

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EZH2 ARACILIKLI H3K27me3
MODİFİKASYONUNUN
HEPATOSELÜLER KARSİNOMA
GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ**

SANEM TERCAN AVCI

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2010970088

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EZH2 ARACILIKLI H3K27me3
MODİFİKASYONUNUN
HEPATOSSELÜLER KARSİNOMA
GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

SANEM TERCAN AVCI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şerife Esra ERDAL

TÜBİTAK 112T173 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2010970088

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Sanem TERCAN AVCI "EZH2 Aracılıklı H3K27me3 Modifikasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Gelişimindeki Rolü" konulu Doktora tezini 26.08.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Şerife Esra ERDAL
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Neşe ATABEY
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Metiner TOSUN
ÜYE
İzmir Ekonomi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Buket KOSOVA
ÜYE
Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Serdar ÖZÇELİK
YEDEK ÜYE
İYTE, Fen Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Hani Alotaibi
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR	IX
TEŞEKKÜR	X
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2 Araştırmanın amacı	5
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Hepatoselüler Karsinomanın Genel Özellikleri	7
2.2 Hepatik Kanser Kök Hücrelerin Hepatokarsinogenezdeki İşlevi.....	10
2.4 Hepatoselüler Karsinoma Gelişiminde Epigenetik Regülasyonların Rolü	14
2.4.1 Polycomb Grup Proteinlerin Epigenetik Rolü ve Moleküler Biyolojisi	16
2.5 EZH2 Aracılıklı Epigenetik Düzenlemenin Hepatokarsinogenezdeki İşlevi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1 Araştırmanın Tipi	20
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	20

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	20
3.4 Çalışma Materyali	20
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	20
3.6 Veri Toplama Araçları	20
3.6.1 Hücre Kültürü İdamesi	20
3.6.2 Hücrelerin Dondurulup Çözülmesi	21
3.6.3 EZH2 Gen Susturulması	22
3.6.3.1 HEK293T Hücrelerde Viral Partiküllerin Üretilmesi.....	22
3.6.3.2 Transduksiyon	22
3.6.4 Hücre Proliferasyonu	24
3.6.4.1 Sulforhodamine (SRB) Testi	24
3.6.4.2 XCelligence ile Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyonu	24
3.6.5 Hücre Döngüsü Analizi	25
3.6.6 Hücre Motilitesi ve İnvazyonu	25
3.6.7 <i>In vivo</i> “Xenograft” Tümör Modeli	27
3.6.8 Akış Sitometri Yöntemi ile Hücre Ayrılması FACS (Fluorescence-activated cell sorting)	28
3.6.9 Akış Sitometri Analizi	28
3.6.10 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi	29
3.6.10.1 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	29
3.6.10.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR.....	29
3.6.11 Western Blotlama	30

3.6.11.1 Total ve Nükleer Protein İzolasyonu	30
3.6.11.2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi	31
3.6.11.3 Proteinlerin SDS-PAGE polikrilamid jelde yürütülmesi	31
3.6.11.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve membranın bloklanması	32
3.6.11.5 Proteinlerin membran üzerinde saptanması	33
3.6.12 Immünboyama	33
3.6.12.1 Immünhistokimya	33
3.6.13 Histon Ekstraksiyonu	36
3.6.14 Kromatin İmmunopresipitasyon Yöntemi (ChIP).....	37
3.6.14.1 In vivo cross-linking, lizis ve sonikasyon aşaması	37
3.6.14.2 “Cross-link” edilen DNA/protein örneği ile İmmunopresipitasyon aşaması..	38
3.6.14.5 Serbest DNA elde etmek amacıyla, protein/DNA kompleksinin elüsyonu ve reverse cross-link aşaması;	39
3.6.14.6 Spin kolonlar ile DNA’nın purifikasyonu aşaması	39
3.6.14.7 Elde edilen ChIP örnekleri ile gerçek zamanlı kantitatif PCR	39
3.6.15 ChIP Sekanslama	40
3.6.16 Biyoinformatik Analiz	41
3.6.17 İstatistik	41
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi	42
3.7.1 Araştırma Planı	42
3.7.2 Araştırma Takvimi	43
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	43

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	43
3.10 Etik Kurul Onayı.....	44
4. BULGULAR	45
4.1 HuH-7 Hücrelerinde EZH2 Geninin Susturulması	45
4.2 HuH-7 Hücrelerinde EZH2'nin Kalıcı Olarak Sessizleştirilmesinin Hücrenin Biyolojik Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi	47
4.3 Kalıcı Olarak EZH2 Geni Sessizleştirilen HuH-7 Hücrelerinden Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH)'lerin ayrışması	49
4.3.1 scr-HuH-7 ve shEH2-HuH-7 Hücre Populasyonu İçerisinde EpCAM Eksprese Eden HpKKH Oranının Belirlenmesi.....	49
4.3.2 scr-HuH-7 ve shEH2-HuH-7 Hücrelerinden EpCAM+ Populasyonun Ayrışması.....	50
4.3.3 scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEH2-HuH-7(EpCAM+) Hücrelerinde H3K27Me3 ve H3K27Ac Modifikasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	52
4.4 EZH2'nin Kalıcı Olarak Sessizleştirilmesinin Hücrenin Biyolojik Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi.....	53
4.5 shEZH2-HuH-7(EpCAM+) Hücrelerinin in-vivo Tümör Başlatma Kapasitelerinin Belirlenmesi	55
4.6 Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH)'lerde EZH2 Aracılıklı Epigenetik Düzenlemede Rolü Olan Genlerin Araştırılması.....	57
4.6.1 H3K27me3 Kromatin İmmünopresipitasyonu (H3K27me3-ChIP).....	57
4.6.2 H3K27me3-ChIP sekans analizi (H3K27me3-ChIPseq).....	59
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR	72

8.EKLER.....	76
8.1 Etik Kurul 1	76
8.2 Etik Kurul 2	78
8.3 Etik Kurul 3	80



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.6.1. SDS-PAGE ayırlama ve istifleme jel bileşenleri	31
Tablo 3.6.2. Kullanılan bloklama solüsyonları ve antikorlar	32
Tablo 3.6.3. Rutin doku takibi protokolü	34
Tablo 3.6.4. Hematoksilen-Eozin boya protokolü	35
Tablo 3.6.5. ChIP-seq örneklerinin Genecore ID'leri ve DNA konsantrasyonları.	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi (Farazi and DePinho 2006).	8
Şekil 2.2. Kanser kök hücre hipotezi (Yamashita and Wang 2013).	9
Şekil 2.3. Karaciğer yenilenmesi ve HCC oluşum sürecinde HpKKH'ler (Yamashita and Wang 2013).	11
Şekil 2.4. Epitelyal mezenşimal plastisite (Tam and Weinberg 2013).	13
Şekil 3.6.1. pGIPZ lentiviral shRNA vektör bileşenleri ve ayrıntılı plasmid haritası.	23
Şekil 3.6.2. XCelligence cihazının çalışma prensibi	24
Şekil 3.6.3. Kontrol eklentilerinin çalışma şeması.	25
Şekil 3.6.4. H3K27me3-ChIP-seq yöntemi.	37
Şekil 4.1. 293T hücrelerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi.	45
Şekil 4.2. HuH-7 hücrelerinde EZH2 gen ekspresyon düzeyinin gerçek zamanlı qPCR ile belirlenmesi.	46
Şekil 4.3. shEZH2-HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin protein düzeyinde ve H3K27me3 histon modifikasyonu düzeyinde değişiminin western blot yöntemi ile gösterilmesi.	46
Şekil 4.4. HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücrenin biyolojik davranışlarına etkisi.	48
Şekil 4.6. scr-HuH-7 kontrol hücre grubu ile shEZH2-HuH-7 hücre grubunda EpCAM+ hücre popülasyonunun flow sitometri yöntemi ile belirlenmesi.	50
Şekil 4.7. scr-HuH-7 ve shEZH2-HuH-7 hücrelerinde EZH2 miktarının kontrolü.	51
Şekil 4.8. FACS ile ayrımlanan scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH-7 (EpCAM+) hücrelerde EpCAM oranının ve EZH2 miktarının belirlenmesi.	52
Şekil 4.9. scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerde H3K27me3 ve H3K27ac histon modifikasyon düzeylerindeki değişimin western blot yöntemi ile gösterilmesi.	53
Şekil 4.10. HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücrenin biyolojik davranışlarına etkisi.	54
Şekil 4.11. Vimentin, Slug ve E-kaderin düzeyinin gerçek zamanlı qPCR ile gösterilmesi (* simgesi $p<0.05$ ifade etmektedir, $n:3$, Mann-Whitney test).	55
Şekil 4.12. shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerinin in-vivo tümör başlatma kapasitelerinin belirlenmesi.	56

Şekil 4.13. Xenograft fare tümör dokularından alınan kesitlerde EZH2 ve H3K27me3 immunohistokimyasal boyama yöntemi ile EZH2 ve H3K27me3 düzeylerinin gösterilmesi.	57
Şekil 4.14. H3K27me3-ChIPseq örneklerinin validasyonu.	58
Şekil 4.15. ChIPseq-H3K27me3 biyoinformatik analizi ve DAVID programı kullanılarak elde edilen gen grupları ve biyolojik işlevleri.	60
Şekil 4.16. shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerde KLF4 geninin H3K27me3 ile ilişkili promotor bölgesinde meydana gelen sinyal değişiminin iGV programı ile belirlenmesi.	61
Şekil 4.17. KLF4'un H3K27me3 ile regülasyonunun gerçek zamanlı qPCR ile gösterilmesi. a)KLF4 gen ekspresyonun b)KLF4'ün promotor bölgesindeki H3K27me3 regülasyonunun gerçek zamanlı qPCR yöntemi ile belirlenmesi (* simgesi $p<0.05$ ifade etmektedir, n:3, Mann-Whitney test).	62
Şekil 4.18 HCC hastalarında hipermetile olarak belirlenen bölgeler ile EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile regüle edilen ortak bölgelerin DAVID programı kullanılarak elde edilen gen grupları ve işlev yaptıkları yollar.	63

KISALTMALAR

EZH2: Enhancer of Zeste Homolog 2

HCC: Hepatocellular Carcinoma (Hepatoselüler Karsinoma)

HpKKH: Hepatik kanser kök hücre

KKH: Kanser kök hücre

EMT: Epithelial mesenchymal transition (Epitelyal-mezenşimal dönüşüm)

KLF4: Kruppel-like faktör 4

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

HAT: Histon acetyl transferase

HDAC: Histon deacetylase

HMT: Histon metil transferase

PTM: Post-translasyonel modifikasyonlar

DNMT: DNA metil transferaz

HOX: Homeodomain genleri

H3K27me3: Histon 3 lizin 27 trimetilasyonu

H3K27ac: Histon 3 lizin 27 asetilasyonu

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

PcG: Polycomb G protein

TF: Transkripsiyon faktörü

PRC1/2: Polycomb Repressive Complex 1/ 2

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

ChIP: Chromatine Immunoprecipitation (Kromatin immunoprecipitasyonu)

ChIPseq: ChIP sekanslama

FACS: Floresans-activated cell sorting (Floresan Akış Sitometrisi)

TEŞEKKÜR

Hocalarım **Prof.Dr. Esra Erdal** ve **Prof.Dr. Neşe Atabey** başta olmak üzere, grup arkadaşlarım; **Yrd. Doç. Dr. İmge Kunter, Dr. Peyda Korhan, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Fırtına Karagonlar, Dr. Emine Kandemiş, Dr. Evin Özen, Ayşim Güneş, Soheil Akbari, Eren Şahin, Hande Topel, Yeliz Yılmaz, Nevin Ersoy, Ezgi Bağirsakçı, Erkan Kahraman, Mustafa Karabiçici** ve **Sena Alptekin'e** saygı, sevgi ve denge içinde birlikte çalışmanın keyfine ve gücüne dair hayatıma kattıkları, paylaştıkları herşey için teşekkür ederim. Deneylerim sırasında yorumlarını benden esirgemeyen **Yrd. Doç. Dr. Hani Alotaibi'ye**, FACS uygulamalarındaki yardımları için **Dr. Xiaozhou Hu'ya**, biyoinformatik konusundaki yardımları için **Yrd. Doç. Dr. Can Küçük** ve **Yrd. Doç. Dr. Gökhan Karakulah'a** teşekkür ediyorum. İleriye yönelik yorumları ve katkıları nedeniyle sayın jüri üyelerime de çok teşekkür ederim.

Her zaman desteğini hissettiğim, sabrı, sakinliği, yaratıcılığı, bilgisi, programlı ve disiplinli tarzı ile hayatım boyunca örnek alacağım sevgili hocam **Prof. Dr. Neşe Atabey'e** tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

Beni sadece bir bilimsan olarak değil her yönden geliştiren, yaratıcılığı, bilgisi, birçok işi bir anda yapabilme motivasyonu, enerjisi ve hayata karşı güçlü duruşuyla her zaman örnek aldığım ve alacağım sevgili hocam, danışmanım **Prof Dr. Esra Erdal'a** desteği ve bu süreçteki tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

Öncelikle büyüyüp, şekillendiğim, sevgi ve huzur içindeki ailemiz için ve tek bir an bile tereddüt etmeden hiçbir desteği esirgemedi hedeflerime hep saygı duydukları için melek olan anneciğim **Gürsel Tercan**, canım babacığım **Erol Tercan** ve canım kardeşim **Kerem Tercan'a** teşekkür ederim. Birtanecik eşim **Tolga Avci'ya** ben pes ettiğimde o etmediği için, annemle babamın kaldığı yerden devam edip, sonsuz sabır ve sevgisini esirgemediği için teşekkür ederim. En büyük sabrı ve anlayışı gösteren oğlum **Barış Avci'ya** yaşama sevincim, en büyük motivasyonum olduğu için teşekkür ederim. En az benim kadar gösterdiğiniz çaba olmasaydı, başaramazdım.

Anneciğim'e..

EZH2 ARACILIKLI H3K27me3 MODİFİKASYONUNUN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

Sanem TERCAN AVCI, DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD,
İnciraltı/İZMİR

ÖZET

Hepatoselüler karsinoma (HCC) kötü prognozu, ilaç direnci ve agresif karakteri ile, ölüm oranı sıralamasında tüm dünyada kanserlerin içinde ikinci sıradadır. Son yıllarda, tümör başlatıcı hücreler olarak kabul edilen EpCAM+ hepatik kanser kök hücrelerin (HpKKH), metastaz ve ilaç direncindeki önemi gösterilmiş olsa da, bu hücrelerde gerçekleşen epigenetik düzenlemelerin tümör gelişimindeki rolleri bilinmemektedir. PcG kompleksi ve onun katalitik altbirimi olan EZH2 gelişim sırasında, hücre kimliğinin belirlenmesi ve sürdürülmesinde görevli birçok genin düzenlenmesinde rol oynayan anahtar moleküllerdir. HCC’de ise EZH2’nin aşırı ekspresyonu agresif fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla, EZH2’nin kanser kök hücre davranışındaki rolü ve bu rolü hangi genleri kontrol ederek düzenlediğinin belirlenmesi, HCC tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir.

