak, ETS1 ifadesinin baskılanması, ZEB2'nin neden olduğu MMP9 ve TWIST1 protein seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Tümör hücrelerinin invazyonu ve yayılması için MMP aracılı hücre dışı matriks bozunması gereklidir [152]. MMP9, MMP ailesinin başlıca aktörleri arasındadır ve kanser hücrelerinin invazivliği ve agresifliği ile ilişkilidir [153, 154].

MMP9 ifadesinin ZEB2 tarafından düzenlendiği daha önce mide kanserinde gösterilmiştir [137]. Verilerimiz, ZEB2 kaynaklı MMP9 aşırı ifadesinin ETS1 ifadesi gerektirdiğini açıkça göstermektedir. ETS1 aracılı MMP9 ifadesi daha önce farklı sinyal yollarında tanımlanmıştır. Yumurtalık kanser hücrelerinde, damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), ETS1 ifadesini indükleyerek MMP9'un ifadesini arttırmıştır [155]. Daha sonra Gao ve arkadaşları kolon kanser hücrelerinde MMP9 ifadesinin, $\beta 6$ integrin ile indüklenen ERK-ETS1 yoluyla oluştuğunu bulmuştur [156]. TWIST1, EMT'nin ana düzenleyicilerinden biridir ve E-kaderin'i promotorunda bulunan E-box kutusuna bağlanarak baskılar [157]. Ek olarak, kök hücre özelliği gösteren insan meme epitelyal hücrelerinde EMT'nin TWIST1 ile indüklendiği gösterilmiştir [158]. Oral hücre skuamöz hücreli karsinomda TWIST1 ve ZEB2'nin birlikte ifadesi gözlenmiş ve bu durumun zayıf sağkalımla ilişkili olduğu belirtilmiştir [159].

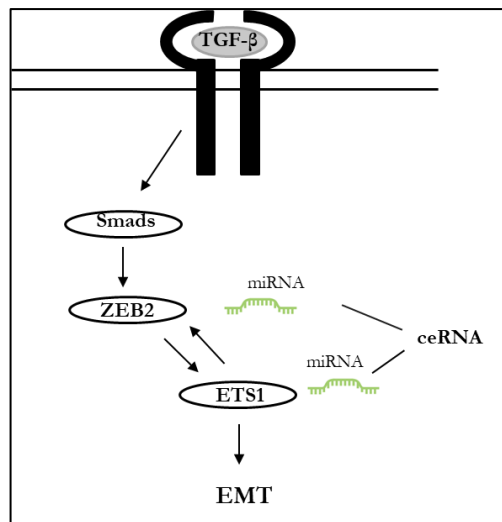
Son günlerde, ZEB2'in insan kolorektal kanserinde metastaz ve prognozda rolünün çalışıldığı bir çalışmada TWIST1 ifadesinin ZEB2'e bağımlı olduğu gösterilmiştir [138].

İnsan akciğer tümörlerinde ve fare akciğer kanseri modelinde TWIST1'in ETS1 tarafından doğrudan transaktivasyonu bildirilmiştir [160]. Tüm bu bilgilerin yanı sıra çalışmamız, ZEB2'nin indüklediği TWIST1 ifadesinde ETS1'in rolüne dair kanıt sağlayan ilk çalışmadır. ZEB2'nin indüklendiği koşullarda ETS1'in susturulması, sadece TWIST1 ve MMP9 ifadelerini baskılamakla kalmadı, aynı zamanda mezenkimal fenotiple ilişkili SNAIL1 ve İntegrin $\alpha 3$ 'ün ifadelerinin azalmasına ve epitel fenotip ile ilişkili E-kaderin ifadesinin artmasına neden olmuştur. Dahası hem in vitro hem de in vivo olarak kanser hücrelerinde ZEB2 ve ETS1'in birlikte ifade edildiklerini ve pozitif korelasyon gösterdiğini bulduğumuz çalışmamız ile ZEB2 ile indüklenen EMT'de ETS1'in önemi ortaya konmuştur.

ZEB2 ve ETS1 gen ifadesi arasında anlamlı bir korelasyonun görülmesi ZEB2 ve ETS1 mRNA'larının birbirlerinin yarışmacı endojen RNA'sı olabileceğini

düşündürmüştür. ceRDB (competitive endogenous mRNA database) veritabanına göre ZEB2 ve ETS1 mRNA'larının ortak 10 tane miRNA bağlanma bölgesine sahip olduğu bulunmuştur. Ortak miRNA bağlanma bölgelerinin bulunması ve ifadelerinin hepatoselüler karsinoma hücrelerinde anlamlı korelasyon göstermesi nedeniyle ZEB2-ETS1 ceRNA ilişkisi araştırılmıştır. Lentiviral sistemle ETS1 ifadesi baskılanan SK-HEP-1 hücrelerinde ZEB2 ifadesinin baskılanması, bu durumun ortak miRNA'lardan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. ceRNA hipotezine göre, ETS1 mRNA'sının ifadesinin azaltıldığı durumda, ortak miRNA havuzunda çok sayıda miRNA serbest kalmaktadır. Serbest kalan miRNA'lar, ZEB2 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanacak ve böylece ZEB2 mRNA'sı için daha yüksek seviyede baskılama söz konusu olacaktır. ETS1 ifadesi baskılanan SK-HEP-1 hücrelerinde ZEB2 mRNA'sının 3'UTR'sinin lusiferaz aktivitesinde azalma görülmüştür. ZEB2 3'UTR'sindeki bu baskılamanın ETS1 ifadesinin azalmasına bağlı olarak serbest kalan ortak miRNA'lardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız ZEB2'nin ETS1'in düzenleyicisi olarak davrandığını, kanser hücrelerinde ETS1'in ZEB2 ile indüklenen EMT fenotipi için gerekli olduğunu göstermiştir. Mekanik olarak, ZEB2'nin MMP9 ve TWIST1'i ETS1 aracılığıyla düzenlediğini gösterdik. Bu bulgular, ZEB2 ile indüklenen EMT'nin anlaşılmasına başka bir karmaşıklık düzeyi ekleyerek ZEB2 ve ETS1'i birlikte ifade eden kanserlerde ZEB2-ETS1 eksenini terapötik bir hedef olarak sunmaktadır.



Şekil 6.1: TGF-β transkripsiyon ağında ZEB2-ETS1 ilişkisi

KAYNAKLAR

- [1] Gupta G. P., Massagué J., (2006), "Cancer metastasis: building a framework", *Cell*, 127 (4), 679-695.
- [2] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A., (2018), "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: a cancer journal for clinicians*.
- [3] Perz J. F., Armstrong G. L., Farrington L. A., Hutin Y. J., Bell B. P., (2006), "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide", *Journal of hepatology*, 45 (4), 529-538.
- [4] Mazzanti R., Arena U., Tassi R., (2016), "Hepatocellular carcinoma: Where are we?", *World journal of experimental medicine*, 6 (1), 21.
- [5] Lee J. G., Kang C. M., Park J. S., Kim K. S., Yoon D. S., Choi J. S., Lee W. J., Kim B. R., (2006), "The actual five-year survival rate of hepatocellular carcinoma patients after curative resection", *Yonsei medical journal*, 47 (1), 105-112.
- [6] Forner A., Reig M. E., de Lope C. R., Bruix J., (2010). "Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects", *Seminars in liver disease*, 061-074.
- [7] Ghanaati H., Alavian S. M., Jafarian A., Daryani N. E., Nassiri-Toosi M., Jalali A. H., Shakiba M., (2012), "Imaging and imaging-guided interventions in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma (HCC)-review of evidence", *Iranian Journal of Radiology*, 9 (4), 167.
- [8] Llovet J. M., Di Bisceglie A. M., Bruix J., Kramer B. S., Lencioni R., Zhu A. X., Sherman M., Schwartz M., Lotze M., Talwalkar J., (2008), "Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma", *Journal of the National Cancer Institute*, 100 (10), 698-711.
- [9] Kudo M., (2018), "Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Latest Advances", *Cancers*, 10 (11), 412.
- [10] Zhao L.-J., Wang L., Ren H., Cao J., Li L., Ke J.-S., Qi Z.-T., (2005), "Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors", *Experimental cell research*, 305 (1), 23-32.
- [11] Nagai H., Kim Y. S., Konishi N., Baba M., Kubota T., Yoshimura A., Emi M., (2002), "Combined hypermethylation and chromosome loss associated with

inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas", *Cancer letters*, 186 (1), 59-65.

- [12] Luo W., Zhu X., Liu W., Ren Y., Bei C., Qin L., Miao X., Tang F., Tang G., Tan S., (2016), "MYC associated zinc finger protein promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial mesenchymal transition", *Oncotarget*, 7 (52), 86420.
- [13] Ito Y., Miyoshi E., Takeda T., Sakon M., Noda K., Tsujimoto M., Monden M., Taniguchi N., Matsuura N., (2000), "Expression and possible role of ets-1 in hepatocellular carcinoma", *American journal of clinical pathology*, 114 (5), 719-725.
- [14] Zhang G., Wang Q., Xu R., (2010), "Therapeutics based on microRNA: a new approach for liver cancer", *Current genomics*, 11 (5), 311-325.
- [15] Thiery J. P., (2002), "Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression", *Nature Reviews Cancer*, 2 (6), 442.
- [16] Lee K., Nelson C. M. (2012), "New insights into the regulation of epithelial–mesenchymal transition and tissue fibrosis". "International review of cell and molecular biology", Elsevier.
- [17] Moustakas A., Heldin C.-H., (2005), "Non-Smad TGF- β signals", *J Cell Sci*, 118 (16), 3573-3584.
- [18] Kalluri R., Neilson E. G., (2003), "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis", *The Journal of clinical investigation*, 112 (12), 1776-1784.
- [19] Peinado H., Olmeda D., Cano A., (2007), "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?", *Nature Reviews Cancer*, 7 (6), 415.
- [20] del Barrio M. G., Nieto M. A., (2002), "Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation", *Development*, 129 (7), 1583-1593.
- [21] Barrallo-Gimeno A., Nieto M. A., (2005), "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer", *Development*, 132 (14), 3151-3161.
- [22] Boutet A., De Frutos C. A., Maxwell P. H., Mayol M. J., Romero J., Nieto M. A., (2006), "Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney", *The EMBO journal*, 25 (23), 5603-5613.

- [23] Scarpa M., Grillo A. R., Brun P., Macchi V., Stefani A., Signori S., Buda A., Fabris P., Giordani M. T., De Caro R., (2010), "Snail1 transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury", *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300 (2), G316-G326.
- [24] Lee K., Gjorevski N., Boghaert E., Radisky D. C., Nelson C. M., (2011), "Snail1, Snail2, and E47 promote mammary epithelial branching morphogenesis", *The EMBO journal*, 30 (13), 2662-2674.
- [25] Liu J., Uygur B., Zhang Z., Shao L., Romero D., Vary C., Ding Q., Wu W. S., (2010), "Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression", *The Prostate*, 70 (16), 1768-1777.
- [26] Vega S., Morales A. V., Ocaña O. H., Valdés F., Fabregat I., Nieto M. A., (2004), "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death", *Genes & development*, 18 (10), 1131-1143.
- [27] Vandewalle C., Van Roy F., Berx G., (2009), "The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease", *Cellular and molecular life sciences*, 66 (5), 773-787.
- [28] Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., Van Roy F., (2001), "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion", *Molecular cell*, 7 (6), 1267-1278.
- [29] Eger A., Aigner K., Sonderegger S., Dampier B., Oehler S., Schreiber M., Berx G., Cano A., Beug H., Foisner R., (2005), "DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells", *Oncogene*, 24 (14), 2375.
- [30] Vandewalle C., Comijn J., De Craene B., Vermassen P., Bruyneel E., Andersen H., Tulchinsky E., Van Roy F., Berx G., (2005), "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell–cell junctions", *Nucleic acids research*, 33 (20), 6566-6578.
- [31] Yu W., Kamara H., Svoboda K. K., (2008), "The role of twist during palate development", *Developmental Dynamics*, 237 (10), 2716-2725.
- [32] Chen Z.-F., Behringer R. R., (1995), "twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis", *Genes & development*, 9 (6), 686-699.
- [33] Kida Y., Asahina K., Teraoka H., Gitelman I., Sato T., (2007), "Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55 (7), 661-673.

- [34] Yang J., Mani S. A., Donaher J. L., Ramaswamy S., Itzykson R. A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R. A., (2004), "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis", *cell*, 117 (7), 927-939.
- [35] Eckert M. A., Lwin T. M., Chang A. T., Kim J., Danis E., Ohno-Machado L., Yang J., (2011), "Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis", *Cancer cell*, 19 (3), 372-386.
- [36] Cheng G. Z., Chan J., Wang Q., Zhang W., Sun C. D., Wang L.-H., (2007), "Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel", *Cancer research*, 67 (5), 1979-1987.
- [37] Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R. A., (2007), "Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer", *Nature*, 449 (7163), 682.
- [38] Slattery C., McMorrow T., Ryan M. P., (2006), "Overexpression of E2A proteins induces epithelial–mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells suggesting a potential role in renal fibrosis", *FEBS letters*, 580 (17), 4021-4030.
- [39] Pérez-Moreno M. A., Locascio A., Rodrigo I., Dhondt G., Portillo F., Nieto M. A., Cano A., (2001), "A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions", *Journal of Biological Chemistry*.
- [40] Kume T., Deng K., Hogan B., (2000), "Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract", *Development*, 127 (7), 1387-1395.
- [41] Mani S. A., Yang J., Brooks M., Schwaninger G., Zhou A., Miura N., Kutok J. L., Hartwell K., Richardson A. L., Weinberg R. A., (2007), "Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (24), 10069-10074.
- [42] Grabitz A. L., Duncan M. K., (2012), "Focus on molecules: Smad interacting protein 1 (Sip1, ZEB2, ZFH1B)", *Experimental eye research*, 101, 105.
- [43] Funahashi J.-i., Sekido R., Murai K., Kamachi Y., Kondoh H., (1993), "Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis", *Development*, 119 (2), 433-446.

