

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA SIP1'in PROTEİN
ETKİLEŞİMLERİNİN VE İFADESİNİ DÜZENLEDİĞİ
GENLERİN TANIMLANMASI

PELİN BALÇIK ERÇİN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA
SIP1'in PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN VE
İFADESİNİ DÜZENLEDİĞİ GENLERİN
TANIMLANMASI

PELİN BALÇIK ERÇİN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2018

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

**DEFINING THE PROTEIN INTERACTIONS
OF AND REGULATION OF TARGET
GENES BY SIP1 IN HEPATOCELLULAR
CARCINOMA**

PELİN BALÇIK ERÇİN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2018



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/03/2018 tarih ve 2018/119 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/04/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Pelin Balçık Eray'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayşe ÖZER

ÜYE

: Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER

ÜYE

: Doç. Dr. Ayten KANDILCI

ONAY

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

ÖZET

Hepatoselüler karsinoma (HCC) karaciğerin en sık görülen primer malignitesi olup tüm dünyada kansere-bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde metastaz en önemli ölüm nedenidir. Normal embriyo gelişiminde rol oynayan epitel-mezenkim geçişi (EMT) epitelyal tümörlerin invazyon ve metastazında önemli rol alır. E-box dizilerine bağlanarak E-kaderini baskılayan EMT düzenleyicilerinden ZEB2 (SIP1)'nin ayrıca hücre döngüsü, hücre yaşlanması ve mikroRNA'ların karşılıklı düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ZEB2 tarafından transkripsiyonel regülasyonu gerçekleştirilen az sayıda hedef gen tanımlanmıştır. Bu çalışmada, ZEB2 tarafından düzenlenen biyolojik süreçlerin çeşitliliği ve genomda çok sayıda E-box varlığından hareketle, endojen ZEB2 anlatımı yüksek SNU398 HCC hücre hattında ZEB2 hedef genleri kromatin-immünopresipitasyon sonrası yeni nesil dizilemeyle (ChIP-seq) belirlendi. ChIP-dizileme analizi sonucunda 509 gen tanımlandı. Hedef genom bölgelerinin analizleri ilk olarak, ZEB2'nin baskılandığı SNU398 ZEB2-shRNA klonlarında yapıldı. İfade değişimi belirlenen MAP7, BOK ve GALNT3'ün ChIP-DNA'larında ZEB2'nin bağlandığı bölgenin zenginleşmesi belirlendi. Hem gen anlatımında hem de kromatin zenginleşmesinde en yüksek değişim ZEB2 ile negatif korelasyon gösteren GALNT3 geninde belirlendi. Çalışmalara proteinlerin glikolizasyonunda rol alan PolypeptideN-Acetylgalactosaminyltransferase ailesi üyesi GALNT3 ile devam edildi. ZEB2 anlatımının arttırıldığı kolon kanseri hücre hattında da GALNT3 gen ve protein ifade değişimlerinin gösterilmesi sonrasında in vivo analizler yapıldı. İnsan kanser örneklerinde ZEB2 ve GALNT3'ün normal dokulara göre tümörlerdeki anlatımları in vivo örnekler ve in silico analizlerde değerlendirildi. İn-vitro koşullarda elde edilen değerlendirmelerin in vivo değerlendirmeler için de geçerli olduğu ve iki gen arasında ters korelasyon bulunduğu tespit edildi. Sonuç olarak, ZEB2'nin glikozilasyonda görevli GALNT3 enziminin transkripsiyonel regülasyonunda rol aldığı belirlenmesi, EMT ve kanser metastazının oldukça kompleks yapısına dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK SBAG111S484 projesi kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HCC; EMT; ZEB2; ChIP-dizileme; Monoklonal Antikor.

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent primary malignancy of the liver and the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Tumor invasion and metastasis are the most prominent cause of cancer-related deaths and are regulated by a molecular program, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which is active during normal embryogenic development. ZEB2 (SIP1) is among EMT regulators that downregulate E-cadherin by binding to E-box sequences and is also involved in cell cycle, cellular senescence reciprocal regulation of micro RNAs. Only a few genes regulated by ZEB2 were described so far. Given the multiplicity of biological processes regulated by ZEB2 and the presence of myriad of E-boxes in the genome, we aimed in this study to identify ZEB2 target genes in a HCC cell line, SNU398 with high endogenous ZEB2 expression, by home-made monoclonal antibody-based chromatin immunoprecipitation followed by next generation sequencing (ChIP-seq). A total of 509 genes were detected by ChIP-Seq. The analyses of target genome regions were first performed in ZEB2-shRNA and control clones of SNU398 cells. Differentially expressed genes *MAP7*, *BOK* and *GALNT3* also displayed significant fold enrichment in ChIP assay. The most significant change in ZEB2-dependent gene expression and ChIP fold-enrichment was found for *GALNT3* gene, which shows negative correlation with *ZEB2*. *GALNT3* is a member of the Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase family of enzymes that glycosylate proteins and was selected in this thesis work for further studies. *In vivo* analyses were performed after the demonstration of ZEB2-dependent changes in gene and protein expression of *GALNT3* in the ZEB2-inducible colorectal cancer cell line. Expression of ZEB2 and *GALNT3* in human cancer samples was assessed in tumor cDNA arrays and *in silico* analyzes. Our *in vitro* observation that ZEB2 and *GALNT3* are inversely correlated was validated in *in vivo* studies.

In conclusion, our findings that reveal the role of ZEB2 in the transcriptional regulation of *GALNT3*, an enzyme that mediates glycosylation of proteins, point out to the complexity of EMT and cancer metastasis processes.

This thesis study was supported by TUBITAK SBAG project 111S484.

Key Words: HCC; EMT; ZEB2; ChIP-seq; Monoclonal Antibody.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde, değerli bilgilerini, desteğini esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya ve tez çalışması süreci boyunca desteğini esirgemeyen Doç. Dr. A. Emre SAYAN'a teşekkür ederim.

Proje ve tez çalışmasında kendileri ile birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve her aşamada desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Uzm. Metin ÇETİN, Uzm. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması sırasında ve çalışma arkadaşlığının ötesinde dostlukları ile de bana destek olan Dr. Mine GÜL ŞEKER, Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Arş.Gör. Zeynep GİRGIN ERSOY, Dr. Tuğrul DORUK, Dr. Hüseyin BALCI ve Ar.Gör. Tuba KORKMAZ'a çok teşekkür ederim.

Yaşama şanslı başlamamı sağlayan sevgili annem ve babam Solmaz ve Recep BALÇIK'a ve kardeşleri olmaktan mutluluk duyduğum ve desteklerini hiç esirgemeyen Serap GÖKÇEN, Selma BOZDAĞ ve Ebru ŞİRELİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

En özel teşekkürü aileme, özellikle bütün bu eğitim sürecinin gerçekleşmesini sağlayan ve her zaman desteğini hissettiğim hayat arkadaşım İhsan ERÇİN'e ve bu süreçte hayatıma katılan en değerlilerim Metehan ve Selin ERÇİN'e sabırları için teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	Page
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. HEPATOSELULER KARSİNOMA	2
2.1. Hepatosellular Karsinoma Risk Faktörleri	2
2.1.1. Viral Hepatit Kaynaklı Hepatokarsinogenezis	3
2.1.1.1. Hepatit B Virüsü (HBV)	3
2.1.1.2. Hepatit C Virüsü (HCV)	4
2.1.2. Aflatoksin B1	5
2.1.3. Alkol	6
3. EPİTEL-MEZENKİM GEÇİŞİ (EMT)	7
3.1. Epitel-Mezenkim Geçişini Düzenleyen Transkripsiyon Faktörleri	9
3.1.1. SNAI Transkripsiyon Faktörü Ailesi	9
3.1.2. bHLH Transkripsiyon Faktörü Ailesi	10
3.1.3. ZEB Transkripsiyon Ailesi	11
4. KANSERDE ZEB TRANSKRİPSİYON AİLESİ	14
4.1. ZEB Proteinleri Tarafından Düzenlenen Transkripsiyonun Moleküler Mekanizmaları	15
4.2. Kanserde ZEB2 Transkripsiyon Faktörünün Bilinen Hedefleri	16
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
5.1. Gereçler	17
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar	17

5.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	17
5.1.3. Kullanılan Kitler	17
5.1.4. Kullanılan Antikorlar	18
5.1.5. Kullanılan Hücre Hücre Hatları	18
5.1.6. İnsan Karaciğer Total RNA ve Oligonükleotidler	18
5.1.7. DNA Belirteçleri, Yükleme Tamponları ve Görüntüleme Substratı	19
5.1.8. Kullanılan Çözeltiler	19
5.2. Yöntemler	20
5.2.1. Hücre Çözme İşlemi	20
5.2.1. Hücre Kültürü ve Büyütülme Şartları	21
5.2.3. Hücre Dondurma İşlemi	21
5.2.4. Kültüre Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu	21
5.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	22
5.2.5.1. DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi	22
5.2.5.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi	22
5.2.6. cDNA Sentezi	22
5.2.7. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi	23
5.2.8. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Western Blot	25
5.2.9. İmmün-Çöktürme Yöntemi	26
5.2.10. Kromatin İmmün-Çöktürmenin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması	27
5.2.11. Kromatin İmmunopresipitasyon Yöntemi	28
5.2.12. ChIP-qPCR Verilerinin Analizi	28
5.2.13. ChIP-Dizileme	29
5.2.14. shRNA ile kalımlı baskılama yöntemi	30
5.2.15. ChIP-Dizileme ile Belirlenen Hedef Gen Anlatımlarının ZEB2 Bağımlı Değişiminin Araştırılması	30
5.2.16. ChIP-Dizileme Sonuçlarında Motif Analizi ve Hedef Genlerin Hücresel Fonksiyonları	31
5.2.17. GALNT3 ve ZEB2 Gen İfadelerinin İnsan Kanseri Örneklerinde İncelenmesi	31
5.2.18. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri	32
6. BULGULAR	33

6.1. HCC Hücre Hatlarında ZEB2 Gen İfadesi	33
6.2. Anti-ZEB2 Monoklonal AntikorUNUN HCC Hücre Hatlarında Test Edilmesi	33
6.3. Monoklonal 6E5 antikorunun İmmün-Çöktürme Yönteminde ZEB2 Proteinini Zenginleştirilmesi	34
6.4. 6E5 Antikorunun ChIP Uygunluğunun Test Edilmesi	35
6.5. ChIP Optimizasyon Çalışmaları	35
6.5.1. Sonikasyon Çalışmaları	36
6.5.2. ChIP qPCR Çalışmaları	36
6.6. SNU398 shRNA Klonlarının Geliştirilmesi	37
6.7. ChIP-Dizileme Sonuçları	38
6.8. ChIP-Dizileme Hedeflerinin Motif ve Biyolojik İşlev Analizi	39
6.9. ChIP Dizileme Sonuçlarının Validasyonu ve Belirlenen Hedeflerde ZEB2-Bağımlı İfade Değişiminin Gösterilmesi	40
6.10. GALNT3 Geninin HCC Hücre Hatlarında İfade Analizi	42
6.11. İnsan Kanseri Hücre Hatlarında ZEB2-Bağımlı GALNT3 Anlatım Değişimlerinin Belirlenmesi	43
6.12. İnsan Kanseri Örneklerinde ZEB2 ve GALNT3 Karşılaştırmalı Analizi	45
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8.ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	68
EKLER	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Acıklamalar</u>
<u>Kisaltmalar</u>	
HCC	: Hepatosellüler Karsinoma
EMT	: Epitel Mezenkim Geçişi
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
MET	: Mezenkim Epitel Geçişi
TGF- β	: Transforme Büyüme Faktörü-beta
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
RTK	: Reseptör Trozin Kinaz
MMP	: Matriks Metallo Protein Kinaz
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
SBD	: Smad Bağlanma Bölgesi
ChIP	: Kromatin immunopresipitasyon
IHC	: İmmünohistokimya
IP	: İmmün çöktürme
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
CCND1	: Siklin D1
CDH1	: E-kaderin
CLND4	: Klaudin4
miR	: MikroRNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hepatokarsinogenezin başlıca risk faktörleri ve hepatocellüler karsinoma oluşum sürecinin şematik gösterimi.	3
3.1: EMT'nin biyolojik farklı rolleri.	8
3.2: ZEB ailesi üyesi transkripsiyon faktörlerinin şematik gösterimi.	12
6.1: ZEB2 geninin HCC hücre hatlarındaki göreceli ifadesi.	33
6.2: HCC hücre hatlarında ZEB2 protein ifadesi.	34
6.3: SNU398 ve PLC/PRF/5 hücre lizatlarında 6E5 antikorunu kullanılarak gerçekleştirilen immunopresipitasyon deneyi.	34
6.4: SNU398 ve SK-HEP1 hücrelerinde ChIP Western çalışması.	35
6.5: SNU398, SK Hep1 ve PLC/PRF/5 hücre kromatinlerinde sonikasyon işlemi.	36
6.6: İzotip (IgG2a) ve 6E5 (ZEB2) antikorları ile zenginleştirilen kromatin yüzdelerinin karşılaştırılması.	37
6.7: SNU398 hücreleriyle shRNA klonlarında ZEB2 ifadesi.	37
6.8: Tasarlanan iki ZEB2 primeri ile gerçekleştirilen RT-qPCR analizinde ZEB2-shRNA Lot2 klonunda ZEB2 anlatımının % baskılama oranları.	38
6.9: SNU398 ChIP DNA ZEB2 bağlanma bölgelerinin genom dağılımı.	39
6.10: MEME TOMTOM analizi. SNU398 hücre hatlarında gerçekleştirilen ChIP-dizileme sonuçlarında ZEB2 proteininin hedef dizilerinde belirlenen konsensus dizi motifi (CACCTG).	39
6.11: ZEB2 hedef genlerinin gen ontolojilerine göre moleküler fonksiyon sınıflandırılması.	40
6.12: ChIP-dizileme sonuçlarının qPCR ile validasyonu.	41
6.13: SNU398-shZEB2 hücrelerinde ZEB2-bağımlı gen ifadesi değişimi gösteren genler.	41
6.14: Hedef genlerin ChIP-qPCR ile validasyonu.	42
6.15: HCC hücre hatlarında GALNT3 geninin ifadesi.	43
6.16: SNU398 sh-ZEB2 ve kontrol (NSC) klonlarında ZEB2, GALNT3, Siklin D1 (CCND1), E-kaderin protein ifadelerinin western blot	43

gösterimi.	
6.17: Doksisisiklin ile indüklenen DLD-1 hücrelerinde ZEB2, GALNT3 ve CDH1 ifade analizi. Doksisisiklin ile ZEB2 anlatımının gerçekleştirilmesi sonrasında RT-qPCR analizi ile belirlenen gen ifade değişimleri.	44
6.18: DLD-1 hücrelerinde Doksisisiklin ile indüklenen (DOX+) ve indüklenme yapılmayan (DOX-) hücrelerde protein ifadesi.	45
6.19: İnsan kanser cDNA dizinlerinde ZEB2 ve GALNT3 gen ifadelerinin korelasyon grafikleri.	46
6.20: expO (Expression Project for Oncology) veri bankasındaki ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım değerleri.	48
6.21: Protein Atlas kanser veri tabanında ZEB2 ve GALNT3 protein ifadelerinin yüzdellik oranları.	51

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.	23
5.2: Ters transkriptaz karışımı.	23
5.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.	24
5.4: RT-qPCR’da kullanılan Primer Listesi.	24
5.5: RT-qPCR döngü şartları.	24
5.6: qPCR analizinde kullanılan primer listesi.	29
6.1: cDNA dizinlerinde gen ifade değerleri $\Delta\Delta Ct$ ile hesaplanmıştır.	47
6.2: ExpO very tabanındaki ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım değerlerinin karşılaştırılması.	49
6.3: Protein Atlas verilerinde aynı hasta örneklerindeki ZEB2 ve GALNT3 IHC değerlerinin gösterimi.	50

1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma primer karaciğer kanserleri arasında ilk sırada yer alırken genel olarak kansere bağlı ölümlerde ise ikinci sırada yer almaktadır. Solid tümörlerde hasta ölümlerinin yaklaşık olarak %90'ından metastaz sorumludur [1]. Normal embriyo gelişiminde rol oynayan, epitel hücrelerin epitel karakterlerini kaybetmeleri ve mezenkim hücre özellikleri kazanarak göç edebilir hale gelmelerini sağlayan epitel-mezenkim geçiş (EMT) mekanizması epitel kökenli tümörlerin metastazında da rol oynamaktadır. Epitel karakter belirteci olan E-kaderin proteini hücreler arası adezyonda görevlidir ve EMT sürecinde anlatımı baskılanmaktadır. E-kaderin proteinin baskılanmasında rol oynayan başlıca transkripsiyon faktör aileleri olan SNAI, bHLH ve ZEB EMT mekanizmasının başlıca düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu transkripsiyon faktörlerinin invazyon ve metastaza ek olarak çok farklı hücresel süreçlerde rol oynadığı belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen transkripsiyon faktörü ailelerinden ZEB ailesi üyesi olan ZEB2 (SIP1) bu tez çalışmasının temel proteinidir ve bugüne kadar literatürde az sayıda hedefi tanımlanmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

ZEB2 transkripsiyon faktörü genomda, E-box dizisine çinko parmak motifleri ile bağlanarak gen regülasyonunda rol oynamaktadır. Genomda CANNTG E-box dizi sıklığının çokluğu göz önüne alındığında, ZEB2 transkripsiyon faktörünün çok sayıda hedefinin olması olasıdır.

ZEB2 transkripsiyon faktörü EMT üzerindeki etkisi ile kanserde kötü prognozu belirtir nitelikte olmasına karşın, farklı kanser tiplerinde tümör süpressör gibi görev yaparak hTERT ve siklin D1 üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. Bu etki mekanizmasında ilişki kurduğu proteinler ile hücrenin karsinogenez sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, yeni nesil dizileme yöntemlerinden olan ChIP (Kromatin İmmunopresipitasyon) dizi analizi ile HCC hücrelerinde ZEB2 transkripsiyon faktörünün endojen ifade edildiği koşullarda ifadesini düzenlediği yeni hedef genlerin tanımlanması hedeflenmiştir.

2. HEPATOSELLULER KARSİNOMA

Hepatoselluler karsinoma (HCC) hepatositlerden köken alan ve primer karaciğer malignitelerinin en sık rastlanılan %85-90'lık en büyük grubunu oluşturan, karaciğer kanseri tipidir [2, 3]. 2012 yılı GLOBOCAN verilerine göre Dünya'da toplam 782.000 yeni karaciğer kanseri olgusu belirlenmiştir. Bu olguların %83 ü az gelişmiş ülkelerde ve özellikle %50'lik kısmı Çin'de bulunmaktadır. Hepatosellular karsinomaya erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanılmaktadır. Cinsiyete göre değerlendirmede, yetişkin erkekler arasında 554.000 yeni olgu ile toplam kanser vakalarının %7,5 ini oluşturmakta ve beşinci sırada yer almakta, kadınlar arasında ise 228.000 yeni vaka ile toplam kanser vakalarının %3,4'ünü oluşturduğu ve dokuzuncu sırada yer aldığı belirtilmektedir. HCC solid kanserler içinde dünyada beşinci sırada ve maligniteye bağlı ölümlerde akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır [4].

Hastalığın insidansı coğrafi dağılım olarak da değişim göstermektedir. Özellikle Doğu ve Güney-Doğu Asya ile Sahra-altı Afrika ülkelerinde HCC insidansı yüksektir. Coğrafik dağılımdaki değişikliğin en önemli nedeni yüksek Hepatit B ve Hepatit C endemisidir [5].

2.1. Hepatosellular Karsinoma Risk Faktörleri

HCC için major risk faktörleri bölgesel olarak değişkenlik göstermekte ve Hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), aşırı alkol alımı, aflotoksin entoksikasyonu ve son yıllardaki çalışmalar ile tip2 diabetes mellitus, alkolik olmayan steato-hepatitis (non-alcoholic steato-hepatitis), ve metabolik sendrom şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 2.1) [6]. HCC sıklıkla kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişir.

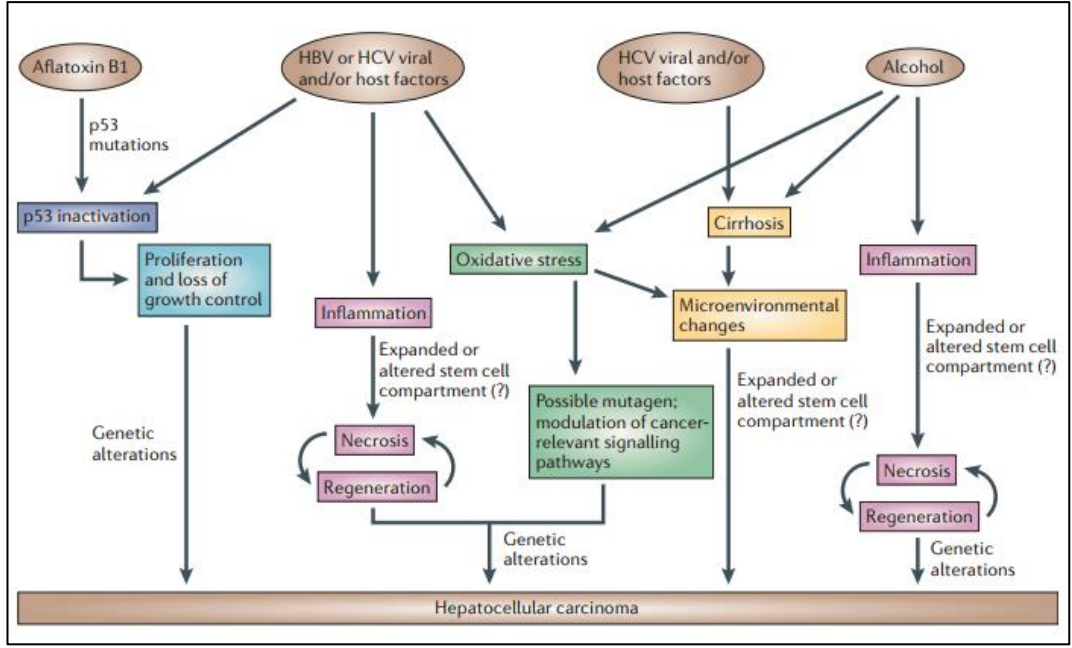


Figure 2.1: Hepatokarsinogenezin başlıca risk faktörleri ve hepatosellüler karsinoma oluşum sürecinin şematik gösterimi.

2.1.1. Viral Hepatit Kaynaklı Hepatokarsinogenez

HBV ve HCV'ne bağlı kronik enfeksiyonlar dünya genelinde sirozun en önemli nedenleridir. Viral enfeksiyona bağlı siroz gelişiminde ilk olarak inflamasyon, sonrasında nekrozis, fibrozis ve rejenerasyon gelişir [7]. Dünya genelinde HCC vakalarının yaklaşık % 50'si HBV ve % 25'i HCV enfeksiyonu ile ilişkilidir [8]. HBV ile enfekte hastalarda, genel popülasyona oranla HCC gelişme riskinin 5-15 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. HCV taşıyan hastalar ile taşımayan hastalar karşılaştırıldığında, HCC gelişme riskinin 17 kat fazla olduğu belirtilmektedir [2].

2.1.1.1. Hepatit B Virüsü (HBV)

Genel olarak, HCC gelişiminin en büyük sebebi HBV enfeksiyonu varlığıdır ve Dünya genelinde yaklaşık 300 milyon kişinin bu virüsle kronik enfekte olduğu düşünülmektedir [2]. Virüs kontamine kan transfüzyonları, damardan enjeksiyonlar ve cinsel temas yoluyla bulaşır [9].

Risk faktörleri içinde yalnızca HBV'de HCC gelişiminde siroz görülmesi şart değildir [5].