Çalışmamızda, ilk olarak, lentiviral shRNA yöntemi ile kalıcı olarak EZH2 geni sessizleştirilen HuH-7 hücreleri ve/veya bunlardan ayrımlanan HpKKH altpopulasyonunda, proliferasyon, motilite, invazyon ve/veya tümöröenez aktivitelerindeki farklılıklar ve sonrasında bu hücrelerde EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonunun transkripsiyonunu düzenlediği genler ChIP-sekanslama yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre, atasal HuH-7’de, EZH2 ekspresyonundaki azalmanın anlamlı şekilde EpCAM+ hücre sayısında azalmaya ve ayrımlanan EpCAM+ HpKKH’lerin proliferasyonunda artmaya, buna karşın, invaziv hücre sayısında azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Sonrasında, bu koşullarda EZH2 aracılıklı histon kodu ile düzenlenen genler analiz edildiğinde, hücre farklılaşması, hücre sinyal iletimi ve hücre çoğalması gibi biyolojik süreçlerde görevli gen setlerine rastlanmıştır. Bunlar arasından seçilen ve kök hücrelerin potansisini kontrol ettiği bilinen KLF4’ün değişimi konvensiyonel yolla doğrulanmış olup, bu genin HpKKH’lerde EZH2

aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile regüle edildiği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Çalışmamızda biyoinformatik analizlerini gerçekleştirdiğimiz, epigenetik olarak regüle edilen gen veya gen setlerinin ileride HCC tedavisinde hedeflenebilecek molekül ve/veya mekanizmalar olarak kullanılma potansiyellerinin yüksek olduğunu düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELELER; HCC, HpKKH, EZH2, KLF4, H3K27me3, ChIPseq



THE ROLE OF EZH2 MEDIATED H3K27me3 MODIFICATION IN THE DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Sanem TERCAN AVCI, DEÜ Institute of Health Science, Department of Medical Biology and Genetics, İnciraltı/İZMİR

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is second of most fatal malignancy in all cancers worldwide because of its highly aggressive characteristics, poor prognosis and drug resistance. Although EpCAM⁺ hepatic cancer stem cells (HpCSC), which are accepted as tumor initiating cells, has recently been shown to be important for drug resistance and metastasis, the role of epigenetic regulations in these cells during tumorigenesis is still not clear. PcG complex and its catalytic subunit EZH2 are the key molecules with their roles in the regulation of the genes responsible for cell fate decision and maintenance during development. EZH2 overexpression is related to aggressive phenotype in HCCs. Thereby it is important to clarify the roles of EZH2 in HpCSCs, determine the genes it controls and how it regulates these roles in order to develop new treatment strategies.

In our study, firstly, we stably silenced EZH2 by shRNA lentiviral system in HuH-7 cells and/or HpCSC that we sorted from these cells and we determined the differences in cell proliferation, motility, invasion and/or in vivo tumorigenesis. Then we specified the genes that are regulated by EZH2 mediated H3K27me3 in HpCSC by using ChIP sequencing technique. We showed that the number of EpCAM⁺ cells in parental HuH-7 are reduced and the sorted HpCSC are more proliferative, although the number of invasive cells are reduced due to EZH2 silencing. In the same conditions we analyzed the genes that are regulated by histone code and we determined the gene sets involved in biological processes such as cellular differentiation, cell signaling and cell proliferation. KLF4 gene that is critical for stem cell pluripotency is chosen from these gene sets and alterations in the expression of this gene is confirmed by a conventional method. In this study it has been shown for the first time that KLF4 is regulated by EZH2 mediated H3K27me3 modification in HpCSC.

In conclusion, the molecules/mechanisms discovered in this project have the potential to be candidate targets in HCC treatment.

KEY WORDS; HCC, HpKKH, EZH2, KLF4, H3K27me3, ChIPseq



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Son yıllarda, “xenograft” fare modellerinde, insan doku ve/veya hücre hatlarından ayrımlanan, EpCAM+ hücrelerin çok düşük sayıda tümörü başlattıkları gösterilmiştir. Tümör başlatıcı hücreler ya da hepatik kanser kök hücre (HpKKH), olarak tanımlanan bu hücrelerin metastaz ve ilaç direncinde rol aldıkları bildirilmiştir. Ancak, bu hücrelerin tümörde ve farklılaşma aşamalarındaki roller ve epigenetik düzenlemelerin bu süreçte nasıl etkili oldukları bilinmemektedir. PcG kompleksleri, epigenetik hücresel hafızanın anahtar regülörleridir. Embriyogenez, gelişim ve tümörögenез süreçlerinde hücresel kimliğin belirlenmesi ve sürdürülmesi bakımından önemlidirler. PcG kompleksinin katalitik altbirimi olan EZH2 aynı zamanda HCC’de onkogen gibi davranması, ek olarak gelişim sırasında önemli embriyonik genlerin ekspresyonunu dolayısıyla farklılaşmayı kontrol ediyor olması bize karaciğer kanser kök hücrelerinde de düzenleyici rolü olabileceği hipotezini kurdurmuştur. Sonuç olarak bu çalışma kapsamında, EZH2 geni ve onun katalizlediği histon modifikasyonu H3K27me3’ün, HCC’de kanser kök hücrelerin proliferasyon, motilite ve invazyon gibi davranışlarının *in vitro* ve fare “xenograft” modellerinde nasıl etkilediğini ve hangi genlerin transkripsiyonunu kontrol ederek bunları gerçekleştirdiğini anlamak, ileride HCC’de tedavi stratejisi olabilecek yeni hedef molekül ve mekanizmalarının bulunmasını sağlayacaktır.

1.2 Araştırmanın amacı

Bu tez kapsamında, EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonunun, hepatokarsinogenez sürecinde hepatik kanser kök hücrelerinde hangi mekanizmaları, hangi genleri düzenleyerek gerçekleştirdiğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Tez kapsamında, hepatokarsinogenez sürecinde, hepatik kök hücrelerin, hepatik kanser kök hücrelerine dönüşümü ve farklılaşmasını tamamlamış hepatik hücrelerin yeniden programlanması ile tümör başlatma ve agresif fenotip kazanma sürecinde; proliferasyon, epitelyal mezenşimal dönüşüm (EMT), motilite ve invazyon yeteneğinin kazanılmasının EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile

düzenlendiği hipotezi kurulmuştur. H3K27me3-ChIPseq biyoinformatik analizleri ile elde edilen, HpKKH özelliği gösteren hücrelerde EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonunun düzenlediği bu moleküllerin ve/veya mekanizmaların HCC tedavisinde biyobelirteç olarak ve/veya terapötik potansiyelleri bulunmaktadır.



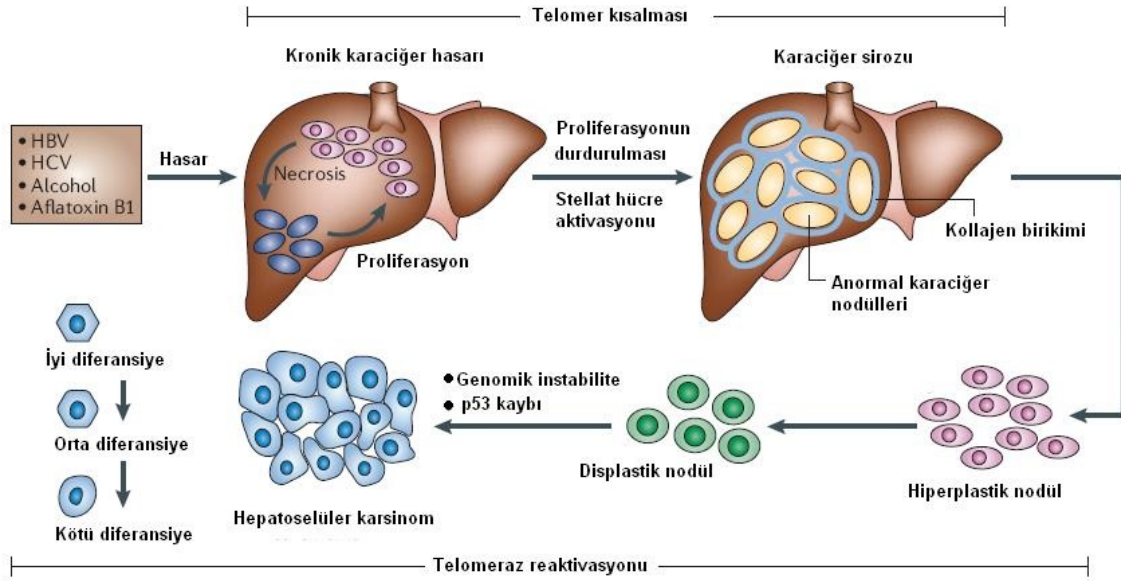
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hepatoselüler Karsinomanın Genel Özellikleri

Karaciğer kanseri tüm kanser türlerinin içinde dünyada sıklık bakımından 6., ölüm oranı bakımından 3. sıradadır ve yılda yaklaşık 700.000 yeni vakanın bulunduğu bildirilmektedir (Torre, Bray et al. 2015). Hepatoselüler karsinoma (HCC) primer karaciğer kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturmakta olup, geç prognozu ve ilaç direnci ile karakterize, agresif seyirli bir tümördür. Bu nedenlerle tedavi rezeksiyon, transplantasyon ve transarterial embolizasyon gibi cerrahi ya da cerrahi olmayan yöntemlerle sınırlıdır. HCC tedavisinde FDA onaylı tek ilaç olan sorafenib'in sağ kalımı yalnızca 2-3 ay uzatabildiği ve bu etkininde sınırlı hastada ve durumda görüldüğü bildirilmiştir (Copur 2008). Sonuç olarak, HCC'de yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır.

HCC, etiyolojisi çoğu olguda tanımlanabilen birkaç kanser türünden biridir. Tüm dünya popülasyonunun her parçasını etkilemekle beraber çeşitli ülkelerde HCC insidansı bakımından belirgin farklılıkların olması, etnik köken ile beraber özgül etiyolojik faktörleri yansıtır. HCC ile ilişkili en belirgin faktörler, kronik hepatit B ve C viral enfeksiyonu, kronik alkol tüketimi, aflotoksin-B1 kontamine gıdalar ve sirozu indükleyen koşullardır. Düşük frekansa sahip olsalar da diğer etiyolojik faktörler de HCC'ye neden olmaktadır; belli metabolik hastalıklar, diyabet, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanma bozukluğu. Cinsiyet de HCC riskini ve davranışını etkiler, olguların büyük kısmını erkekler oluşturmaktadır (Sherman 2005).

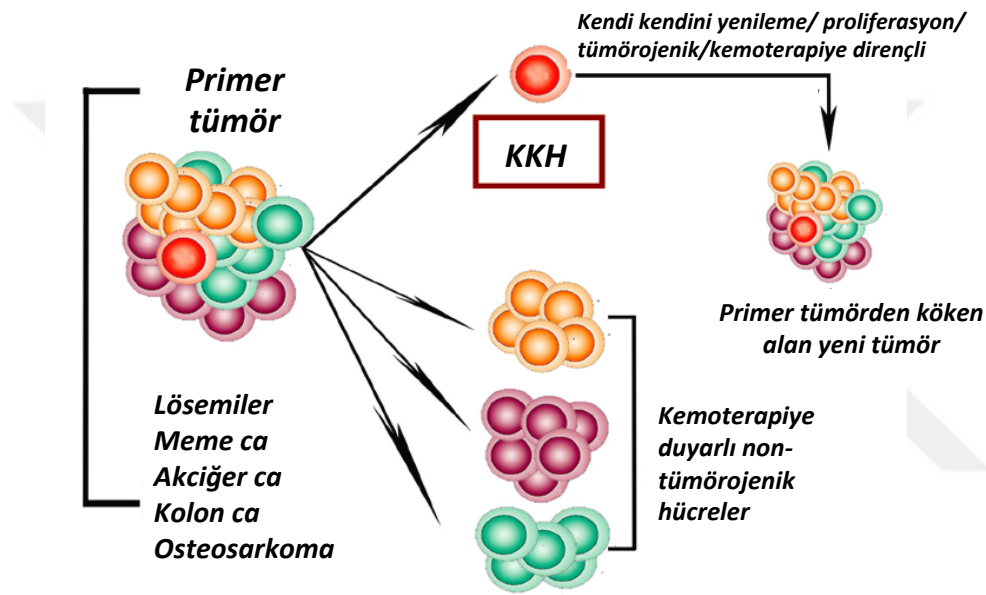
Hepatokarsinogenez, çoğu hepatositin öldüğü, karaciğerin ve bağ dokusunun enflamasyonlu hücreler tarafından istila edildiği, kronik hepatit veya siroz zemininde gelişir (Thorgeirsson and Grisham 2002). HCC gelişimi çok basamaklı ve yavaş bir süreçtir. HCC'ye neden olan ardışık olaylar 5 basamakta özetlenebilir; inflamasyona neden olan kronik karaciğer hasarı, hücre ölümü, siroz ve rejenerasyon döngüleri sonucunda oluşan DNA hasarı, displazi ve sonuç olarak HCC (Şekil 2.1) (Farazi and DePinho 2006).



Şekil 2.1. Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi (Farazi and DePinho 2006).

Bu süreçte meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu birçok sinyal yolağı regülasyonu değişmekte ve dolayısıyla hücrenin büyüme, sağkalım, proliferasyon, diferansiyasyon, hücre ölümü gibi davranışları da değişmektedir. Hepatokarsinogenez sürecinde viral enfeksiyonlar ve/veya hepatotoksik maruziyet sonucunda karaciğer dokusunun değişimine bağlı olarak çeşitli sinyal yollarında ve bu yolların regülasyonunda değişiklikler belirlenmiştir (Dhanasekaran, Bandoh et al. 2016). HCC patogeneğinde öncelikli olarak rol oynayan regülasyonu değişen başlıca sinyal yolları; insulin-benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet türevi büyüme faktörü (PDGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF/MET) gibi büyüme faktörlerini regüle eden sinyal yolları ile WNT, Hedgehog, Notch gibi hücre diferansiyasyonu ile ilişkili sinyal yolları ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), FGF gibi angiogenez ile ilişkili sinyal yollarıdır (Dhanasekaran, Bandoh et al. 2016). Reseptör tirozin kinaz sinyalizasyonu alt bileşenleri; Ras/Raf/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR kaskat mekanizmalarında meydana gelen düzensizlikler yanında tümör mikroçevresinin düzenlenmesi ve tümöre karşı oluşturulan immün yanıtın aksatılmasına neden olan sinyal iletimi değişiklikleri hepatokarsinogenez sürecini desteklemektedir (Dhanasekaran, Bandoh et al. 2016).

Hasarlı dokularda bir yenilenme ve hasar onarımı süreci olan dediferansiyasyon aşırı aktivasyonu sonucunda, kanser kök hücreler gibi aşırı çoğalan prematüre hücre oluşumuna neden olmaktadır (Pan Yu et al. 2013). Farklılaşmasını tamamlayan hücrelerin yeniden kök hücre yani “stemness” karakteri kazanması dediferansiyasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç nükleer yeniden programlanmayı gerektirmektedir. Böylece farklılaşmasının son basamağındaki olgun hücre tekrar multipotent hatta pluripotent aşamaya dönmektedir. Hücrenin bu süreçte olgun fenotipi değişmekte, prematüre fenotipi eksprese etmeye başlamaktadır.



Şekil 2.2. Kanser kök hücre hipotezi (Yamashita and Wang 2013).