- [44] Verschueren K., Remacle J. E., Collart C., Kraft H., Baker B. S., Tylzanowski P., Nelles L., Wuytens G., Su M.-T., Bodmer R., (1999), "SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes", *Journal of Biological Chemistry*, 274 (29), 20489-20498.
- [45] Postigo A. A., Dean D. C., (1999), "ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (12), 6683-6688.
- [46] Postigo A. A., (2003), "Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF β /BMP signaling pathway", *The EMBO journal*, 22 (10), 2443-2452.
- [47] Mejlvang J., Kriajevska M., Vandewalle C., Chernova T., Sayan A. E., Berx G., Mellon J. K., Tulchinsky E., (2007), "Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition", *Molecular biology of the cell*, 18 (11), 4615-4624.
- [48] Lin S.-Y., Elledge S. J., (2003), "Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase", *Cell*, 113 (7), 881-889.
- [49] Bracken C. P., Gregory P. A., Kolesnikoff N., Bert A. G., Wang J., Shannon M. F., Goodall G. J., (2008), "A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition", *Cancer research*, 68 (19), 7846-7854.
- [50] Tylzanowski P., Verschueren K., Huylebroeck D., Luyten F. P., (2001), "Smad-interacting protein 1 is a repressor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (43), 40001-40007.
- [51] 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", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (31), 12919-12924.
- [52] Gregory P. A., Bracken C. P., Bert A. G., Goodall G. J., (2008), "MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition", *Cell cycle*, 7 (20), 3112-3117.
- [53] van Grunsven L. A., Michiels C., Van de Putte T., Nelles L., Wuytens G., Verschueren K., Huylebroeck D., (2003), "Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin", *Journal of Biological Chemistry*, 278 (28), 26135-26145.

- [54] Bindels S., Mestdagt M., Vandewalle C., Jacobs N., Volders L., Noël A., Van Roy F., Berx G., Foidart J.-M., Gilles C., (2006), "Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells", *Oncogene*, 25 (36), 4975.
- [55] Miyoshi A., Kitajima Y., Sumi K., Sato K., Hagiwara A., Koga Y., Miyazaki K., (2004), "Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells", *British journal of cancer*, 90 (6), 1265.
- [56] Walker J. L., Assoian R. K., (2005), "Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression", *Cancer and Metastasis Reviews*, 24 (3), 383-393.
- [57] Cong Y.-S., Wright W. E., Shay J. W., (2002), "Human telomerase and its regulation", *Microbiology and molecular biology reviews*, 66 (3), 407-425.
- [58] Ozturk N., Erdal E., Mumcuoglu M., Akcali K. C., Yalcin O., Senturk S., Arslan-Ergul A., Gur B., Yulug I., Cetin-Atalay R., (2006), "Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (7), 2178-2183.
- [59] Beltran M., Puig I., Peña C., García J. M., Álvarez A. B., Peña R., Bonilla F., de Herreros A. G., (2008), "A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial–mesenchymal transition", *Genes & development*, 22 (6), 756-769.
- [60] Rodenhiser D. I., Andrews J., Kennette W., Sadikovic B., Mendlowitz A., Tuck A. B., Chambers A. F., (2008), "Epigenetic mapping and functional analysis in a breast cancer metastasis model using whole-genome promoter tiling microarrays", *Breast cancer research*, 10 (4), R62.
- [61] Li A., Omura N., Hong S.-M., Vincent A., Walter K., Griffith M., Borges M., Goggins M., (2010), "Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels", *Cancer research*, 0008-5472. CAN-0009-4227.
- [62] Ladeiro Y., Couchy G., Balabaud C., Bioulac-Sage P., Pelletier L., Rebouissou S., Zucman-Rossi J., (2008), "MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations", *Hepatology*, 47 (6), 1955-1963.
- [63] Acun T., Oztas E., Yagci T., Yakicier M. C., (2011), "SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation", *BMC cancer*, 11 (1), 223.
- [64] Bartel D. P., (2009), "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions", *Cell*, 136 (2), 215-233.

- [65] Thomas M., Lieberman J., Lal A., (2010), "Desperately seeking microRNA targets", *Nature structural & molecular biology*, 17 (10), 1169.
- [66] Garzon R., Calin G. A., Croce C. M., (2009), "MicroRNAs in Cancer", *Annual Review of Medicine*, 60 (1), 167-179.
- [67] Lu M., Zhang Q., Deng M., Miao J., Guo Y., Gao W., Cui Q., (2008), "An analysis of human microRNA and disease associations", *PloS one*, 3 (10), e3420.
- [68] Salmena L., Poliseno L., Tay Y., Kats L., Pandolfi P. P., (2011), "A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?", *Cell*, 146 (3), 353-358.
- [69] Panzitt K., Tschernatsch M. M., Guelly C., Moustafa T., Stradner M., Strohmaier H. M., Buck C. R., Denk H., Schroeder R., Trauner M., (2007), "Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA", *Gastroenterology*, 132 (1), 330-342.
- [70] Wang J., Liu X., Wu H., Ni P., Gu Z., Qiao Y., Chen N., Sun F., Fan Q., (2010), "CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer", *Nucleic acids research*, 38 (16), 5366-5383.
- [71] Hollander M. C., Blumenthal G. M., Dennis P. A., (2011), "PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models", *Nature Reviews Cancer*, 11 (4), 289.
- [72] Alimonti A., Carracedo A., Clohessy J. G., Trotman L. C., Nardella C., Egia A., Salmena L., Sampieri K., Haveman W. J., Brogi E., (2010), "Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility", *Nature genetics*, 42 (5), 454.
- [73] Trotman L. C., Niki M., Dotan Z. A., Koutcher J. A., Di Cristofano A., Xiao A., Khoo A. S., Roy-Burman P., Greenberg N. M., Van Dyke T., (2003), "Pten dose dictates cancer progression in the prostate", *PLoS biology*, 1 (3), e59.
- [74] Huse J. T., Brennan C., Hambardzumyan D., Wee B., Pena J., Rouhanifard S. H., Sohn-Lee C., le Sage C., Agami R., Tuschl T., (2009), "The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo", *Genes & development*, 23 (11), 1327-1337.
- [75] Poliseno L., Salmena L., Riccardi L., Fornari A., Song M. S., Hobbs R. M., Sportoletti P., Varmeh S., Egia A., Fedele G., (2010), "Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation", *Science signaling*, 3 (117), ra29-ra29.

- [76] Tay Y., Kats L., Salmena L., Weiss D., Tan S. M., Ala U., Karreth F., Poliseno L., Provero P., Di Cunto F., (2011), "Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs", *Cell*, 147 (2), 344-357.
- [77] Karreth F. A., Tay Y., Perna D., Ala U., Tan S. M., Rust A. G., DeNicola G., Webster K. A., Weiss D., Perez-Mancera P. A., (2011), "In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma", *Cell*, 147 (2), 382-395.
- [78] Seth A., Watson D. K., (2005), "ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer", *European journal of cancer*, 41 (16), 2462-2478.
- [79] Kar A., Gutierrez-Hartmann A., (2013), "Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48 (6), 522-543.
- [80] Nunn M. F., Seeburg P. H., Moscovici C., Duesberg P. H., (1983), "Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene", *Nature*, 306 (5941), 391.
- [81] Leprince D., Gégonne A., Coll J., De Taisne C., Schneeberger A., Lagrou C., Stehelin D., (1983), "A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26", *Nature*, 306 (5941), 395.
- [82] Watson D. K., McWilliams-Smith M. J., Nunn M., Duesberg P., O'Brien S. J., Papas T. S., (1985), "The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (21), 7294-7298.
- [83] Wang C., Kam R. K. T., Shi W., Xia Y., Chen X., Cao Y., Sun J., Du Y., Lu G., Chen Z., (2015), "The proto-oncogene transcription factor Ets1 regulates neural crest development through Histone Deacetylase 1 to mediate output of bone morphogenetic protein signaling", *Journal of Biological Chemistry*, jbc. M115. 644864.
- [84] Laudet V., HaËnni C., St  helin D., Dut  rque-Coquillaud M., (1999), "Molecular phylogeny of the ETS gene family", *Oncogene*, 18 (6), 1351.
- [85] Wasylyk C., Kerckaert J., Wasylyk B., (1992), "A novel modulator domain of Ets transcription factors", *Genes & development*, 6 (6), 965-974.
- [86] Laitem C., Leprivier G., Choul-Li S., Begue A., Monte D., Larsimont D., Dumont P., Dut  rque-Coquillaud M., Aumercier M., (2009), "Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51", *Oncogene*, 28 (20), 2087.