Hepatit B virüsü (HBV) 10 genotipi (A-J) bulunan, çift halkalı bir DNA virüsüdür [10]. Bu genotip çeşitlerinin dağılımı; genotip A, Sahraaltı Afrika, Kuzey Avrupa ve Batı Avrupa; genotip B, Tayvan ve Vietnam; genotip C, Çin, Japonya ve Kore; genotip D, Hindistan, Avrupa, Afrika ve Akdeniz ülkeleri; genotip E, Batı Afrika; genotip F, Orta ve Güney Amerika; genotip G, Fransa, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD); genotip H, Orta Amerika; genotip I, Vietnam ve Laos; genotip J, Japonya olarak belirlenmiştir [11]. Genotip C'nin HCC gelişiminde A, B ve D'ye oranla daha yüksek risk taşıdığı belirlenmiştir [12].

HBV genomunun kodladığı bazı proteinler ters transkriptaz/DNA polimeraz, kapsid, L, M, S yüzey ve HBx proteinleridir. Replikasyonu için viral DNA ile hücre DNA entegrasyonu gerekmemektedir. HBV bağlantılı HCC'da % 90 oranında HBV DNA'sının hücre genomuna entegre olduğu tespit edilmiştir [13]. HBV DNA'sının konak hücre genomuna entegrasyonu mutageniz, kromozomal instabilite, ikincil kromozomal düzenlemelere (delesyon, duplikasyon, translokasyon) ve tamamlanmamış viral proteinlerin sentezine neden olabilir. HBV ve HCC bağlantısını araştıran çalışmalar HBx transaktif edici proteini üzerinde yoğunlaşmaktadır. 154 aminoasitlik küçük bir viral protein olan HBx sıklıkla HBV taşıyıcılarının malign hepatositlerinde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda HBx'in onkogenik ve apoptotik çok sayıda yolağı etkilediği bulunmuştur [14].

2.1.1.2. Hepatit C Virüsü (HCV)

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 verilerine göre, Dünya genelinde 71 milyon kişi HCV ile kronik enfekte olarak yaşamaktadır. HBV enfeksiyonuna göre daha az kişide HCV enfeksiyonu belirlenmiştir ve iki virüsün Dünya genelindeki prevalanslarında da farklılıklar bulunmaktadır. Doğu Akdeniz Bölgesi, %2.3 ile en yüksek prevalansa sahip olup bu bölgeyi ikinci sırada %1.5 ile Avrupa takip etmektedir [15].

İnsanda, HCV kaynaklı HCC gelişimi, 20-40 yıl sürebilen çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreç, kronik HCV enfeksiyonu, kronik hepatik enflamasyon, karaciğer fibrozu, pre-neoplastik klonların oluşması, geri dönüşümsüz somatik

genetik/epigenetik değişiklikler ve malignant klonların oluşması sıralamasıyla gelişmektedir [16].

HCV tek iplikli bir RNA virüsüdür. Altı farklı genotipi tanımlanmıştır. Genotiplerin prevalansı değişiklik göstermektedir, Batı ülkeleri ve Uzakdoğu'da genotip I, II ve III, Orta Doğu'da ise genotip IV yaygındır [5]. HCV, HBV'den farklı olarak, genetik materyalinin konakçının genomuna sınırlı entegrasyonu olan bir RNA virüsüdür. HCV'nin kanserojen potansiyelinin genellikle dolaylı mekanizmalarla bağlantılı olduğu varsayılmaktadır [16].

HCV enfeksiyonu, reaktif oksijen türleri, hücre ölüm sinyalleri, hedgehog ligandları ve nükleotidler gibi fibrotik ve inflamatuvar ajanların aktive olmasına neden olur. Hücre içi inflamazom aktivasyonu, nükleer reseptör ailesi ve diğer transkripsiyonel olaylar, hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonuna katkıda bulunur. Aktive edilmiş hepatik stellat hücre, proliferasyon, kontraktilite, fibrojenez, matris bozulması ve inflamatuvar sinyal vasıtasıyla karaciğer hasarını teşvik eder. Karaciğer fibrozunun şiddeti, kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda artan HCC riski ile sıkı bir korelasyona sahiptir ve siroza bağlı karsinogenezin, HCV ile ilişkili HCC'nin gelişmesindeki ana mekanizma olduğunu düşündürmektedir [16].

2.1.2. Aflatoksin B1

Aspergillus sınıfı mantarlar tarafından üretilen bir mikotoksin olan Aflatoxin-B1 karsinojenik olarak kabul edilmektedir. Özellikle sıcak nemli koşullarda saklanan tahıl ürünleri ve fıstık gibi gıda maddeleri üzerinde kolaylıkla Aspergillus ürer ve bu toksini üretirler. Oral olarak alınan Aflatoksin B1 metabolize olurken ekzo-8,9-epoksidine ara molekülüne dönüşür ve bu molekül DNA'ya kovalent bağlanarak hasara neden olur. Özellikle p53 tümör süpresör geninin karakteristik mutasyonunda kodon 249'da AGG nükleotid dizisini AGT olarak değiştirir ve protein sentezi sırasında arjinin yerine serin aminoasiti oluşur (R249S). Ayrıca HRAS onkogeninde de mutasyona sebep olduğu belirlenmiştir [17]. Aflatoksin B1 ve HBV enfeksiyonu arasında sinerjistik etki olduğu belirlenmiştir. Tek bir risk faktörünün olmasına bağlı HCC gelişimi ile her ikisine maruz kalmada ki HCC riski karşılaştırıldığında, HBV ve Aflatoksin B1'in HCC riskini 5-10 kat daha fazla arttırdığı belirlenmiştir [18].

2.1.3. Alkol

HCC için alkol önemli bir risk faktörüdür. Kronik alkol alımı proinflatuar sitokinlerin üretimine ve monosit aktivasyonuna sebep olmaktadır. Monosit aktivasyonu endotoksin konsantrasyonunun artışına ve Küpffer hücrelerinin aktivasyonuna neden olur. Bu hücreler çok sayıda kemokin ve sitokinlerin salınmasını sağlar ve hepatositlerin sağ kalımını azaltır. Hepatositlerdeki aşırı sitotoksik etki, kronik hepatosit yıkımına, rejenerasyona, stallet hücre aktivasyonuna, siroza ve sonuç olarak HCC'ya sebep olabilmektedir [18].

3. EPİTEL-MEZENKİM GEÇİŞİ (EMT)

Epitel-Mezenkim geişı canlılarda fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir süreçtir. Fizyolojik rolü gelişim, yara iyileşmesi ve kök hücre feneotipinde, patolojik rolü ise fibrozis ve kanser progresyonunda belirlenmiştir [19]. Fizyolojik ve patolojik olarak süreç geri dönüşümlüdür, hücreler Mezenkim-Epitel Geişı (MET) ile tekrar epitel hücre özelliklerini kazanırlar. Hücrelerin gelişimde epitel hücre karakterlerini kaybederek mezenkim hücre özellikleri kazanmaları ilk olarak Elizabeth Hay tarafından piliç embriyolarının gelişiminde tanımlanmıştır [20]. Epitel-mezenkim hücre geişı (EMT), birçok canlının embriyonik gelişim basamağında önemli bir fazdır. Bu değişim sırasında mezenkim hücreler ekstrasellüler alana göç ederek organ oluşumuna katılırlar. Gelişim sırasında blastula evresinde başlayan hücrelerin ayrılarak vücut formasyonunun şekillenmesi, gastrula evresine kadar belirgin değildir. Çoğu türde, mezenkimal hücrelerin g edebilme yetileri sayesinde vücut formasyonu oluşmaktadır. Gelişim sırasında parietal endoderm oluşumunda EMT sayesinde E-kaderin ifadesinin durdurulduğu bilinmektedir [21]. Epitel hücreleri apikal-bazal polarite, zgn intersellüler bağlanmaları sayesinde bazal membranda yerleşim gösterirler. Plastisitelerinin değişimi doku ve hücre tipine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. E-kaderin baskılanması EMT'nin en önemli belirteci olarak kabul edilmektedir. Bu baskılanma sonrasında adherens bağlanma proteinlerinin kararlılığı bozulur. Ek olarak, desmoplakin, plakogloblin, plakofilin, klaudin ve okludin genlerinin anlatımı da baskılanır. Gen anlatımındaki bu değişimler epitel hücre-hücre bağlantılarını ve epitel hücre bariyerini bozar. Epitel hücre özelliği olan E-kaderin ve mezenkim hücre belirteci Nöral kaderin (N-kaderin) arasında denge vardır. E-kaderin baskılandığında N-kaderin artmaktadır. N-kaderin E-kaderine oranla hücre-hücre bağlantılarında daha zayıf bağ kurmaktadır ve böylelikle hücreler migrasyon ve invazyon gerçekleştirebilirler. N-kaderin hücre iskeleti ile α -katenin ve β -katenin aracılığı ile bağlantı kurar [22].

Biyolojik işlevleri açısından değerlendirildiğinde EMT süreci üç alt grupta değerlendirilebilir. Bu gruplar arasında değişimi sağlayan spesifik sinyaller ve süreçlerin farkları çok net olmamasına karşın biyolojik işlevsel rolleri belirgindir. Birinci grup, implantasyon, embriyo oluşumu ve organ gelişimiyle ilişkilidir. Bu

EMT grubu fibroze ve invaziv fenotipe sebep olmaz. İkinci grup, yangı ile ilişkilidir ve yara iyileşmesi veya doku yenilenmesi sırasında görülür ve inflamasyon zayıfladığında durur. Üçüncü grup EMT’de daha önce genetik ve epigenetik değişiklikler geçirmiş pre-neoplastik hücreler, kanserleşirler ve EMT özelliği sayesinde metastaz yapabilirler (Şekil 3.1) [23].

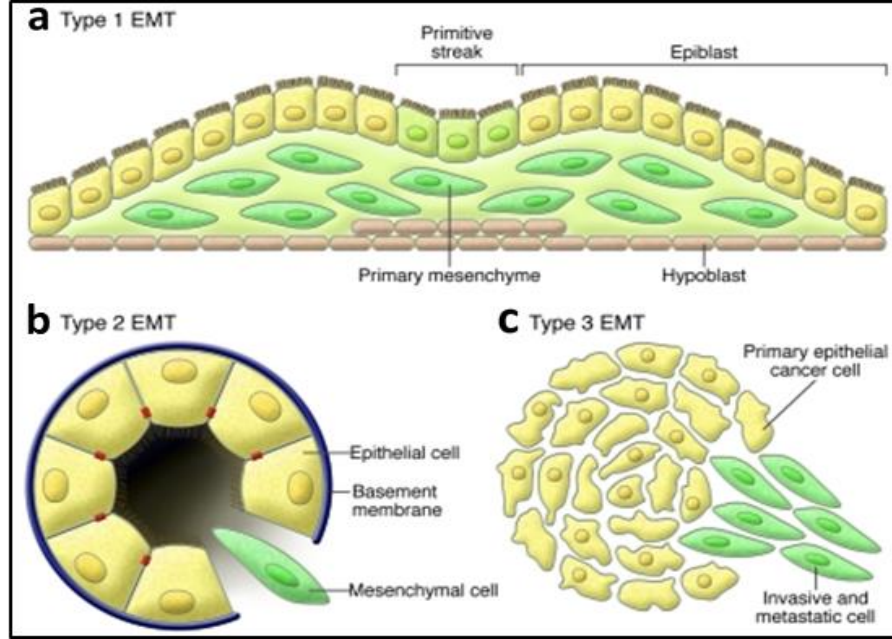


Figure 3.1: EMT'nin biyolojik farklı rolleri. a) Normal Embriyonik süreçte, EMT implantasyon ve embriyonik gastrulasyon ile ilişkilidir. Mezoderm, endoderm ve mobil nöral krest hücrelerinin oluşmasını sağlar. İlkel epiteller yani epiblast EMT ile primer mezenkim hücrelerinin oluşmasını sağlar. b) Organ ve doku hasarında EMT, inflamasyon ve doku hasarında dokunun yenilenmesinde rol oynamaktadır. c) Kanserde aktif olan EMT ile epitel hücreler invazyon ve metastaz yeteneği kazanır.

Hücre morfolojisindeki değişiklikler, hücre-matris yapışması ve göç yeteneklerinin kazanılması, bir epitel hücresinden bir mezenkimal hücreye dönüşüm için gerekli olaylardır. Sıkı bağlantıların kaybından sonra hücre kutuplarının kaybedilmesi, EMT programının başlangıcı olarak düşünülmektedir. E-kaderin, bozulmamış bir hücre-hücre etkileşimini ve stabilize edilmiş bir hücre iskeletini korumak üzere işlev görür, E-kaderin anlatımının durması ve mezenkimal belirteçler olan vimentin, N-kaderin gibi proteinler hücrenin polaritesini ve hücre-hücre bağlantılarını zayıflatır ve hücre göç edebilir duruma gelir. EMT sürecinde, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) veya fibroblast büyüme faktörü (FGF), çeşitli reseptör tirozin kinazlar (RTKs), WNT / β -katenin, NOTCH ve HEDGEHOG

sinyal yolları aktive olmaktadır. Özellikle E-kaderin başta olmak üzere, epitel karakterle ilgili genlerin anlatımının durdurulması ve direkt ve/veya dolaylı olarak mezenkim karakter ile ilgili genlerin aktivasyonunda rol oynayan EMT'yi düzenleyen transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır [19, 23].

3.1. Epitel-Mezenkim Geçişini Düzenleyen Transkripsiyon Faktörleri

Embriyonik süreçte tanımlanmış olan EMT/MET bağımlı hücrel değişim ve hücrenin kazandığı plastisite neoplastik hücrelerde tekrar görülmektedir. Epitel-Mezenkim Geçişini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin artmış anlatımlarının bulunmasının *in vitro* çalışmalar ile hücre proliferasyonuna, hücre siklusuna ve senesense etki ettiği belirlenmiştir [24, 25]. EMT transkripsiyon faktörlerinin ve onların hedeflerinin (E-kaderin ve Vimentin gibi) ifadeleri tümör agresifliğinin belirlenmesinde ve hasta sağkalım değerlendirmesinde prognostik belirteç olarak kullanılabilir [26, 27].

EMT sırasında meydana gelen moleküler yeniden programlama major olarak üç büyük transkripsiyon faktörü grubu tarafından düzenlenmektedir: ZEB, SNAI ve bHLH. Bu EMT aktive edici transkripsiyon faktörlerinin son yıllarda yapılan *in vitro* ve ksenograft hayvan modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda sadece hücrelerin invazyon ve göç etme yeteneklerinde rol oynamadıkları, farklı önemli hücrel süreçlerde de görev aldıkları belirlenmiştir [28]. Bu özellikler; (i) hücrenin değişimi (ii) kök hücre ve kanser kök hücre plastisitesi, (iii) malignant transformasyon ve tümör başlangıcı, (iv) kanser hücrelerinin tedaviye direnç geliştirerek hayatta kalmaları ve (v) immun yanıtından kaçış ve kanserin oluşumu olarak sıralanabilir. [29].

3.1.1. SNAI Transkripsiyon Faktörü Ailesi

SNAIL, SLUG ve SMUC olmak üzere 3 proteinden oluşan protein ailesinin karboksi ucundaki çinko parmak yapısı epitelyal genlerin E-box dizilerine bağlanarak gelişim, fibrozis ve kanser süreçlerinde EMT programını aktive etmektedir. SNAIL ve SLUG transkripsiyon faktörlerinin EMT sürecinde baskıladığı belirlenen genler; E-kaderin, kludin, okkludin, Crumbs3, PALS1, PATJ,

sitokeratinler, desmoplakin ve plakofilin iken, aktive ettiği bilinen genler ise Fibronektin, N-kaderin, kollajen, MMP2, MMP15, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1 ve ZEB2'dir. SNAIL transkripsiyon faktörü E-kaderin promotor bölgesinin proksimal bölgesindeki E-box dizilerine çinko parmak motifi ile bağlanır. Bu bağlanma Polikomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) kompleksinin aynı bölgeye toplanmasını sağlar. Bu kompleksin komponentleri histon modifikasyonlarını düzenler. Özellikle H3K9 ve H3K27 metilasyonu baskılanmanın, H3K9 asetilasyonu aktif kromatin yapısının belirteçidir. E-kaderin promotorunun ikili domainlerinde bulunan bu zıt gen anlatım belirteçleri, embriyonik kök hücrelerde birçok promotorda bulunmaktadır. Ortamdan alınan sinyale göre uyku durumu ve aktif form arasında hızlı geçiş olabilmektedir [22].

Hücrenin bulunduğu fizyolojik koşullara bağlı olarak farklı sinyal yolları aktive olabilmektedir. TGF β , WNT, Notch ile büyüme faktörleri tarafından aktive edilen Reseptör Tirozin kinazlar SNAIL anlatımını arttırmaktadır. SNAIL ve SLUG farklı transkripsiyon faktörleri ile birlikte çalışarak hücrenin gen anlatımını değiştirebilmektedir. Örneğin, SNAIL ve ETS1 proteinlerinin birlikte gen ifade düzenlemeleri sonrasında MMP9 anlatımını aktive olmaktadır [30].

3.1.2. bHLH Transkripsiyon Faktörü Ailesi

Homomerik ve heteromerik temel heliks-ilmek-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörü ailesinin üyeleri olan TWIST1 ve TWIST2 gelişimin farklı periyotlarında etkinleşerek EMT'yi aktive eder. Drosophila'da TWIST1 anlatımını mesodermel süreçte önemli rol oynamasına karşın farelerde mezodermal süreçten sonra gelişimde görev almaktadır [31]. TWIST1'in EMT sürecinde E-kaderin, kludinin, okludinin, desmoplakin ve plakoglobulin gen anlatımlarını baskıladığı, buna karşın Fibronektin, N-kaderin ve $\alpha 5$ integrin anlatımını arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [22]. Hipoksik koşullarda, Hipoksi-indüklenebilir faktör 1 α (HIF1 α) TWIST anlatımını artırır ve bu nedenle EMT indüklenerek tümör hücrelerinin yayılımı artar [32]. TWIST1 protein stabilitesi ve aktivitesi Ser68'in MAPK yolağı ile fosforilasyonu sonrasında artar ve TWIST1 aktivitesine bağlı olarak meme kanser hücrelerinin invazyonunun arttığı gösterilmiştir [33]. TWIST proteinlerinin aktivitesi dimer kompozisyonlarına göre değişiklik gösterir. TWIST1 ve TWIST2'nin

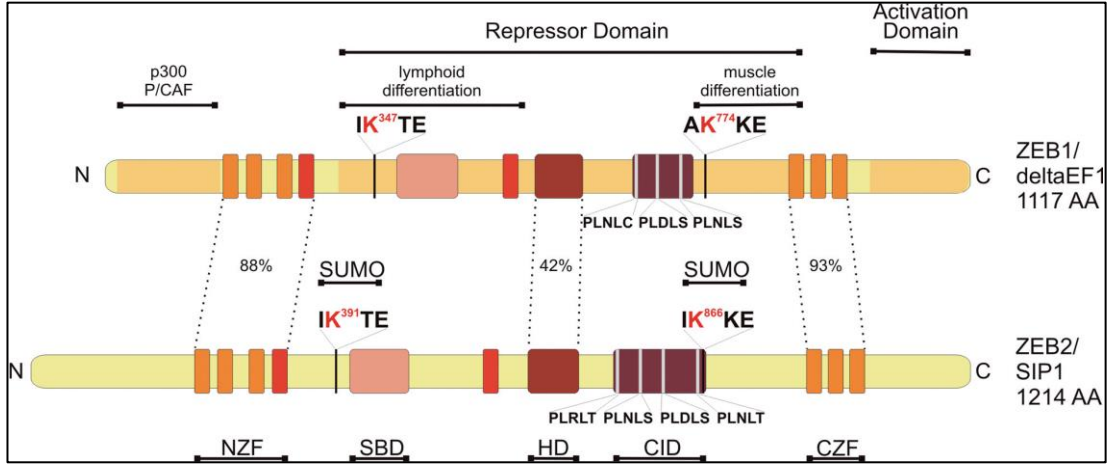
homodimer yapısı veya TWIST/E12 heterodimer yapısı transkripsiyonal regülasyonda hem represör hem de aktivatör düzenleyiciler olarak rol oynamasını sağlar [34].

3.1.3. ZEB Transkripsiyon Ailesi

Vertebralarda iki homolog ZEB proteini bulunmaktadır. ZEB1 (δ EF1, Nil-2-a, Tcf8, Bzp, Areb6, Meb1, Zfhx1a ve Zfhep) tavuklarda lens–spesifik δ 1-kristalin olarak lens hücrelerinde belirlenmiştir. ZEB ailesinin diğer üyesi olan ZEB2 (SIP1 ve Zfhx1a) proteini 1214 aa uzunluğunda 140 kDa öngörülen moleküler ağırlığı olan bir proteindir. İlk olarak 1999 yılında Verschueren ve arkadaşları Smad1 ile Zeb2 proteinin ilişki kurarak Xenopuslarda 5'-CACCT-3' dizisine bağlandığı göstermiştir [35]. ZEB2 transkripsiyon faktörünün gelişimde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Fare embriyolarında ZEB2 proteinin yokluğunda yapılan çalışmada, nöral tüp kapanamaması sebebiyle E9.5 günde embriyoların öldüğü belirtilmiştir [36]. ZEB2 proteini, TGF β sinyal yolağı ile düzenlenen SMAD proteinleri ile etkileşime girerek DNA'ya bağlanan transkripsiyonel baskılayıcı olarak rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür.

ZEB ailesine üye ZEB1 (δ EF1) ve ZEB2 (SIP1, ZFHX1B) transkripsiyon faktörleri yapılarında iki çinko parmak kümesi göstermeleri ile karakterize edilmektedir. 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 karşılaştırılmaları sonucunda NZF bölgesinde %88 benzerlik bulunurken, CZF bölgesinde ise %93 benzerlik bulunmuştur. Bu bölgeler dışındaki alanlarda benzerlik daha az oranda gözlemlenmektedir [37] (Şekil 3.2). 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 protein-1 CtBP1 (C terminal binding protein-1) için olan dizi PXDLS'yi içermektedir. CtBP1 proteininin, ilk olarak adenovirüs E1A onkoproteininin C terminal bölgesindeki PLDS dizisiyle ilişki kurduğu belirlenmiştir [38]. CtBP1 proteini DNA'ya direkt olarak bağlanma yetisine sahip olmamasına karşın diğer proteinlerle etkileşim kurarak bir kompleks halinde ko-repressör olarak birçok farklı genlerin

transkripsiyonunda görev yapmaktadır [39]. ZEB1 ve ZEB2 proteinleri E cadherin promotorunda bulunan E-box'a çinko parmak yapıları ile bağlanarak E-kaderin proteinin anlatımını baskılamaktadır. Köpek böbrek epitelyum hücre hattı (MDCK) ile yapılan çalışmada CtBP'nin ZEB2'ye bağlanarak E-kaderin anlatımını engellediği gösterilmesine karşın, CtBP'ye bağlanamayan mutant ZEB2 proteininin de yabani tip kadar E-kaderin ifadesinin baskılandığı bildirilmiştir [40].



Şekil 3.2: ZEB ailesi üyesi transkripsiyon faktörlerinin şematik gösterimi.

ZEB transkripsiyon faktörleri sumolasyon ile post-transkripsiyonel modifikasyon geçirmektedir. ZEB2 proteinin sumolasyonu; Lizin391 ve Lizin866 bölgelerinde meydana gelmektedir. 2005 yılında Long ve arkadaşlarının çalışmalarında; Polikomb protein Pc2'nin SUMO E3 ligaz olarak iş görerek ZEB2 proteinin sumolasyonunda görev aldığı belirlenmiştir. Protein sumolasyonunun protein kararlılığı ve protein lokalizasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Fakat ZEB2 sumolasyonun etkilerinin incelenmesi sonucunda ZEB2 proteinin kararlılığında ve nuklear lokalizasyonunda farklılık belirlenmemiştir [41].