Tümör hücreleri heterojen morfoloji ve davranış göstermektedir. Bu heterojenite, klonal gelişim sürecinde, hücrelerde, birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin oluşması ve birikmesi şeklinde açıklanmaktadır. Ayrıca tümörün mikroçevresinde meydana gelen ve yukarıda sözü geçen birçok ekstrinsik sinyal yolağı aktivasyonu gibi değişiklikler de bu heterojeniteyi desteklemektedir. Bunlara ek olarak son zamanlarda yapılan çalışmalar, heterojenitenin, kanser kök hücreleri olarak tanımlanan kök hücre/öncül hücre özelliklerinde bir grup hücrenin hiyerarşik organizasyonunun bir sonucu olduğunu göstermektedir (Yamashita and Wang 2013). Bir kanser hücresi ve kök hücre; kendi kendini yenileyebilme, simetrik ve asimetrik bölünme yeteneği sayesinde heterojen yeni yavru hücreler meydana getirme, limitsiz

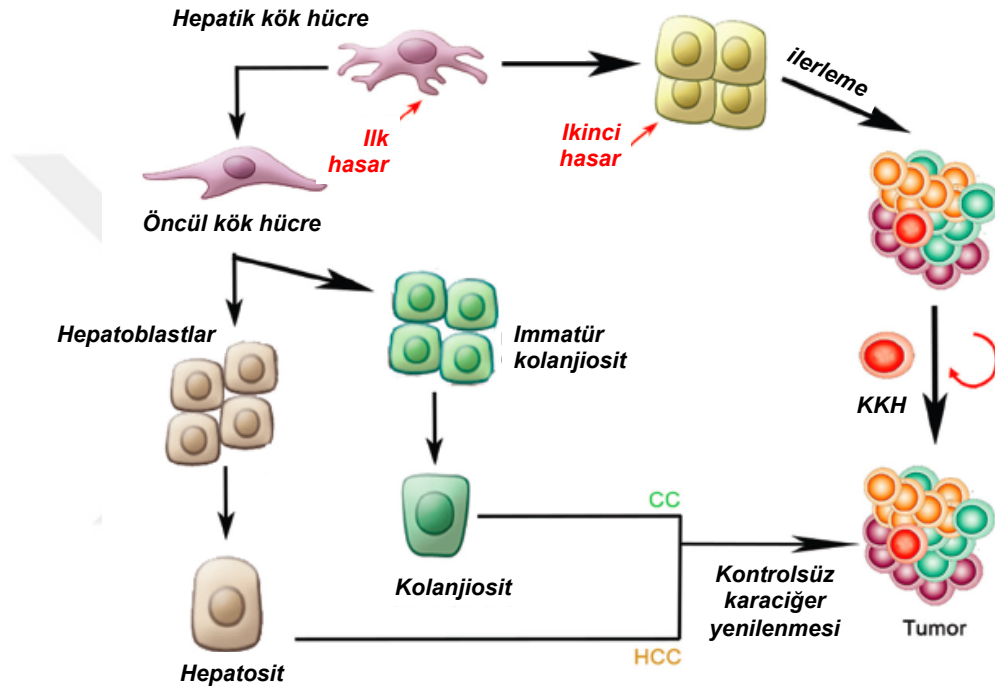
çoğalma gibi birçok benzer işlevi gerçekleştirebilmektedir (Şekil 2.2). Kanser kök hücre hipotezi, birçok kök hücre yüzey belirtecini hiyerarşik bir organizasyonla yüzeyinde eksprese eden, kendi kendini yenileme özelliğine sahip kanser hücrelerinin deneysel validasyonları ile henüz ortaya koyulmuştur (Yamashita and Wang 2013). Bu kendini yenileme kapasitesi, çeşitli *in vitro* klonojenik büyüme ve *in vivo* tümörojenik özellikleri göstermesi ile konfirme edilmiştir. Böylece KKH'ler; tümör başlatma kapasitesine sahip, metastatik, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli, tedaviden sonra relaplardan sorumlu, asimetric ve simetric bölünme yeteneği ile tümör hacminin belirlenmesinden sorumlu hücreler olarak belirlenmiştir. Bu nedenlerle KKH'leri, aralarında karaciğer kanserinin de bulunduğu çeşitli kanser türlerinin tedavisi için öncelikli hedef oluşturmaktadırlar (Yamashita and Wang 2013).

2.2 Hepatik Kanser Kök Hücrelerin Hepatokarsinogenezdeki İşlevi

Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimini anlamak için karaciğer embriyolojisini de anlamak gerekmektedir. Hepatik öncül kök hücreler, karaciğerin fetal ve neonatal dönemde karaciğer duktal tabakasında, pediatrik ve yetişkin dönemde ise Hering kanalları olarak tanımlanan kök hücre alanlarında lokalize olan multipotent kök hücrelerdir. Bu hücreler fenotipik olarak EpCAM, NCAM, CD133, CXCR4, SOX9, SOX17, FOXA2, CK7/8/18/19, Hedgehog proteinleri, intranükleer telomeraz proteini, claudin3, MDR1, çok az miktarda da albumin ve MHC antijenleri eksprese ederken; AFP, ICAM-1, CD34, CD38, CD45, CD90 gibi hematopoietik, VEGFr, CD31 gibi endotelyal, veya CD146, desmin, CD105 gibi mezenşimal belirteçleri eksprese etmemektedirler (Turner, Lozoya et al. 2011).

Hepatoblastlar, hepatosit ya da kolajiositlerin köken aldığı diploid bipotent hücrelerdir. Fetal ve neonatal karaciğer parankimi boyunca veya yetişkin karaciğer Hering kanallarının son kısmında tek tek ve küçük hücre agregatları olarak yerleşmişlerdir (Romano, De Francesco et al. 2015). Hepatik kök hücreler ile benzer antijenik profile sahiptirler. Karaciğerin yenilenme sürecinde; EpCAM ekspresyonları azalırken, albumin seviyesi artması, NCAM yerine ICAM-1 ekspresyonu, CK14, CK19 ve hepatik hücrelere özgü AFP ekspresyonu gibi protein ekspresyonlarında değişiklikler meydana gelir. Sonuç olarak, karaciğerde, kök hücre gen ekspresyonlarını kaybetmiş, unipotent ve hem hepatositik hem de kolanjiosit

antijenleri eksprese eden farklılaşmasını tamamlamamış öncü hücrelere dönüşürler (Şekil 2.3) (Romano, De Francesco et al. 2015). Fetal ve neonatal karaciğer dokusu ile kronik karaciğer hastalıklarında sayıları oldukça fazladır. Karaciğerin olgun hepatosit ve kolanjiosit hücrelerinden oluşan kısımlarında hasar meydana geldiğinde, kök hücre rezervleri aktive olur (Roskams 2006). Birçok kronik karaciğer hastalığında bu öncül hücrelerin aktivasyonu HCC gelişimini de tetiklediği için, öncül HpKKH'leri karsinogenezi çalışmak, anlamak ve tedavi etmek için hedef hücre popülasyonlarıdır.



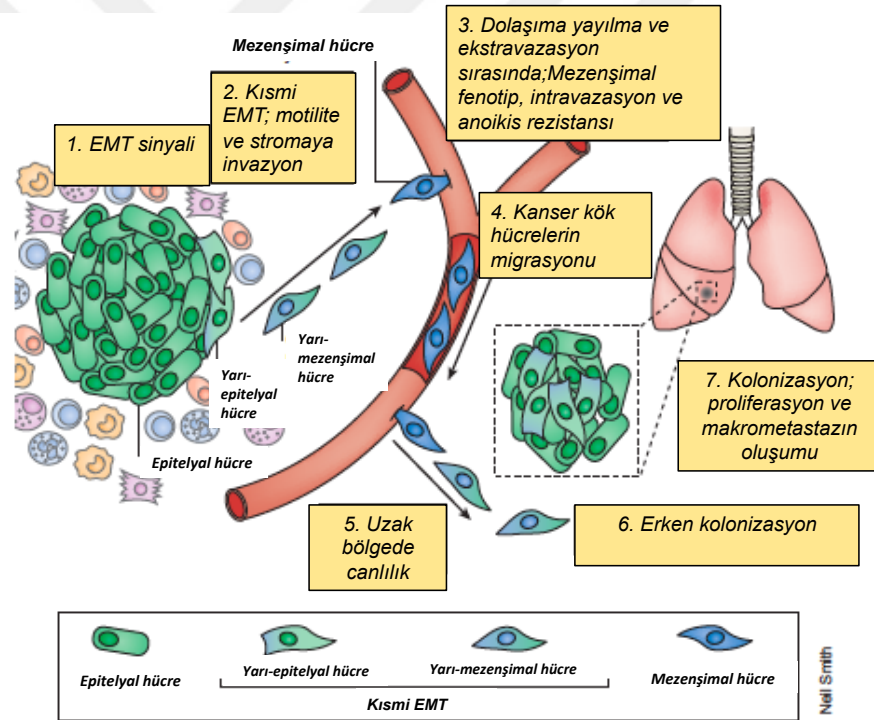
Şekil 2.3. Karaciğer yenilenmesi ve HCC oluşum sürecinde HpKKH'ler (Yamashita and Wang 2013).

Kanser kök hücreler ilk kez 1997 yılında akut miyeloid lösemilerde yüzeylerinde CD34 eksprese eden ve CD38 eksprese etmeyen hücreler olarak tanımlanmış ve izole edilmişlerdir (Bonnet and Dick 1997). Günümüze kadar solid tümörler ile yapılan farklı çalışmalarda; meme (Chiotaki, Polioudaki et al. 2016), akciğer (Hardavella, George et al. 2016), beyin (Ortensi, Setti et al. 2013), kolon (Zeuner, Todaro et al. 2014), pankreas (Sancho, Alcala et al. 2016), prostat (Packer and Maitland 2016), melanoma (Parmiani 2016), baş ve boyun (Pearson, Jackson et al. 2016) gibi tümör modellerinde de kanser kök hücrelerin varlığı belirlenmiştir.

Hepatokarsinogenezin moleküler biyolojisi alanında yapılan çalışmalarda da çeşitli biyobelirteçler tanımlanmış ve HCC sürecinde rolü olan HpKKH'lerin yüzeylerinde CD133, CD90, CD44, OV6 ve EpCAM gibi hücre yüzey antijenlerini eksprese ettikleri belirlenmiştir (Romano, De Francesco et al. 2015). Birçok çalışmada, bu kök hücre belirteçlerini eksprese eden ve oldukça az sayıda olan bu hücreleri içeren HCC'lerin, diğer konvansiyonel HCC'lere göre daha agresif karakter gösterdiği gösterilmiştir (Romano, De Francesco et al. 2015). Örneğin, CD133+ hücrelerin yüksek proliferatif ve tümörojenik potansiyele sahip oldukları ve matüre hepatosit belirteçlerini az düzeyde eksprese ettikleri gösterilmiş ve HCC hastalarında CD133 varlığı kötü prognoz ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Bir diğer kök hücre belirteci olan EpCAM, embriyonik karaciğer, safra kanalı epitelyumu ile sirotik karaciğerde çoğalan safra kanalı hücrelerinde eksprese edilirken, olgun hepatositlerde bulunmamaktadır. Ayrıca EpCAM, kanser hücrelerinin kendi kendini yenilemesinden sorumlu olan Wnt/B-katenin sinyal yolağının da doğrudan hedefidir (Yamashita, Budhu et al. 2007). EpCAM+ HCC'lerde, bu hücrelerin portal vene invazyonu ve geriye kalan karaciğere mikro boyutta yayılımı nedeni ile radikal rezeksiyonun ardından erken relaplardan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Yamashita, Ji et al. 2009). HpKKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesi karaciğerin tümörögenezini anlamak için önemli bir deney modelidir (Romano, De Francesco et al. 2015).

Tümörün yakın veya uzak metastaz yapabilme yeteneği kanser nedeni ile ölümlerin başlıca nedenidir. Metastaz süreci, hücrenin göç edebilme ve ekstrasellüler matriksi geçerek damara invaze olma yeteneği kazanması, immun baskılama mekanizmalarından kaçması ve hedef dokuya ekstravaze olması şeklinde basamaklanabilir (Şekil 2.4). Bazı tümörler kısmi EMT özellikleri gösterirler. Yani, mezenşimal belirteçleri eksprese etmeye başlamışlardır fakat aynı zamanda epitelyal karakteri de korumaktadırlar. Bu tümörlerden izole edilen hücrelerin CD24, CD44 ekspresyonu gibi tumor başlatma kapasitesine sahip kanser kök hücre antijenlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (Tam and Weinberg 2013). Metastaz sürecinin mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da EMT bu süreçte öncü bir rol oynamaktadır. Bu EMT dönüşümünden KKH'leri sorumlu tutulmaktadır (Marquardt, Factor et al. 2010).

EMT/MET Sürecinde Hepatik Kanser Kök Hücrelerin Rolü; Farklı birçok dokuda olduğu gibi karaciğer dokusunda da epitelyal ve mezenşimal hücreler birarada bulunmaktadır. Epitelyal hücreler, apikal bazal polariteye sahip, birbirine sıkıca tutunan adheran hücre dizileri oluştururlarken, mezenşimal hücreler ise tam aksine, polarize olmayan ve hücrelerarası bağlantıları olmadığı için tek tek hareket etme yeteneğine sahip hücrelerdir (Choi and Diehl 2009). EMT, hücrenin tipik epitelyal karakterini kaybederek mezenşimal hücreye dönüşmesidir, MET ise tam tersi bir süreçtir. EMT/MET tersinir süreci; 1) embriyogenez ve gelişim, 2) yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, organ fibrozisi ve 3) neoplazi gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda gözlemlenmektedir (Choi and Diehl 2009).



Şekil 2.4. Epitelyal mezenşimal plastisite (Tam and Weinberg 2013).

EMT sürecinde epitelyal proteinlerin ekspresyonunun azalması sonucu hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarının kaybı ile hücre iskeleti elemanlarının yeniden düzenlenmesi nedeni ile hücre polaritesinin kaybı gözlenirken; hücre hareket etme ve kendini çevrelen matriks içine geçme yeteneği kazanır, bazal membranı aşır, stromal dokuya geçerek dolaşıma katılabilir. Bu süreçte birçok genin ekspresyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenmektedir.

HCC hücrelerinin dediferansiyasyonları sonucu invaziv ve metastatik karakter kazanmasında, TGF- β , Notch, Wnt gibi bazı sinyal yollarının ve molekülleri ile hipoksi gibi mikroçevre koşulları değişikliklerinin rol oynadıkları gösterilmiştir (Felipe Lima, Nofech-Mozes et al. 2016). EMT'nin farklı yollarla, hücre ve koşul spesifik ilerleyişi EMT ilişkili transkripsiyon faktörleri diye tanımlanan bir gen grubu ile regüle edilmektedir. Snail (çinko-parmak protein; Snail ve Slug), Zeb (çinko parmak protein, Zeb1/2) ve Twist (heliks-loop-heliks protein; Twist1 ve Twist2) transkripsiyon faktörü aileleri onkogenik EMT sürecinde, E-kaderin gibi epitelyal gen ekspresyonlarının EZH2 tarafından epigenetik olarak baskılanması ve N-kaderin gibi mezeneşimal gen ekspresyonunun indüklenmesi ile epitelyal hücrelerin dediferansiyasyonunu uyaran moleküllerdir (Diepenbruck and Christofori 2016). Prx1, Sox4, Klf4, Sox9, FoxC2, p53 gibi bir kısım transkripsiyon faktörler de EMT/MET dönüşümlü sürecini kontrol ederek veya katkıda bulunarak hücre plastisitesini sağlamaktadırlar (Diepenbruck and Christofori 2016). Yapılan çalışmalarda, miRNA'ların da EMT sürecinde ekspresyonlarının değiştiği ve özellikle miR-200 ailesinin epitelyal fenotip ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gregory, Bert et al. 2008).

2.4 Hepatoselüler Karsinoma Gelişiminde Epigenetik Regülasyonların Rolü

Epigenetik, DNA dizisinin kendisi tarafından kodlanmayan gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin çalışılmasıdır. Kromatin yapısındaki alternatifleri oluşturan epigenetik regülasyonlar, öncelikle histon kuyruklarında meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar (PTM), histon varyantlarının nukleozomlara eklenmesi ve DNA metilasyonlarıdır (Kouzarides 2007).