- [87] Gegonne A., Punyammalee B., Rabault B., Bosselut R., Seneca S., Crabeel M., Ghysdael J., (1992), "Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein", *The New biologist*, 4 (5), 512-519.
- [88] Jorcyk C. L., Watson D., Mavrothalassitis G., Papas T., (1991), "The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing", *Oncogene*, 6 (4), 523-532.
- [89] Chen J., Jeha S., Oka T., (1993), "Negative regulatory elements in the human ETS1 gene promoter", *Oncogene*, 8 (1), 133-139.
- [90] Iotsova V., Crepieux P., Montpellier C., Laudet V., Stehelin D., (1996), "TATA-less promoters of some Ets-family genes are efficiently repressed by wild-type p53", *Oncogene*, 13 (11), 2331-2337.
- [91] Majérus M.-A., Bibollet-Ruche F., Telliez J.-B., Wasylyk B., Bailleul B., (1992), "Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter", *Nucleic acids research*, 20 (11), 2699-2703.
- [92] Seth A., Papas T., (1990), "The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated", *Oncogene*, 5 (12), 1761-1767.
- [93] Ozaki I., Zhao G., Mizuta T., Ogawa Y., Hara T., Kajihara S., Hisatomi A., Sakai T., Yamamoto K., (2002), "Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase-1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line", *Journal of hepatology*, 36 (2), 169-178.
- [94] Ozaki I., Mizuta T., Zhao G., Zhang H., Yoshimura T., Kawazoe S., Eguchi Y., Yasutake T., Hisatomi A., Sakai T., (2003), "Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1", *Hepatology research*, 27 (4), 289-301.
- [95] Tomita N., Morishita R., Taniyama Y., Koike H., Aoki M., Shimizu H., Matsumoto K., Nakamura T., Kaneda Y., Ogiwara T., (2003), "Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1", *Circulation*, 107 (10), 1411-1417.
- [96] Koh S. A., Lee K. H., Choi E. Y., Kim M. K., Jang B. I., Kim S. W., Kim S. W., Song S. K., Kim J. R., Hepatocyte growth factor-mediated gastrin-releasing peptide induces IL-8 expression through Ets-1 in gastric cancer cells, in: (Ed.)[^](Eds.), AACR, 2013, pp.
- [97] Fafeur V., Tulasne D., Queva C., Vercamer C., Dimster V., Mattot V., Stéhelin D., Desbiens X., Vandenbunder B., (1997), "The ETS1 transcription factor is

expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells", *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8 (6), 655-665.

- [98] Hahne J. C., Okuducu A. F., Fuchs T., Florin A., Wernert N., (2011), "Identification of ETS-1 target genes in human fibroblasts", *International journal of oncology*, 38 (6), 1645-1652.
- [99] Watanabe D., Takagi H., Suzuma K., Suzuma I., Oh H., Ohashi H., Kemmochi S., Uemura A., Ojima T., Suganami E., (2004), "Transcription factor Ets-1 mediates ischemia-and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization", *The American journal of pathology*, 164 (5), 1827-1835.
- [100] Lavenburg K. R., Ivey J., Hsu T., Muise-Helmericks R. C., (2003), "Coordinated functions of Akt/PKB and ETS1 in tubule formation", *The FASEB journal*, 17 (15), 2278-2280.
- [101] Phuchareon J., McCormick F., Eisele D. W., Tetsu O., (2015), "EGFR inhibition evokes innate drug resistance in lung cancer cells by preventing Akt activity and thus inactivating Ets-1 function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (29), E3855-E3863.
- [102] Oikawa M., Abe M., Kurosawa H., Hida W., Shirato K., Sato Y., (2001), "Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1", *Biochemical and biophysical research communications*, 289 (1), 39-43.
- [103] Fiorito V., Neri F., Pala V., Silengo L., Oliviero S., Altruda F., Tolosano E., (2014), "Hypoxia controls Flvcr1 gene expression in Caco2 cells through HIF2 α and ETS1", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839 (4), 259-264.
- [104] Maroulakou I. G., Bowe D. B., (2000), "Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network", *Oncogene*, 19 (55), 6432.
- [105] Sementchenko V. I., Watson D. K., (2000), "Ets target genes: past, present and future", *Oncogene*, 19 (55), 6533.
- [106] Wakiya K., Begue A., Stehelin D., Shibuya M., (1996), "A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene", *Journal of Biological Chemistry*, 271 (48), 30823-30828.
- [107] Dittmer J., (2015). "The role of the transcription factor Ets1 in carcinoma", *Seminars in cancer biology*, 20-38.

- [108] Tsutsumi S., Kuwano H., Asao T., Nagashima K., Shimura T., Mochiki E., (2000), "Expression of ets-1 angiogenesis-related protein in gastric cancer", *Cancer letters*, 160 (1), 45-50.
- [109] Ito T., Nakayama T., Ito M., Naito S., Kanematsu T., Sekine I., (1998), "Expression of the ets-1 proto-oncogene in human pancreatic carcinoma", *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11 (2), 209-215.
- [110] Ito Y., Miyoshi E., Takeda T., Sakon M., Tsujimoto M., Yokosaki Y., Monden M., Matsuura N., (2000), "ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma", *Oncology*, 58 (3), 248-252.
- [111] Nakayama T., Ito M., Ohtsuru A., Naito S., Sekine I., (2001), "Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma", *Modern Pathology*, 14 (5), 415.
- [112] Kanda K., Nakayama T., Onizuka S., Tomioka T., Kanematsu T., (2002), "Expression of the Ets-1 proto-oncogene is linked to cell differentiation of human hepatocellular carcinoma", *Hepato-gastroenterology*, 49 (45), 747-751.
- [113] Saeki H., Kuwano H., Kawaguchi H., Ohno S., Sugimachi K., (2000), "Expression of ets-1 transcription factor is correlated with penetrating tumor progression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus", *Cancer*, 89 (8), 1670-1676.
- [114] Pande P., Mathur M., Shukla N., Ralhan R., (1999), "Ets-1: a plausible marker of invasive potential and lymph node metastasis in human oral squamous cell carcinomas", *The Journal of pathology*, 189 (1), 40-45.
- [115] Sasaki H., Yukiue H., Moiriyama S., Kobayashi Y., Nakashima Y., Kaji M., Kiriya M., Fukai I., Yamakawa Y., Fujii Y., (2001), "Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer", *Journal of Surgical Research*, 101 (2), 242-247.
- [116] de Nigris F., Mega T., Berger N., Barone M. V., Santoro M., Viglietto G., Verde P., Fusco A., (2001), "Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation", *Cancer research*, 61 (5), 2267-2275.
- [117] Davidson B., Risberg B., Goldberg I., Nesland J. M., Berner A., Tropé C. G., Kristensen G. B., Bryne M., Reich R., (2001), "Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome", *The American journal of surgical pathology*, 25 (12), 1493-1500.
- [118] Kitange G., Tsunoda K., Anda T., Nakamura S., Yasunaga A., Naito S., Shibata S., (2000), "Immunohistochemical expression of Ets-1 transcription factor and

the urokinase-type plasminogen activator is correlated with the malignant and invasive potential in meningiomas", *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 89 (11), 2292-2300.