Ayrıca ZEB ailesi üyesi her iki proteinde de TGF β yolağıyla ilgili Smad-Bağlanma Bölgesi belirlenmiştir (SBD). ZEB proteinleri TGF β yolağıyla aktive olmaktadır. Smad3 ve Smad4'ün direkt olarak DNA'ya bağlanma yetkinlikleri bulunmasına karşın, DNA'ya olan afiniteleri ve spesifiteleri azdır. Bu nedenle, hedef genlerde fiziksel ve fonksiyonel düzenleme Smad proteinleri ile birlikte bağlanan komplekste bulunan proteinler ve transkripsiyon faktörleri tarafından sağlanmaktadır. ZEB2 ile Smad proteinlerinin etkileşimlerinin incelenmesi ZEB2 proteininin Smad proteinlerinin MH2 domainlerine bağlanabildiğini ortaya

koymaktadır. Verschueren ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ZEB2 proteinin Smad1,2,3 ile bağlanabildiğini göstermiştir. ZEB2 ile Smad4 arasında direkt bir bağlantı gösterilememiştir. Smad proteinleri ve ZEB2 etkileşimini Transforme-Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β) tip1 reseptör aktivasyonun gerçekleştirdiği belirlenmiştir [35]. TGF- β sinyal yolağı hücrenin büyümesi, sağ kalımı, farklılaşması ve EMT gibi çok sayıda önemli hücrenel süreçte rol oynamaktadır [42]. ZEB1 ve ZEB2 ayrıca NF κ B, Ras-ERK2 ve HIF-1 gibi önemli sinyal yollarının aktivasyonu ile EMT sürecinin tetiklenmesine özellikle karsinogenez sürecinde aracılık etmektedir [43, 44].

4. KANSERDE ZEB TRANSKRİPSİYON AİLESİ

Ksenograft fare tümör modellerinde artmış ZEB1 anlatımının hücre polaritesini bozduğu ve metastatik potansiyeli arttırdığı gösterilmiştir [45]. ZEB1 ve/veya ZEB2 anlatımının primer insan karsinomlarından over, meme, endometriyum, kolon, akciğer, prostat, pankreas ve mesane kanserlerinde artmış agresif özellik ve yüksek metastatik kapasite ile uyumlu olduğu gösterilmiştir [46].

MikroRNA'lar 20-22 nükleotit uzunluğunda küçük protein kodlamayan ve post-transkripsiyonel regülasyonda rol oynayan RNA'lardır. Özellikle miR200 ailesi ve ZEB transkripsiyon faktörleri arasında bağlantı olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır [47]. Epitel fenotip ve miRNA'lar arasındaki bağlantının incelendiği 60 hücre hattını kapsayan çalışmanın sonucunda, miR200 ailesinin dolaylı olarak E-kaderin anlatımıyla pozitif ve Vimentin anlatımıyla ise ters korelasyon gösterdiği belirlenmiştir [48]. MDA-MB-231 insan meme adenokarsinom hücrelerinin miR200a ve miR200c MikroRNA'ları ile transfekasyonu sonrasında hücrede E-kaderin proteinin arttığı, ZEB1 ve ZEB2 proteinlerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Tam tersi deneysel çalışmada ise HCT-116 insan kolorektal karsinoma hücrelerinde miR200 baskılanması sonrasında ZEB1 ve ZEB2 proteininde artış belirlenmiştir [49]. Ayrıca MDCK hücrelerinde TGF β yolağına bağlı olarak EMT indüklenmesi sonrasında miR200 ailesinin anlatım profili değişmektedir [50]. Yapılan çalışmalar ile hem ZEB2'nin hem de ZEB1'in miR200 ailesi üyeleriyle karşılıklı bir düzenlenme mekanizması gösterdikleri bulunmuştur. Başka bir deyişle, ZEB1 ve ZEB2 miR ailesi üyelerini baskılamakta, miR transkriptleri ise ZEB1 ve ZEB2'yi negatif yönde regüle etmektedir [51].

miR200 ailesi yalnızca ZEB düzenlenmesinde değil, ayrıca kanser kök hücre indükleyici proteinler olan Bmi1, Sox2 ve KLF4 baskılanmasında da rol oynamaktadır. Meme epitel hücrelerinden izole edilen CD44+ CD24- kök hücrelerinde EMT programını indükleyen diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte ZEB2 mRNA seviyelerinin de yüksek olduğu saptanmıştır [52]. Meme kanseri kök hücrelerinin izolasyonu sonrasında hücrelerin azalmış miR200 ve artmış ZEB1 ve ZEB2 anlatımlarının olduğu belirlenmiştir. BMI proteinin hücrenin senesensinde rol oynadığı ve bu düzenlemenin miR200c ile gerçekleştiği gösterilmiştir [53]. Tüm bu çalışmalar, ZEB ailesi üyeleri ile kök hücre fenotipi arasında güçlü bir bağlantı

ortaya koymaktadır. ZEB transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilen transkripsiyonel regülasyon mekanizmaları normal fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır.

4.1. ZEB Proteinleri Tarafından Düzenlenen Transkripsiyonun Moleküler Mekanizmaları

ZEB1 ve ZEB2 başlangıçta transkripsiyonel baskılayıcı olarak tanımlanmasına karşın her iki faktör de hedef gen ve dokuya bağlı olarak transkripsiyonu aktive edebilir veya baskılayabilir [46]. ZEB1 ve ZEB2 cDNA'ları GAL4 mayasında test edildiklerinde her iki heterolog proteinin de güçlü aktif transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Yapısal olarak N-terminal ve merkezinde baskılayıcı bağlanma bölgeleri bulunmasına karşın C-terminal ucunda aktivatör domaini bulunmaktadır [54, 55]. ZEB proteinlerinin, hedef gen promotor bölgelerinde seçici olarak ko-repressörlerin toplanmasını sağladıkları düşünülmektedir. Bununla birlikte, hangi ko-repressörlerin görev aldığı sadece birkaç ZEB hedef geni için bilinmektedir. Tip60, CD4'ün baskılanmasında ZEB1'e aracılık etmektedir [56]. ZEB1 ile CtBP represör kompleksinin büyüme hormonu, interlökin-2 ve Bcl-6'nın gen ifadesini düzenlediği belirlenmiştir [57]. E-kaderin gen anlatımının baskılanmasında ZEB1 CtBP ve BRG1 proteinleri ile kompleks oluştururken, ZEB2 ise CtBP ve NuRD ile kompleks oluşturarak baskılama yapmaktadır [3].

ZEB1 ve ZEB2'nin transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapmalarında p300 ve pCAF bağlanmasıyla oluşan kompleks hedef proteinin transkripsiyonunda rol oynamaktadır [58]. Bu histon asetil transferazların bağlanması hedef genlerin anlatımının gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Kolorektal karsinoma hücrelerinde ZEB1 hedefi olduğu bilinen Vitamin D Reseptörünün anlatımının p300 miktarına bağlı olarak pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir [59]. Fakat hangi koşullarda bu aktivasyonun gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. ZEB proteinlerinin aktivatör veya represör gen regülatörü olarak rol oynamalarında, post-transkripsiyonel modifikasyonlarının etkili olduğu belirlenmiştir. ZEB2'nin Pc2 tarafından sumolasyonu sonrasında CtBP'nin bağlanmasını engellediği ve E-kaderin baskılanmasının azaldığı belirtilmiştir [41]. Tüm bu bilgiler ışığında, ZEB proteinlerinin transkripsiyonel regülasyonları ve hangi koşullarda ne şekilde

regülasyonda rol oynadıkları henüz netleştirilememiştir.

4.2. Kanserde ZEB2 Transkripsiyon Faktörünün Bilinen Hedefleri

ZEB2'nin hedef genlerinden olan E-kaderin geninin promotor bölgesindeki CACCTG dizilerini içeren iki adet E-box dizisine NH2 ve COOH uçlarındaki çinko-parmak motifleriyle bağlanarak gen anlatımını baskıladığı gösterilmiştir [40]. ZEB2 hedefi olarak belirlenen CLDN4 (klaudin-4), CCND1 (siklin D1) ve SFRP1 (secreted-frizzled-related protein1) gen ifadelerinin baskılanmasında ZEB2'nin E-box benzeri AGGTG dizilerine bağlandığı belirlenmiştir [60-62]. Ayrıca TERT (Telomeraz revers transkriptaz), ALPL (dokuya spesifik-olmayan alkalin fosfataz) ve miR-200 ailesi (miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-200c ve miR-141) genlerinin de ZEB2-bağımlı olarak ifadelerinin baskılandığı gösterilmiştir [51, 63, 64]. ZEB2'nin bağlandığı diziler olan E-box dizilerinin genomda bulunma sıklığı çok yüksektir [65]. Önceki çalışmalar, henüz aydınlatılmamış ve ZEB2'nin regüle etmesi olası çok sayıda hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Farklı hücresel süreçlerde rol oynayan bu hedeflerin belirlenmesinde kromatin immünopresipitasyon yöntemi uygulanmış olmasına karşın kullanılan deney kurgusunda ZEB2'nin ektopik olarak ifade edilmesi sağlanmış ya da fare modellerinde çalışılmıştır. ZEB2'nin endojen olarak ifade edildiği insan hücre hatlarında kromatin immünopresipitasyon dizileme yoluyla ZEB2 hedeflerinin belirlendiği bir çalışma literatürde mevcut değildir.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Metanol, EDTA (Merck), Etanol (Merck), Agaroz (Lonza) ve RNase-ExitusPlus (AmpliChem), Proteaz inhibitörü (Roche), Proteinaz K (NEB), RnaseA (Thermo Scientific), polybrene (Millipore), doksisisiklin (Abcam) haricindeki tüm kimyasallar Fischer Scientific firmasından temin edildi.

5.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre besiyeri olarak düşük-glikoz ve yüksek-glikoz içerikli DMEM ile RPMI1640 (Gibco), besiyerleri, % 10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), düşük seviyede IgG (<0.005 mg/mL) içeren FBS (Super Low IgG FBS, Hyclone), 10X PenisilinStreptomisin (Gibco), 1X Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ve 10X Tripsin (Gibco) kullanıldı.

5.1.3. 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 (SIP1) gen ifadesinin SNU398 hücrelerinde baskılanmasında GIPZ Lentiviral shRNA partikülleri (Thermo Scientific) kullanıldı. İmmün çöktürme yönteminde protein G resin (Genscript) bilyeler kullanılarak antikor bağlandı ve ZEB2 proteini zenginleştirilerek Western blot yöntemi ile gösterildi. Kromatin-immünopresipitasyon deneylerinde ise manyetik bilyeler (Dynabeads, Lifetechnologies) kullanıldı. CHIP deneylerinde ZEB2 antikoruna ile elde edilen DNA

izolasyonu QIAQuick PCR saflaştırma kiti (QIAGEN) ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'nın miktarının belirlenmesinde Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) ile yapıldı. Kanser doku ve normal insan cDNA'larında gen ifade analizleri TissueScan qPCR Cancer Survey cDNA arrays I (CSRT101-OriGene) ile gerçekleştirildi.

5.1.4. Kullanılan Antikorlar

Doktora tez Danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI tarafından geliştirilen Monoklonal anti-ZEB2 antikorunu 6E5 hibridoma hücre süpernatantlarından elde edildi. GALNT3 (LS-C166355- LifeSpan BioSciences), tavşan poliklonal anti-MYC Tag (ab9106-Abcam), fare monoklonal anti-siklin D1 (sc-20044) ve anti-E-cadherin (sc8426-Santacruz) antikorları ise ticari olarak alındı. Western blotta yükleme kontrolü olarak α -tubulin (Genscript, A01410) ve β -aktin (Genscript, A00702), ikincil antikorlar olarak anti-fare HRP (Cell Signaling, 7076S) ve anti-tavşan HRP (Cell Signaling, 7074S) antikorları kullanıldı. Kromatin immünopresipitasyon deneylerinde kontrol antikorunu olarak fare izotip IgG2a (Millipore) antikorunu kullanıldı.

5.1.5. Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada GTU Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde stoklu 8 hepatoma (SNU182, SNU398, SNU423, SNU475, 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 ile indüklenilerek anlatımının gerçekleştirildiği epitel karakterli kolorektal kanser hücre hattı DLD1-ZEB2 kullanıldı.

5.1.6. İnsan Karaciğer Total RNA ve Oligonükleotidler

RT-qPCR deneylerinde kullanılan İnsan Karaciğer Total RNA ekstraktı Agilent Technologies'den, primerler ise Alpha DNA ve iontek firmasından temin edildi.

5.1.7. DNA 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) kullanıldı. Protein görüntülemelerinde kemilüminesan substratı Signalfire ECL reagent Cell Signaling firmasından alındı.

5.1.8. Kullanılan Çözeltiler

- 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 ddH₂O içinde çözülüp, pH 8,5 yapıldıktan sonra 500 ml'e ddH₂O 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 Na₂HPO₄.2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄. Bu bileşenler belirli miktar ddH₂O içinde çözülüp, pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye ddH₂O 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 MgCl₂, %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-merkaptioetanol, 200mM Tris (pH=6.8), %0,1 Bromofenol mavi.

- %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.
- %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.
- 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 olacak şekilde hazırlandı.

- 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.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Hücre Çözme İşlemi

Sıvı azot tankından alınan hücre hatları oda sıcaklığında geldiğinde, üzerine yavaşça %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve 8mM L-Glutamin ile desteklenen besiyeri eklendi ve 15 ml santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelleti besiyeri ile sulandırıldı ve 100 mm'lik kültür kabına ekim yapılarak 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

5.2.2. Hücre Kültürü ve Büyütülme Şartları

Hücreler 100 mm'lik kültür kabının %80-90'ını kapladıklarında besiyeri aspire edildi. Hücrelerin üzerine 1X PBS eklenerek hücreler yıkandı. 1X PBS aspire edilerek 3X tripsin eklendi ve hücreler kaldırıldı. Hücreler gerekli oranlarda pasajlanarak kültüre edilmeye devam edildi. SNU 182, 398, 423 ve 475 hücre hatları RPMI1640 besiyerinde, HUH-7, Hep3B, PLC/PRF/5, SK-HEP1 ve HEPG2 hücre hatları düşük – glikoz içerikli, 6E5 hibridoma hücre hattı ise düşük IgG içeren FBS destekli yüksek – glikoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü. DLD1-ZEB2 yüksek – glikoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü. Bu hücreler indükleneneği zaman besiyerine 2µg/ml doksisisiklin eklendi. Tüm besiyerlerine %10 FBS ve %1 Penisilin – Streptomisin antibiyotik karışımı eklendi.

5.2.3. Hücre Dondurma İşlemi

Hücreler stok yapma amacıyla dondurularak saklandı. 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 aktarılarak uzun süreli saklanmaları gerçekleştirildi.

5.2.4. 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. Lizis tamponu ile hücre pelleti lizis edildi. Ardından elde edilen lizat filtrelendi. Filtreden geçen sıvının üzerine RNA-bağlama solüsyonu eklendi. Bu üst sıvı kolona uygulanarak RNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Kolondaki tuzlar MDB (Membran Desalting Buffer) eklenerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Kolondaki DNA, rDNase kullanılarak parçalandı. Kolon yıkandı ve kurutuldu. Yüksek saflıkta RNA'nın elüsyonu 40 µl dH₂O kullanılarak yapıldı.

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

5.2.5. Agaroz Jel Elektrofizi

5.2.5.1. DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektrofizi

Agaroz jel, istenilen miktardaki toz agarozun 1X TAE tamponu içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. İçerisine 6 µl/100 ml olacak şekilde RedSafe (20.000X) boyası eklendi. RT – qPCR örnekleri, 6X DNA yükleme boyası ile son hali 1X olacak şekilde karıştırılıp jele yüklendi. Belirteç olarak ise 100 – 1000 baz çifti aralığında bantlar oluşturan DNA boyut belirteçi kullanıldı. Jelde yürütülen nükleik asitler, ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

5.2.5.1. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektrofizi

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.

5.2.6. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lerden 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 5.1) hazırlandı. Bu karışım PCR cihazına yerleştirildi ve 70°C'de 5 dk ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Primerlerin bağlanmasının ardından üzerine RT karışımı (Tablo 5.2) 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.

Table 5.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.

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

Table 5.2: Ters transkriptaz karışımı.

M – MuIv Reaksiyon Karışımı	0,8-3,78 µl
M – MuIv Enzim	2 µl
Toplam	2 µl

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.

5.2.7. 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 5.3). Primerler (Tablo 5.4) ile Maxima Sybergreen qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanılarak kitin önerdiği döngü şartlarında RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 5.5). Gen ifadesindeki değişim ise, $\Delta\Delta Ct$ formülü ile hesaplandı [66]. Normalizatör olarak GAPDH housekeeping geni kalibratör olarak da sağlıklı insan karaciğer hücrelerinden izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldı.

Table 5.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

2X master mix	10 µl
İleri primer (200 mM)	0,4 µl
Geri primer (200 mM)	0,4 µl
Kalıp cDNA (50 – 100 ng)	1 µl
N.F. dH ₂ O	8,2 µl
Toplam	20 µl

Table 5.4: RT-qPCR'da kullanılan Primer Listesi.

Gen Adı	İleri	Geri
ZEB2	5'CAAGGAGCAGGTAATCGCAAGT3'	5'GGAACCAGAATGGGAGAAACG3'
Fare ZEB2	5'-ACCGACTCAAGGAGACAGAT-3'	5'-GAGTGGATATGCTGTGGTTCTC-3'.
GADPH	5'GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT3'	5'CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA3'
GALNT3	5'-GGCACAACATCCAGAAGGAA-3'	5'-CATATCTGCTCTCCAGTGACAAC-3'.
MAP7	5'-GTGGACTTATCTTTGCCTTACCT-3'	5'-GCCAAACACAGTCAACATTCC-3'
BOK	5'-GATGGACTGATGTCCTCAAGTG-3'	5'-GGCAGCAGCACGAAGAA-3'

Table 5.5: RT-qPCR döngü şartları.

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

RT-qPCR reaksiyonlarında gen ifadesindeki değişim, $\Delta\Delta Ct$ formülünde aşağıdaki gibidir.

$$\Delta\Delta Ct = \frac{E_{Hedef}^{\Delta Ct_{Hedef}(Ct_{Kal} - Ct_{Örn})}}{E_{Norm}^{\Delta Ct_{Norm}(Ct_{Kal} - Ct_{Örn})}} \quad (5.1)$$

Formülde E_{Hedef} ; Hedef gene spesifik primerin etkinlik değerini, ΔCt_{Hedef} ; Hedef genin kalibratördeki Ct değeri (Ct_{Kal}) ile örnekteki Ct değerini, ($Ct_{Örn}$) arasındaki farkı, E_{Norm} ; Normalizatör gene spesifik primerin etkinlik değerini, ΔCt_{Norm} ; Normalizatör genin kalibratördeki Ct değeri (Ct_{Kal}) ile örnekteki Ct değeri ($Ct_{Örn}$) arasındaki farkı ifade eder.

$\Delta\Delta Ct$ formülünden elde edilen değerler log2 tabanında grafiğe geçirilerek gen ifadelerindeki değişim 2'nin katları şeklinde ifade edildi.

5.2.8. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Western Blot

Hücreler petrilere ekildi ve kültür kabını %80-90 oranında kaplamalarını takiben hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Soğuk 2 ml PBS varlığında hücre kazıyıcı ile kazınarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Tüpler +4°C'da 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edildi. Elde edilen hücre pelletleri buza alınarak hücre lizatı elde etmek amacıyla lizis protokolü uygulandı. Hücre pelletleri farklı lizis tamponları içinde çözüldükten sonra sonikatörde (Branson) %15 amplitüd'de 25 saniyelik aralar ile 5'er sn. sonikasyon işlemine tabi tutuldu. İşlem 4

defa tekrarlanarak hücrelerin lizis tampon içinde parçalanmaları sağlandı. Elde edilen hücre lizatlarına yükleme tamponu eklenerek örnekler 5 dakika kaynatıldı ve poliakrilamid jele yüklendi. SDS-PAGE 100 V' ta 2 saat yürütüldü. Proteinlerin PVDF membrana aktarımı ıslak transferle gerçekleştirildi (400 mA, 90 dakika). Transfer sonrası membran gece-boyu %1 Tween-20 içeren yağsız süt tozu ile bloklandı. Ertesi gün, membran primer antikor ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalanarak inkübe edildi. Yıkanan membran ikincil antikor olarak anti-mouse veya anti-rabbit HRP ile 1,5 saat muamele edildi. Bağlanmayan antikorların membrandan uzaklaştırılması amacıyla yıkama işleminde TBS-T kullanıldı. Signalfire (Cell Signaling) kemilüminesan substratı uygulanan membrandan protein görüntüleri Görüntü Analiz Sisteminde (Biorad) fotoğraflanarak dosyalandı.

5.2.9. İmmün-Çöktürme Yöntemi

Düşük ZEB2 gen ifadesinin saptandığı PLC/PRF/5 hücreleri ve yüksek ZEB2 gen ifadesinin saptandığı SNU398 ve SK-HEP1 hücreleri kullanılarak immünopresipitasyon (IP) deneyleri yapıldı. İmmün-çöktürme yönteminde her bir örnek için protein G resin bilyelerinden 100 ul alındı. Oda sıcaklığında 3500 rpm 3 dakika santrifüj edildi. Bilyeler 2 kere 1 ml NP40 tamponu ile yıkandı. 6E5 üst-sıvısı (ZEB2 monoklonal-antikor) ve 10 ml NP40 Buffer içinde 4 µg Ig2a izotip antikorunu, Protein G resin bilyeler ile gece boyu +4°C'ta inkübasyona bırakıldı.

150 x 20 mm petrielerde kültüre edilen hücreler, petri kabını %80-90 oranında kaplamalarını takiben PBS ile 2 kez yıkandı. Sonraki aşamada, 2 ml soğuk PBS varlığında hücre kazıyıcı ile kazınarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Tüpler +4°C'ta 1500rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edildi. Elde edilen hücre pelletleri buza alınarak hücre lizatı elde etmek amacıyla, lizis protokolü uygulandı. Hücre pelleti SDS lizis tamponu içinde çözüldükten sonra 30 dakika buzda bekletildi. Sonikatörde (Branson 250) %15 titreşim genliğinde (amplitüd) 25 saniyelik aralar ile 5' er sn sonikasyon işlemine tabi tutuldu. İşlem 5 defa tekrarlanarak hücrelerin lizis buffer içinde parçalanmaları sağlandı. Örnekler 14000 rpm 30 dakika +4°C'ta santrifüj edildi ve hücre debrileri ile birlikte SDS'in çökmesi sağlandı. Elde edilen lizatlardan 30' ar µl (input için) alınarak -80°C'ta saklandı.

İnkübe edilen Protein G resin bilye ve antikor karışımı 3500 rpm oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet NP40 tamponu ile 2 kere yıkandı. Yukarıda hazırlanışı tarif edilen hücre lizatı, bilye ve antikor karışımına eklendi ve proteaz inhibitörü içeren NP40 tamponu ile hacim 2 ml'ye tamamlandı. Gece boyu +4°C'ta inkübasyona bırakıldı. 3500 rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Pellete Laemmli tamponundan 50 µl eklendi ve karışım 10 dakika kaynatıldı. Aynı karışım sonrasında, 3500 rpm' de, oda sıcaklığında, 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst-sıvı SDS-PAGE'de kuyulara yüklendi. Western blot yönteminde bilyelere bağlanan ve primer antikor olarak aynı 6E5 üst-sıvıları kullanıldı. Sekonder antikor olarak anti-fare kullanıldı. Kemilüminesan substratı uygulanan membrandan protein görüntüleri görüntü analiz sisteminde (Biorad) fotoğraflanarak dosyalandı.

5.2.10. Kromatin İmmün-Çöktürmenin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

ChIP-WB yönteminde her bir örnek için protein G manyetik bilyelerinden 15 ul alındı. Oda sıcaklığında manyetik tüplükte 5 dakika bekletildi. Manyetik bilyeler PBS-BSA ile 2 kere yıkandı. 6E5 üst-sıvısına ve PBS-BSA karışımına bilyelerin birbirine yapışmasını önlemek amacıyla 1/10000 oranında Tween 20 eklendi. 6E5 üst-sıvısı (ZEB2 monoklonal-antikor) ve 4 µg Ig2a izotip antikor 10 ml PBS-BSA içinde protein G manyetik bilyeler ile gece boyu +4°C'ta inkübasyona bırakıldı.