Modifikasyonların çoğu, kromatin konformasyonunu ve düzenleyici proteinlerin DNA dizisine erişimini modüle ederek, gen ekspresyonunu regüle eder. Bu

modifikasyonlar çoğu zaman kromatin konformasyon dinamiklerinin regülasyonu ile ilgili proteinler için bağlanma bölgeleri sağlar. En basit düzeyde, ulaşılabilir açık kromatin ipliği transkripsiyona eğilimlidir. Transkripsiyonel olarak aktif ökromatin, histon hiperasetilasyonu ve H3K4 metilasyonu ile ilişkidir. Belirli bir kromatin bölgesinin sıkılaşması ile ilgili modifikasyon taşıyan alanlar, transkripsiyona karşı bariyerler oluşturur. Bu alanlar transkripsiyonun sınırlandırıldığı heterokromatin bölgeleridir. Susturulmuş gen bölgelerinin ekspresyonları, hipoasetilasyon ile ilişkilidir ve H3K9Me1 ve H3K27Me2/3 epigenetik modifikasyonlarını taşırlar (Sims, Nishioka et al. 2003)

Nukleozom içinde yer alan her histon çekirdeği H2A, H2B, H3, H4 altbirimleri ile varyantlarından oluşmaktadır. Histonlar, histon kuyruğu denilen, bazik aminoasitlerden oluşan, 25-30 rezidü uzunluğunda yüksek oranda dinamik amino terminal ucuna sahiptirler. Histon-histon etkileşimine aracılık ederler ve çekirdek yapıdan dışarı doğru uzanırlar. Histon proteinleri, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikutinasyon, sumoilasyon ve ADB ribozilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla ilişkili oldukları gen bölgesinin ekspresyonunu pozitif veya negatif yönde düzenlemektedirler. Histon asetil transferazlar (HAT) tarafından katalizlenen asetile histon bölgeleri çoğunlukla aktif olarak eksprese edilen genlerin promotor bölgelerinde gözlemlenirken; histon metil transferazlar (HMT) tarafından katalizlenen histon metilasyonu meydana geldiği histon residüsüne bağlı olarak aktif veya baskılanmış gen bölgesi ile ilişkili olabilir. Örneğin, H3K4me3 aktif olarak eksprese edilen genlerin TSS bölgesinde gözlemlenirken, H3K27me3 modifikasyonu gen bölgesinin baskılanmasından sorumludur. Histonların posttranslasyonel modifikasyonları tersinirdir, histon deasetilazlar (HDAC) asetil gruplarını, histon demetilazlar da (HDM) metil gruplarını histon rezidülerinden uzaklaştırırlar.

Hepatokarsinogenez sürecinde rolü olan genetik değişiklikler sayıca diğer kanser türlerinde tanımlanandan çok daha az olmasına rağmen, anormal metilasyon paternleri çokca bildirilmiştir (Thorgeirsson and Grisham 2002, Lee, Lee et al. 2003). Yine metiyonince eksik diyet verilen farelerde spontan HCC gözlenmesi epigenetik regülasyonun bu modelde daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Yine HCC'de

birçok çalışmada promoter metilasyonları başta olmak üzere, epigenetik yolla çeşitli genlerin transkripsiyonunun düzenlendiği bildirilmiştir. Örneğin: HCC'de özellikle p16 genindeki hipermetilasyon ve bu yolla inaktivasyon tanımlanmıştır (Wong, Lo et al. 1999). Ek olarak, normal karaciğer, siroz ve HCC dokuları ile yapılan analizlerde, HCC'li dokularda diğerlerine göre, ABL, CAV, EPO, GATA3, LKB1, NEP, NFL, NIS ve p27KIP1 genler unmetile olurken ABO, AR, CSPG2, Cyclin A1, DBCCR1, GALR2, IRF7, MGMT, MT1A, MYOD1, OCT6, p57KIP2, p73, WT1 gibi genlerin hipermetile olduğu gösterilmiştir. Bu genlere ek olarak diğer çalışmalarda, E-kaderin, COX2, apoptoz ilişkili speck-like protein (ASC), karaciğer kanseri delete 1 geni (DLC) hipermetilasyona uğramaktadır (Wong, Lee et al. 2003). DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B ile BMI1 ve EZH2 de HCC'lerde oldukça yüksek düzeyde eksprese olmaktadır (Khan, Ali et al. 2016)

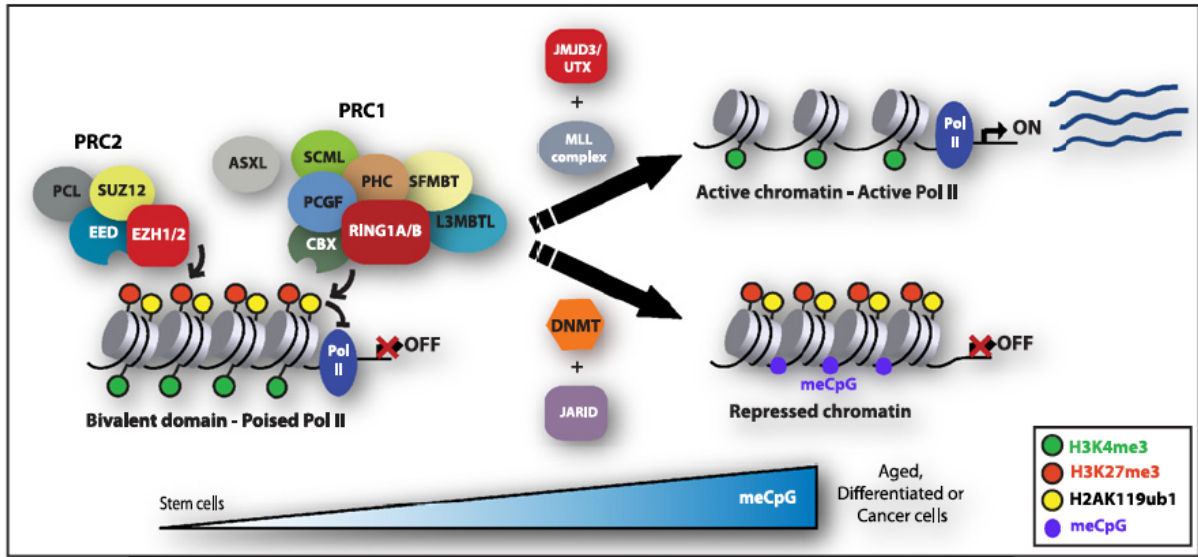
Sonuç olarak, hepatokarsinogenez ile ilgili anahtar genlerin epigenetik olarak sessizleştirilmesinin anti-onkolojik ajanların yeni bir sınıfının geliştirilmesi için yeni bir yön sağlayacağı söylenmektedir.

2.4.1 Polycomb Grup Proteinlerin Epigenetik Rolü ve Moleküler Biyolojisi

Polycomb group (PcG) proteinleri, epigenetik gen susturulması ve bir çok gelişim yolağının regülasyonunda kritik fonksiyona sahip makromoleküler komplekslerdir. Embriyonik kök hücrelerde kromatinin bivalent epigenetik modifikasyonu hücrelerin pluripotensileri ile bağlantılıdır. PcG proteinler, farklılaşma sırasında aktive olması gereken genleri sessizleştirerek hazır bekletilmesinde fonksiyon göstermektedirler (Balch, Nephew et al. 2007).

PcG yolağının anormal regüle edildiği kök hücre benzeri gen ekspresyonu kalıbı geleneksel tedaviye karşı dirençli 13 farklı kanser tipinde ortaktır (Glinsky 2008). Kök hücrenin kendi kendini yenilemesinden ve karakterinden sorumlu yollar ile kanserde anormal regüle edilen yollar aynıdır (Glinsky 2008). Retinoblastoma proteini ile Wnt, Notch ve Hedgehog sinyal yolları kök hücre ve çeşitli tip kanser hücrelerinin kendi kendini yenileme mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Kanserde, bu regülatör yolları kontrol eden veya bu yollara dahil olan birçok genin PcG birikiminden veya susturulmasından etkilenmesi veya direk PcG hedefi olduğunun gösterilmesi ile kanser oluşumunda ve prognozunda epigenetik modifikasyonların

önemi gösterilmiştir (Esteller 2007). Polycomb grup ailesinin iki farklı üyesi vardır; Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) ve Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). PRC2 kompleksinin de altbirimleri; EZH2, EED, SUZ12, AEBP2 ve RBBP4 ile RBBP7'dir. Bu altbirimlerden EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), SET domaini içeren bir histon lizin metiltransferazdır, makromoleküler kompleksin katalitik altbirimidir. Güçlü metiltransferaz aktivitesi EZH2 altbiriminin EED ve SUZ12 ile biraraya gelmesini gerektirmektedir. EZH2, katalizlediği H3K27me3 modifikasyonu aracılığıyla gelişim sürecinde homeobox genleri üzerindeki temel regülatör rolü nedeni ile ilk aydınlatılan polycomb proteinidir.



Şekil 2.5. EZH2 aracılıklı epigenetik susturma mekanizması (Sauvageau and Sauvageau 2010).

Epigenetik susturma mekanizması, PRC2 kompleksinin hedef genleri H3K27 metilasyonu ile susturulmasıyla başlar (Sauvageau and Sauvageau 2010). Eğer K27 önceden asetile ise bu bölgenin metilasyonu için ilk önce PRC2 ile etkileştiği bilinen histon deasetilaz (HDAC) tarafından deasetilasyon gerekmektedir. PRC2 aynı zamanda, hedef genlerin DNA'sında CpG'leri metilleyecek olan ve kromatinin sürekli sessiz duruma gelmesine sebep olan, DNA metiltransferazları (DNMT) toparlar (Şekil 2.5).

2.5 EZH2 Aracılıklı Epigenetik Düzenlemenin Hepatokarsinogenezdeki İşlevi

Kök hücrenin kendi kendini yenilemesinden ve karakterinden sorumlu yollar ile kanserde anormal regüle edilen yollar benzerlik gösterir (Valk-Lingbeek, Bruggeman et al. 2004). Retinoblastoma proteini ile Wnt, Notch ve Hedgehog sinyal yolları kök hücre ve çeşitli tip kanser hücrelerinin kendi kendini yenileme mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Kanserde, bu regülatör yolları kontrol eden veya bu yollara dahil olan birçok genin PcG birikiminden veya susturulmasından etkilenmesi veya direk PcG hedefi olduğunun gösterilmesi ile kanser oluşumunda ve prognozunda epigenetik modifikasyonların önemi gösterilmiştir (Esteller 2007). Epitelyal hücrelerde eksprese edilen bir transmembran glikoprotein olan E-kaderin kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumludur. Hücre-hücre adhezyonunu sağlayan bağlantıların bozulması sonucu oluşan kontakt inhibisyonun kaybı ve kontrolsüz hücre proliferasyonu neoplastik sürecin ilk basamağıdır. Bunun yanı sıra E-kaderinin normal fonksiyonunu sürdürememesi metastaz süreci için de önemlidir. Fujii S ve arkadaşları, gastrik kanserlerde yapmış oldukları bir çalışmada, EZH2 proteini ile E-kaderin proteininin ekspresyonları arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. EZH2'nin siRNA ile sessizleştirilmesi ile E-kaderin gen ekspresyonunun yeniden eksprese edilmeye başladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada E-kaderin yeniden eksprese edilmesinin EZH2'nin E-kadherin promotorundaki H3K27 trimetilasyonunu katalizlemesi ile gerçekleştiği, genin promotor bölgesindeki DNA metilasyon durumundaki bir değişikliğin bulunmadığı gösterilmiştir (Fujii and Ochiai 2008).

EZH2, karaciğer kanserinin de aralarında olduğu birçok kanser türünde aşırı eksprese olmaktadır ve bu durum kanser hücrelerinin çoğalması ve sağkalımı açısından kritik öneme sahiptir. Bu kanser türlerinin çoğunda EZH2 ekspresyonu aşırı hücre çoğalması, agresif fenotip ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca EZH2 ekspresyonunun regülasyonu da hücre çoğalması, tümöröenez ve kök hücre özelliklerinin sürdürülebilirliği açısından önemlidir. Örneğin, Myc, EZH2'nin promotoruna bağlanarak transkripsiyonunu direk aktive eder, prostat kanserinde EZH2 ve Myc ekspresyonunun korele olduğu gösterilmiştir (Yamaguchi and Hung 2014).

PcG kompleksleri, epigenetik hücresel hafızanın anahtar regülatörleridir. Embriyogenez, gelişim ve tümörögenез süreçlerinde hücresel kimliğin belirlenmesi ve sürdürülmesi bakımından önemlidirler (Chiba, Suzuki et al. 2012). EZH2 moleküllerinin, normal ve kanser başlatma kapasitesine sahip hücreler olarak tanımlanan HpKKH'lerin, kendi kendini yenileme süreçlerinin regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir. HCC'nin de aralarında bulunduğu birçok kanser türünde tümör başlatma kapasitesine sahip hücreler tanımlanmıştır. Tümör başlatma kapasitesine sahip HCC hücrelerine spesifik EpCAM, CD133, CD90 ve CD13 gibi hücre yüzey molekülleri tanımlanmıştır. Fakat bu hücreleri yönlendiren moleküler mekanizmalar henüz tanımlanmamıştır (Chiba, Suzuki et al. 2012). Chiba T. ve arkadaşları, EZH2 ekspresyonunun yüksek olduğu HuH-1 ve HuH-7 hücre hatları ile yaptıkları çalışmalarında, EZH2'nin HCC gelişiminde HpKKH'lerin sürdürülebilirliği açısından rolü olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, EZH2 genini lentiviral bir sistemle susturmuş ve ayrıca bir DZNep inhibitörü ile EZH2 proteininin metiltransferaz aktivitesini engellemişlerdir. Her iki sistemde de hücrelerin tümör oluşturma yetenekleri azalmıştır. Ayrıca, EZH2 susturma deneyleri sonrası hücrelerin içerdiği EPCAM⁺ ve CD133⁺ popülasyon yüzdesi düşerken, aşırı ekspresyon deneyleri sonucunda da bu popülasyonlarda artış gözlenmesi EZH2'nin HCC'de tümör başlatma kapasitesine sahip alt-populasyonu direk olarak düzenlediğini göstermektedir. DZNep kullanılarak farmakolojik inhibisyon ile oluşturulan modelde de aynı şekilde doz bağımlı olarak hücrelerin tümör oluşturma yeteneklerinde azalma gözlenmiştir. Her iki sistemde de H3K27me3 düzeyi azalmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda, EZH2'yi hedef alan bir tedavi şeklinin, HCC'de ilaç direncinin yüksek olduğu ve hücrelerin kendi kendini yenileme potansiyellerinin yüksek olduğu HpKKH'ler üzerinden epigenetik bir düzenleme ile etkili olabileceği gösterilmiştir (Chiba, Suzuki et al. 2012)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonunun, hepatokarsinogenez sürecinde tümör başlatma kapasitesine sahip olan kanser kök hücrelerin düzenlenmesindeki rolünün belirlenmesi amacıyla planlanan deneysel bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Ekim 2012 ile Ağustos 2016 tarihleri arasında DEÜ, SBE, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD ile DEÜ, iBG-izmir’de gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma, HuH-7 hücre hattı ile bu hücre hattından FACS yöntemi ile ayrımlanan EpCAM+ HuH-7 hücre hatlarında ve “*NOD/SCID CB17-Prkdscid/NcrCL*” farelerde gerçekleştirilmiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada, EZH2 sessizleştirilmesi için lentiviral shRNA-EZH2 ve shRNA-scramble kontrol virus üretimi 293T hücre hattında üretilmiştir. Elde edilen lentivirüsler ile HuH-7 hücre hattı enfekte edilmiştir ve kalıcı hale getirilmiştir. Daha sonra bu hücrelerden FACS yöntemi ile EpCAM+ hücreler ayrımlanarak shEZH2-HuH-7 (EpCAM+) ve scr-HuH-7(EpCAM+) hücre hatları elde edilmiştir. Ayrıca hayvan deneyleri için, “*NOD/SCID CB17-Prkdscid/NcrCL*” fareler kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

EZH2’nin sessizleştirildiği HuH-7 hücre hattı; shEZH2-HuH-7 ve bu hücrelerden ayrımlanan shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücreleri kontrollerine göre araştırmamızın değişkenleridir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hücre Kültürü İdamesi

Çalışmamızda kullandığımız HCC hücre dizisi HuH-7, Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından hediye edilmiştir. Deneyler başlamadan önce STR profillemesi ile kimlik doğrulaması yapılmış olan HuH-7, belirli aralıklarla mikoplazma kontaminasyonu testine tabi tutularak kullanılmıştır.