- [119] Kitange G., Kishikawa M., Nakayama T., Naito S., Iseki M., Shibata S., (1999), "Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors", *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12 (6), 618-626.
- [120] Naito S., Shimizu K., Nakashima M., Nakayama T., Ito T., Ito M., Yamashita S., Sekine I., (2000), "Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin", *Pathology-Research and Practice*, 196 (2), 103-109.
- [121] Keehn C. A., Smoller B. R., Morgan M. B., (2003), "Expression of the ets-1 proto-oncogene in melanocytic lesions", *Modern Pathology*, 16 (8), 772.
- [122] Zhang Y., Yan L.-X., Wu Q.-N., Du Z.-M., Chen J., Liao D.-Z., Huang M.-Y., Hou J.-H., Wu Q.-L., Zeng M.-s., (2011), "miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer", *Cancer research*, canres. 2435.2010.
- [123] Puzovic V., Brcic I., Ranogajec I., Jakic-Razumovic J., (2014), "Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients", *Neoplasma*, 61 (4), 439-446.
- [124] Hahne J. C., Okuducu A. F., Kaminski A., Florin A., Soncin F., Wernert N., (2005), "Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth", *Oncogene*, 24 (34), 5384.
- [125] Li C., Wang Z., Chen Y., Zhou M., Zhang H., Chen R., Shi F., Wang C., Rui Z., (2015), "Transcriptional silencing of ETS-1 abrogates epithelial-mesenchymal transition resulting in reduced motility of pancreatic cancer cells", *Oncology reports*, 33 (2), 559-565.
- [126] Kubic J. D., Little E. C., Lui J. W., Iizuka T., Lang D., (2015), "PAX3 and ETS1 synergistically activate MET expression in melanoma cells", *Oncogene*, 34 (38), 4964.
- [127] Chan Y. C., Khanna S., Roy S., Sen C. K., (2011), "miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells", *Journal of Biological Chemistry*, 286 (3), 2047-2056.
- [128] Shirakihara T., Saitoh M., Miyazono K., (2007), "Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β ", *Molecular biology of the cell*, 18 (9), 3533-3544.

- [129] Westermarck J., KÄhÄri V.-m., (1999), "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion", *The FASEB journal*, 13 (8), 781-792.
- [130] Singh S., Barrett J., Sakata K., Tozer R. G., Singh G., (2002), "ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis", *Current drug targets*, 3 (5), 359-367.
- [131] Taki M., Verschueren K., Yokoyama K., Nagayama M., Kamata N., (2006), "Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells", *International journal of oncology*, 28 (2), 487-496.
- [132] 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: δ EF1 family members bind with two hands to two target sites", *The EMBO journal*, 18 (18), 5073-5084.
- [133] Avci M. E., Konu O., Yagci T., (2008), "Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression", *BMC cancer*, 8 (1), 392.
- [134] Yuzugullu H., Benhaj K., Ozturk N., Senturk S., Celik E., Toylu A., Tasdemir N., Yilmaz M., Erdal E., Akcali K. C., (2009), "Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells", *Molecular cancer*, 8 (1), 90.
- [135] Balcik-Ercin P., Cetin M., Yalim-Camci I., Odabas G., Tokay N., Sayan A. E., Yagci T., (2018), "Genome-wide analysis of endogenously expressed ZEB2 binding sites reveals inverse correlations between ZEB2 and GalNAc-transferase GALNT3 in human tumors", *Cellular Oncology*, 1-15.
- [136] Fuchs B. C., Fujii T., Dorfman J. D., Goodwin J. M., Zhu A. X., Lanuti M., Tanabe K. K., (2008), "Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells", *Cancer research*, 68 (7), 2391-2399.
- [137] Dai Y.-H., Tang Y.-P., Zhu H.-Y., Lv L., Chu Y., Zhou Y.-Q., Huo J.-R., (2012), "ZEB2 promotes the metastasis of gastric cancer and modulates epithelial mesenchymal transition of gastric cancer cells", *Digestive diseases and sciences*, 57 (5), 1253-1260.
- [138] Li M.-Z., Wang J.-J., Yang S.-B., Li W.-F., Xiao L.-B., He Y.-L., Song X.-M., (2017), "ZEB2 promotes tumor metastasis and correlates with poor prognosis of human colorectal cancer", *American journal of translational research*, 9 (6), 2838.

- [139] Shirakihara T., Kawasaki T., Fukagawa A., Semba K., Sakai R., Miyazono K., Miyazawa K., Saitoh M., (2013), "Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial–mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes", *Cancer science*, 104 (9), 1189-1197.
- [140] Tanaka S., Kobayashi W., Haraguchi M., Ishihata K., Nakamura N., Ozawa M., (2016), "Snail1 expression in human colon cancer DLD-1 cells confers invasive properties without N-cadherin expression", *Biochemistry and biophysics reports*, 8, 120-126.
- [141] Chaffer C. L., Weinberg R. A., (2011), "A perspective on cancer cell metastasis", *Science*, 331 (6024), 1559-1564.
- [142] Kalluri R., Weinberg R. A., (2010), "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *The Journal of clinical investigation*, 120 (5), 1786-1786.
- [143] Onder T. T., Gupta P. B., Mani S. A., Yang J., Lander E. S., Weinberg R. A., (2008), "Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways", *Cancer research*, 68 (10), 3645-3654.
- [144] Baquero P., Jiménez-Mora E., Santos A., Lasa M., Chiloeches A., (2016), "TGF β induces epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer cells by both the BRAF/MEK/ERK and Src/FAK pathways", *Molecular carcinogenesis*, 55 (11), 1639-1654.
- [145] Thorpe H., Asiri A., Akhlaq M., Ilyas M., (2017), "Cten promotes epithelial-mesenchymal transition through the post-transcriptional stabilization of Snail", *Molecular carcinogenesis*, 56 (12), 2601-2609.
- [146] Sayan A. E., Griffiths T. R., Pal R., Browne G. J., Ruddick A., Yagci T., Edwards R., Mayer N. J., Qazi H., Goyal S., (2009), "SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (35), 14884-14889.
- [147] Elloul S., Elstrand M. B., Nesland J. M., Tropé C. G., Kvalheim G., Goldberg I., Reich R., Davidson B., (2005), "Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma", *Cancer*, 103 (8), 1631-1643.
- [148] Kahlert C., Lahes S., Radhakrishnan P., Dutta S., Mogler C., Herpel E., Brand K., Steinert G., Schneider M., Mollenhauer M., (2011), "Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro", *Clinical cancer research*.
- [149] Nakayama T., Ito M., Ohtsuru A., Naito S., Nakashima M., Fagin J. A., Yamashita S., Sekine I., (1996), "Expression of the Ets-1 proto-oncogene in

human gastric carcinoma: correlation with tumor invasion", *The American journal of pathology*, 149 (6), 1931.