Hücreler %80-90 büyüme oranına geldiklerinde %1 formaldehitte 10 dakika bekletilerek DNA-protein çapraz-bağı (crosslink) oluşturuldu. Formaldehit etkisi 125 mM glisin (5 dakika) ilavesiyle sonlandırıldı. Hücreler bu aşamada PBS ile 2 kez yıkandı. 2 ml soğuk PBS varlığında hücre kazıyıcı ile kazınarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Plazma membranı, proteaz inhibitörü karışımı ilave edilmiş PIPES tamponu ile buzda 10 dakika parçalandıktan sonra 1000 rpm 10 dakika +4°C'ta santrifüj işlemiyle çekirdek pelletleri elde edildi. Pelletler Nüklei Lizis tamponu içinde 10 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kromatinin parçalanması için sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. %20 titreşim genliğinde 30 sn. sonikasyon ve 30 sn. buzda bekletme döngülerinden oluşan 8 işlem gerçekleştirildi. Sonikasyon sonrası SDS'in ortamdaki uzaklaştırılması için 14000 rpm 15 dakika+4°C'ta santrifüj yapıldı. Elde edilen lizattan DNA'nın parçalanma etkinliğini

test etmek ve Western blot işleminde input olarak kullanılmak amacıyla 150 µl örnek alındı. PBS-BSA ve 6E5 üst-sıvısı ile doyurulan bilyeler 2 kere proteaz inhibitörlü NP40 Lizis tamponu ile yıkandı. Lizatlar ve bilyeler proteaz inhibitörlü NP40 tamponu içinde +4°C'ta gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün alınan örneklerde farklı yıkama tamponları denendi. 6E5 ChIP örnekleri 5 kere 1ml LiCl yıkama tamponu ile 3 dakika döndürülerek yıkandı. Örnekler 1 ml TE Solüsyonu ile 2 kere 10 dakika döndürülerek son yıkama yapıldı. Tamponun uzaklaştırılmasından sonra bilyelere 2X Laemmli buffer eklendi ve 10 dakika kaynatıldı. Elde edilen üst-sıvı SDS-PAGE'de kuyulara yüklendi. Western blot yönteminde primer antikor olarak bilyelere bağlanan aynı 6E5 üst-sıvıları kullanıldı. Sekonder antikor olarak anti-fare kullanıldı. Signalfire kemilüminesan substratı uygulanan membrandan protein görüntüleri görüntü analiz sisteminde (Biorad) alındı.

5.2.11. Kromatin İmmunopresipitasyon Yöntemi

Hücreler %80-90 büyüme oranına geldiklerinde formaldehit solüsyonunda 15 dakika bekletilerek DNA-protein çapraz-bağı (crosslink) oluşturuldu [67]. Formaldehit etkisi glisin (125mM, 5 dakika) ilavesiyle sonlandırıldı. Hücreler bu aşamada PBS-NP40 tamponu ile 2 kez yıkandı. 2 ml soğuk PBS varlığında hücre kazıyıcı ile kazınarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Hücreler 2 kere 10 ml PBS-NP40 tamponu ile yıkandı ve 1500 rpm 5 dakika +4°C de santrifüj yapıldı. Elde edilen pellete proteaz inhibitörü karışımı ilave edilmiş PIPES Lizis tamponu (10ml) eklendi ve buzda 10 dakika parçalandıktan sonra 1000 rpm 10 dakika +4°C'ta santrifüj işlemiyle çekirdek pelletleri elde edildi. Pelletler Nükleer Lizis tamponu içinde 10 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kromatinin parçalanması için sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. 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 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. Örneklerden her biri 5 kere 1ml LiCl yıkama tamponu ile 3 dakika döndürülerek sonrasında 1 ml TE tamponu içinde 2 kere 5 dakika döndürülerek son

yıkama yapıldı. 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 [68, 69].

5.2.12. ChIP-qPCR Verilerinin Analizi

İzole edilen input, izotip ve ZEB2-IP DNA'ları, 200 mM final ileri ve geri primerleri, Syber boyası içeren DNA polimeraz karışım ve nükleik asit içermeyen su ile hacim 20 µl'ye tamamlanarak ChIP-qPCR gerçekleştirildi. İlgilenilen DNA bölgelerinin primerleri primer 3 programı ile tasarlandı (Tablo 5.6).

Table 5.6: qPCR analizinde kullanılan primer listesi.

Gen Adı	İleri	Geri
LPCAT1_-22k promotor	5'CAAACCGGGAAGTCATCTTG3'	5'TGCACAAGGGTCTGTCTCG3'
CDH4_-35k promotor	5'AGATGCAGATGGGATGTAGC3'	5'TGCCTGTATTGCACCCACAC3'
ADARB2_+165k promotor	5'CGCCACCAGCATATAGAAGAG3	5'CAAAACAACACCCCTCACAGTC3'
miR200c-141 promotor	5'CAGGAGGACACACCTGTGC3'	5'TCCCCTGGTGGCCTTTAC3'
miR200b promotor	5'AAGGTGGGGCGGGACGGA3'	5'TGGGAGGCGGTGGCGAGGTG3'
MAP7 promotor - (-323-175)	5'-GACAGGTGAGCGCAGTC-3'	5'-CCGCTCTCCAGCCGAG-3'
BOK Promotor (+13394 - +13491)	5'-TCTTGTGTTGGAGCCTTCAG-3'	5'-CACCGTGACCAGAATATCA-3'
Galnt3 promotor1	5'TCCCGCCTGCTCTAACG3'	5'GACAGCAACCGGAGTCG3'
Galnt3 promotor2	5'GGCTCGGCTTCCACTTG3'	5'CGCGATCCAAGTTCTCAC3'

ChIP-qPCR 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 antikoru ve 6E5 ZEB2 antikoru ile indirilen DNA'dan elde edilen Ct değerleri

aşağıdaki formüle yerleştirilerek antikorların indirdiği kromatin miktarı % input olarak hesaplandı.

$$\% \text{ Input: } 100 \times 2^{[\% 100 \text{ Input Ct} - \text{IP-Ct}]} \quad (5.2)$$

5.2.13. ChIP-Dizileme

Antikorun ChIP için uygunluğunun saptanması, ZEB2-hedefi miR200 gen promotorunun özgül DNA amplifikasyonunun gösterilmesi ve dizileme için uygun boyutta DNA fragmentlerinin sonikasyonla elde edilebilmesi sonrasında ChIP-dizileme hizmeti alınacak Active Motif firmasına başvuruldu. Firma ChIP optimizasyon deney sonuçlarımızı tatmin edici buldu. SNU398 hücrelerinin kromatin lizatları ve 6E5 antikorunu firmaya iletildi ve ChIP dizileme işlemlerini firma gerçekleştirdi.

5.2.14. shRNA ile Kalımlı Baskılama Yöntemi

ZEB2 gen ifadesinin baskılandığı HCC hücre hattı elde etmek amacıyla Thermo Scientific GIPZ Lentiviral shRNA partikülleri kullanıldı. ZEB2 genini hedefleyen shRNA'yı bulunduran üç farklı lot lentiviral partikül (lot1: 5,39 x 10⁸ TU/ml, lot2: 4,65 x 10⁸ TU/ml, lot3: 2,90 x 10⁸ TU/ml) ile SNU398 hücreleri enfekte edildi. Kontrol olarak kullanılmak üzere hücreler herhangi bir gen hedeflemeyen (non-silencing) viral partikülleri ile enfekte edildi.

SNU398 hücrelerine %1 FBS ve 8 µg/ml polybrene varlığında 1/100 viral dilüsyon ile transdüksiyon yapıldı. 20-24 saat sonra, her bir kuyudan virüs içeren besiyeri aspire edilerek, %10 FBS içeren besiyeri konuldu. Hücrelerde GFP ışınması gözlenmeye başladı. Kalımlı klonların elde edilmesi amacıyla enfekte hücrelerin seçilimine (selection) 2,5 µg/ml puromisin ile başlandı ve ilk 2 pasajın ardından 5µg/ml puromisin oranında devam edildi.

Lentiviral shRNA transdüksiyon yapılmış hücrelerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapılarak RT-qPCR yapıldı. Ayrıca protein baskılanmasının gösterimi için transdüksiyon yapılmış hücrelerden lizat hazırlanarak ZEB2 protein ifadesinin kontrolü için SDS-PAGE Western blot yapıldı.

5.2.15. ChIP-Dizileme ile Belirlenen Hedef Gen Anlatımlarının ZEB2 Bağımlı Değişiminin Araştırılması

sh-RNA transdüksiyonu ve antibiyotik seçilimi sonrası elde edilen kalımlı ZEB2 baskılanması gerçekleşen ZEB2-shRNA ve kontrol hücre (NSC) klonları ZEB2 baskılanmasının modellenmesinde kullanıldı. Normal koşullarda ZEB2 anlatımı bulunmayan doksisiklin ile ZEB2 anlatımı gerçekleştirilebilen kolorektal kanser hücre hattı DLD-ZEB2 ve doksisiklin eklenmemiş besiyerinde büyütülen DLD-1 hücreleri ZEB2 anlatımının arttığı koşullarda ChIP-dizileme sonrasında belirlenen genlerin ZEB2 bağımlı anlatım değişimlerinin test edilmesinde kullanıldı.

Kültüre edilen hücrelerden yukarıda ayrıntılı olarak belirtilen şekilde protein lizati ve RNA izolasyonu gerçekleştirilerek Western Blot ve RT-qPCR uygulamaları gerçekleştirilerek hedef genlerin protein ve gen anlatım değişimleri belirlenmiştir.

5.2.16. ChIP-Dizileme Sonuçlarında Motif Analizi ve Hedef Genlerin Hücresel Fonksiyonları

ChIP-Dizileme sonucunda gelen hedef genlerin verdikleri pik noktasının ± 200 baz çiftlik uzağındaki diziler TOMTOM algoritmasıyla MEME veri tabanında (meme-suite.org version 4.12.0) incelenerek ortak motif analizi gerçekleştirildi [71]. ZEB2 hedeflerinin fonksiyonel analizlerinde “Protein Analysis Through Evolutionary Relationships” (PANTHER) analiz sistemi kullanıldı.

5.2.17. GALNT3 ve ZEB2 Gen İfadelerinin İnsan Kanser Örneklerinde İncelenmesi

ZEB2 ve GALNT3 gen anlatımları, herbir kanser için 9 tümör ve 3 normal insan örneği içeren, meme, kolorektal, böbrek, karaciğer, over, tiroid, akciğer ve prostat tümör cDNA dizinlerinde incelendi.

RT-qPCR dizinlerinde GALNT3 ve ZEB2 anlatımlarının tanımlanması deneyleri iki kere tekrarlandı. Her bir kanser için normal doku anlatım seviyeleri kalibratör olarak kullanıldı. Normalizatör olarak dizinler ile birlikte gelen β -Aktin primerleri kullanıldı. Gen anlatımının belirlenmesinde $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanıldı.

cDNA dizinlerimizde bulunan sekiz farklı kanser tipinin ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım seviyeleri expO (Expression Project for Oncology) veri kümeleri kullanılarak analiz edildi. Her iki genin in vivo protein seviyeleri İnsan Protein Atlas (Human Protein Atlas) (<http://www.proteinatlas.org>) veri bankasının kanser bölümündeki protein ifadeleri üzerinden incelendi. Protein değerinin hesaplanmasında proteinlerin yaygınlık ve şiddet değerleri kullanıldı

5.2.18. Kullanılan İstatiksel Analiz Yöntemleri

Hücre hatları ve cDNA dizinlerinde gen anlatım seviyelerinin istatistiksel analizlerinde Paired Student's *t* test kullanıldı. Anlamlı istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak belirtildi.

cDNA dizinleri, expO veri kümesi ve İnsan Protein Atlas verilerindeki ZEB2 and GALNT3 anlatım seviyelerinin korelasyonunun karşılaştırılmasında Pearson's Correlation Coefficient Hmisc 4.0.3 R paket versiyon 3.4.0 istatistik analiz yöntemi kullanıldı. Bulunan *r*-değerinin negatif bulunması iki değişken arasında ters ilişkinin bulunduğunu gösterirken, pozitif *r*-değeri her iki değişkenin aynı yönde değişim gösterdiğini belirtmektedir [72].

6. BULGULAR

6.1. HCC Hücre Hatlarında ZEB2 Gen İfadesi

ZEB2 geninin HCC hücre hatlarındaki anlatım profilini göstermek amacıyla 9 farklı HCC hücre hattından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar ile gerçekleştirilen RT-qPCR analizinde normal karaciğer RNA'sından elde edilen cDNA'ya göre HCC hücre hatlarındaki ZEB2 ifadesi belirlendi (Şekil 6.1). Fibroblast fenotipindeki SK-HEP1, SNU398 ve SNU 475 hücrelerinde ZEB2 ifadesinin normal karaciğere göre arttığı, aynı fenotipi gösteren SNU423 ile SNU182 hücrelerinde ise hafif bir azalma gösterdiği bulundu. Buna karşın epitel fenotip gösteren HepG2, HUH7, Hep3B ve PLC hücre hatlarındaki ZEB2 ifadesinde belirgin bir düşüş olduğu görüldü.

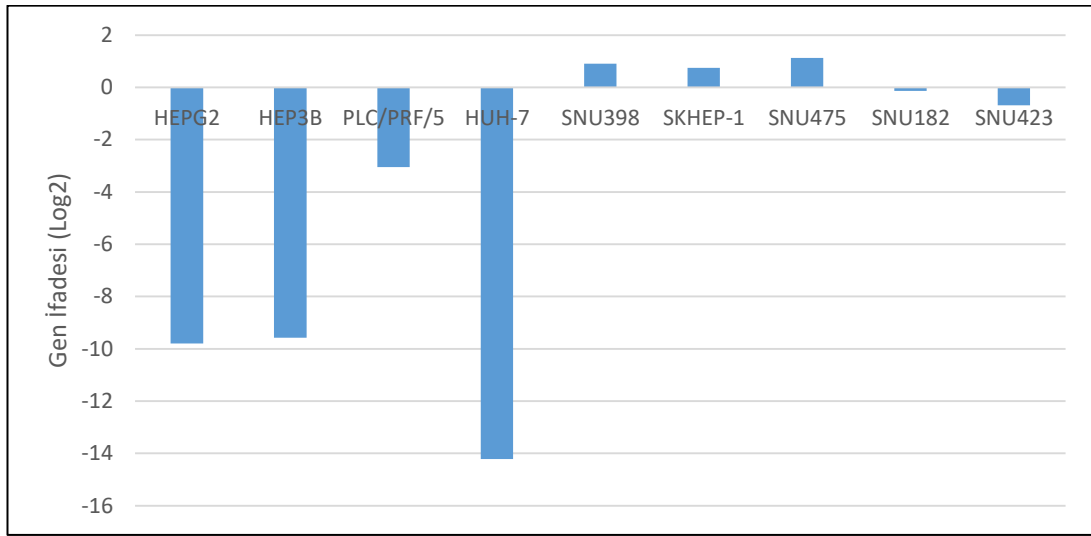
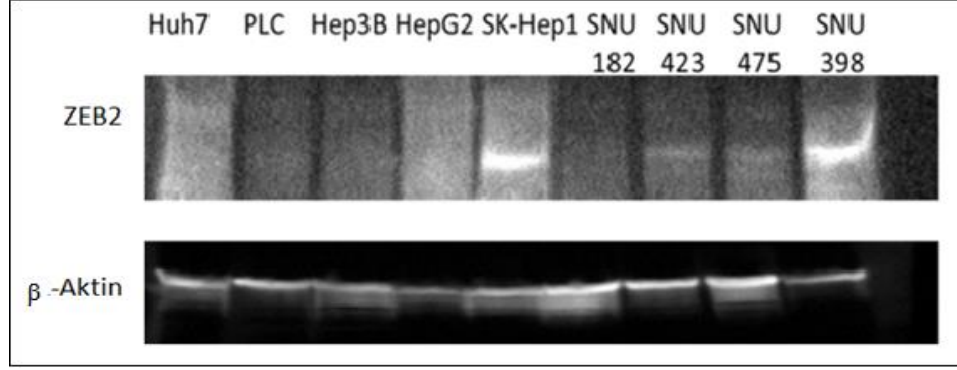


Figure 6.1: ZEB2 geninin HCC hücre hatlarındaki göreceli ifadesi. Kontrol olarak normal karaciğer RNA'sı kullanılmıştır (Total RNA). Gen ifadeleri GAPDH ile normalize edilmiştir.

6.2. Anti-ZEB2 Monoklonal AntikorUNUN HCC Hücre Hatlarında Test Edilmesi

HCC hücre hatlarında 6E5 antikorunu kullanılarak endojen ZEB2 protein ifadesi test edildi. HCC hücre hatlarından elde edilen total hücre lizatı ile yapılan Western

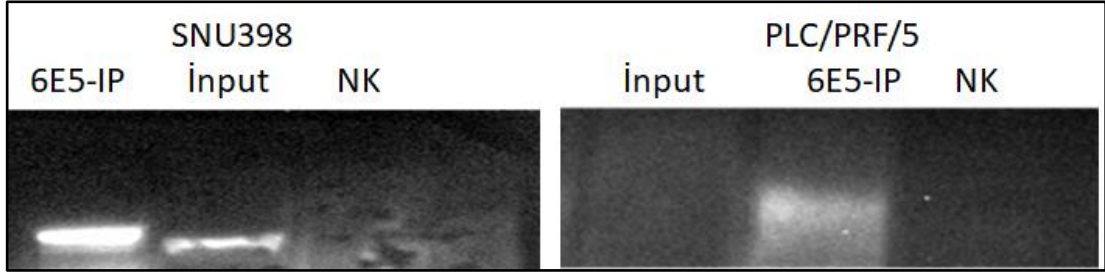
blot çalışmasındaki bulgular gerçek-zamanlı PCR sonuçlarını doğrular nitelikteydi (Şekil 6.2). En güçlü protein ifadesinin SNU398 ve SKHep-1 hücrelerinde olduğu ve daha az olmakla birlikte SNU475 ile SNU423 hücrelerinin de ZEB2 proteinini ifade ettiği saptandı.



Şekil 6.2: HCC hücre hatlarında ZEB2 protein ifadesi. Total hücre lizatlarının transfer edildiği membran 6E5 monoklonal antikoruna ile prolanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır.

6.3. Monoklonal 6E5 antikorunun İmmün-Çöktürme Yönteminde ZEB2 Proteinini Zenginleştirilmesi

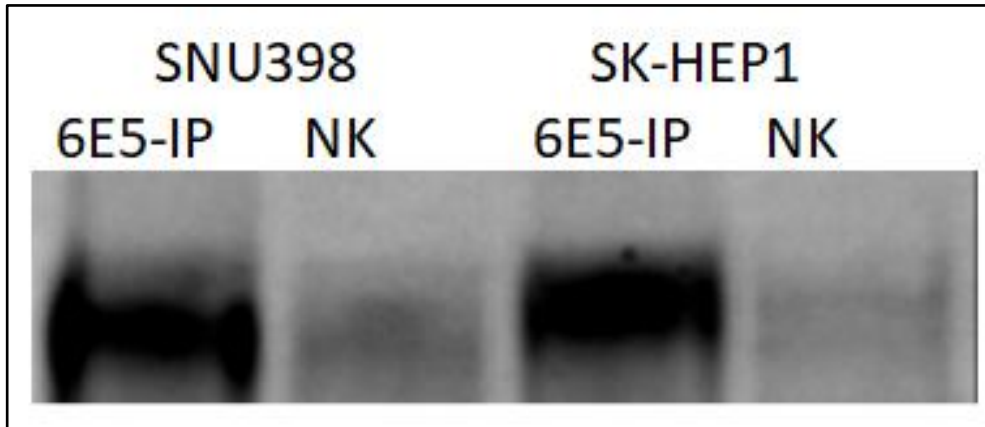
ChIP ve ChIP dizileme deneylerinde kullanılacak olan antikorların proteinlerin doğal konformasyonunu tanıması gerektiğinden endojen ZEB2 ifadesi yüksek SNU398 ve düşük PLC/PRF/5 hücre lizatları ile 6E5 monoklonal anti-ZEB2 antikoruna kullanılarak immünopresipitasyon (IP) yapıldı. SNU398 ve PLC/PRF/5, hücre lizatı (input), izotip antikor IP (NK) ve 6E5 IP yüklenerek gerçekleştirilen SDS-PAGE ve Western blotlaması sonrasında, ZEB2 proteinini zenginleştirdiği gösterildi (Şekil 6.3).



Şekil 6.3: SNU398 ve PLC/PRF/5 hücre lizatlarında 6E5 antikoru kullanılarak gerçekleştirilen immunopresipitasyon deneyi. Western-Blot membranında inputa göre 6E5-IP örneğinin daha kalın bir bant vermesi IP ile ZEB2 proteinin zenginleştiğini göstermektedir. NK: Negatif kontrol (izotip kontrol), M: Marker.

6.4. 6E5 Antikorumun ChIP Uygunluğunun Test Edilmesi

SNU398 ve SK-HEP1 hücrelerinin lizatları ChIP protokolüne uygun bir şekilde hazırlandı. Hücrelerden formaldehit fiksasyonu sonrasında elde edilen nükleer pelletler lizis tamponunda çözülerek DNA'nın da parçalanması amacıyla sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Bu şekilde elde edilen kromatin kompleksine 6E5 antikoru ile IP uygulandı ve immün çöktürmeler SDS-PAGE'de yürütülerek Western blot işlemi gerçekleştirildi. İzotip antikoru ile yapılan IP'da herhangi bir bant görülmezken 6E5 antikorumun ZEB2 proteinini ChIP koşullarında da indirebildiği gösterildi (Şekil 6.4).



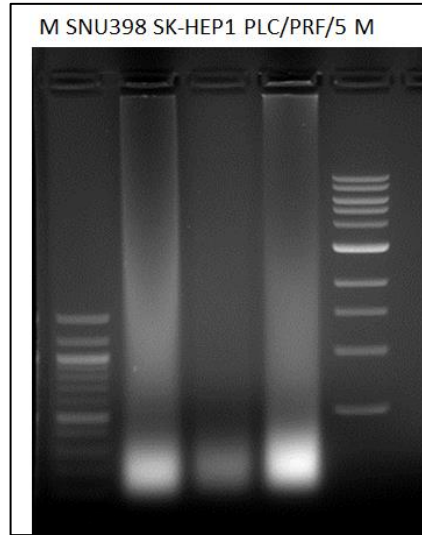
Şekil 6.4: SNU398 ve SK-HEP1 hücrelerinde ChIP Western çalışması. 6E5 antikorumun izotip antikorla karşılaştırıldığında ZEB2 proteinini özgül olarak çöktürebildiği görülmektedir. İzotip kontrol antikoru ile çöktürülen lizatta görülen düşük yoğunluklu sinyal non-spesifik bir bağlanma olup ChIP uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. NK: negatif kontrol (izotip antikoru).

6.5. ChIP Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmalar kapsamında 6E5 antikoru ile çöktürülen kromatin kompleksinden elde edilen DNA boyutunun ChIP-dizileme için uygunluğu ve ChIP-DNA'sı ile yürütülen qPCR'da ZEB2 hedeflerinden miR200c-141 promotör bölgesinin zenginleştirilme oranı araştırıldı.

6.5.1. Sonikasyon Çalışmaları

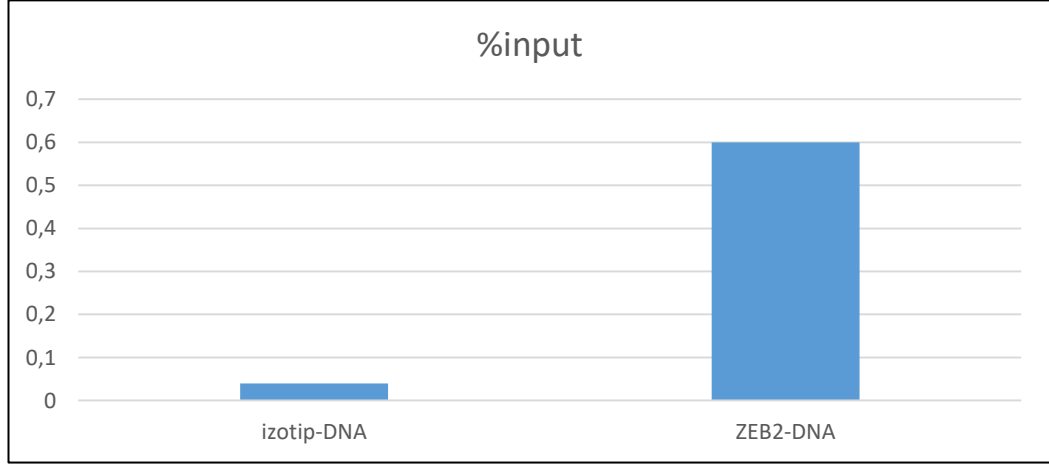
ChIP dizileme aşamasına geçebilmek için sonikasyonla parçalanmış DNA fragmentlerinin 100-300 bp uzunluğunda ve ağırlıklı olarak da 250 bp'lik fragmentler halinde kümelenmesi gerekmektedir. Formaldehitte fikse edilmiş SNU398, SK-Hep1 ve PLC/PRF/5 hücre lizatlarına %25 titreşim genliğinde 20 s. sonikasyon ve 30 s. buzda bekletme döngülerinden oluşan SNU398 için 22, SK-Hep1 için 15 ve PLC/PRF/5 için de 13 sonikasyon döngüsü uygulandı. Sonikasyon sonrasında 6E5 ile çöktürülen kromatin kompleksleri yıkama işlemlerinden sonra 65°C'de tüm gece tutularak de-crosslink edilen ChIP-DNA saflaştırıldı ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 6.5).