Hücreler, normal koşullarda %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, 10500064), 2mM L-Glutamin (Gibco, 25030024), 100u/ml penisilin/0,1mg/ml streptomisin (Gibco, 15140122) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı (Gibco, 11140035) içeren DMEM (Gibco, 31885049) içerisinde üretilmiştir. Hücre kültürü işlemleri biyogüvenlik-2 düzeyinde ClassII A2 biyogüvenlik kabini içerisinde yapılırken, hücreler 37⁰C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler büyüme hızları ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte 2 ila 3 günlük aralıklarla alt kültüre edilmiştir. Hücreler %80 civarında yoğunluğa ulaştığı zaman kültür kaplarındaki ortam uzaklaştırılıp, 2 defa pH: 7.4 steril PBS (Gibco, 70011036) ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre kültür kabının yüzeyini kaplayacak miktarda Tripsin-EDTA (Gibco, 25300054) solüsyonu eklenerek 2-3 dk 37⁰C'de, hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılması beklenmiştir. Tripsinize edilen hücrelerin üzerine FBS içeren ortam eklenerek enzimatik reaksiyon sonlandırılmıştır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak uygun seyreltme yapılmış ve 10ul örnek Neubauer lamı ile ters bakışlı faz kontrast mikroskopunda, 10 alan sayılmış ve hücre sayısı ortalaması alınmıştır. Bu değer dilusyon faktörü ile çarpılarak ml'deki hücre sayısı bulunmuştur..

3.6.2 Hücrelerin Dondurulup Çözülmesi

Logaritmik büyüme evresine gelmiş hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştınca dondurulmuştur. Bunun için tripsinize edilen hücreler, hücre kültür ortamıyla suspanse edildikten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip çöktürülmüştür. Hücre pelleti taze olarak hazırlanmış soğuk hücre dondurma ortamında (% 20 FBS, % 10 DMSO, % 70 DMEM) suspanse edilerek özel tüpler içerisinde, dakikada 1⁰C'lik soğuma sağlayan dondurma kutusuna (Mr. Frosty Freezing Container) konularak gece boyunca -80⁰C'de dondurulmuş ve uzun süreli stoklamalar için sıvı azot tankına transfer edilmiştir. Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi için hücreler sıvı azottan çıkarılıp, hızla çözülerek hücre kültür ortamı ile suspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip DMSO içeren üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti taze kültür ortamıyla süspanse edilerek uygun hücre kültür kabına ekilmiştir.

3.6.3 EZH2 Gen Susturulması

3.6.3.1 HEK293T Hücrelerde Viral Partiküllerin Üretilmesi

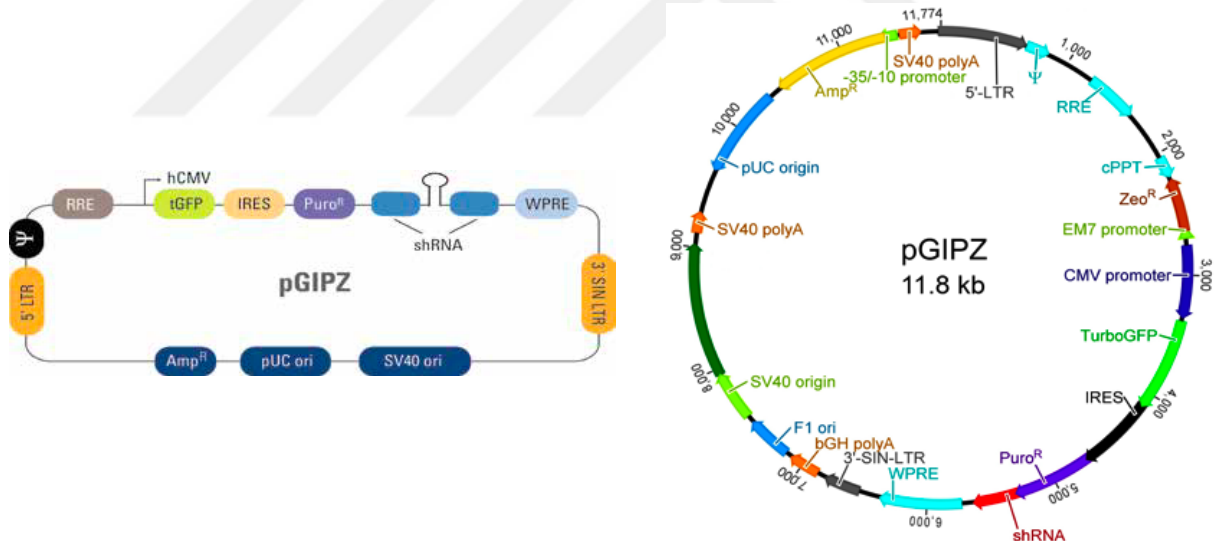
293T hücreleri 3.5×10^6 hücre/10 cm hücre kültürü kabı olacak şekilde ekildikten sonra, 8ml büyüme ortamı (DMEM-high glucose, %10FBS, penisilin/streptomisin, L-glutamin, sodium bikarbonat ve non-esansiyel aminoasitler eklenmiş) içerisinde 1 gecelik normal koşullarda inkübe edilmiştir. Ertesi gün viral plazmidler transfeksiyon için hazırlanmış ve 293T hücre hattında paketlenmesi için paketleme plazmidleri kiti (Thermo, Scientific) kullanılmıştır. Kısaca, 15µg viral plazmid, paketleme kitinin içerisinde gelen ve çeşitli paketleme plazmidleri karışımından 10µl ile steril bir tüpte karıştırılmış ve steril su eklenerek toplam hacim 450µl yapılmıştır. Bu karışıma kitin içerisinde gelen 50µl CaCl_2 solüsyonu eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Toplam 500 µl olan bu karışım daha sonra kitin içerisinde gelen 500µl 2XHBSS solüsyonuna damlatılarak ve sürekli karıştırılarak eklenmiştir. 10 dakika beklenildikten sonra bu karışımlar bir gün önceden 10cm hücre kültürü kaplarına ekilen 293T hücrelerinin üzerine damlatılarak eklenmiş ve hücreler gece bekletilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir (37°C , %5 CO_2). Ertesi sabah hücrelerin üzerindeki ortamlar çekilerek taze büyüme ortamıyla değiştirilmiştir. 48 saat sonra hücrelerin üzerindeki ortamlar toplanmış ve 0,45 mikron filtreler kullanılarak filtrelenmiştir. İstenilen plazmidleri viral partiküller halinde içeren bu ortamlar daha sonra kullanılmak üzere küçük miktarlarda -20°C de dondurulmuş veya hemen kullanılmak üzere ise 4°C ye konulmuştur.

3.6.3.2 Transduksiyon

Çalışmamızda kullandığımız vektörler Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından hediye edilmiştir. Deneylerimizde, EZH2'nin shRNA ile sessizleştirilmesinin optimizasyonu için hücreler; EZH2 genine spesifik, 8 farklı pGIPZ kökenli “*KMT6/EZH2 shRNA*” vektörleri ve “*scramble*” (*scr*) kontrolü ile farklı konsantrasyon ve sürelerde transfekte edildi. 10cm'lik hücre kültürü kaplarında, bu plazmidler kullanılarak transfekte edilen 293T hücrelerinden elde edilen ortamın 8 mililitresi ile 2 ml taze büyüme ortamı ve polikatyon olarak 8ug/ml polybrene eklenmiştir. Toplam 10ml olan bu ortam, bir gün önceden FACS yöntemi ile ayrılmış 600.000 hücre/10cm plate olarak ekilmiş EpCAM+ HuH-7 hücreleri üzerine eklenmiştir ve bu hücreler gece bekletilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir (37°C , %5 CO_2). Bir gün

sonra, hücrelerin üzerindeki ortam taze büyüme ortamı (DMEM-low glucose, %10FBS, penisilin/streptomisin, L-glutamin, ve non-esansiyel aminoasitler eklenmiş) ile değiştirilmiş ve hücreler 48 saat daha plazmidleri ifade etmeleri için inkübatörde bekletilmiştir.

pGIPZ vektörleri, içlerinde EZH2'yi hedef alan farklı shRNA sekanslarını barındırmaktadır. Ayrıca bu vektörler GFP genini ve puromicin direnç genini taşımaktadırlar. Böylece transfekte edilen 293T hücreleri transfeksiyondan sonraki 24-48 saat içinde GFP ekspresyonuna bakılarak transfeksiyon verimliliği saptanabilmekte ve gerektiğinde antibiyotik seleksiyonu ile kalıcı klonlar elde edilebilmektedir. Kalıcı klonların elde edilmesi için transfeksiyon sonrasında hücreler 4ug/ml puromycin içeren ortamda ortamları 3 günde bir değiştirilerek ve yoğunlukları %80 olduğunda pasajlanarak en az 15 gün çoğaltılmışlardır. Yaşayan ve çoğalan antibiyotik dirençli yani pGIPZ plazmidini içeren hücreler tripsinize edilerek poliklonlar elde edilmiş ve dondurulmuştur.



Şekil 3.6.1. pGIPZ lentiviral shRNA vektör bileşenleri ve ayrıntılı plazmid haritası.

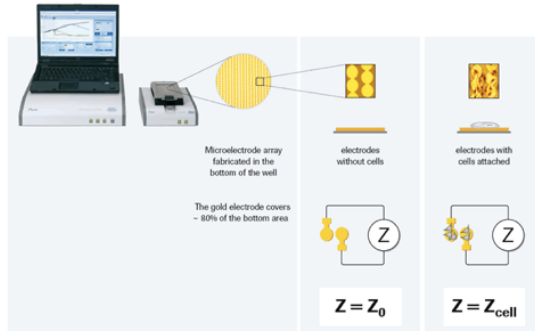
3.6.4 Hücre Proliferasyonu

3.6.4.1 Sulforhodamine (SRB) Testi

SRB testi hücresel proteinleri ölçme temeline dayalı kolorometrik bir testtir. Analizlerimizde 96 kuyucuklu hücre kültür kabına, 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücrelerden 24, 48 ve 72.saat sonunda ölçüm alınmıştır. Bunun için belirtilen saatlerde, hücre kültür ortamının 1/4'ü kadar (25 µl) TCA solüsyonu eklenerek 1 saat $+4^{\circ}\text{C}$ ' de fikse edilen hücreler, daha sonra 4 kez distile su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 1 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün fikse edilmiş hücrelere 50 µl %4 sulforhodamine B solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda %1 asetik asit solüsyonu ile yıkanan hücreler, 1 saat 50°C ' de kurutulmuştur. Daha sonra hücreler 100 µl sulforhodamine B çözdürme solüsyonu eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiş ve 560nm'de florometrik ölçümleri alınmıştır.

3.6.4.2 XCelligence ile Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyonu

Hücre proliferasyonu çalışmaları için Roche Xcelligence cihazı kullanılmıştır. Hücrelerin yapıştığı ve idame ettirildiği yüzey altın elektrod ile kaplı olan bu sistemde, hücrelerin yapışarak şekillerini alması "Cell index" adı verilen empedansta artış (bir elektrik akımına karşı oluşturulan direnç) ile ölçülmektedir (Şekil 3.6.2).



Şekil 3.6.2. XCelligence cihazının çalışma prensibi

Proliferasyon çalışmaları için E-PLATE'ler assembly tool üzerine yerleştirilmiştir. Her biri kuyu içerisine 30µl ortam eklenerek, plakalar "equilibrium" için inkübatöre yerleştirildikten sonra cihaz üzerinde cihaz-plaka kontağı, plakalar üzerinde toz olup olmaması gibi kontroller için cihazın kontrol sistemi 1 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Her bir kuyucuğa daha önce optimize edilen 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde hücre

süspansiyonu hazırlanarak her biri kuyucuğa 100µl ortam içerisinde eklenmiştir. Her 15 dakikada bir "Cell index" değeri ölçülecek şekilde 96 saatlik deney programı hazırlanmıştır.

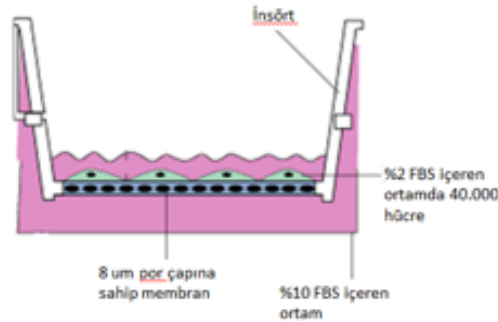
3.6.5 Hücre Döngüsü Analizi

Hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 60×10^3 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat 37°C 'da %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında tripsin ile hücreler kaldırılıp 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 5 mL PBS ile yıkanıp tekrar santrifüjlenmiştir. Elde edilen hüce pelleti 1 ml PBS ile çözülüp 4ml -20°C 'daki etanol (%99.8) ile hafifçe vortekslenerek fikse edilmiş ardından fiksasyon işlemine 24 saat boyunca -20°C 'de inkübe edilerek devam edilmiştir.

Fikse edilmiş hücreler 1200 rpm'de 10 dakika 4°C 'de santrifüj edilip ardından pellet 5 mL PBS ile yıkanarak santrifüjlenmiştir. Pellet "*propidyum iyodür (PI)*" boyaması için % 0.1 Triton X-100 içeren 200 µL PBS içinde çözülüp 20 µL RNaseA (200 µg/mL) eklenerek 37°C 'da %5 CO_2 altında 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında 20 µL propidyum iyodür (1 mg/mL) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücre döngüsü dağılımı Flow Sitometre kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen veriler ModFit LT yazılımı ile analiz edilmiş, GraphPad uygulaması ile grafiklendirilmiştir.

3.6.6 Hücre Motilitesi ve İnvazyonu

Hücre hareketliliğinin incelenmesini amaçlayan motilite çalışmalarımızda 8 mikron por çapına sahip kontrol eklentiler (insörtler) (BD) kullanılmıştır.



Şekil 3.6.3. Kontrol eklentilerinin çalışma şeması.