- [150] Takai N., Miyazaki T., Fujisawa K., Nasu K., Miyakawa I., (2000), "Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma", *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 89 (10), 2059-2067.
- [151] Yamaguchi E., Nakayama T., Nanashima A., Matsumoto K., Yasutake T., Sekine I., Nagayasu T., (2007), "Ets-1 proto-oncogene as a potential predictor for poor prognosis of lung adenocarcinoma", *The Tohoku journal of experimental medicine*, 213 (1), 41-50.
- [152] Stetler-Stevenson W., (2001), "The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis", *Surgical oncology clinics of North America*, 10 (2), 383-392, x.
- [153] Allott E. H., Lysaght J., Cathcart M. C., Donohoe C. L., Cummins R., McGarrigle S. A., Kay E., Reynolds J. V., Pidgeon G. P., (2013), "MMP9 expression in oesophageal adenocarcinoma is upregulated with visceral obesity and is associated with poor tumour differentiation", *Molecular carcinogenesis*, 52 (2), 144-154.
- [154] Niu H., Li F., Wang Q., Ye Z., Chen Q., Lin Y., (2018), "High expression level of MMP9 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal carcinoma", *PeerJ*, 6, e5050.
- [155] Ghosh S., Basu M., Roy S. S., (2012), "ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3", *Journal of Biological Chemistry*, 287 (18), 15001-15015.
- [156] Gao H., Peng C., Liang B., Shahbaz M., Liu S., Wang B., Sun Q., Niu Z., Niu W., Liu E., (2014), "β6 integrin induces the expression of metalloproteinase-3 and metalloproteinase-9 in colon cancer cells via ERK-ETS1 pathway", *Cancer letters*, 354 (2), 427-437.
- [157] Kang Y., Massagué J., (2004), "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis", *Cell*, 118 (3), 277-279.
- [158] Mani S. A., Guo W., Liao M.-J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., (2008), "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells", *Cell*, 133 (4), 704-715.
- [159] Kong Y. H., Zangaruddin S. N. S., Lau S. H., Ramanathan A., Kallarakkal T. G., Vincent-Chong V. K., Mustafa W. M. W., Abraham M. T., Rahman Z. A. A., Zain

- R. B., (2015), "Co-expression of TWIST1 and ZEB2 in oral squamous cell carcinoma is associated with poor survival", PloS one, 10 (7), e0134045.
- [160] Millien G., Cao Y., O'Hara C. J., Tagne J.-B., Hinds A., Williams M. C., Ramirez M. I., Kathuria H., (2018), "ETS1 regulates Twist1 transcription in a Kras G12D/Lkb1^{-/-} metastatic lung tumor model of non-small cell lung cancer", Clinical & experimental metastasis, 1-17.

ÖZGEÇMİŞ

İrem Yalım Camcı, 29 Ağustos 1984'te Bursa'da doğdu. 2002 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2006 yılında birincilikle tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitime başladı. 2010 yılında yüksek lisans derecesini alan İrem Yalım Camcı, aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Doktora eğitime başladı. 2011 yılından bu yana Gebze Teknik Üniversitesi bünyesinde bulunan Moleküler Onkoloji Laboratuvarında çalışmalarını sürdürmektedir.

EKLER

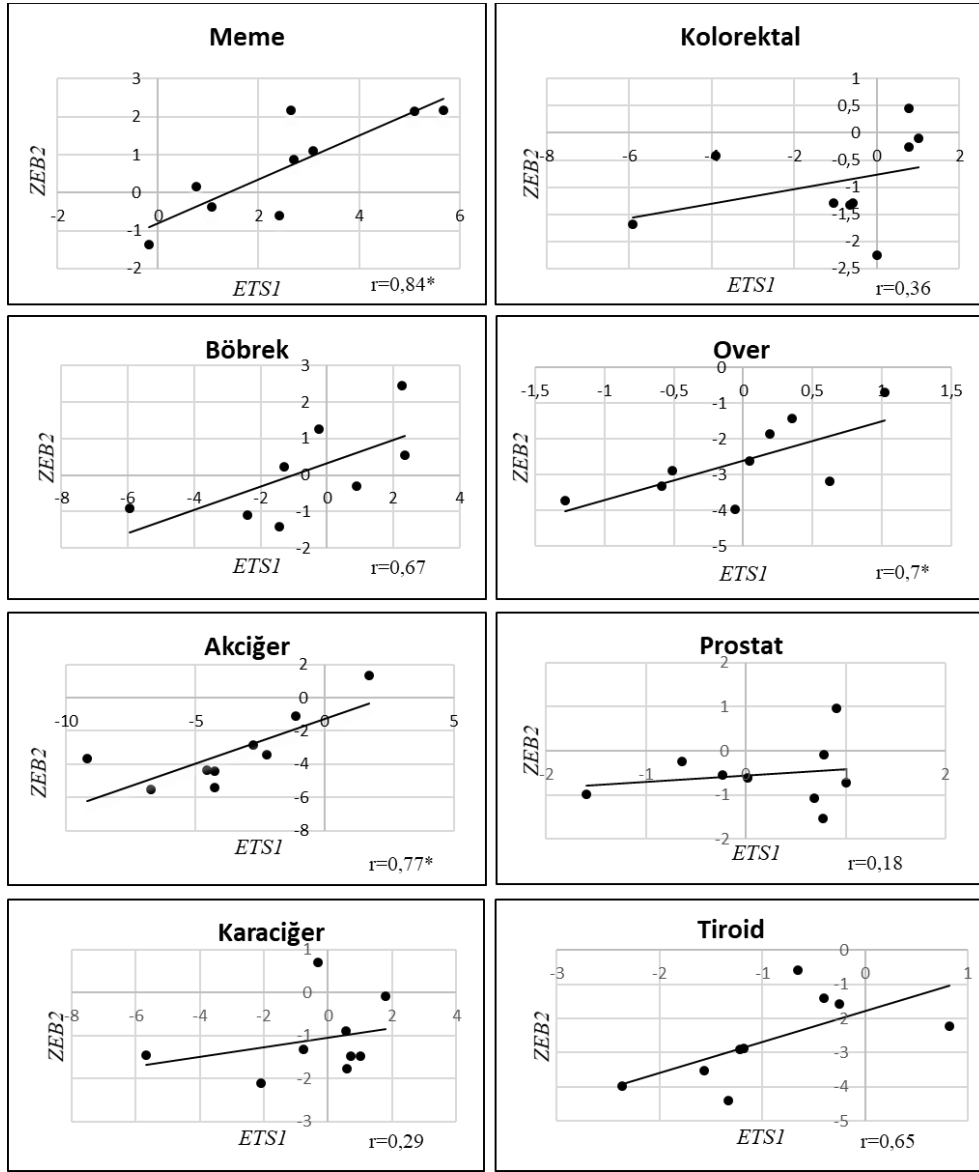
EK-A : Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Yalim-Camci, I., Balcik-Ercin, P., Cetin, M., Odabas, G., Tokay, N., Sayan, A. E., & Yagci, T. (2019). ETS1 is Co-Expressed with ZEB2 and Mediates ZEB2-induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Tumors. *Molecular carcinogenesis*, 58(6):1068-1081.