Şekil 6.5: SNU398, SK Hep1 ve PLC/PRF/5 hücre kromatinlerinde sonikasyon işlemi. DNA'nın ChIP-dizileme için istenen 100-300 bp düzeyinde kümelendiği görülmektedir. M: marker.

6.5.2. ChIP qPCR Çalışmaları

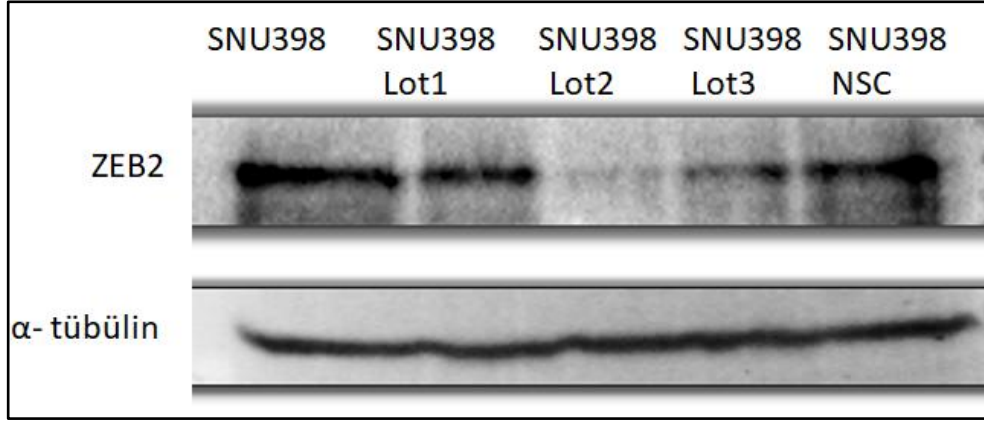
SNU398 hücrelerinden 6E5 ve izotip antikorları ile indirilen ChIP DNA'ları miR200c-141 gen kümesinin promotor bölgesindeki E-box dizilerini de içeren bölgeye yönelik primerler kullanılarak qPCR ile test edildi. miR200c-141 geni için 15 (0,6/0,04) kat zenginleşme sağlanmıştır (Şekil 6.6).



Şekil 6.6: İzotip (IgG2a) ve 6E5 (ZEB2) antikorları ile zenginleştirilen kromatin yüzdelерinin karşılaştırılması. ChIP DNA'sında miR200c-141 promotor bölgesi ZEB2 antikoru ile izotip antikora göre 15 kat zenginleştirilmiştir.

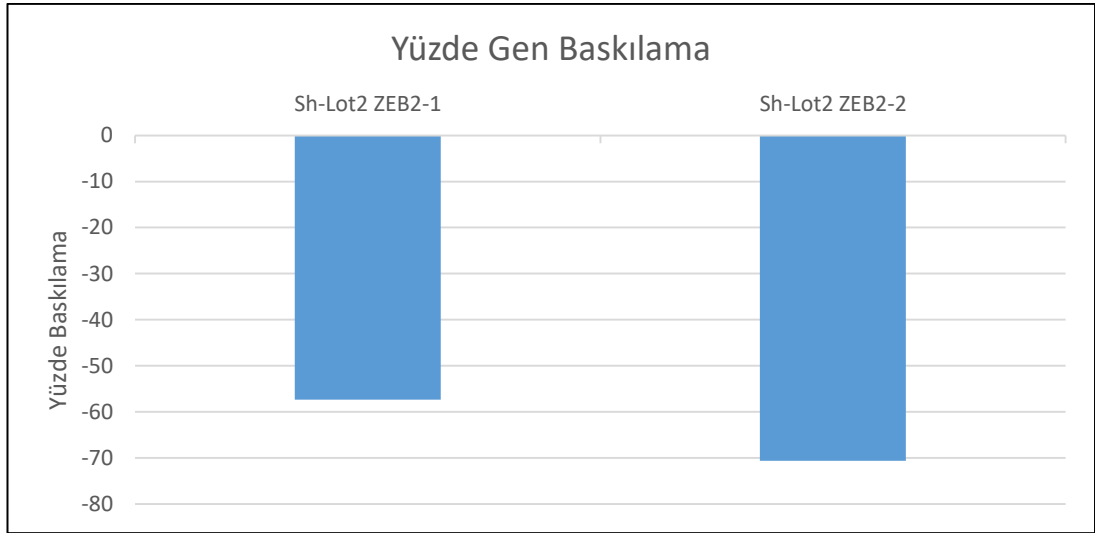
6.6. SNU398 shRNA Klonlarının Geliştirilmesi

ChIP-dizileme sonucu elde edilecek olan ZEB2 hedeflerinin proteinin varlığı ve yokluğunda test edilebilmesi için yüksek ZEB2 ifadeli SNU398 hücreleri ZEB2 transkriptinin farklı bölgelerine yönelik shRNA'yı bulunduran üç farklı lot lentiviral partikülle enfekte edildi (Şekil 6.7). Kontrol olarak susturma etkinliği bulunmayan shRNA lentiviral partikülleri kullanıldı (NSC: Non-Silencing Control). Enfekte edilmiş hücreler puromisin antibiyotiği ile seçilerek kalımlı shRNA klonlarının elde edilmesi sağlandı.



Şekil 6.7: SNU398 hücreleriyle shRNA klonlarında ZEB2 ifadesi. SNU398 hücre lizatlarında ZEB2 proteininin monoklonal anti-ZEB2 antikorunu kullanarak Western Blot yöntemiyle gösterimi. Anti α -tübülin antikorunu eş-yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. NSC: Non-Silencing Kontrol.

Protein baskılaması tespit edilen lot2 ZEB2-shRNA klonu ve NSC kontrol klon hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İki farklı ZEB2 primeri ile gerçekleştirilen RT-qPCR analizi sonucunda lot2 ZEB2-shRNA klonunda hem transkript hem de protein düzeyinde baskılamanın gerçekleştiği belirlendi ve sonraki çalışmalara bu klon ile devam edildi (Şekil 6.8).

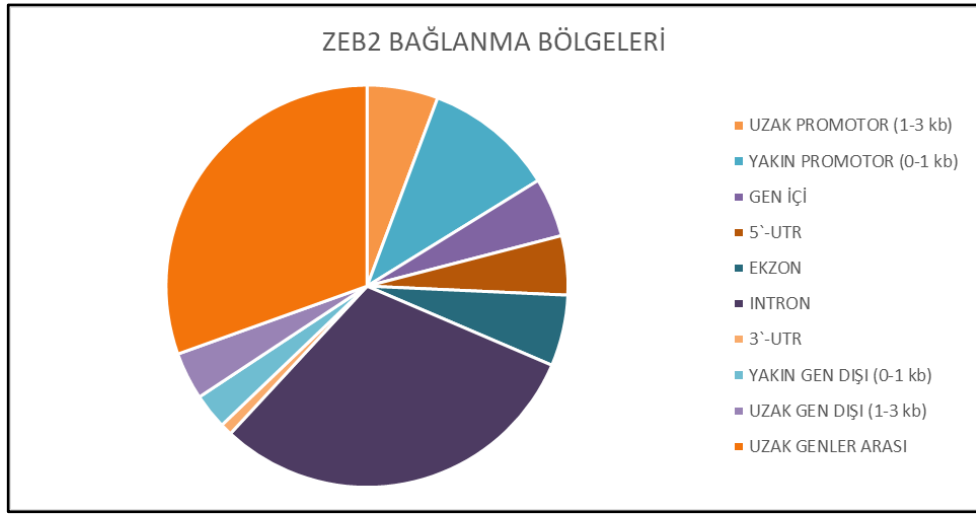


Şekil 6.8: Tasarlanan iki ZEB2 primeri ile gerçekleştirilen RT-qPCR analizinde ZEB2-shRNA Lot2 klonunda ZEB2 anlatımının % baskılama oranları.

6.7. ChIP-Dizileme Sonuçları

ChIP için valide edilen anti-ZEB2 monoklonal antikoru (6E5) kullanılarak Active Motif firmasında gerçekleştirilen ChIP-Dizileme analizi sonucunda SNU398 hücrelerinde ZEB2 bağlanma bölgeleri belirlendi. ChIP-dizileme sonuçları Gene Expression Omnibus (GEO) veri bankasına GSE103048 veri numarası ile yüklendi.

ZEB2-bağlı DNA fragmentleri ile input DNA fragmentlerinin 21 milyon okuma değerleri MACS algoritması ile referans insan genomu (hg19) ile karşılaştırılarak analiz edildi ve 554 genomik aralık (interval) tespit edildi. Bu intervallerin analizi ile ZEB2'nin 509 gen bölgesine bağlandığı bulundu. ZEB2-bağlanma bölgelerinin sıklığı, uzak promotor (1-3 kb, %6), yakın promotor (0-1 kb, %10), gen içi (%5), 5' (%5) ve 3' UTR (%1) (Untranslated Region), ekzon (%6), intron (%32), yakın gen-dışı (0-1 kb, %3), uzak gen-dışı (1-3 kb, %4) ve uzak genler arası (%34) belirlendi (Şekil 6.9).



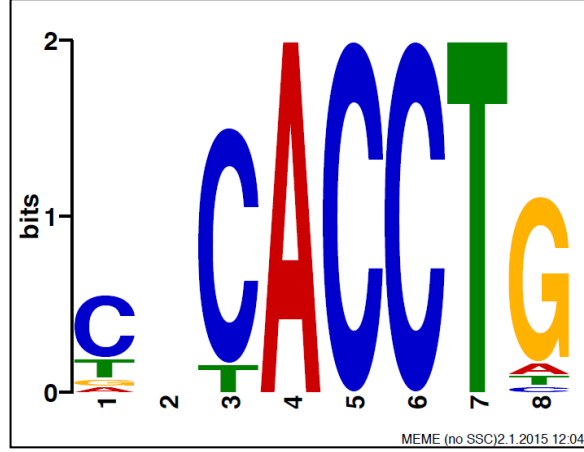
Şekil 6.9: SNU398 ChIP DNA ZEB2 bağlanma bölgelerinin genom dağılımı.

6.8. ChIP-Dizileme Hedeflerinin Motif ve Biyolojik İşlev Analizi

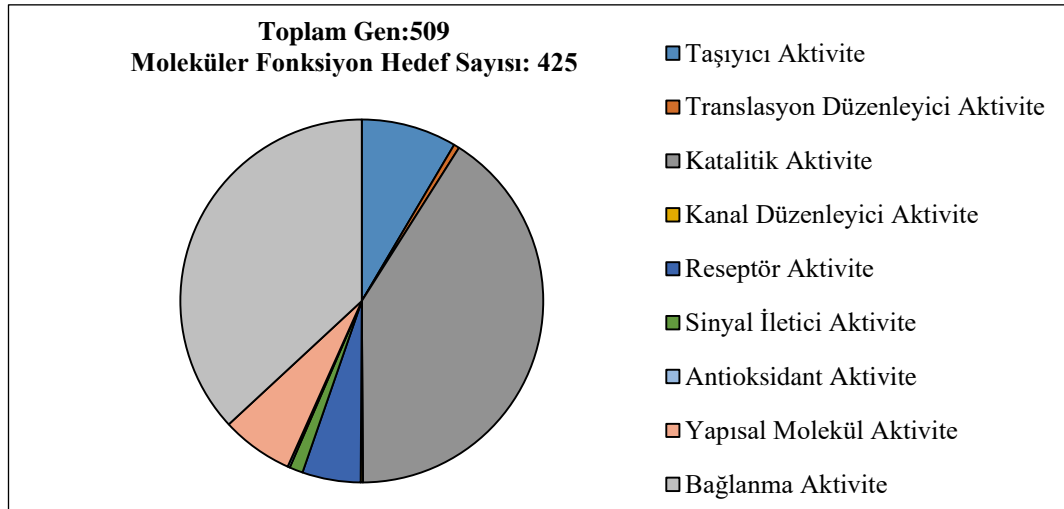
ZEB2 hedefi olarak tanımlanan 509 genin MEME-TOMTOM motif analizi sonucunda konsensüs E-box dizisi olan “CACCTG” motifi belirlendi (Şekil 6.10).

PANTHER veri tabanında 509 hedef genin Gen Ontoloji olarak sınıflandırılması yapıldı. ZEB2 hedefi olarak belirlenen 509 genin çok sayıda farklı

hücresel fonksiyonda rol oynadığı belirlendi. Özellikle fonksiyonel sınıflandırma grubunda katalitik fonksiyon grubunun iki alt grubu olan kinaz aktivitesi ve enzim düzenleme aktivitelerinin bulunduğu gruplar anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 6.11).



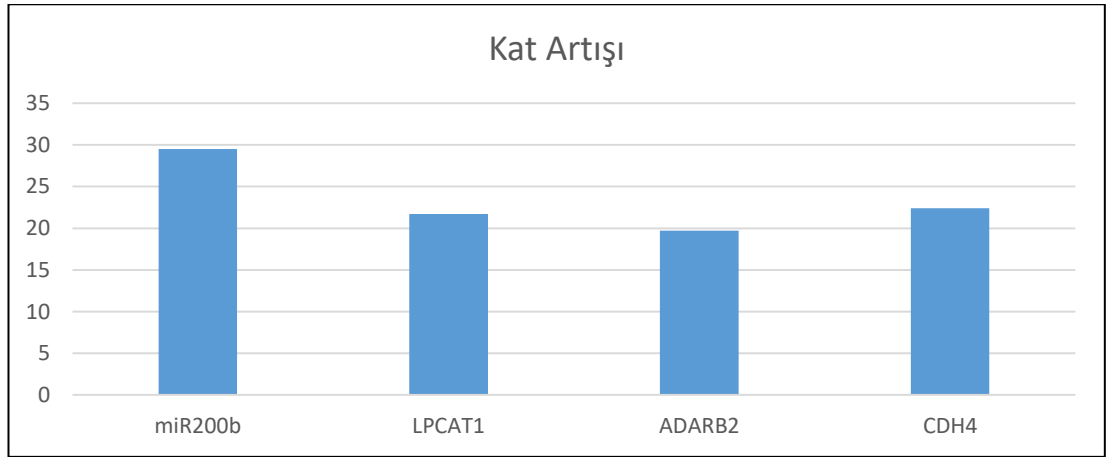
Şekil 6.10: MEME TOMTOM analizi. SNU398 hücre hatlarında gerçekleştirilen ChIP-dizileme sonuçlarında ZEB2 proteininin hedef dizilerinde belirlenen konsensus dizi motifi (CACCTG).



Şekil 6.11: ZEB2 hedef genlerinin gen ontolojilerine göre moleküler fonksiyon sınıflandırılması. Hedef genlerin moleküler fonksiyonlarına göre oluşturdukları grupların yüzdeleri, 8,5 taşıyıcı, 0,5 translasyon düzenleyici, 40,9 katalitik, 0,2 kanal düzenleyici, 5,2 reseptör, 1,2 sinyal iletici, 0,2 antioksidant, 6,40 yapısal molekül ve 36,9 bağlanma aktivite olarak tespit edildi. PANTHER veri tabanı ve Bonferroni analiz sistemi kullanılarak yapılan sınıflandırmada katalitik aktivite grubunda 134 kat zenginleşme olduğu ve bu zenginleşmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.01$). Katalitik aktivite grubunun alt grupları olan kinaz aktivitesi ve enzim düzenleme aktivitelerinin de zenginleşme oranlarının yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

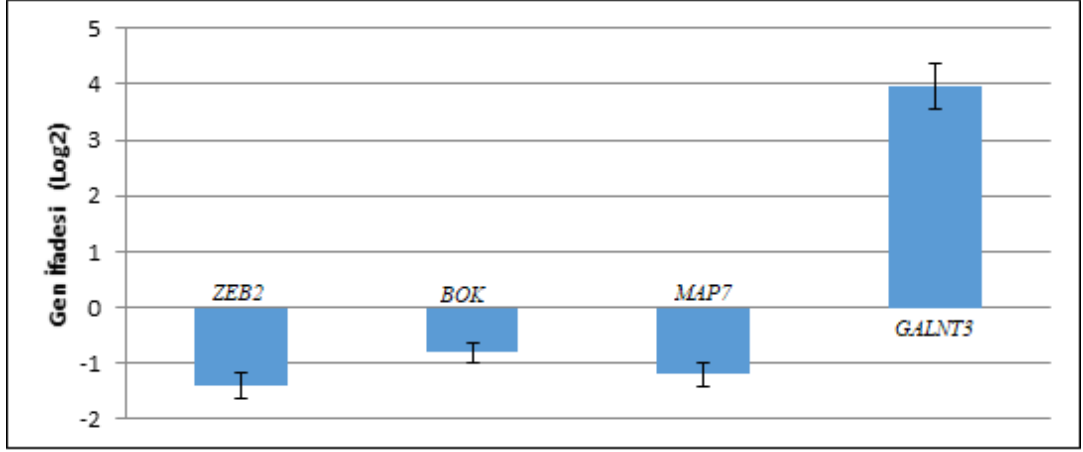
6.9. ChIP Dizileme Sonuçlarının Validasyonu ve Belirlenen Hedeflerde ZEB2-Bağımlı İfade Değişiminin Gösterilmesi

ChIP-dizileme sonuçlarının validasyonunda interval bölgede çoklu E-box dizisi içeren CDH4, ADARB2, LPCAT1 gen bölgeleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca, daha önceki çalışmalar ile ZEB2'nin bağlanarak gen regülasyonu sağladığı bilinen miR200b konsensüs bölgesinin zenginleşme oranı da pozitif kontrol olarak kullanıldı [73]. 6E5 antikoru ile çöktürülen DNA fragmentlerinin izotip kontrole göre zenginleşme oranları miR200b (29,5), CDH4 (22,4), ADARB2 (19,7) ve LPCAT1 (21,7) genleri için belirlendi. (Şekil 6.12).



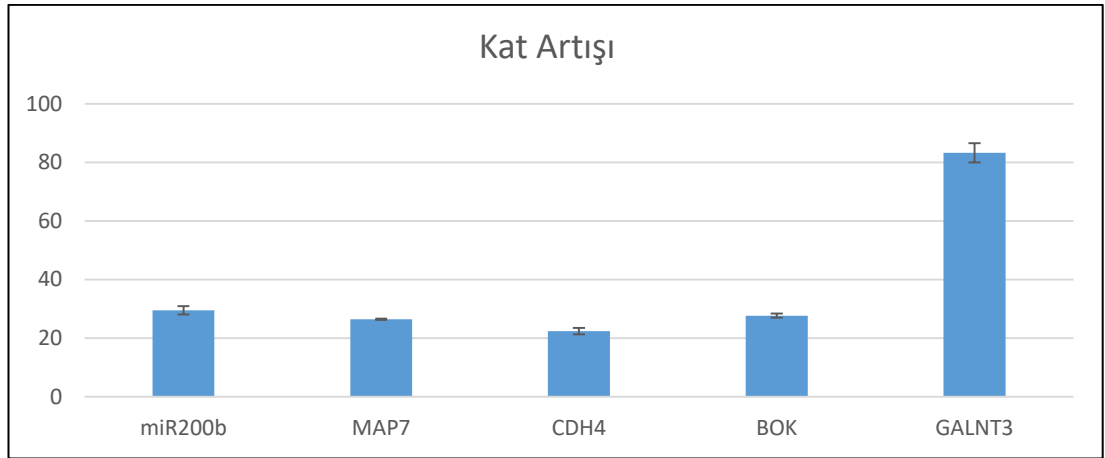
Şekil 6.12: ChIP-dizileme sonuçlarının qPCR ile validasyonu. ChIP DNA'larının negatif kontrole oranla zenginleşme oranlarının gösterimi.

ChIP validasyon çalışması sonrasında yüksek pik değeri, ZEB2 bağlanma motifi bulunması ve/veya bağlanma bölgesinin olası promotor bölgesinde (Transkripsiyon Başlama Bölgesine göre - 7500 bp - +2500 bp aralığında) bulunmasına göre 509 gen hedefinden 62 (Ek A.) gen seçilerek ZEB2-bağımlı gen anlatım değişimi ZEB2-shRNA klonunda RT-qPCR yöntemi test edildi. (Şekil 6.13).



Şekil 6.13: SNU398-shZEB2 hücrelerinde ZEB2-bağımlı gen ifadesi değişimi gösteren genler.

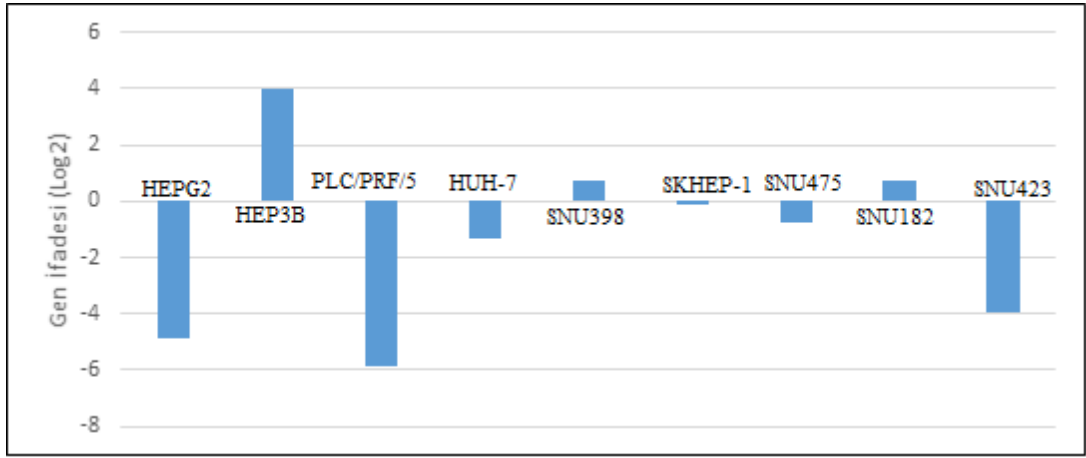
Analiz sonucunda MAP7, BOK ve GALNT3 gen ifadelerinde değişim belirlendi. ZEB2'nin baskılandığı klon ile kontrol klonunun karşılaştırılması sonrasında MAP7 ve BOK genlerinin anlatımının Log2 tabanında sırasıyla -1.2 ve -0.8 kat değişim gösterdikleri belirlendi. BOK ve MAP7 anlatım değerlerinin azalmasına karşın GALNT3 geni Log2 tabanında 3.96 kat arttı. Bu sonuçlar ile ZEB2 gen anlatımı ile MAP7 ve BOK gen anlatımları arasında pozitif, GALNT3 ile ise negatif korelasyon belirlendi. Bu genlerin ZEB2 bağlanmasına bağlı olarak değişim gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ChIP-PCR sonuçları MAP7 için 25.5, BOK için 27.8 ve GALNT3 için 85 kat zenginleşmeyi ortaya çıkardı (Şekil 6.14).