İnvazyon ve motilite deneyleri için “BD Biocoat control inserts 8.0 mikron”

hücre kültür kaplarında deneyin kurulması; İnvazyon kuyularının oluşturulması için stok konsantrasyonu 9.9mg/ml olan matrigel 1 gece önceden -20°C'den +4°C'ye buz içinde çıkarılmıştır. Deney günü matrigel son konsantrasyon 0.25mg/ml olacak şekilde DMEM-0 içinde hazırlandıktan sonra her kuyucuğa 150µl olacak şekilde eklenerek 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyular 300µl 0.1% BSA'lı DMEM-0 eklenerek bloklanmış ve kuyuların içindeki ortam uzaklaştırılarak shEZH2-HuH-7 ve scr-Huh7 hücreleri, 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 2% FBS'li ortamda kuyulara ekilmiştir. Matrigel ile kaplanmamış kuyulara motilite deneyleri için hücreler aynı şekilde ekilmiştir.

xCELLigence-Roche Applied Science cihazında deneylerin kurulması;

İnvazyon deneyi için yukarıda anlatıldığı gibi son konsantrasyon 0.25mg/ml olacak şekilde DMEM-0 içinde hazırlanan matrigel (30µl) ile üst kuyular kaplanıp, inkübe edilip ve bloklanmıştır. 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde sEZH2-Huh7 ve scr-Huh7 hücreleri 2% FBS'li ortam içinde CIM-plate'lere ekilmiştir. 24 saat sonunda cihazdan cell indeksler “Microsoft Excel 'e” aktarılarak 4 kuyunun cell indeks ortalamaları alınmış ve SE hesaplanarak bar grafiklerine eklendi.

Motilite/invazyon kuyularının altına 10% FBS'li ortam eklenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra “Diff-Quick (Siemens) kiti ile kuyular boyanmıştır. Kuyuların iç kısmındaki hücreler pamuk çubukla temizlendikten sonra dış kısma (2% FBS'li ortamdan 10% FBS'li ortama) göç eden hücreler inverted mikroskopta sayılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce eklentiler oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir alt kuyu içine 750µl %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Eklentiler, baloncuk kalmamasına özen gösterilerek 45°'lik açı ile eğilerek kuyuların üzerine yerleştirilmiştir. Hücreler sayıldıktan sonra 20×10^3 hücre/eklenti şeklinde ekim yapılmıştır. Her bir eklenti içine hücreler 500µl %2 FBS'li ortam içerisinde ekilmiştir. 24 saat sonunda “Diff-Quick (Siemens) kiti ile kuyucuklar boyanmıştır. Sırası ile fiksatif, Eosin (Kırmızı) ve Hematoksilen (Mavi) ile 1'er dakika boyama yapılır. Her kuyucuğun iç kısmındaki hücreler pamuk çubukla temizlendikten sonra dış kısma göç etmiş hücreler inverted mikroskop altında sayılmıştır. Her bir koşul dördü olarak çalışılıp deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

Hücre hareketliliği ve invazyon yeteneğinin değerlendirilmesi için invazyon çalışmaları yapılmıştır. Bu deneylerde 8 mikron porlara sahip BD kontrol eklentiler Matrigel (BD 354234) ile kaplanmıştır. Deneyden bir gün önce 100, 200 ve 1000µl'lik pipet uçları -20°C'ye yerleştirilmiştir. Kontrol eklentilerin kaplanması kullanılan matrigel bir gün önce -20°C'den buz içerisinde bekletilmiştir.

Matrijel'in son konsantrasyonu 0.25mg/ml olacak şekilde 150µl DMEM-0 içerisinde seyreltilmiştir. Kuyular 2 saat, 37°C'lik inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra donmamış olarak kalan matrijel her bir kuyudan uzaklaştırılmıştır. 0.1% BSA içeren DMEM-0 hazırlanarak, her bir kuyucuğa 300µl eklenerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bloklama solüsyonu hemen uzaklaştırılıp, hücrelerin ekimi yukarıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.6.7 *In vivo* “Xenograft” Tümör Modeli

Hücreler, 50×10^3 veya 25×10^3 hücre/enjeksiyon olacak şekilde hazırlandıktan sonra 1:1 oranında, 200µl DMEM: 200µl matrigel karışımı içerisinde süspanse edilmiştir. Hücreleri içeren 400µl karışım 6-8 haftalık erkek NOD/SCID (NOD/ SCID CB17-Prkdscid/NCrCrI) farelere derialtı enjekte edilmiştir. Karşılaştırılacak hücre gruplarının enjeksiyon işlemi aynı farenin sol ve sağ sırt bölgelerine uygulanmıştır.

Enjeksiyondan 1 hafta sonra tümör oluşumlarının takibi başlamıştır. Tümör oluşumunun gözlenmesi ve boyutlarının ölçümü haftada 3 kez gerçekleştirilmiştir. Uzman veteriner hekim gözetiminde tümör gelişimi takip edilerek, hekimin kararı sonrası farelere nekropsi uygulanmıştır. Nekropsi sonrası çıkarılan tümörler ileri aşamalarda histolojik incelemelerin yapılabilmesi için formaline alınarak fikse edilmiştir.

3.6.8 Akış Sitometri Yöntemi ile Hücre Ayrılması FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Hücrelerin FACS için hazırlanması; Hücreler tripsinle kaldırıldıktan sonra 10% FBS'li ortam eklenmiş ve 1500rpm 5 min santrifüjlendiren hücre pelleti elde edilmiştir. Pellet 10ml FACS buffer (1X PBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES, 1% FBS. 0.2µm filtreden geçirilip, +4°C'de saklanmıştır.) ile yıkandıktan sonra önce 100µm sonra 40µm mesh'ten geçirilmiş ve sayılmıştır. 15×10^6 hücre olacak şekilde aliquatlanan hücreler 1500rpm 5 min santrifüjlendikten sonra, 105µl FACS buffer ile çözüldükten sonra + 30µl FcR (Miltenyi, 130-059-901) + 15µl EPCAM (Miltenyi, 130-080-301) eklendi (1:11 antikor oranı), 10min +4°C'de inkübasyon FACS buffer ile yıkandı, santrifüjlendi, Pellet 2ml FACS buffer ile çözüldü. Ölü hücrelerin kantifikasyondan eliminasyonu için DAPI boyaması yapıldı, 0,5µM/1ml olacak şekilde 80µg/µl stok DAPI'den 2,2µl/ml eklendi.

3.6.9 Akış Sitometri Analizi

Her deney planı öncesinde ve deney süresi sonunda EpCAM+/CD133+ ve EpCAM-/CD133- hücrelerin CD133 ve EpCAM oranlarının belirlenmesi amacıyla akış sitometre yöntemi ile hücreler analiz edilmiştir. $0,3 \times 10^6$ hücre hiçbir antikorla etkileştirilmeyen, sadece EpCAM-FITC ve sadece CD133-APC antikorlarıyla etkileştirilen kontrol örnekleri ile CD133 ve EpCAM oranları belirlenecek olan örnekler hazırlanmıştır.

Boyama yapılmayan kontrol örneği: Hiçbir antikor ile muamele edilmeden 500µl FACS buffer ile çözülmüştür.

Tekli boyama örneklerinin hazırlanması: 40µl FACS buffer ile çözülen hücre pelletine, 10µl FcR (Miltenyi, 130-059-901) + 5µl EPCAM (Miltenyi, 130-080-301) veya 5µl CD133 (Miltenyi, 130-090-826) eklendikten sonra (1:11 antikor oranı), 10min +4°C'de inkübe edilmiş ve FACS buffer ile yıkanmıştır. Hücre süspansiyonu 1500rpm de 5 dakika santrifüjlendikten sonra pellet 500µl FACS buffer ile çözümlenip analizlenmiştir.

İkili boyama örneklerinin hazırlanması: 35µl FACS buffer ile çözülen hücre pelletine, 10µl FcR (Miltenyi, 130-059-901) + 5µl EPCAM (Miltenyi, 130-080-301) + 5µl CD133 (Miltenyi, 130-090-826) eklendikten sonra (1:11 antikor oranı), 10dk

+4°C'de inkübe edilmiş ve FACS buffer ile yıkanmıştır. Hücre süspansiyonu 1500rpm de 5 dakika santrifüjlendikten sonra pellet 500µl FACS buffer ile çözülüp akış tüplerine alınmış ve analizlenmiştir.

3.6.10 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi

3.6.10.1 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu için PureLink RNA Mini Kiti (ambion 12183018A) kullanılmıştır. Bunun için, hücreler tripsinize edildikten sonra PBS ile yıkanmış ve kitte önerildiği şekilde lizis buffer eklenerek homojenize edilmiştir. Sonrasında %70 etanol eklenerek şeffaf olana kadar vorteksenerek karıştırılan örnekler kit içerisindeki kolonlara yüklenmiştir. RNA'lar kolonlara bağlanıp yıkamalar yapıldıktan sonra RNase-içermeyen su kullanılarak kolondan. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayinleri, Picodrop (Picodrop, Picopet01) cihazı ile spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Bunun için belirli oranlarda seyreltilen örneklerin 260 ve 280nm dalga boylarındaki absorbanları (A) tespit edilmiş ve RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi için $A^{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 = 1\text{ml'deki RNA miktarı (g)}$ formülü, saflıklarını belirlemek için de, A^{260}/A^{280} oranı kullanılmıştır. Örneklerdeki RNA saflıklarının 1.6-1.8 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Total RNA izole edilip miktarı ve saflığı belirlendikten sonra, 2 µg total RNA'dan, cDNA sentezi yapılmıştır. Bu işlemde ticari olarak elde edilen cDNA sentez kiti (Thermo, K1622) kullanılmıştır. Bu amaçla total RNA, "random primer", "Oligo(dT) primer" ve "DEPC" ile muamele edilmiş distile su içerisinde hazırlandıktan sonra 70 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra karışıma 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü, dNTP ve "M-MuLV Reverse Transcriptase" eklenerek, 25°C'de 10 ve 42°C'de 60 dakika inkübe edilmiş ve hazırlanan cDNA reaksiyonu, 70°C'de 10 dakika inkübasyon ile sonlandırılmıştır.

3.6.10.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR

Tüm PCR reaksiyonları AB Step-One-Plus (Applied Biosystems system kat no: 4376592) cihazı ve amplifikasyonlar SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR Green Applied Biosystems cat no: 4367695) kullanılarak yapılmıştır. Primerler her bir gen için özgün olarak tasarlanmıştır (Tablo2.1.) Deney seti gen ekspresyonları analizlenmeden önce, primer çiftleri ile, cDNA miktarı, primer miktarı, annealing ısıları gibi parametreler optimize edilmiştir. Amplifikasyonlar optimizasyon sonrası

elde edilen en uygun koşullarda yapılmış ve her örnek için dört tekrarlı setlerle çalışılmıştır.

Her amplifikasyon için, 25ul master mix (kit içerisinde hazır olan), 1,25ul primer, 5ul cDNA ve 17,5ul dH₂O'dan oluşan 50ul'lik solüsyon hazırlanıp vortekslenerek karıştırılmıştır. Cihaza ait floresan ışık geçirgen 96 well plate'in her kuyusuna 10ul olacak şekilde hazırlanan bu solüsyon dağıtıldıktan sonra spin edilmiş ve reaksiyon başlatılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonu, 10 dakika 95°C denatürasyonu takiben 40 döngü olacak şekilde (95°C'de 15 sn, 55°C'de 40 sn, 72°C 40 sn) gerçekleştirilmiştir. Deneylerde herbir reaksiyon içerisine eklenen ROX boyası hacimsel farklılıkları normalize etmek imkanı sağlamıştır. Amplifikasyon bittikten sonra her primer için Ct değerleri tespit edilmiştir. Gen ekspresyonları Rölatif/Bağıl Kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanıp endojen kontrole göre normalize edilmiştir. Bu deneylerde GAPDH endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6.11 Western Blotlama

3.6.11.1 Total ve Nükleer Protein İzolasyonu

100mm'lik hücre kültür kaplarında %80 yoğunluğa ulaşana kadar üretilen hücreler, ortamları uzaklaştırıldıktan sonra, soğuk PBS ile 2-3 kez yıkanıp, 1 ml PBS içerisine hücre kazıyıcı ile kazınmış ve 1,5 ml'lik tüpler içerisine toplanmıştır. Hücreler 1500rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir (Eppendorf Centrifuge, 5415R). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti içeren tüplere pellet hacminin üç katı kadar lizis tamponu (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %1 NP-40, 1 ug/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) eklenip, örnekler buz üzerinde 3-4 dakikada bir vortekslenerek 20-30 dakika boyunca lize edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler hücre atıklarının uzaklaştırılması için +40°C'de 15.000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Aynı miktarda hücreden nükleer protein izolasyonu için Proteojet K0311 nükleer/sitoplazmik protein izolasyonu kiti kullanılarak, kit yönergesi doğrultusunda önerilen yöntem takip edilmiştir.

3.6.11.2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein miktarlarının belirlenmesi için “BCA protein assay kit” (Pierce, 23225) kullanılmıştır. Standart eğrinin 0, 2, 4, 8, 16, 20µg/ul sığır serum albumini (BSA, 2µg/ul, Pierce, 23209) kullanılarak çizilmiştir. Miktarı bilinen BSA örnekleri ve protein miktarı hesaplanacak örnekler kit bileşenleri ile hazırlanmış 90µl 'lik BCA solusyonu ile 60°C'de 30 dakika inkübe edilerek BCA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan bikronik asit-bakır komplekslerinin optik dansiteleri (OD), Varioscan cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak 562nm'de ölçülmüştür. BSA konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri ile standart grafiği çizilmiş ve bu reaksiyon için hesaplanan eğri konsantrasyonu bilinmeyen örneklerdeki protein miktarını hesaplamak için kullanılmıştır.

3.6.11.3 Proteinlerin SDS-PAGE poliakrilamid jelde yürütülmesi

Aşağıda içerikleri belirtildiği şekilde, ayrıştırıcı (resolving) %10'luk ve istifleyici (Stacking) %5'lik poliakrilamid jeller hazırlanmıştır (Tablo 2.2). Her bir örnek için 50ug total protein ve bu protein denaturasyonunu sağlamak için %20 oranında β-merkaptotanol içeren 4X yükleme tamponu ile eşit hacimde karıştırılarak 95°C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Elektroforez tankına (BioRad) jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra uygun miktarda Tris-Glisin elektroforez tamponu (“running buffer”, 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklenerek, hazırlanan protein örnekleri jelin kuyularına yüklenmiştir.

Tablo 3.6.1. SDS-PAGE ayırlama ve istifleme jel bileşenleri

Kullanılacak kimyasal	%15'lik ayırıcı jel (10ml)	%5'lik istifleme jel (10ml)
dH2O	2.3 ml	6.8 ml
%30 akrilamid mix	5 ml	1.7 ml
Tris-HCl	2.5 ml (1.5M pH 8.8)	1.25 ml (1M pH 6.8)
%10 SDS	0.1 ml	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.004 ml	0.01 ml

Proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrımlandıkları jelde ilerlemelerini izleyebilmek için molekül ağırlıkları belli olan proteinlerle hazırlanmış ticari belirteçlerden (protein marker) (MBI Fermentas, SM0441 ve SM0671)

yararlanılmıştır. Jeller bu belirteçler sayesinde analiz edilecek protein büyüklüğüne denk gelen seviyeye kadar yürütülmüştür.

3.6.11.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve membranin bloklanması

Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak taze hazırlanan Tris- Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %20 metanol) içerisine alınmıştır. 40 saniye metanol içerisinde bekletilen PVDF membran (Millipore, IPVH15150) transfer tamponu içerisine alınmış. Islak transfer cihazına (BioRad) Whatmann, jel, PVDF membran ve Whatmann sandviçleri oluşturulmuş katmanlar arasındaki hava kabarcıkları çıkartılmıştır. Transfer sırasında jelin cm²'si başına 3.5 - 5.5 mA olacak şekilde akım geçirilerek 400mA'de, 90 dakika transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranlar 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama solusyonu olarak %0,1- 0,5 lik TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween-20) içinde hazırlanmış 6-8% yağsız süt tozu (NFMP) veya 10% BSA kullanılmıştır. Bloklama işleminin ardından, membran Tablo 2.3'deki gibi optimize dilüsyonlarda O/N +4°C'de primer antikor ile muamele edilmiştir. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için 0,5% lik TBS-T ile membranlar yıkandıktan sonra primer antikorların üretildikleri konağın IgG lerine karşı üretilen sekonder antikorlar ile optimize dilusyonlarda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak Pierce firmasının anti-fare (1858415) veya anti-tavsan (1858414) antikorları kullanıldı.