Irem Yalim-Camci, Metin Cetin, Pelin Balcık-Ercin, Gorkem Odabas and Tamer Yagci (2018), 'Epitel-Mezenkim Geçiş Programında ZEB2 ve ETS1'in Karşılıklı Düzenlenmesi', 2. Çukurova Hepatoselüler Karsinoma Kongresi, Adana, 23-25 Şubat (*Sözlü Sunum*)

Irem Yalim-Camci, Metin Cetin, Pelin Balcık-Ercin, Gorkem Odabas and Tamer Yagci (2017), 'Reciprocal Regulation of ZEB2 and ETS1 in Human Tumors', 5. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi, 8-10 Eylül (*Poster Sunumu*)

EK-B İnsan Kanseri cDNA Dizinlerinde ZEB2 ve ETS1 Transkriptleri Arasındaki Korelasyon



Şekil B1.1: İnsan kanseri cDNA dizinlerinde ZEB2 ve ETS1 transkriptleri arasındaki korelasyon. Normal dokularla kalibre edilmiş ve ACTNB1'e normalize edilmiş tümör numunelerinde ZEB2 ve ETS1'in göreceli gen ifadesi değerleri, noktalar ile temsil edilir ve Pearson Korelasyon testine tabi tutulur. Çizgiler, belirtilen kanser tipi için ZEB2 ve ETS1 korelasyonunu temsil eder; Grafiklerde r değerleri verilmiştir. * P < 0.05.

EK-C TCGA veritabanında bulunan kanser tipleri ve örnek sayıları

Tablo C1.1: TCGA veritabanında bulunan kanser tipleri ve örnek sayıları.

HPA kanser tipi	TCGA kanser	TCGA'daki örnek sayısı
Meme Kanseri	Meme İnvaziv Karsinomu (BRCA)	1075
Rahim ağzı kanseri	Servikal Skuamöz Hücreli Karsinom ve Endoservikal Adenokarsinom (CESC)	291
Kolorektal Kanser	Kolon Adenokarsinomu (COAD)	438
	Rektum Adenokarsinom (READ)	159
Endometriyal kanser	Uterin Korpus Endometrial Karsinomu (UCEC)	541
Gliyom	Glioblastoma Multiform (GBM)	153
Baş ve boyun kanseri	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomu (HNSC)	499
Karaciğer kanseri	Karaciğer Hepatoselüler Karsinomu (LIHC)	365
Akciğer kanseri	Akciğer Adenokarsinomu (LUAD)	500
	Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinomu (LUSC)	494
Melanom	Deri Kutanöz Melanom (SKCM)	102
Yumurtalık kanseri	Over Seröz Kistadenokarsinom (OV)	373
Pankreas kanseri	Pankreas Adenokarsinomu (PAAD)	176
Prostat kanseri	Prostat Adenokarsinomu (PRAD)	494
Böbrek kanseri	Böbrek Chromophobe (KICH)	64
	Böbrek Renal Berrak Hücreli Karsinom (KIRC)	528
	Böbrek Renal Papiller Hücreli Karsinom (KIRP)	285
Mide kanseri	Mide Adenokarsinomu (STAD)	354
Testis kanseri	Testis Germ Hücre Tümörü (TGCT)	134
Tiroid kanseri	Tiroid Karsinomu (THCA)	501
Ürotelyal kanser	Mesane Ürotelyal Karsinomu (BLCA)	406

“İnsan Protein Atlası” veritabanında analiz edilen kanser türleri ve TCGA tarafından RNA-Seq verilerinin sağlandığı kanser histolojik alt tipleri sırasıyla birinci ve ikinci sütunda verilmiştir. Her bir kanser alt tipi için örnek sayısı son sütunda verilmiştir.

EK D. Telif Haklı Şekillerin İzinleri

Tablo D1.1: Telif hakkı tablosu.

ŞEKİL NO	LİSANS TARİHİ	LİSANS NO	TELİF HAKKI SAHİBİ
Şekil 2.1., 2.2.	11 NİSAN,2019	4565810033432	Academic Press
Şekil 2.3.	11 NİSAN,2019	4565811465395	Springer International Publishing
Şekil 2.4., 2.5.	9 MAYIS,19	4584750530910	Elsevier
Şekil 2.6., 2.7.	11 NİSAN,2019	4565811153763	Elsevier
Şekil 2.8.	-	-	Springer Nature
Şekil 2.9.	-	-	The Japan Academy

EK-E. Yönlendirilmiş Mutasyon Çalışmalarının Dizi Analizi Sonuçları

	AGTTGAGTCATTACCAGTAGTCAGACATTTCCTGGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCT
ets1	-----
2. sdm	CGCTAGCCTCGAGCCAAGTCCATATCCAGTCAGCTCTCTCCACAAAATTATTTTCITTT
ets1	----- ccaagtccatattccagtccagctctcttccacaaaattattttctttt *****
2. sdm	CTTTAGAAAATATCATTTCATATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAAGCCTGAGCAGG
ets1	----- ctttagaaaaatcacatttcatatcaagttattagagagaaaaggaagcctgagcagg *****
2. sdm	TGACTGGGIGGTGGACGTCCTGTGTTTCTAAAGCAATCCCTTTCCTCAAGAGACCTT
ets1	----- tgactgggtggtggagctccgtgttttctaaagcaatccctttccctcaagagacctt *****
2. sdm	GCCTAGGTTAATGGGGCTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACA
ets1	----- gcctaggtttaattggggctccattgagaaagtcaaggaacatgaagcatgaatatttaca *****
2. sdm	TATTCAGCAGAGAGTAATATGCATCAGCAATGATGAGTGAGATACAGTGTTATCCCACT
ets1	----- tattcagcagagagtaaatgcatcagcaatgatgagtgagatacagtgttatcccaact *****
2. sdm	GAACTAGTTCCTTTTGTCTATCTCCCTCCCTGTTACTTCCAAAGGCTGAGTTATATTCA
ets1	----- gaactagtcccttttgtctatctccctccctgttacttccaaaggctgagttatattca *****
2. sdm	GCTGAAGCACAATTTGAAGAATACGAAATAAIGTGTGATTGGTGCCACCAGTGTCAATC
ets1	----- gctgaagcacaaatttgaagaatacgaataataatgtgtattgtgcccaccagtgtcaatc *****
2. sdm	AACAGTGCTTTCCACCTAGACTGCTGTGCTGTGCCAGTGGCTGCTGCTGGTGCCAGG
ets1	----- aacagtgcctttccacctagactgctgtgcctgtgccagtggctgctgctggtgccagg *****
2. sdm	GGCAAGAGGAAGACTGCCTTTTTCAGCTTTCCTGGCTTGACCACACCCCAATTTA
ets1	----- ggcaagaggaagactgcctttttccagctttccctggcttgaccacaccccccaattta *****
2. sdm	AGGAGAAGCTTGGCAATCCGGTACTGTGGTAAAGCCACCATGGAAGATGCCAAAAACAT
ets1	----- aggagaagcttggcaatccggtaactgtggtaaagccaccatggaagatgccaaaaacat *****