Şekil 6.14: Hedef genlerin ChIP-qPCR ile validasyonu. 6E5 antikoruna ile indirilen kromatin komplekslerinde ZEB2 bağlanma bölgelerindeki DNA amplifikasyonunun izotip-DNA'ya oranı. miR200b ve CDH4 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

6.10. GALNT3 Geninin HCC Hücre Hatlarında İfade Analizi

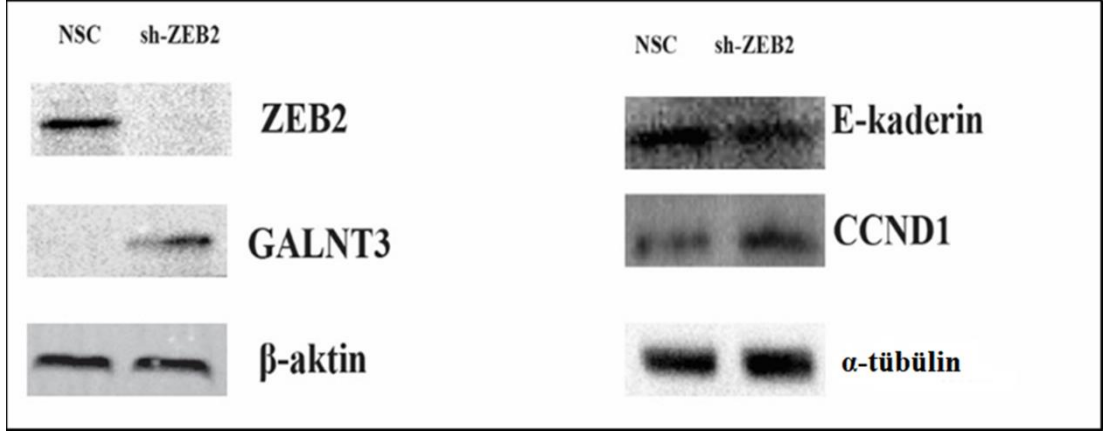
GALNT3 geninin HCC ifade profili dokuz hücre hattında incelendi. HCC hücre hatlarındaki GALNT3 ifadesi sağlıklı karaciğer cDNA'sından elde edilen amplifikasyonlara göre kalibre edildi. RT-qPCR sonuçlarında, GALNT3 ifadesi SNU398 ve SNU182 hücrelerindeki hafif yükselmenin yanında sadece Hep3B'de artmış, diğer hücre hatlarında ise sağlıklı insan karaciğer örneğine göre azalmış olarak bulundu (Şekil 6.15).



Şekil 6.15: HCC hücre hatlarında GALNT3 geninin ifadesi. Gen ifadeleri sağlıklı karaciğere göre kalibre edilmiştir.

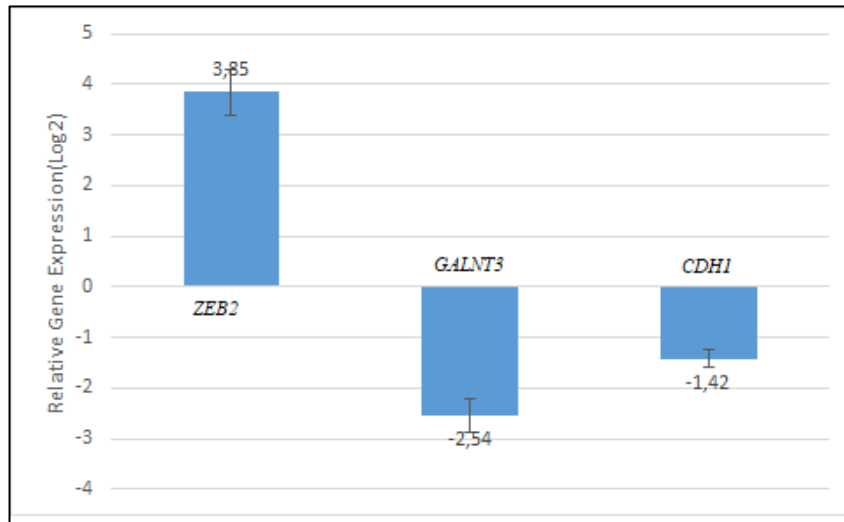
6.11. İnsan Kanser Hücre Hatlarında ZEB2-Bağımlı GALNT3 Anlatım Değişimlerinin Belirlenmesi

ZEB2'nin baskılandığı ZEB2-shRNA hücre klonunda GALNT3 ifadesindeki artış ve 6E5 CHIP-DNA'sında GALNT3'ün yüksek zenginleşmesinin belirlenmesi sonrasında ZEB2-bağımlı GALNT3 protein anlatımı değişimleri insan kanser hücre hatlarında detaylı bir şekilde incelendi. İlk olarak, ZEB2 baskılanmış sh-ZEB2 klonlarında saptanan protein ifade değişimlerinin gen ifade değişimleri ile (Şekil 6.13) aynı profili gösterdiği belirlendi. (Şekil 6.16).



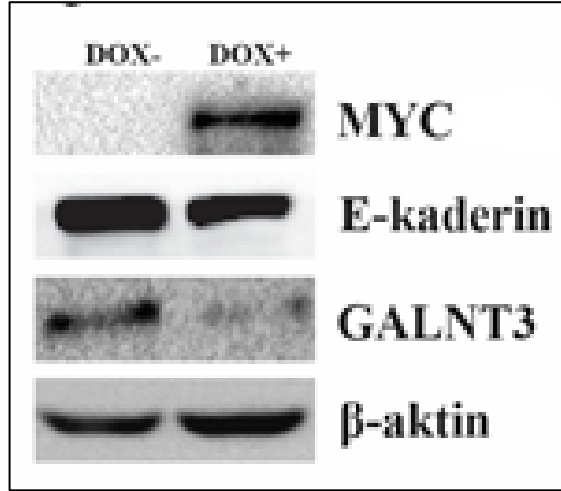
Şekil 6.16: SNU398 sh-ZEB2 ve kontrol (NSC) klonlarında ZEB2, GALNT3, Siklin D1 (CCND1), E-kaderin protein ifadelerinin Western blot gösterimi. Eşit yükleme kontrolü için β-Aktin ve α-tübülin proteinleri kullanıldı.

ZEB2'nin azaldığı koşullarda GALNT3'ün hem transkript hem de protein ifadesinin arttığı belirlendi. GALNT3 gen ve protein ifadelerinin ZEB2'nin arttığı koşullarda analizi ise ZEB2 ifadesinin doksisisiklin ile indüklenbildiği DLD1 kolorektal kanser hücrelerinde gerçekleştirildi. Doksisisiklin ile indüklenen hücrelerde kontrole göre ZEB2 transkript miktarının 3.85 kat arttığı, buna karşın, CDH1 anlatımının 1.42 ve GALNT3 ifadesinin ise 2.54 kat azaldığı tespit edildi. (Şekil 6.17).



Şekil 6.17: Doksisisiklin ile indüklenen DLD-1 hücrelerinde ZEB2, GALNT3 ve CDH1 ifade analizi. Doksisisiklin ile ZEB2 anlatımının gerçekleştirilmesi sonrasında RT-qPCR analizi ile belirlenen gen ifade değişimleri gösterilmiştir. GAPDH normalizatör, indüklenmeyen DLD-1 hücrelerinin anlatımı kalibratör olarak kullanılmıştır. Gen ifadeleri $\Delta\Delta Ct$ ile hesaplanmıştır.

Hücrelerden hazırlanan lizatlar ile gerçekleştirilen Western blotlama sonuçlarında gen ifade değişiminde belirlenen değişim proteinlerde de gözlemlendi. ZEB2 anlatımının indüklendiği kolorektal kanser hücrelerinde ZEB2'nin arttığı GALNT3'ün ise azaldığı belirlendi (Şekil 6.18).

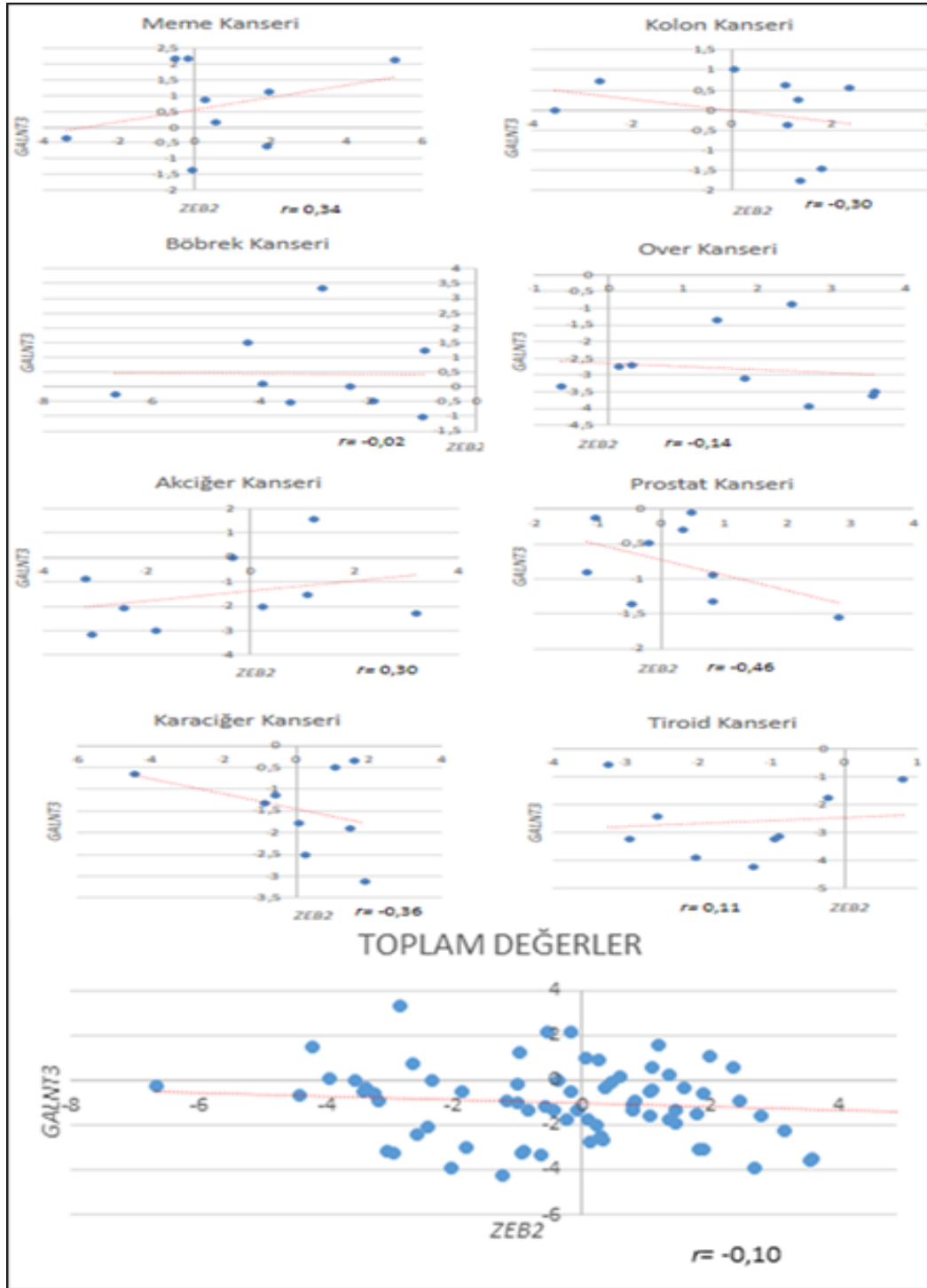


Şekil 6.18: DLD-1 hücrelerinde Doksisisiklin ile indüklenen (DOX+) ve indüklenme yapılmayan (DOX-) hücrelerde protein ifadesi. Western Blot ile MYC ekli anlatımı gerçekleşen ZEB2, E-kadherin, GALNT3 protein ifade değişimleri belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanıldı.

6.12. İnsan Kanser Örneklerinde ZEB2 ve GALNT3 İfadelerinin Karşılaştırmalı Analizi

İnsan kanser hücre hatlarında ZEB2 ve GALNT3 arasında belirlenen ters korelasyonun in vivo koşullarda insan tümör dokusu örneklerindeki geçerliliği test edildi. Bu kapsamda ilk olarak sekiz farklı kanser tipini barındıran ve her kanser tipi için üç normal ve dokuz kanser örneğini içeren cDNA dizinleri analiz edildi. Kontrol grubuna göre kalibre edilen sonuçlarda, ZEB2 anlatımının çoğu kanser tipinde azaldığı sadece meme kanserinde orta düzeyde arttığı belirlendi. GALNT3 anlatımının ise, over kanserinde belirgin artışı buna karşın böbrek kanserinde belirgin azalışı tespit edildi. ZEB2 ve GALNT3 gen ifadelerinin Student t-test analizlerinde anlamlı farklılık ($p < 0,05$) over, böbrek, prostat, karaciğer ve tiroid kanserlerinde belirlendi (Tablo 6.1). In vitro çalışmalarımızda belirlediğimiz ZEB2 ve GALNT3 arasındaki negatif korelasyon karaciğer, kolon, prostat, over ve böbrek kanserlerinde

de saptanırken, meme, akciğer ve tiroid kanserlerinde pozitif korelasyon tespit edildi (Şekil 6.19 ve Tablo 6.1).

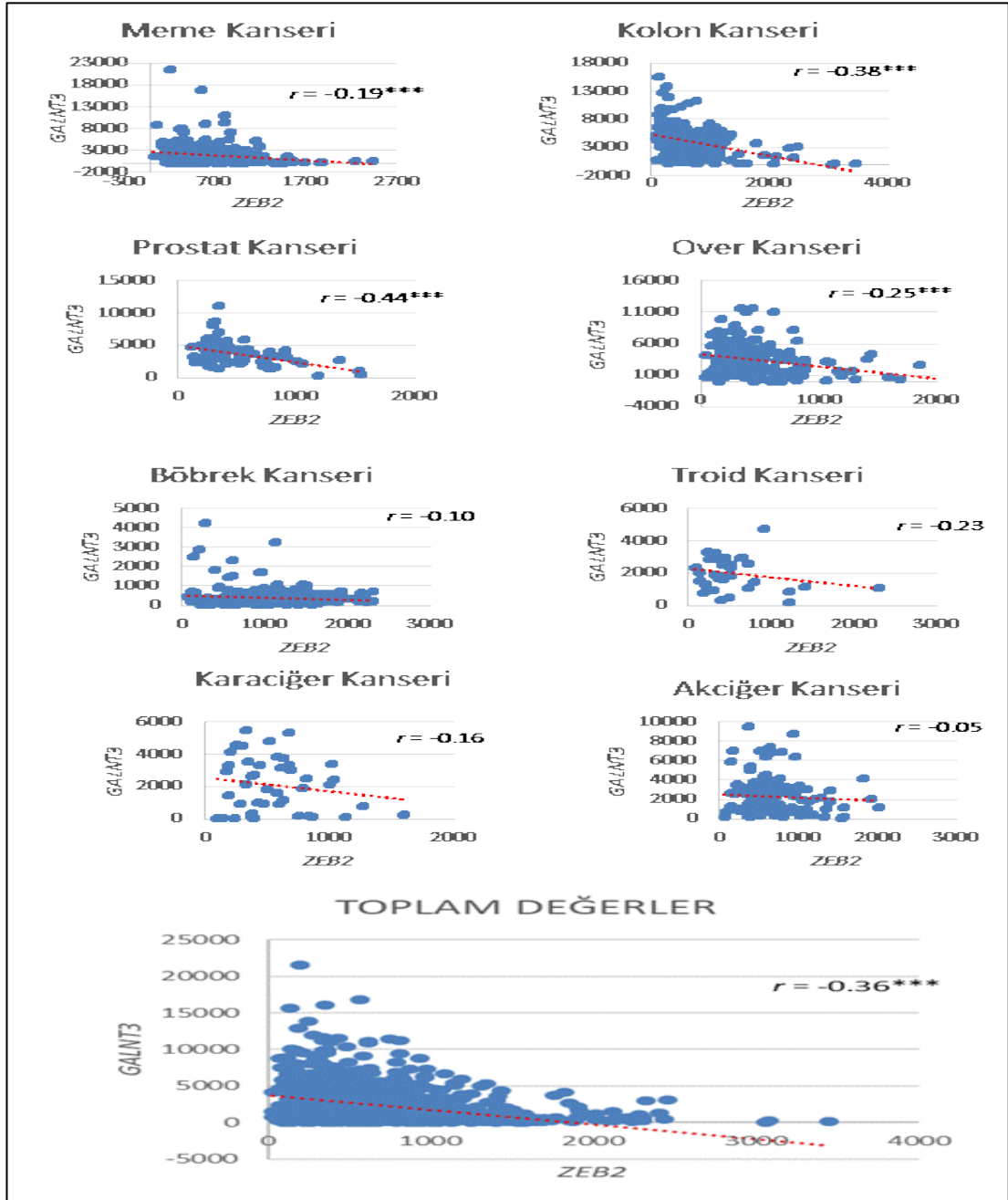


Şekil 6.19: İnsan kanser cDNA dizinlerinde ZEB2 ve GALNT3 gen ifadelerinin korelasyon grafikleri. Normale göre kanser dokularında saptanan ZEB2 ve GALNT3 gen ifadeleri arasındaki korelasyon Pearson Correlation Coefficient analizi ile hesaplandı. Gen ifadelerinin hesaplanmasında β -aktin normalizatör olarak kullanıldı. r değeri korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Table 6.1: cDNA dizinlerinde gen ifade değerleri $\Delta\Delta Ct$ ile hesaplanmıştır. ZEB2 ve GALNT3 gen ifadelerinin Student t-test ile yapılan analizleri sonucunda over, böbrek, prostat, karaciğer ve tiroid kanserlerinde anlamlı farklılık saptandı ($p < 0,05$). Korelasyon katsayısı Pearson Correlation Coefficient analizi ile hesaplanmıştır.

Kanser Tipi	N	Gen	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	Korelasyon Katsayısı r
Meme	9	ZEB2	0.70	0.34
		GALNT3	0.66	
Kolorektal	9	ZEB2	-0.90	-0.30
		GALNT3	0.33	
Böbrek	9	ZEB2	0.10	-0.02
		GALNT3	-2.74	
Over	9	ZEB2	-2.60	-0.14
		GALNT3	2.98	
Akciğer	9	ZEB2	-3.10	0.30
		GALNT3	-0.53	
Prostat	9	ZEB2	-0.50	-0.46
		GALNT3	0.44	
Karaciğer	9	ZEB2	-1.10	-0.36
		GALNT3	0.06	
Tiroid	9	ZEB2	-2.6	0.11
		GALNT3	-1.48	
Toplam	72	ZEB2	-1.25	-0.10
		GALNT3	-0.04	

Tümör cDNA dizinlerinde az sayıda örnek ile çalışılabilmesi nedeniyle, geniş ölçekli hasta örneklerinde gen ifade analizlerini içeren expO (Expression Project for Oncology) veri bankasındaki ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım değerleri kullanılarak korelasyon analizleri gerçekleştirildi. Solid tümörlere ait 2158 dizin içerisinde (GEO accession GSE2109) tümör cDNA dizin çalışmasını gerçekleştirdiğimiz sekiz kanser tipinin verileri bu analizde kullanıldı. Bu kanserlerle ilişkili 1415 dizinden elde edilen 352 meme, 293 kolon, 280 böbrek, 199 over, 132 akciğer, 83 prostat, 44 karaciğer ve 32 tiroid örneklerindeki ZEB2 ve GALNT3 gen ifadeleri sonuçları ile Pearson korelasyon analizi gerçekleştirildi. Meme, kolon, tiroid, karaciğer, böbrek, akciğer ve prostat kanserlerinde ZEB2 anlatımı ile GALNT3 anlatımı arasında negatif korelasyon tespit edildi. Bunlardan meme, kolon, over ve prostat kanserlerindeki negatif korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Korelasyon analizine tabi tutulan toplam 1415 örnek açısından ZEB2 ve GALNT3 ifadeleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu ($r = -0.36$; $p < 0.001$) (Şekil 6.20 ve Tablo 6.2).



Şekil 6.20: expO (Expression Project for Oncology) veri bankasındaki ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım değerleri ve gen ifadeleri arasındaki korelasyon. r değeri korelasyon katsayısını ifade etmektedir. ZEB2 ve GALNT3 gen ifadeleri arasında korelasyonun yönelimi kırmızı çizgiler ile belirtilmiştir (Negatif korelasyon, pozitif korelasyon).

Tablo 6.2: ExpO very tabanındaki ZEB2 ve GALNT3 gen anlatım değerlerinin karşılaştırılması. ZEB2 ve GALNT3 anlatım değerlerinin belirlenmesinde en yüksek prob şiddeti kullanıldı. Anlatım değerlerinin istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında Student t-test ve korelasyon katsayısı hesaplanmasında Pearson correlation coefficient analiz yöntemleri kullanıldı. *** anlamlı farklılık değeri ($p < 0.001$) ve N örnek sayısını temsil etmektedir.

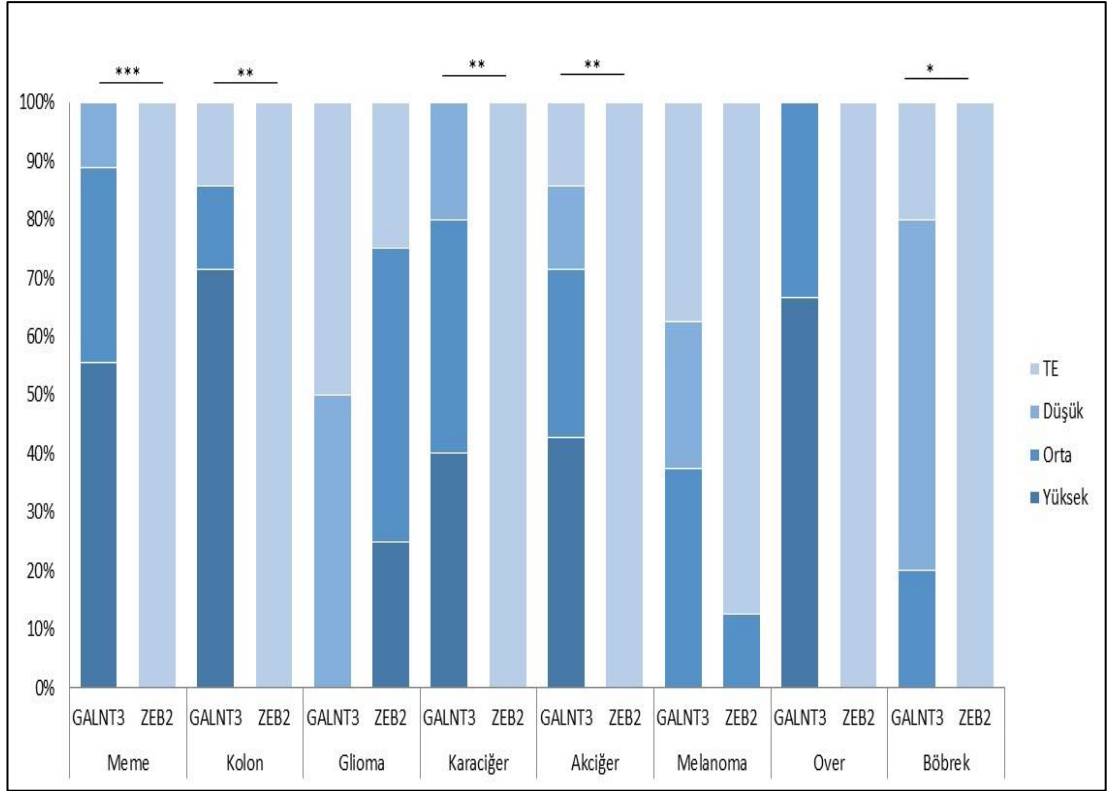
Kanser Tipi	N	Gen	Prob Şiddeti Değeri	p Değeri	Korelasyon Katsayısı r
Meme	352	ZEB2	643,72	$p < 0.0001$	-0.19***
		GALNT3	1821,33		
Kolon	293	ZEB2	508,71	$p < 0.0001$	-0.38***
		GALNT3	4244,68		
Böbrek	280	ZEB2	995,3	$p < 0.0001$	-0.10
		GALNT3	383,4		
Over	199	ZEB2	455,94	$p < 0.0001$	-0.25***
		GALNT3	3490,91		
Akciğer	132	ZEB2	664,44	$p < 0.0001$	-0.05
		GALNT3	2309,37		
Prostat	83	ZEB2	500,79	$p < 0.0001$	-0.44***
		GALNT3	3665,87		
Karaciğer	44	ZEB2	554,73	$p < 0.0001$	-0.16
		GALNT3	2083,65		
Tiroid	32	ZEB2	556,1375	$p < 0.0001$	-0.23
		GALNT3	1975,45		
Toplam	1415	ZEB2	1269,46	$p < 0.0001$	-0.36***
		GALNT3	2438,76		

ZEB2 ve GALNT3 protein anlatımlarının değerlendirilmesi “Human Protein Atlas” veri bankasındaki, immunohistokimya verileri kullanılarak gerçekleştirildi [74]. ZEB2 ve GALNT3 protein ifadeleri aynı hasta örneklerinin IHC verileri esas alınarak karşılaştırıldı. Hasta verilerinin değerlendirilmesinde Yüksek, Orta, Az ve Tespit Edilemedi ifadelerinin karşılığı olarak sırasıyla 3, 2, 1 ve 0 değerleri kullanıldı. Aynı hastanın GALNT3 ve ZEB2 immunohistokimya verileri eşleştirildiğinde toplam 48 kanser örneğini içeren ve alt gruplar olarak da 9 meme, 7 kolon, 7 akciğer, 7 melanoma, 5 karaciğer, 5 böbrek, 4 glioma ve 3 over kanseri örneğinin değerleri analizde kullanıldı. Daha önce cDNA analizlerinde

belirlediğimiz sonuçlar ile uyumlu olarak, protein verilerinde de çoğu kanser tipinde ZEB2'nin azaldığı belirlendi. Yalnızca glioma ve melanomanın bazı hastalarında artmış ZEB2 protein ifadesi belirlendi (Tablo 6.4). İstatistiksel değerlendirmede Wilcoxon Rank Sum test analizi yazılım MASS R paketi (version 3.4.0.) kullanılarak yapıldı. Toplam 48 hasta örneği içeren verilerde, ZEB2 ve GALNT3 protein ifadelerinin anlamlı olarak farklı olduğu ($p<0.001$), alt grupların incelenmesinde ise meme ($p<0.001$), kolon ($p<0.01$), karaciğer ($p<0.01$), akciğer ($p<0.01$), ve böbrek ($p<0.05$) kanserlerinde anlamlı farklılığın bulunduğu saptandı (Şekil 6.21). Kanser örneklerinin korelasyon analizlerinde melanoma hariç incelenen bütün kanser tiplerinde ters korelasyon değeri belirlendi (Tablo 6.3).