Tablo 3.6.2. Kullanılan bloklama solüsyonları ve antikorlar

Bloklama solüsyonu	Primer Antikor	Dilüsyon
0.5% TBS-T içinde 6% süt tozu	Kalnexin (sc11397)	1:5000
0.5% TBS-T içinde 5% süt tozu	H3K27me3 (Millipore 07-449)	1:1000
0.5% TBS-T içinde 5% süt tozu	H3K27ac (Millipore 07-360)	1:500
0.5% TBS-T içinde 5% süt tozu	EZH2 (ab3748)	1:500

3.6.11.5 Proteinlerin membran üzerinde saptanması

Membranlar primer ve sekonder antikorlarla muamele edilip yıkama işlemi tamamlanınca proteinlerin membran üzerinde görünür hale getirilmesi işlemlerine geçilmiştir. Sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimlerinin substratını parçalaması esasına dayanan ve oluşan kimyasal ışımanın saptanması temeline dayanan kemiluminesans (Pierce-RPN2108) görüntüleme solüsyonları kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanan karışım membran üstüne, membranı kaplayacak miktarda yayılarak 3-5 dakika bekletildi. Görüntüleme işlemleri Vilber Lourmat Chemismart 5100 cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.6.12 Immünboyama

3.6.12.1 Immünhistokimya

Xenograft farelerin nekroskopisi sonrası çıkarılan tümör dokuları histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edilmiştir. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece musluk suyu altında yıkandıp dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutulmuştur. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra 2 kez 1'er saatlik yumuşak parafin ile immersiyonu sağlanıp ardından dokular sert parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alınmıştır (Tablo 3.6.3).

Tablo 3.6.3. Rutin doku takibi protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Musluk suyu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton-1 Aseton-2 Aseton-3 Aseton-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol-1 Xylol-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin-1 Yumuşak parafin-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilen ile etkileştirilmiştir. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirilip, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 5 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandmıştır. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri mutlak alkolden geçirilen kesitler şeffaflştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır (Tablo 3.6.4).

Tablo 3.6.4. Hematoksilen-Eozin boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Parafin dokulardan alınan 5µm lik kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30'ar dakika, 3 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından %100'den (absolü) %70'e azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 2 dakika bekletilmiştir. Pap-pen (Sigma Aldrich, Z377821) ile sınırlandırılan kesitler sitrat tampon (pH:6.0) ile 5 dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra 3 kez PBS (Phosphate Buffer Solution) tamponu ile yıkanıp, dokuların endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 10 dakika %3'lük H₂O₂ uygulanmıştır. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 30 dakika bloklama solüsyonu (Reagent A serum "blocking solution", 10% keçi non-immun serum, İnvitrogen Histostain plus kit) ile muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikor olan EZH2 (ab3748) ve H3K27me3 (millipore 07-449) ile bir gece +4C'de

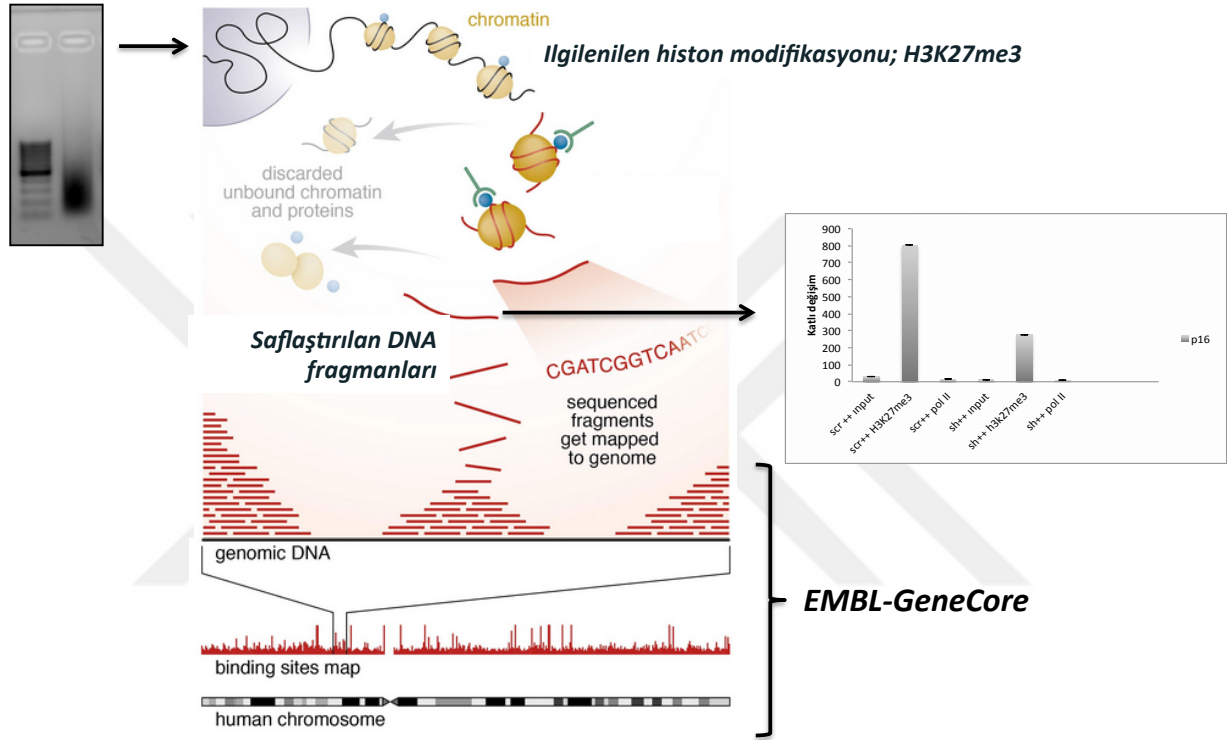
inkübe edilmiştir. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-tavşan biotin-ikincil antikoru (Reagent B, biotinylated second antibody, Invitrogen) ile 20 dakika inkübe edildikten sonra üç defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Kesitler, streptavidin peroksidaz (Reagent C., streptavidin-peroxidase (HRP) ile 20 dakika inkübe edildikten sonra oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (DAB-Roche, Germany) kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 2 dk yıkanan kesitler artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

3.6.13 Histon Ekstraksiyonu

Hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında buzda soğutulmuş PBS ile yıkandıktan sonra kazınarak 3000rpm'de 10dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti 2 kez 5mM sodium bütirat içeren soğuk PBS ile yıkandıktan sonra pellet 0,5% Triton X-100, 2mM PMSF, 0.02% NaN₃ içeren TEB (Triton Ekstraksiyon Tamponu) içinde, 1x10⁷ hücre /ml olacak şekilde çözünmüş ve 10dk buz üzerinde yavaşça karıştırılarak lize edilmiştir. Lizat 2000 rpm'de, 10dk, +4°C' de santrifüj edildikten sonra supernatant atılmış ve pellet bir öncekinin yarısı kadar miktarda TBE ile tekrar çözünerek ve santrifüj edilmiştir. Son olarak pellet, 4 x 10⁷ hücre/ml olacak şekilde 0,2N HCl ile resuspende edilmiş ve bu asit ekstraksiyonu +4°C'de, karıştırılmalı olarak gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Asit ekstraksiyonu tamamlanan histonlar 2000 rpm'de 10 dk, +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir ependorfa alınmıştır. 100% TCA'dan finalde 33% olacak şekilde süpernatanta eklenmiştir. Buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiş ve bu inkübasyon sırasında tüpler dikkatlice ters-düz edilerek karıştırılmıştır. 16000g'de 10dk +4°C'de santifüjlendikten sonra pellet soğuk aseton ile yıkanmış, 16000g'de 5dk +4°C'de santifüjlenmiştir. Aseton ile yıkama adımı tekrarlanmıştır ve sonunda elde edilen pellet 20 dk kurumaya bırakıldıktan sonra 100µl distile su ile çözülmüştür.

3.6.14 Kromatin İmmunopresipitasyon Yöntemi (ChIP)

EZ-Magna ChIP A/G (Catalog No. 17-10086) kit manueleine göre yaklaşık 1×10^7 hücre ile uygulamaya başlanmıştır. Deneyler scr-HuH7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH7(EpCAM+) hücre hatlarında yapılmıştır. Her hücre tipi için fiksasyon süresi ve hücre sayısına göre lizis buffer miktarı ile özellikle sonikasyon basamağında optimizasyon gerekmektedir.



Şekil 3.6.4. H3K27me3-ChIP-seq yöntemi.

3.16.14.1 In vivo cross-linking, lizis ve sonikasyon aşaması

EZ-Magna ChIP A/G kit manueleine göre 145mm plate içinde büyütülen yaklaşık 80% yoğunluktaki hücrelerin ortamına, biyolojik grade 37% formaldehitten son konsantrasyonu 1% olacak şekilde eklenerek, oda sıcaklığında 10 dk fikse edildikten sonra hücreler 10X glisinden 2ml eklenerek 5 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Hücre kültür kapları buz üzerine alınarak soğuk PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 5ul Protease Inhibitor Cocktail II (PIC-II)/1ml PBS olacak şekilde hazırlanan PBS ile buz üzerinde kazınmıştır.

800g'de 4C'de 5dak santrifüj sonrası elde edilen pelletler önce sitoplazmik lizis buffer solüsyonu (2,5µl PIC-II/500µl hücre lizis tamponu) ile 15 dakika buz üzerinde 5dk'da bir vortakslenerek lize edilmiştir. Kite önerilen *dounce homogenitor* yerine, lizat, 26g enjektörden 10 kez geçirildikten sonra 800g/4°C'de 5 dakika santrifüj sonrası elde edilen pelletler nükleer lizis (2.5ul PIC-II/500ul nükleer lizis tamponu) çözeltisi ile resüspande edilmiştir.

Hücre lizatından 5µl sonike edilmeyen DNA kontrol amacıyla ayrı bir tüpe alınmıştır. 200-500bp arası büyüklükte fragmanlar elde edilmesi amacıyla "Bioruptor plus" sonikasyon cihazı kullanılarak (30sec pulse//30sec rest) x 45 dk örnekler sonike edilmiş, "Gene-elute PCR Clean up" (NK1020 Sigma) kit ile saflaştırılan DNA fragmanlarının büyüklüğü, 1,5% agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir.

3.6.14.2 "Cross-link" edilen DNA/protein örneği ile İmmunopresipitasyon aşaması

Her 50µl örnek 1×10^6 hücre lizatına eşittir ve bir ChIP denemesi için yeterlidir. Cross-link ve sonike edilen kromatin örneği 50µl'lik aliquatlar halinde 3 ay -80°C 'de saklanabilmektedir. İstenen fragman aralığında elde edilen 50µl kromatin örneği ile ChIP-grade H3K27me3 (*Millipore Catalog no. 17-622*) antikoru kullanılarak ChIP (Kromatin immunopresipitasyonu) yapılmıştır.

Kit içeriğinde bulunan, *anti-RNA polimeraz II antikoru* pozitif kontrol, *anti-IgG antikoru* negatif kontrol ve anti-H3K27me3 (*Millipore Catalog no. 17-622*) antikor denemeleri için her hücre için 3 adet IP tüpü hazırlanmış, her bir IP tüpü içine; 50µl IP örneğine 450µl dilüsyon buffer ve 2,25µl proteaz inhibitör kokteyli II eklenerek, buz üzerine alınmıştır. Deney sisteminin kontrolü olarak ve analizlerin yapılabilmesi amacıyla dilüsyon basamağından sonra 5ul örnek ayrılarak (INPUT) elüsyon aşamasına kadar buz üzerinde tutulmuştur.

(450µl dilüsyon buffer + 50µl örnek+ 2,25µl PI) eklenen her bir IP tüpüne, 20'şer µl iyice resuspande edilen A/G magnetic beadler eklendikten sonra, RNA polimeraz II ve IgG tüplerine 1'er µl antikor, H3K27me3 tüpüne ise datasheette önerildiği gibi 4µl antikor eklenmiş ve O/N, 4°C 'de, rotator üzerinde inkübe edilmiştir. *Magna GriP Rack*

Catolog no. 20-400, kullanılarak magnetik seperasyon ile (A/G “magnetic bead” + kromatin + antikor) kompleksi pelleti elde edilmiştir. (A/G “magnetic bead” + kromatin + antikor) kompleksinin yıkama aşamalarında; sırasıyla kit içeriğinde bulunan tamponlardan sırasıyla (1- *Low salt wash buffer X*; 2- *High salt wash buffer X*; 3- *LiCl salt wash buffer X 1*; 4- *TE buffer X 1*) 500µl eklendikten sonra, 5 dakika rotatorda inkübe edilmiş ve magnetik seperasyon ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır.

3.6.14.5 Serbest DNA elde etmek amacıyla, protein/DNA kompleksinin elüsyonu ve reverse cross-link aşaması;

Kit içeriğinde bulunan *ChIP* ayrıştırma tamponu (*elüsyon buffer, EB*) oda sıcaklığına getirildi ve *Proteinaz K* buz üzerinde eritildikten sonra INPUT tüpü de dahil her tüp için, (100µl ChIP EB + 1µl Proteinaz K) hazırlanmıştır. (A/G “magnetic bead” + kromatin + antikor) kompleksi üzerine eklenmiş ve önce 2 saat 62°C’de, daha sonra 10 dk 95 °C’de sallamalı inkübatörde, inkübe edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra ve magnetik seperasyon sonrasında elde edilen süpernatantlar ayrı tüplere alınmıştır.

3.6.14.6 Spin kolonlar ile DNA’nın purifikasyonu aşaması

Her 100µl örnek üzerine 500µl kit içeriğinde bulunan reagent A eklenmiş ve spin kolona uygulanmıştır. 30sn, 10000xg’de santrifüj ardından sıvı uzaklaştırılmış ve kolona 500µl Reagent B eklenerek aynı işlem tekrarlanmıştır. Spin kolon yeni bir tüpe alındıktan sonra 50µl elüsyon buffer eklenmiş ve tekrar 30sn, 10000xg’de santrifüjlenmiştir. Bu basamak iki kez tekrarlanmış ve sonuç olarak 50µl saf DNA elde edilmiştir.

3.6.14.7 Elde edilen ChIP örnekleri ile gerçek zamanlı kantitatif PCR

ChIP kiti içerisinde kontrol olarak GAPDH primerleri bulunmaktadır. Ayrıca ilgilenilen molekülün bilinen bir hedef geninin promotor bölgesinden elde edilen primerleri de (H3K27me3 ile yapılan ChIP deneyi için p16 primerleri kullanılmıştır)

kontrol amacıyla kullanılmıştır. “Sybergreen master mix” kitinin önerdiği şekilde hazırlanan örnekler ile GAPDH için kitin önerdiği parametreler, p16 için optimize edilen koşul kullanılarak (94°C 10dk, 50 döngü: 94°C 20sn// Tm 60°C 1dk) reaksiyon kurulmuştur.

3.6.15 ChIP Sekanslama

“EMBL-GeneCore/Heidelberg” merkezi, “Next Generation Sequencing” biriminin parametreleri doğrultusunda; 200-500bp aralığında sonike edilen ve konsantrasyonları Qubit ile analiz edildikten sonra en az 0,3ng/μl olacak şekilde toplamda 10ng olarak aliquatlanan DNA fragmanları merkezin sistemine girilmiş ve Tablo1 2.6.’de belirtildiği şekilde sistemin örneklere verdiği ID’ler ile etiketlenerek merkeze gönderilmiştir.