Şekil E1.1: İkinci E box bölgesinde gerçekleştirilen yönlendirilmiş mutasyon.


```

ets1      -----ccaa
2+3      TAGCTCAGACATTCTCTGGCCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGAGGCCAA
*****

ets1      gtccatatccagtcagctctcttccacaaaattattttcttttctttagaaaaatcacaca
2+3      GTCCATATCCAGTCAGCTCTCTTCCACAAAATTATTTCTTTTCTTTAGAAAATATCACAC
*****

ets1      ttccatatcaagttattagagagaaacgggaagcctgagcaggtgactgggtggtgagc
2+3      TTTCATATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAAGCCTGAGCAGGTGACTGGGTGTTGAGCG
*****

ets1      tcctgtgtttctaaagcaatccctttccctca 33 gagaccttgacctaggttaaatgggg
2+3      TCCTGTGTTCTAAAGCAATCCCTTTCCCTCA 33 GAGACCTTSCCTAGGTTAATGGGG
*****

ets1      ctccattgagaaagtcagggaacatgaagcatgaatatttacatattcagcagagagtaa
2+3      CTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACATATTCAGCAGAGAGTAA
*****

ets1      atgcatcagcaaatgatgaggtgagatacagtgattatccactgaactagtctccctttt
2+3      ATGCATCAGCAAAATGATGAGGTGAGATACAGTGTTATCCACTGAAGTACTGCTCCCTTTT
*****

ets1      ctcatctccctccctgttactctccaagctgagttatattcagctgaagcacaaatttga
2+3      CTCATCTCCCTCCCTGTTACTCTCCAAGCTGAGTTATATTACAGCTGAAGCACAAATTTGA
*****

ets1      agaatacgaataatgtgtgatttgggtgccaccactgtcaatcaacagtgctttcca 33
2+3      AGAATACGAAATAATGTGTGATTGGTGCCACCCTGTCAATCAACAGTGCTTTCCA 33
*****

ets1      agactgctgtgacctgtgccagtgctgtgtcctggtgccaggggcaagaggaagactgc
2+3      AGACTGCTGTGACCTGTGCCAGTGCTGTGTCTGCTGCTGCCAGGGGCAAGAGGAAGACTGC
*****

ets1      cttttttccagctttccctggcttgaccacaccccccaatttaaggagAAGCTTCGTA--
2+3      CTTTTTCCAGCTTTCCCTGGCTTGACCACACCCCCCAATTAAAGGAGAAGCTTTGGCAAT
*****

```

Şekil E1.4: İkinci ve üçüncü E box bölgelerinde gerçekleştirilen yönlendirilmiş mutasyon.

```

ets1      -----cca
1+2+3    GAGGGGCAGACATTCTCTGGCCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGAGGCCA
*****

ets1      agtccatatccagtcagctctcttccacaaaattattttcttttctttagaaaaatcac
1+2+3    AGTCCATATCCAGTCAGCTCTCTTCCACAAAATTATTTCTTTTCTTTAGAAAATATCAC
*****

ets1      atttcatatcaagttattagagagaaacgggaagcctgagca 33 gactgggtggtgagc
1+2+3    ATTTCATATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAAGCCTGAGCA 33 GACTGGGTGTTGAGC
*****

ets1      gtccctgtgtttctaaagcaatccctttccctca 33 gagaccttgacctaggttaaatgggg
1+2+3    GTCCCTGTGTTCTAAAGCAATCCCTTTCCCTCA 33 GAGACCTTSCCTAGGTTAATGGGG
*****

ets1      gctccattgagaaagtcagggaacatgaagcatgaatatttacatattcagcagagagtaa
1+2+3    GCTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACATATTCAGCAGAGAGTAA
*****

ets1      aatgcatcagcaaatgatgaggtgagatacagtgattatccactgaactagtctccctttt
1+2+3    AATGCATCAGCAAAATGATGAGGTGAGATACAGTGTTATCCACTGAAGTACTGCTCCCTTTT
*****

ets1      gctcatctccctccctgttactctccaagctgagttatattcagctgaagcacaaatttga
1+2+3    GCTCATCTCCCTCCCTGTTACTCTCCAAGCTGAGTTATATTACAGCTGAAGCACAAATTTGA
*****

ets1      agaatacgaataatgtgtgatttgggtgccaccactgtcaatcaacagtgctttcca 33
1+2+3    AGAATACGAAATAATGTGTGATTGGTGCCACCCTGTCAATCAACAGTGCTTTCCA 33
*****

ets1      agactgctgtgacctgtgccagtgctgtgtcctggtgccaggggcaagaggaagactgc
1+2+3    AGACTGCTGTGACCTGTGCCAGTGCTGTGTCTGCTGCTGCCAGGGGCAAGAGGAAGACTGC
*****

ets1      cttttttccagctttccctggcttgaccacaccccccaatttaaggag-----
1+2+3    CTTTTTCCAGCTTTCCCTGGCTTGACCACACCCCCCAATTAAAGGAGAAGCTTTGGCAA
*****

```

Şekil E1.5: Birinci, ikinci ve üçüncü E box bölgelerinde gerçekleştirilen yönlendirilmiş mutasyon.

```

ets1      -----ccaa
1+3      TAGATCAGACATTTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGAGCCAA
*****

ets1      gtccatatccagtcagctctcttccacaaaattattttcttttcttttagaaaatatcaca
1+3      GTCCATATCCAGTCAGCTCTCTTCCACAAATTAATTTCTTTCTTTAGAAAAATATCACA
*****

ets1      ttccatatcaagttatttagagagaaaacgggaagcctgagca gactgggtggtggagc
1+3      TTTCAATCAAGTTATTAGAGAGAAACGGGAAGCCTGAGCA GACTGGGTGTTGGAGC
*****

ets1      tcctgtgttttctaaagcaatccctttccctcacctgagaccttgctaggttaaatgggg
1+3      TCCTGTGTTTCTAAAGCAATCCCTTTCCCTCACCTGAGACCTTGCTAGGTTAATGGGG
*****

ets1      ctccattgagaaadtcaaggaacatgaagcatgaatatttacatattcagcagagagtaa
1+3      CTCCATTGAGAAAGTCAAGGAACATGAAGCATGAATATTACATATTCAGCAGAGAGTAA
*****

ets1      atgcatcagcaaatgatgaggtgagatacagtggttatccactgaactagttcccttttg
1+3      ATGCATCAGCAAAATGATGAGGTGAGATACAGTGTATCCCACTGAAGTATGTTCCCTTTTG
*****

ets1      ctcatctccctccctgttactctccaaggctgagttatattcagctgaagcacaatttga
1+3      CTCATCTCCCTCCCTGTTACTCTCCAAGGCTGAGTTATATTGAGCTGAAGCACAATTGGA
*****

ets1      agaatacgaataaatgtgtgatttgggtgccaccactgtcaatcaacagtgctttcca
1+3      AGAATACGAATAAATGTGTGATTTGGGTGCCACCCTGTCAATCAACAGTGTCTTTCCA
*****

ets1      agactgctgtgcctgtgccagtggtgctgtcctggtgccaggggcaagaggaagactgc
1+3      AGACTGCTGTGCCTGTGCCAGTGGTGCTGTCTGTTGTTGCCAGGGGCAAGAGGAAGACTGC
*****

ets1      ctttttccagctttccctggcttgaccacaccccccaatttaagdag-----
1+3      CTTTTTCCAGCTTTCCCTGGCTTGACCACACCCCCCAATTTAAGGAGAAGCTTGGCAAT
*****

```

Şekil E1.6: Birinci ve üçüncü E box bölgelerinde gerçekleştirilen yönlendirilmiş mutasyon.