Tablo 6.3: Protein Atlas verilerinde aynı hasta örneklerindeki ZEB2 ve GALNT3 IHC değerlerinin gösterimi. Korelasyon kat sayısı hesaplanmasında Pearson Korelasyon yöntemi kullanılmıştır. İlgili proteinin bulunmadığı örnekler TE. Tespit edilemedi ile gösterildi.

Kanser Tip	Gen	Protein Anlatım Değeri				Korelasyon Katsayısı <i>r</i>
		Yüksek	Orta	Düşük	TE	
Meme	ZEB2	0	0	0	9	-0.67
	GALNT3	5	3	1	0	
Kolon	ZEB2	0	0	0	7	-0.22
	GALNT3	5	1	0	1	
Akciğer	ZEB2	0	0	0	7	-0.52
	GALNT3	3	2	1	1	
Melanoma	ZEB2	0	1	0	7	0.56
	GALNT3	0	3	2	3	
Karaciğer	ZEB2	0	0	0	5	-0.87
	GALNT3	2	2	1	0	
Böbrek	ZEB2	0	0	0	5	-0.13
	GALNT3	0	1	3	1	
Glioma	ZEB2	1	2	0	1	-0.71
	GALNT3	0	0	2	2	
Over	ZEB2	0	0	0	3	-0.52
	GALNT3	2	1	0	0	
Toplam	ZEB2	1	3	0	44	-0.67
	GALNT3	17	13	10	8	



Şekil 6.21: Protein Atlas kanser veri tabanında ZEB2 ve GALNT3 protein ifadelerinin yüzdelik oranları incelenen tüm kanser türlerinde gösterilmiştir. Anlamlılık değerleri *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ olarak belirtildi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epitel-Mezenkim Geçişi, hücrelerin epitel özelliklerini kaybederek mezenkim karakter kazanmalarını sağlayan bir süreçtir. EMT programının aktif hale gelmesi hücrelerin göç edebilme yeteneklerini kazanmasında ve tümör hücrelerinin metastazında rol oynamaktadır [21]. EMT indükleyen transkripsiyon ailelerinin (ZEB, SNAI, bHLH) hücrede ifade edilmeleri, E-kaderinin baskılanmasını ve hücrelerin mezenkim karakter kazanmalarını sağlamaktadır. Doktora çalışmamda incelediğimiz ZEB2 transkripsiyon faktörünün CDH1 geninin anlatımını baskılamasının dışında [40], hücre döngüsü, hücre yaşlanması ve post-transkripsiyonal düzenlemede rol oynayan mikro-RNA'ların gen ifadesinde de rol oynadığı daha sonraki çalışmalar ile gösterilmiştir [51, 61-64] .

Hepatoselüler Karsinoma (HCC) karaciğerin en sık rastlanılan primer tümörüdür [18]. HCC hücreleri tümörün farklılaşma derecesine göre intrahepatik yayılma ve uzak organ metastazı gösterebilmektedir. ZEB2 ve diğer EMT düzenleyicilerinin HCC hücrelerinin yayılma özellikleriyle olan ilişkileri daha önce gerçekleştirilen araştırmalar ile belirlenmiştir [75, 76]

ZEB2 proteini genomda CACCTG motifini içeren E-box dizilerine bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedir. ZEB2'nin ifadesini düzenlediği genler olarak CDH1, miR200 ailesi, CLDN4, CCND1, hTERT, SFRP1 ve ALPL bugüne kadar yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [60-64]. ZEB2'nin EMT mekanizması dışında hücre yaşlanması, hücre siklusu gibi farklı hücresel süreçleri de düzenlemesi ve ZEB2 konsensüs dizisi E-box'ların genomdaki yoğunluğu göz önüne alındığında, bu transkripsiyon faktörünün yukarıda belirtilenlerin dışındaki genlerin regülasyonunda da rol alabileceği bu çalışmanın temel hipotezini oluşturmaktadır [65]. Bu amaçla, çalışmada yüksek endojen ZEB2 ifade eden HCC hücre hattı SNU398 model olarak kullanılmıştır.

Transkripsiyon faktörlerinin genomda bağlandığı bölgelerin tanımlanmasında kullanılan yeni nesil dizileme yöntemi olan kromatin-immünopresipitasyon dizileme yöntemi bu çalışmada kullanıldı. ChIP çok sayıda süreç ve basamak içeren bir tekniktir. ChIP çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan antikorum yüksek afinitesi ve özgüllüğüdür. Tez çalışmasında kullanılan 6E5 anti-ZEB2 monoklonal antikoru tez danışmanım Prof.Dr. Tamer Yağcı ve

arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve Western blot, immun floresan ve immunohistokimya çalışmalarında kullanılabilirliği belirlenmiştir [25, 76, 77]. Fakat Landt ve arkadaşları transkripsiyon faktörü proteinlere ait 227 antikorun ChIP uygunluklarını inceledikleri çalışmada, bu antikorların yalnızca 44 (%19) tanesinin ChIP çalışmalarında kullanılabileceğini saptamıştır [78]. Bu nedenle, tez çalışmasında ilk olarak antikor validasyon denemeleri gerçekleştirildi. ChIP çalışmalarında başarıyı etkileyen diğer önemli faktör ise araştırılacak transkripsiyon faktörünün endojen veya ektojen olarak hedef hücrelerde yeterli düzeyde anlatımının bulunmasıdır. Yukarıda tanımlanan ZEB2 hedefi genler önemli bir kısmı ChIP ile gösterilmiş, ancak bu çalışmalarda ZEB2'yi ekzojen olarak ifade eden hücre hatları kullanılmıştır [60, 61]. Bu tez çalışmasında amaç, anti-ZEB2 monoklonal antikorunu kullanarak ZEB2'nin endojen olarak ifade edildiği hücre hatlarında ChIP-dizileme yaklaşımıyla yeni ZEB2 hedefi genlerin bulunmasıdır.

İlk olarak, HCC hücre hatlarında ZEB2 transkript ifadelerinin sağlıklı karaciğere göre düzeyleri araştırıldı. Bugüne kadar, HCC hücre hatları ile yapılan çalışmalarda hücreler farklılaşma dereceleri ve fenotiplerine göre iyi farklılaşmış epitel fenotipi gösteren ve az farklılaşmış fibroblastoid/mezenkimal fenotip gösteren iki grupta değerlendirilmiştir [79]. RT-qPCR sonuçları iyi farklılaşmış HEPG2, HUH7, HEP3B ve PLC/PRF/5 hücrelerinde ZEB2 ifadesinin düşük, buna karşın az farklılaşmış SK-HEP1, SNU398 ve SNU475 hücrelerinde normal karaciğere göre artmış olduğunu gösterdi. ZEB2'nin HCC hücre hatlarındaki protein ifadesi 6E5 antikorunu ile incelendi ve western blot sonuçlarının RT-qPCR verilerini doğrular nitelikte olduğu görüldü. Burada en yüksek protein anlatımının SNU398 ve SK-HEP1 hücrelerinde daha az olarak da SNU475 ve SNU423 hücrelerinde olduğu saptandı. Diğer hücre hatlarında ise ZEB2 protein ifadesine rastlanılmadı. ChIP yönteminde kullanılan antikorların transkripsiyon faktörlerinin kromatine bağlanmış doğal konformasyonlarını tanıması gerekmektedir [80]. Bu bağlamda, hem protein ifadesini Western blotta gösterdiğimiz SNU398 hücrelerinde, hem de Western blotta protein ifadesi saptanamayan PLC/PRF/5 hücrelerinde 6E5 antikorunu kullanarak IP ile ZEB2 proteininin indirilebildiği saptandı. Bu bulgu, 6E5 antikorunun ChIP koşullarında da kullanılabilmesine işaret etmektedir. Formaldehitte fikse edilmiş ve yüksek endojen ZEB2 protein ifadesi bulunan SNU398 ve SK-HEP1 hücrelerinde ChIP-Western blot deneyi gerçekleştirildi. Bu deney, 6E5 antikorunun formaldehitte fikse edilmiş ve sonikasyon işlemi uygulanmış hücrelerin kromatin lizatlarında ZEB2

proteininin IP ile çöktürülebileceğine ve ChIP uygulamaları için uygun olduğuna işaret etmekteydi. ChIP optimizasyon çalışmaları kapsamında, sonikasyonla parçalanmış DNA'nın fragment büyüklüğü üzerine yoğunlaşıldı ve dizi analizinin uygulanabileceği boyutta fragmentler sonikasyon ile elde edildi. Bu ön çalışmalardan sonra ChIP validasyon deneylerinin daha ileri çalışmalarına SNU398 hücrelerinde devam edildi.

ZEB2 ve miR200 ailesi arasında karşılıklı gen ifadesi düzenlemesinin olduğu daha önceki çalışmalar ile saptanmıştır [61-63]. Bu genlerden olan miR200c-141'in promotorunda bulunan ve ZEB2'nin DNA'ya bağlanma dizisini de içeren bölgeye yönelik primerler tasarlanarak hedef DNA bölgesinin ZEB2-ChIP ile özgül zenginleşmesi SNU398 hücrelerinde test edildi. SNU398 hücrelerinde gerçekleştirilen ChIP-qPCR'da, 6E5 antikoru ile indirilen ChIP DNA'sının izotip antikor ChIP-DNA'sına göre hedef bölgeyi 15 kat fazla amplifikasyona uğrattığı görüldü. Bu deneyde, izotip antikorunun son derece düşük olan "background" amplifikasyonu ile ZEB2'ye bağlı özgül amplifikasyon değerlerinin literatürle uyumlu olduğu görüldü. Antikoru ChIP için uygunluğunun saptanması, ZEB2-özgül DNA amplifikasyonunun gösterilmesi ve dizileme için uygun boyutta DNA fragmentlerinin sonikasyonla elde edilebilmesi üzerine ChIP-dizileme hizmeti Active Motif firmasından alındı.

SNU398-ChIP dizileme sonuçlarında belirlenen 509 gen içinde, ZEB2'nin hedefi olarak tanımlanmış olan siklin D1 ve miR200 ailesi üyesi hedefler bulunmasına karşın EMT düzenleyicilerinin başlıca hedefi olan E-kaderin bulunmuyordu. EMT transkripsiyon faktörlerinin birbirlerini tamamlayıcı bir işlev gördükleri de bilindiğinden, SNU398 hücrelerinde E-kaderinin ZEB2 dışındaki düzenleyiciler tarafından baskılandığını düşündürmektedir [81]. Vertebralarda E box dizisi (5'-CAnnTG-3') korunmuş olarak bulunmaktadır [82]. ZEB2-bağlanma hedeflerinin MEME-TOMTOM analizinde saptadığımız motif ZEB2 için daha önceden tanımlanmış motifi doğruladı [40].

Gen düzenleyici bölge olarak hipotetik promotor bölgeleri Active Motif firmasında gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerde transkripsiyon başlama noktasına göre -7500 bp ve +2500 bp olarak tanımlanmıştır. Nispeten geniş olarak tutulan bu tanımlamaya rağmen, ChIP-dizileme verileri sınırlı sayıda promotor hedefine işaret ediyordu. ZEB2 bağlanma bölgeleri ekzon, intron, 3'-UTR, 5'-UTR ve genler arası bölgelere dağılmış durumdaydı. Bu noktalarda da ChIP hedeflerinin

tanımlanmış olması ZEB2'nin gen ifadesini düzenleme mekanizmalarının karmaşık düzeyini vurguluyor olabilir [83].

ChIP-dizileme verileri açısından gerekli ve önemli değerlendirmelerden biri ChIP-dizileme ile belirlenen hedeflerin ChIP validasyonudur [84]. ZEB2 DNA-bağlanma motifini çoklu içeren üç hedef gen bölgesine ilaveten daha önce test ettiğimiz miR200c-141 primerleriyle gerçekleştirilen ChIP-qPCR deneylerinde bu hedeflerin zenginleşmesi izotip antikora göre gösterildi. ChIP-dizileme hedeflerinden yüksek pik değerlerine sahip, gen düzenleyici bölge yerleşimi gösterenler ve/veya ZEB2 DNA-bağlanma motifini içerenler araştırıldı. Seçilen genlerin ifadeleri shZEB2-SNU398 klonlarında kontrol klonuna (NSC) göre karşılaştırıldı. RT-qPCR analizleri sonucunda, 3 genin ZEB2-bağımlı olarak anlatım değişikliği gösterdiği saptandı. Bunlardan GALNT3 ifadesi ZEB2'nin baskılandığı klonlarda yaklaşık 16 kat artmakta, buna karşın MAP7 ve BOK ifadeleri aynı koşullarda yaklaşık 2 kat azalmaktaydı. GALNT3'ün ZEB2-bağımlı ifade değişimi protein düzeyinde de transkript sonuçlarıyla paralellik göstermekteydi.

SNU398 ChIP-dizileme hedefleri GALNT3, MAP7 ve BOK'un ZEB2 hedefi olarak validasyonları parental SNU398 hücrelerinde ChIP-qPCR ile incelendi. ChIP-dizileme genom bölgelerine ZEB2'nin DNA-bağlanma motifini de içerecek şekilde primerler tasarlanarak gerçekleştirilen ChIP-qPCR'da seçilen genom bölgelerinin 6E5 antikoru ile indirilmiş ChIP DNA'larında zenginleşme tespit edildi. ZEB2'nin bu üç gene bağlandığı belirlendi ve en yüksek değişimin saptandığı GALNT3 ile analizlere devam edildi. ZEB2 proteininin arttığı koşullarda ve farklı kanser tiplerinde de bu değişimin geçerli olup olmadığının araştırılması amacıyla kolon kanseri hücre hattı DLD1 hücreleri kullanıldı. ZEB2 anlatımı doksisisiklin indüklemesi ile gerçekleşen bu hücrelerde yapılan RT-qPCR ve western blot deneyleri GALNT3 ve E-kaderin anlatımının hem transkript hem de protein düzeyinde azaldığını gösterdi. Hücre kültürü çalışmalarında diğer hedef genlere göre yüksek ifade değişimi belirlenen GALNT3'ün in vivo değerlendirmeleri ile çalışmalara devam edildi.

Glikolizasyon temel post-transkripsiyonel modifikasyonlardan biridir. Genellikle salgısal yolaktaki proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini değiştirir. Bu değişim, özellikle malign transformasyonda da görülmektedir. Mucin-tip O-bağlı-glikolizasyon membran proteinlerinde ve salınan proteinlerde en sık rastlanılan post-transkripsiyonel regülasyon olarak belirlenmiştir

[85, 86]. GALNT3'ün üyesi olduğu, N- Asetil Galaktozamin Transferaz ailesi 20 enzimin yer aldığı geniş bir ailedir ve bu aile serin ve treonin rezidülerine O-bağlı N-asetil galaktozamin transferinde rol oynamaktadır [87]. Bu transferazlar fertilizasyon, antikoagülasyon, inflamatuvar yanıt, malignitede önemli adezyon, invazyon, hücresel farklılaşma gibi çok sayıda biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır [87, 88]. İlginç olarak GALNT ailesi doku spesifik anlatım göstermektedir [89]. Sağlıklı insan dokularında GALNT3'ün deri, kemik, böbrekte yüksek, karaciğer, akciğer, plasenta, pankreas, retina dokularında az ifade edildiği, buna karşın kalp, iskelet kası ve beyin dokularında ifadesinin bulunmadığı saptanmıştır [90]. İnsan kanser cDNA dizin örneklerinde normal dokuya göre GALNT3 anlatımlarının karşılaştırılması sonucunda böbrek ve troid kanserlerinde düşük anlatım bulunmasına karşın over kanserinde yüksek anlatım belirlendi. Bu sonuçlar kanserde GALNT3 anlatımının normal dokuya göre değiştiğine işaret etmektedir. Maupin ve arkadaşlarının pankreatik kanser hücre hatlarında yaptıkları ifade analizlerinde GALNT3'ün epitel karakter gösteren hücrelerde varlığı, ZEB1'in ise mezenkim hücrelerde anlatımının gerçekleştiği dikkat çekicidir [91]. Fakat dokuz HCC hücre hattında yaptığımız GALNT3 anlatımı analizinde epitel ve mezenkim karakterli hücreler arasında net bir ayırım gözlenmemiş ve en yüksek anlatım HEP3B hücrelerinde saptanmıştır. Bunu doğrulayan bir çalışma olarak, HCC hücre hatlarından gerçekleştirilen fare orthotopik ksenograft tümörlerinde GALNT3 anlatımına bakıldığında, metastatik hücre hatlarına göre metastatik olmayan HEP3B tümörlerinde yüksek oranda GALNT3 anlatımı saptanmıştır. Fakat aynı çalışmada, hastaların metastatik ve metastatik olmayan dokularında yapılan GALNT3 analizinde anlamlı farklılık saptanmamıştır [92]. Kolon kanserinde GALNT3 profilinin incelenmesi sonucunda, GALNT3 anlatımı azalmış olan hastaların düşük sağkalım gösterdikleri belirlenmiştir [93]. Aynı çalışmada, histolojik gruplar arasında da GALNT3 anlatım seviyelerinde farklılık olduğu ve iyi-farklılaşmış tümörlerde yüksek, az-farklılaşmış tümörlerde düşük GALNT3 anlatımı bulunmuştur. Renal hücre karsinomu ile yapılan başka bir çalışmada ise, kolon kanseri bulgularının tam tersi nitelikte sonuçlar belirlenmiştir. GALNT3 anlatımının yüksek olması ilerlemiş hastalık ve düşük sağkalım oranı ile ilişkili bulunmuştur [94]. Bu sonuca benzer olarak, oral skuamoz kanser hastalarında da GALNT3 anlatımının yüksek bulunduğu olgularda artmış tümör nüksü ve düşük hastaliksız sağkalım oranı belirlenmiştir [95]. İnsan kanser cDNA dizinlerindeki RT-qPCR analizinde, en yüksek değişim over kanserinde,

yaklaşık olarak normal dokuya göre 3 kat artış olarak belirlendi. Bu sonuç ile uyumlu olarak, Wang ve arkadaşlarının over kanserinde yaptıkları çalışmada GALNT3 anlatımının tümörde arttığı ve yüksek GALNT3 anlatımının düşük hayatta kalma ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir [95].

Gerçekleştirdiğimiz *in vivo* analizlerde tümör dokularında genellikle ZEB2 anlatımının azaldığı, GALNT3 anlatımının ise arttığı belirlendi. *İn-vitro* çalışmalarda tespit ettiğimiz ZEB2 ile GALNT3 arasındaki ters korelasyon *in vivo* analizler ile doğrulandı. Buna ek olarak, protein ifadelerinin korelasyon analizi, melonoma haricindeki diğer kanserlerde ters korelasyon gösterdi. İlginç olarak, cDNA dizin örneklerinde bulunmayan bir kanser türü olan melinomada ZEB2'nin artmış olduğu belirlendi. Aynı hastaların GALNT3 değerlerinin düşük olması yine protein düzeyinde ZEB2 ve GALNT3 arasında ters korelasyona işaret etmekteydi.

GALNT3'ün transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar genellikle kemik yeniden modellenmesi ve paratiroid hormon üzerine yoğunlaşmıştır. GALNT3 FGF23'ün treonin178 aminoasitinden glikozillenmesini sağlamakta ve glikozillenen FGF23 proteolitik yıkımdan korunmaktadır. GALNT3 mutasyonu sonrasında FGF23'ün glikozillenmemesi proteinin yıkılmasına yol açmaktadır. GALNT3 mutasyonu sonucu oluşan bu hastalık Hiperfosfatemi Tümöral Kalsinozis olarak isimlendirilen ve kalsifiye kitle oluşumu ile karakterize bir patolojidir [90]. Paratiroid hormon GALNT3'ün negatif regülasyonunda rol oynamasına karşın, RUNX2 ve NRF1 GALNT3 anlatımını arttırmaktadır [96-98]. GALNT3'ün kanserde gen regülasyonu ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Neoplastik transformasyon sürecinde, post-transkripsiyonel glikozilasyon değişiminin hücresel birçok farklı süreçte rol oynadığı ve malignan gelişimde etkili olduğu bilinmektedir [99].

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında EMT transkripsiyon faktörlerinden olan ZEB2 proteinin çok farklı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığı belirlendi.

8. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ZEB2'nin GALNT3 gen regülasyonundaki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasında yapılan kromatin-immünopresipitasyon dizileme deneyi sonucunda 509 ZEB2 hedefi gen listelenmiş fakat az sayıdaki hedef için ileri moleküler analizler gerçekleştirilebilmiştir. Yeni ZEB2 hedeflerinin tanımlanması için bu tez çalışmasına benzer çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

GALNT3 enzimi çok sayıda farklı proteinin post-translasyonel regülasyonunda rol oynamaktadır. Bu kapsamda GALNT3-bağımlı protein değişimlerinin belirlenmesi ve karsinogenez mekanizmasındaki etkisinin tanımlanması karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılması için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Gupta G. P., Massagué J., (2006), “Cancer metastasis: building a framework”, *Cell*, 127 (4), 679-695.
- [2] El-Serag H. B., Rudolph K. L., (2007), “Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis”, *Gastroenterology*, 132 (7), 2557-2576.
- [3] 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.
- [4] Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D., Bray F., (2015), “Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”, *International journal of cancer*, 136 (5), E359-E386.
- [5] Balogh J., David Victor III E. H. A., Burroughs S. G., Boktour M., Saharia A., Li X., Ghobrial R. M., Monsour Jr H. P., (2016), “Hepatocellular carcinoma: a review”, *Journal of hepatocellular carcinoma*, 3, 41-53.
- [6] Farazi P. A., DePinho R. A., (2006), “Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment”, *Nature Reviews Cancer*, 6 (9), 674-688.
- [7] Davis G. L., Dempster J., Meler J. D., Orr D. W., Walberg M. W., Brown B., Berger B. D., O'Connor J. K., Goldstein R. M., (2008). “Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem”, *Baylor University Medical Center. Proceedings*, 266-280.
- [8] Gurtsevitch V., (2008), “Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis”, *Biochemistry (Moscow)*, 73 (5), 504-513.
- [9] Ott J., Stevens G., Groeger J., Wiersma S., (2012), “Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity”, *Vaccine*, 30 (12), 2212-2219.
- [10] Tatematsu K., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Mano S., Maeshiro T., Nakayoshi T., Wakuta M., Miyakawa Y., Mizokami M., (2009), “A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J”, *Journal of virology*, 83 (20), 10538-10547.
- [11] Kao J.-H., (2011), “Molecular epidemiology of hepatitis B virus”, *The Korean journal of internal medicine*, 26 (3), 255-261.

- [12] McMahon B. J., (2009), "The natural history of chronic hepatitis B virus infection", *Hepatology*, 49 (S5), 45-55.
- [13] Saigo K., Yoshida K., Ikeda R., Sakamoto Y., Murakami Y., Urashima T., Asano T., Kenmochi T., Inoue I., (2008), "Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma", *Human mutation*, 29 (5), 703-708.
- [14] Ozkal-Baydin P., (2014), "How did hepatitis B virus effect the host genome in the last decade?", *World journal of hepatology*, 6 (12), 851-859.
- [15] Organization W. H., (2017), "Global hepatitis report 2017".
- [16] Goossens N., Hoshida Y., (2015), "Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma", *Clinical and molecular hepatology*, 21 (2), 105-114.
- [17] Wu H. C., Santella R., (2012), "The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma", *Hepatitis monthly*, 12 (10 HCC).
- [18] Gomaa AI., Khan SA., Toledano MB., Waked I., Gomaa AI., Khan SA., Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Taylor-Robinson SD., (2008), "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis", *World J Gastroenterology*, 21,4300-4308.
- [19] Prieto-García E., Díaz-García C. V., García-Ruiz I., Agulló-Ortuño M. T., (2017), "Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression", *Medical Oncology*, 34 (7), 122.
- [20] Hay E., (1995), "An overview of epithelio-mesenchymal transformation", *Cells Tissues Organs*, 154 (1), 8-20.
- [21] Thiery J. P., (2002), "Epithelial? mesenchymal transitions in tumour progression", *Nature Reviews Cancer*, 2 (6), 442-454.
- [22] Lamouille S., Xu J., Derynck R., (2014), "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (3), 178-196.
- [23] Kalluri R., Weinberg R. A., (2009), "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *The Journal of clinical investigation*, 119 (6), 1420-1428.
- [24] Baygi M. E., Soheili Z. S., Schmitz I., Sameie S., Schulz W. A., (2010), "Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines", *Cell biology and toxicology*, 26 (6), 553-567.
- [25] 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.
- [26] Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D. S., Dean D. C., Castells A., Postigo A., (2012), “EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness”, *Cellular and molecular life sciences*, 69 (20), 3429-3456.
- [27] Becker K.-F., Rosivatz E., Blechschmidt K., Kremmer E., Sarbia M., Höfler H., (2007), “Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers”, *Cells Tissues Organs*, 185 (1-3), 204-212.
- [28] Puisieux A., Brabletz T., Caramel J., (2014), “Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors”, *Nature cell biology*, 16 (6), 488-494.
- [29] Goossens S., Vandamme N., Van Vlierberghe P., Berx G., (2017), “EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1868, 584-591.
- [30] Jordà M., Olmeda D., Vinyals A., Valero E., Cubillo E., Llorens A., Cano A., Fabra À., (2005), “Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor”, *J Cell Sci*, 118 (15), 3371-3385.
- [31] Barnes R. M., Firulli A. B., (2009), “A twist of insight-the role of Twist-family bHLH factors in development”, *The International journal of developmental biology*, 53 (7), 909-924.
- [32] Yang M.-H., Wu M.-Z., Chiou S.-H., Chen P.-M., Chang S.-Y., Liu C.-J., Teng S.-C., Wu K.-J., (2008), “Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis”, *Nature cell biology*, 10 (3), 295-305.
- [33] Hong J., Zhou J., Fu J., He T., Qin J., Wang L., Liao L., Xu J., (2011), “Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness”, *Cancer research*, 71 (11), 3980-3990.
- [34] Garg M., (2013), “Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer”, *World journal of stem cells*, 5 (4), 188-195.
- [35] Verschuere 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.
- [36] Van de Putte T., Maruhashi M., Francis A., Nelles L., Kondoh H., Huylebroeck D., Higashi Y., (2003), “Mice lacking Zfhx1b, the gene that codes for Smad-

interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease–mental retardation syndrome”, *The American Journal of Human Genetics*, 72 (2), 465-470.

- [37] 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.
- [38] Schaeper U., Subramanian T., Lim L., Boyd J. M., Chinnadurai G., (1998), “Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif”, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (15), 8549-8552.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Long J., Zuo D., Park M., (2005), “Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin”, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (42), 35477-35489.
- [42] Moustakas A., Heldin C.-H., (2009), “The regulation of TGF β signal transduction”, *Development*, 136 (22), 3699-3714.
- [43] Chua H., Bhat-Nakshatri P., Clare S., Morimiya A., Badve S., Nakshatri H., (2007), “NF- κ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2”, *Oncogene*, 26 (5), 711-724.
- [44] Krishnamachary B., Zagzag D., Nagasawa H., Rainey K., Okuyama H., Baek J. H., Semenza G. L., (2006), “Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor–null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B”, *Cancer research*, 66 (5), 2725-2731.
- [45] Spaderna S., Schmalhofer O., Wahlbuhl M., Dimmler A., Bauer K., Sultan A., Hlubek F., Jung A., Strand D., Eger A., (2008), “The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer”, *Cancer research*, 68 (2), 537-544.
- [46] Sánchez-Tilló E., Siles L., De Barrios O., Cuatrecasas M., Vaquero E. C., Castells A., Postigo A., (2011), “Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression”, *American journal of cancer research*, 1 (7), 897-912.

- [47] Croce C. M., Calin G. A., (2005), “miRNAs, cancer, and stem cell division”, *Cell*, 122 (1), 6-7.
- [48] Søkilde R., Kaczkowski B., Podolska A., Cirera S., Gorodkin J., Møller S., Litman T., (2011), “Global microRNA analysis of the NCI-60 cancer cell panel”, *Molecular cancer therapeutics*, 10 (3), 375-384.
- [49] Park S.-M., Gaur A. B., Lengyel E., Peter M. E., (2008), “The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2”, *Genes & development*, 22 (7), 894-907.
- [50] Brabletz S., Brabletz T., (2010), “The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer?”, *EMBO reports*, 11 (9), 670-677.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] Shimono Y., Zabala M., Cho R. W., Lobo N., Dalerba P., Qian D., Diehn M., Liu H., Panula S. P., Chiao E., (2009), “Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells”, *Cell*, 138 (3), 592-603.
- [54] Sekido R., Murai K., Kamachi Y., Kondoh H., (1997), “Two mechanisms in the action of repressor δ EF1: binding site competition with an activator and active repression”, *Genes to Cells*, 2 (12), 771-783.
- [55] Postigo A. A., Dean D. C., (2000), “Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (12), 6391-6396.
- [56] Hlubek F., Löhberg C., Meiler J., Jung A., Kirchner T., Brabletz T., (2001), “Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator”, *The Journal of Biochemistry*, 129 (4), 635-641.
- [57] Papadopoulou V., Postigo A., Sánchez-Tilló E., Porter A. C., Wagner S. D., (2010), “ZEB1 and CtBP form a repressive complex at a distal promoter element of the BCL6 locus”, *Biochemical Journal*, 427 (3), 541-550.
- [58] 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.

- [59] Peña C., García J. M., García V., Silva J., Domínguez G., Rodríguez R., Maximiano C., García de Herreros A., Muñoz A., Bonilla F., (2006), “The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas”, *International journal of cancer*, 119 (9), 2098-2104.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] Lin S.-Y., Elledge S. J., (2003), “Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase”, *Cell*, 113 (7), 881-889.
- [64] 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.
- [65] Grandori C., Mac J., Siébelt F., Ayer D. E., Eisenman R. N., (1996), “Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo”, *The EMBO journal*, 15 (16), 4344.
- [66] 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.
- [67] Spooner C. J., Lesch J., Yan D., Khan A. A., Abbas A., Ramirez-Carrozzi V., Zhou M., Soriano R., Eastham-Anderson J., Diehl L., (2013), “Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1”, *Nature immunology*, 14 (12), 1229-1236.
- [68] Carey M. F., Peterson C. L., Smale S. T., (2009), “Chromatin immunoprecipitation (chip)”, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009 (9), pdb.prot5279.

- [69] Gévry N., Hardy S., Jacques P.-É., Laflamme L., Svtelis A., Robert F., Gaudreau L., (2009), “Histone H2A. Z is essential for estrogen receptor signaling”, *Genes & development*, 23 (13), 1522-1533.
- [70] Lin X., Tirichine L., Bowler C., (2012), “Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species”, *Plant methods*, 8 (1), 48.
- [71] Gupta S., Stamatoyannopoulos J. A., Bailey T. L., Noble W. S., (2007), “Quantifying similarity between motifs”, *Genome biology*, 8 (2), R24.
- [72] Benesty J., Chen J., Huang Y., Cohen I. (2009), “Pearson correlation coefficient”. “Noise reduction in speech processing”, Springer, 1-4.
- [73] Hill L., Browne G., Tulchinsky E., (2013), “ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer”, *International journal of cancer*, 132 (4), 745-754.
- [74] Pontén F., Jirström K., Uhlen M., (2008), “The Human Protein Atlas—a tool for pathology”, *The Journal of pathology*, 216 (4), 387-393.
- [75] 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 of the United States of America*, 103 (7), 2178-2183.
- [76] Acun T., Oztas E., Yagci T., Yakicier M. C., (2011), “SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation”, *BMC cancer*, 11 (1), 223.
- [77] Oztas E., Avci M. E., Ozcan A., Sayan A. E., Tulchinsky E., Yagci T., (2010), “Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays”, *Experimental and molecular pathology*, 89 (2), 182-189.
- [78] Landt S. G., Marinov G. K., Kundaje A., Kheradpour P., Pauli F., Batzoglou S., Bernstein B. E., Bickel P., Brown J. B., Cayting P., (2012), “ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia”, *Genome research*, 22 (9), 1813-1831.
- [79] Yuzugullu H., Benhaj K., Ozturk N., Senturk S., Celik E., Toyly 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.
- [80] Raha D., Hong M., Snyder M., (2010), “ChIP-Seq: A method for global identification of regulatory elements in the genome”, *Current protocols in molecular biology*, 21 (19), 1-14.

- [81] Oloumi A., McPhee T., Dedhar S., (2004), "Regulation of E-cadherin expression and β -catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1691 (1), 1-15.
- [82] Wong T.-S., Gao W., Chan J. Y.-W., (2014), "Transcription regulation of E-cadherin by zinc finger E-box binding homeobox proteins in solid tumors", *BioMed research international*, .
- [83] van Heyningen V., Bickmore W., (2013) "Regulation from a distance: long-range control of gene expression in development and disease", *The Royal Society*, 19, 368.
- [84] Wu D.-Y., Bittencourt D., Stallcup M. R., Siegmund K. D., (2015), "Identifying differential transcription factor binding in ChIP-seq", *Frontiers in genetics*, 6.
- [85] M Nomoto., H Izumi., T Ise., K Kato., H Takano., (1999), "Structural Basis for the Regulation of UDP-N-Acetyl- α -d-galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl Transferase-3 Gene Expression in Adenocarcinoma Cells", *Cancer Research*, 24.
- [86] Hollingsworth M. A., Swanson B. J., (2004), "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface", *Nature Reviews Cancer*, 4 (1), 45-60.
- [87] Ten Hagen K. G., Fritz T. A., Tabak L. A., (2003), "All in the family: the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases", *Glycobiology*, 13 (1), 1R-16R.
- [88] Rudd P. M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I. A., Dwek R. A., (2001), "Glycosylation and the immune system", *Science*, 291 (5512), 2370-2376.
- [89] Bennett E. P., Mandel U., Clausen H., Gerken T. A., Fritz T. A., Tabak L. A., (2011), "Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family", *Glycobiology*, 22 (6), 736-756.
- [90] Topaz O., Shurman D. L., Bergman R., Indelman M., Ratajczak P., Mizrachi M., Khamaysi Z., Behar D., Petronius D., Friedman V., (2004), "Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis", *Nature genetics*, 36 (6), 579-581.
- [91] Maupin K. A., Sinha A., Eugster E., Miller J., Ross J., Paulino V., Keshamouni V. G., Tran N., Berens M., Webb C., (2010), "Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems", *PLoS One*, 5 (9), e13002.
- [92] Liu T., Zhang S., Chen J., Jiang K., Zhang Q., Guo K., Liu Y., (2014), "The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis", *PLoS One*, 9 (9), e107941.

- [93] Shibao K., Izumi H., Nakayama Y., Ohta R., Nagata N., Nomoto M., Matsuo K. i., Yamada Y., Kitazato K., Itoh H., (2002), "Expression of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma", *Cancer*, 94 (7), 1939-1946.
- [94] Kitada S., Yamada S., Kuma A., Ouchi S., Tasaki T., Nabeshima A., Noguchi H., Wang K., Shimajiri S., Nakano R., (2013), "Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas", *British journal of cancer*, 109 (2), 472-481.
- [95] Wang ZQ., Bachvarova M., Morin C., Plante M., Gregoire J., Renaud MC., Sebastianelli A., Bachvarov D.,(2014), "Role of the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in ovarian cancer progression: possible implications in abnormal mucin O-glycosylation", *Oncotarget*, 30;5(2):544-60.
- [96] Fan Y., Bi R., Densmore M. J., Sato T., Kobayashi T., Yuan Q., Zhou X., Erben R. G., Lanske B., (2016), "Parathyroid hormone 1 receptor is essential to induce FGF23 production and maintain systemic mineral ion homeostasis", *The FASEB Journal*, 30 (1), 428-440.
- [97] Yoshida C. A., Kawane T., Moriishi T., Purushothaman A., Miyazaki T., Komori H., Mori M., Qin X., Hashimoto A., Sugahara K., (2014), "Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans", *Journal of Biological Chemistry*, 289 (38), 26584-26596.
- [98] Izumi H., Ryo O., Nagatani G., Tomoko I., Nakayama Y., Nomoto M., Kohno K., (2003), "p300/CBP-associated factor (P/CAF) interacts with nuclear respiratory factor-1 to regulate the UDP-N-acetyl-alpha-d-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-3 gene", *Biochemical Journal*, 373 (3), 713-722.
- [99] Pinho S. S., Reis C. A., (2015), "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications", *Nature Reviews Cancer*, 15 (9), 540-555.

ÖZGEÇMİŞ

Pelin BALÇIK ERÇİN 13.02.1977 tarihinde Elazığ'da doğdu. İlk ve orta eğitimini İzmir'de tamamladı. 1994 yılında Konya Meram Fen Lisesinden mezun oldu. Lisans eğitimi 1999 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünün ardından, 2002-2008 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji Bilim Dalı vitro Fertilizasyon Laboratuvarında Embriyolog olarak çalıştı. 2008 yılından itibaren Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Biyolog kadrosunda çalışmalarını sürdürmektedir.

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde 2005-2008 yılları arasında yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamlamıştır. Evli ve iki çocuk sahibidir.

EKLER

Ek A. İncelenen Gen Listesi

Tablo A1.1: sh-ZEB2 ve NSC Klonlarında İfadesi İncelenen Gen Listesi.

	GEN ADI	İleri Primer Dizisi 5'»3'	Geri Primer Dizisi 5'»3'
1	<i>BCAS4</i>	ACAGAAATGCGTGGCATCTA	AAGCACGTCTGCTTCCAG
2	<i>LPIN3</i>	AACCAGAGGTGTCAAGGTC	CAAAGACATCATTGGGCCTATTC
3	<i>RIPK4</i>	TTATGCAACAAGGAACGAATGG	CACAAGGACTCACCCAAGTAATA
4	<i>PICK1</i>	CCAAGTACTACAACGACTGCTAC	TCTGTGAACTCCTCCTGGTT
5	<i>MAG11</i>	CCACTCAGCCAGAACTCATAAC	CCTTGGGCTGTCAACAATCT
6	<i>RAD50</i>	CTCTCTCTGGGACTTGGTTTC	GTGGTGGGTACTGACTTAGATG
7	<i>CTNNA1</i>	GGAGCCTACTTCTAGCTGTATTT	GGCTTGGTCAGAGCATTACTA
8	<i>PCDH1</i>	CACAGCCTTGGTCCATCTTTAT	CTGCTTGGAGCGCTCATATT
9	<i>TAF11</i>	ACTGGATGTGTGTGAGAAGTG	GTGCTTCGAGTTAGGGATCTG
10	<i>ANKS1A</i>	CCAGCCAGAGAACTCATCTT	CTCCGTAGATTTCCGCATCTT
11	<i>ANKRD6</i>	GAAGCCAAGCCAATCAGAAAG	TCTGCACCCTAGTCCCTTAGT
12	<i>TPD52L1</i>	GCAGGTACACAACCTGGTCATA	CAAGGACATGCACATCATAAAGG
13	<i>MAP7</i>	GTGGACTTATCTTTCGCTTACCT	GCCAAACACAGTCAACATTCC
14	<i>MAP3K5</i>	CCAGGTGGTACTCTTTGGTTT	TTCTGGAACCAGGATGGTAATG
15	<i>ARHGEF1</i>	CTTCTTCCAGCCACAAGTAA	GAGTATCAACGCGAACATCAAAG
16	<i>RIPK2</i>	ACAGTTGGGATAGCACCATTT	CCTGCAGTTGAGAGTGGATTTA
17	<i>UHRF2</i>	CCTGCTTTCCTGTGTGTGTTTC	GTGAGAGATACAGTCCACCATTT
18	<i>CD72</i>	GATGATACACAACGCTACTAGGA	CTCACAGATGTAGGGAAGAGAAC
19	<i>TUBA4A</i>	ACCTCAATCGCCTCATTAGC	GGTTGGTCTGGAACCTCTGTC
20	<i>LEMD3</i>	GTCACCTGCATAGTTCCTACAG	TCCAGCCGTAGCAAATGAA
21	<i>PPMHA1</i>	CACACGCTTCTTTACCGAGA	CGTGCAGCCACCAGATATATTA
22	<i>GAB2</i>	GGAGACAGCGAAGAGAACTATG	GTCCAGGGCCAGATAATCAA
23	<i>RELA</i>	AGCACTTACGGATTCTGGTG	GAGAGAGAGATACAGATACTGACAATAA
24	<i>CCND1</i>	GGGTTGTGCTACAGATGATAGAG	AGACGCCTCCTTTGTGTAAAT
25	<i>KRAS</i>	GGACTCTGAAGATGTACCTATGG	GCTAAGTCTGAGCCTGTTT
26	<i>LRP5</i>	CATTGGCATCATCTCTCTCTC	TCCCGCTGACATACTCGT
27	<i>PPFA1</i>	GGACCACTTGACCAAGAAAGA	CCTTCTCAGGCACATAAATCCA
28	<i>GSPT1</i>	GGAAAGCTGGAATCAGGATCTAT	GGGCTACGGTATCAGTCTCTA
29	<i>TESK1</i>	CTTCAGGACACCCTGTAAGAAC	GAAGTGCTCTGTCCCTTGAG
30	<i>AZINI-AS1</i>	GATCTTTGCCAGCTTCCAATATG	CAAGGATTCAGGTGGTGGAA
31	<i>KILLIN</i>	AATGGCTGGCCCTATCTAAAC	GTGCTTGGAGACCAGTGTATT
32	<i>MAGI3</i>	GACAACCTGCTGCTCGAAATG	GGGAGATCCATCTGTGTGTA
33	<i>TAF3</i>	CATCTTTGTTGCCAGTGCCTTC	CTTCTCTCTTTCCTTCTCTCTT
34	<i>PSEN2</i>	TCCTCATTGGCTTGTGTCTG	GGTTGTCCGTGGAGAAGTAAA
35	<i>HELLS</i>	GATCGAATGCTGCCAGAACTA	CAAGCCTGCTGAAGTTGAAATC
36	<i>EpCAM</i>	GGATCTGGATCCTGGTCAAAC	GCTATCACCAACCACAATAAC
37	<i>IRF9</i>	CCGTGATAATCGTGTCTGAA	ACAGATGAAAGAGGGCGTATATC
38	<i>IRF6</i>	GATCCTTTGATAGTGGCAGTGT	CAGCTCTCTGGGTTTGAAG
39	<i>EZH2</i>	ACGGCTTCCAATAACAGTAG	AGTCCCTGCTCCCTATCA

Tablo A1.1: Devam.

40	<i>JAG2</i>	TGTATGAAAGGAGAGAGCAAAGG	GAGAAACCCGAGTGAGGAATAAA
41	<i>ERCC6</i>	GAAGAGACCCTGGAGAAACATC	TTCACTGTCTTGCTTCTGGTAA
42	<i>ATAD2</i>	GCACTTCCATGCATACTTGC	AAGGTTTCCAACAGAAGCTATTTC
43	<i>SMURF2</i>	TTCTCAGAGCATGTGGATGG	CACTTGTCAGAGACTTTGGTTTATAG
44	<i>ID2</i>	TGAGTGAAACCTTGTGAACTCT	AGCATGAATAAGTACACCATTACAC
45	<i>TWIST1</i>	GAAGTCTGAACAGTTGTTTGTGT	AGTCCATAGTGATGCCTTTCC
46	<i>ATMIN</i>	TTTGCCCAGCTCTAAGGTAAC	GGTCATCCGTTGGACTTTCTAT
47	<i>IL17C</i>	TCCATCTCACCTGGAGATAC	GTGCATCGATACAGCCTCTG
48	<i>CDK10</i>	GAGAATATGCCAACACCCTTCT	CTTCAGGTCCCTGTGGATAATG
49	<i>GAS8</i>	GCAAACACTACGAGAGGGACAA	TGGTGAATCGCTGCTCTAAC
50	<i>AXIN</i>	GGCTCCAGAAGATCACAAAGAG	GCATCCTCCGGTATGGAATTT
51	<i>ANKRD12</i>	CAGCCATACAGTTCAGAGAGAG	CTGAGGTGCTTGAGGAATCA
52	<i>APC2</i>	ACTCCATCCTGTCTTCGTATC	ATTTCTCCCTCCGCCTGT
53	<i>MKNK2</i>	CGCTTCTACCTGGTGTGTTGA	TGGGCGATGCCTTTGTTAT
54	<i>EMX1</i>	GCAGGTGAAGGTGTGGTT	CTTCTTCTTCTGCTCGGACTC
55	<i>GALNT3</i>	GGCACAACATCCAGAAGGAA	CATATCTGCTCTCCAGTGACAAC
56	<i>APIS3</i>	TTGTTGACTGGAAGGAGCTAAA	ACGTAACGATGCACAATCTCT
57	<i>BOK</i>	GATGGACTGATGTCCTCAAGTG	GGCAGCAGCACGAAGAA
58	<i>BCL2L1</i>	CATCAATGGCAACCCATCCT	CCTCAGCGCTTGCTTTACT
59	<i>EDEM2</i>	AGGTGGAGTGCGGATTTG	GTCAAACAGGAGGTAGAGGTATTT
60	<i>SPAG4</i>	AAGCCCGACTATGCTTTGAG	CTGAAGCGATTCCAGAAGTAGG
61	<i>GAD1</i>	GTGCCTAAACTGGTCTCTTC	CATTGTCAGTTCCAAAGCCAAG
62	<i>IL6R</i>	CCTTTCAGGGTTGTGGAATCT	GAAAGATGAGTTCAGGAGTGG

Ek B. Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Balcik E. P., Cetin M., Yalim C. I., Odabas G., Tokay N., Sayan A. E., Yagci T., (2018), "Genome-Wide Analysis of Endogenously-Expressed ZEB2 Binding Sites Reveals Inverse Correlation between ZEB2 and a GalNAc-Transferase GalNAc-T3 in Human Tumors", Cellular Oncology.