Tablo 3.6.5. ChIP-seq örneklerinin Genecore ID’leri ve DNA konsantrasyonları.

Örnek adı	ng/μl	10ng için	Genecore ID
scrHuH7_INPUT_1	0,404	24,75	15s12726
scrHuH7_H3K27_1	2,66	3,76	15s12727
shHuH7_INPUT_1	0,491	20,37	15s12728
shHUH7_H3K27_1	4,26	2,35	15s12729
scrHuH7_INPUT_2	1,16	8,62	15s12730
scrHuH7_H3K27_2	1,98	5,05	15s12731
shHuH7_INPUT_2	2,38	4,20	15s12732
shHuH7_H3K27_2	2,07	4,83	15s12733

Sonuçlar, “SICER Chip-Seq” analiz programı ile “Hg19” insan referans genomu kullanılarak analizlenmiştir. Histon modifikasyonu analizlerine öncelikli olarak, **KLF4**, H3K27me3 hedefi olarak belirlenmiştir. Verinin doğrulanması amacıyla KLF4 geni promotor bölgesinden primer dizayn edilmiş ve qPCR yapılmıştır.

3.6.16 Biyoinformatik Analiz

Aşağıda listelenen veritabanları ve software programlar kullanılarak elde edilen verilerde EZH2 aracılıklı H3K27me3 hedef genlerin kodladığı proteinlerin biyolojik fonksiyonları araştırılarak görev aldıkları yollar listelendi.

- ✓ Integrative Genomics Viewer (iGV)
(<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>)
- ✓ SICER Spatial clustering for Identification of ChIP-Enriched Regions
(https://www.genomatix.de/online_help/help_regionminer/sicer.html)
- ✓ Galaxy NGS veri analizi platformu
- ✓ NCBI-Gene (National Center for Biotechnology Information)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>),
- ✓ NCBI-Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>),
- ✓ Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)
- ✓ EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Databases>)
- ✓ DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis
Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)
- ✓ Gene Ontology PANTHER classification system (<http://pantherdb.org/>)

3.6.17 İstatistik

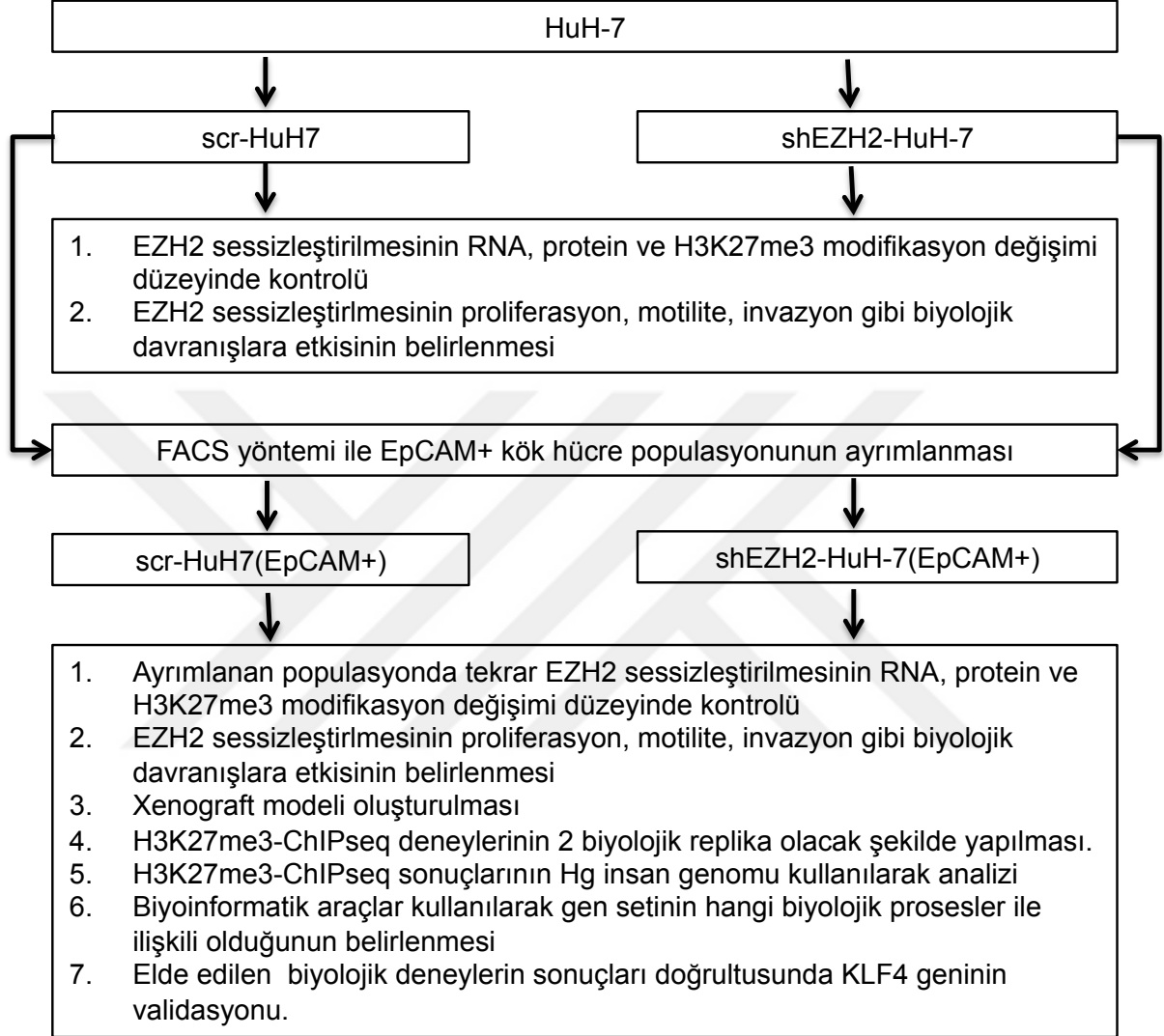
In vitro çalışmalar kendi içerisinde teknik tekrar olarak 3'lü çalışılmıştır. Ek olarak en az 2 farklı bağımsız deneyde biyolojik tekrar yapılmıştır. Graphpad programı kullanılarak standart sapma ve standart hata hesaplanmıştır.

Gruplar arası istatistiksel farklılıklar ise gruplar arası koşullara ve örneklem sayısına bakılarak Anova, student t testi ve Mann-Whitney kullanılarak istatistiksel anlamlılıkları hesaplanmıştır (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

ChIPseq örnekleri, Hg19 insan referans genomuna hizalanmış BAM dosyaları şeklinde Galaxy NGS veri analizi platformuna yüklenmiş. BAM dosyaları analiz için uyumlu BED formatına dönüştürüldükten sonra SICER (PMID: 19505939) adlı histon modifikasyon ChIP-Seq analiz programı kullanılarak, her bir örnekte bulunan H3K27me3 modifikasyon bölgeleri, FDR $< 0,01$ istatistiksel doğrulukta belirlenmiştir.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

3.7.1 Araştırma Planı



3.7.2 Araştırma Takvimi

Yapılacak işler	1. Yarıyıl (Ekim 2012)	2. Yarıyıl	3. Yarıyıl	4. Yarıyıl	5. Yarıyıl	6. yarıyıl	7. yarıyıl	8. Yarıyıl (Ağustos 2016)
Malzeme alımları,	X	X	X					
HuH-7 hücrelerinde lentiviral shRNA yöntemi ile EZH2 gen ekspresyonunun sessizleştirilmesi		X	X					
1. EZH2 susturulmasının RNA, protein ve H3K27me3 modifikasyon değişimi düzeyinde kontrolü 2. EZH2 sessizleştirilmesinin proliferasyon, motilite, invazyon gibi biyolojik davranışlara etkisinin belirlenmesi		X	X	X	X			
FACS yöntemi ile EpCAM+ kök hücre popülasyonunun ayrılmanması; 1. Ayrımlanan popülasyonda tekrar EZH2 susturulmasının RNA, protein ve H3K27me3 modifikasyon değişimi düzeyinde kontrolü 2. EZH2 sessizleştirilmesinin proliferasyon, motilite, invazyon gibi biyolojik davranışlara etkisinin belirlenmesi 3. Xenograft modeli oluşturulması				X	X			
1. H3K27me3-ChIPseq deneylerinin 2 biyolojik replika olacak şekilde yapılması. 2. H3K27me3-ChIPseq sonuçlarının Hg insan genomu kullanılarak analizi 3. Biyoinformatik araçlar kullanılarak gen setinin hangi biyolojik prosesler ile ilişkili olduğunun belirlenmesi 4. Elde edilen biyolojik deneylerin sonuçları doğrultusunda KLF4 geninin validasyonu.					X	X	X	
Tez Yazımı								X

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün istatistiksel analizler ve grafik çizimleri GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adhezyon, proliferasyon, motilite ve invazyon verileri ANOVA (Analysis of variance) yöntemi çoklu grupların karşılaştırılıp değerlendirilmesiyle çözümlenmiştir. Mann-Whitney U test ise ikili grupların karşılaştırmalı analizinde kullanılmıştır. (* p<0,05 ; ** p<0,01; ***p<0,001)

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Yoktur.

3.10 Etik Kurul Onayı

1- Etik kurulun 23.02.2012 tarih ve 519-GOA protokol numaralı 2012/06-20 karar numarası ile görüşülen 112T173 no'lu TÜBİTAK Projemiz etik açıdan uygun bulunmuştur (Ekler 8.1).

2- Etik kurulun 30.06.2016 tarih ve 2790-GOA protokol numaralı 2016/18-14 karar numarası ile görüşülen projemiz etik açıdan uygun bulunmuştur (Ekler 8.2).

3- Yine 112T173 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında 03.03.2015 tarihli Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal hayvan deneyleri etik kurulu tarafından da projemiz uygun bulunmuştur (Ekler 8.3).

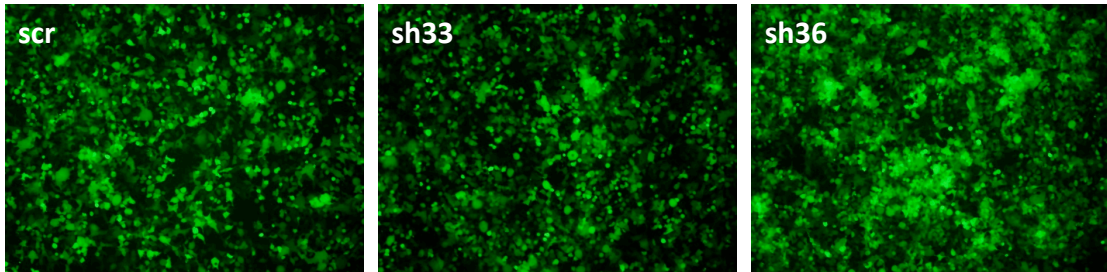


4. BULGULAR

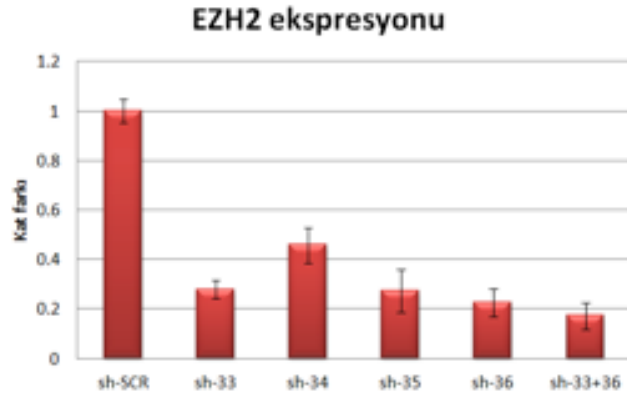
4.1 HuH-7 Hücrelerinde EZH2 Geninin Susturulması

EZH2 geninin shRNA aracılığıyla hücrelerde susturulması için yapılan optimizasyon deneylerinde, EZH2 genine spesifik, 8 farklı PGIPZ kökenli “KMT6/EZH2 shRNA” vektörünün verimlilikleri, “scramble” (scr) kontrolü ile karşılaştırmalı olarak ayrı ayrı, farklı konsantrasyon ve sürelerde transfekte edilerek test edilmiştir.

Bu deneylerde EZH2 susturulması için test edilen shRNA’ler, pGIPZ lentiviral vektörü içerisinde klonlanmış şekilde satın alınmıştır. pGIPZ vektörleri, EZH2’yi hedef alan shRNA sekanslarının yanı sıra, transfeksiyon verimliliğini izlemek için GFP geni ve stabil koloni seçimi için puromisin direnç genini içermektedirler. Böylece transfeksiyondan sonraki 24-48 saat içinde, transfekte edilen 293T hücrelerinin floresan mikroskop ile GFP ekspresyonu kontrol edilerek transfeksiyon etkinliği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Yine, deneylerde EZH2 geninin sessizleştirilmesi “scramble, scr” kontrole göre gerçek zamanlı PCR kullanılarak gösterilmiştir. Buna göre, test edilen shEZH2 plazmidlerinden sh33, sh34, sh35, ve sh36 ile sırasıyla %72.1, %54.3, %72.8, %77.6 oranında ve sh33 ile sh36 plazmidlerinin beraber kullanılmasıyla, %82.9 oranında susturma elde edilmiştir (Şekil 4.2). En uygun koşul belirlendikten sonra HuH-7 hücrelerinde, “pGIPZ-EZH2 shRNA mir V2LHS-17510 (sh33) ve pGIPZ-EZH2 shRNA mir V2LHS-63068 (sh36)” pGIPZ lentiviral shRNA plazmidleri birlikte kullanılarak EZH2 kalıcı olarak susturulup, tüm deneyler bu hücrelerde yapılmıştır.

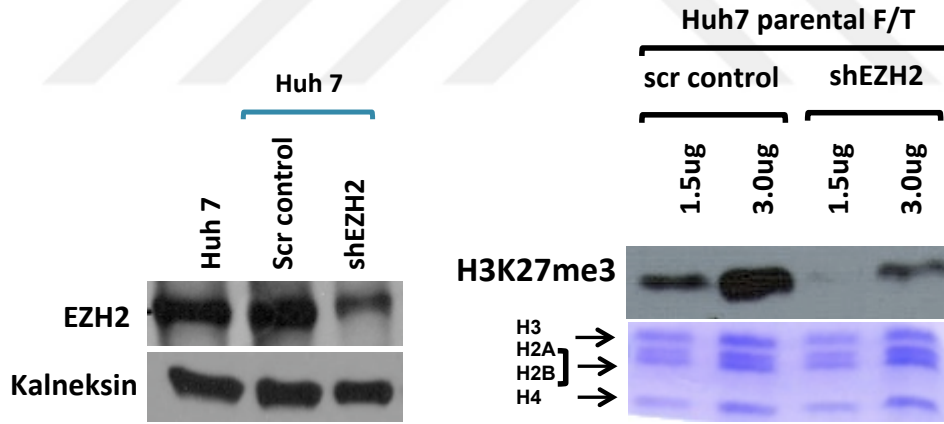


Şekil 4.1. 293T hücrelerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi.



Şekil 4.2. HuH-7 hücrelerinde EZH2 gen ekspresyon düzeyinin gerçek zamanlı qPCR ile belirlenmesi.

Kalıcı olarak EZH2 gen ekspresyonu sessizleştirilen bu hücrelerde, protein düzeyinde EZH2 seviyesinin ve buna bağlı olarak katalizlediği modifikasyon olan H3K27me3 düzeyinin düştüğü, western blot yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 4.3)

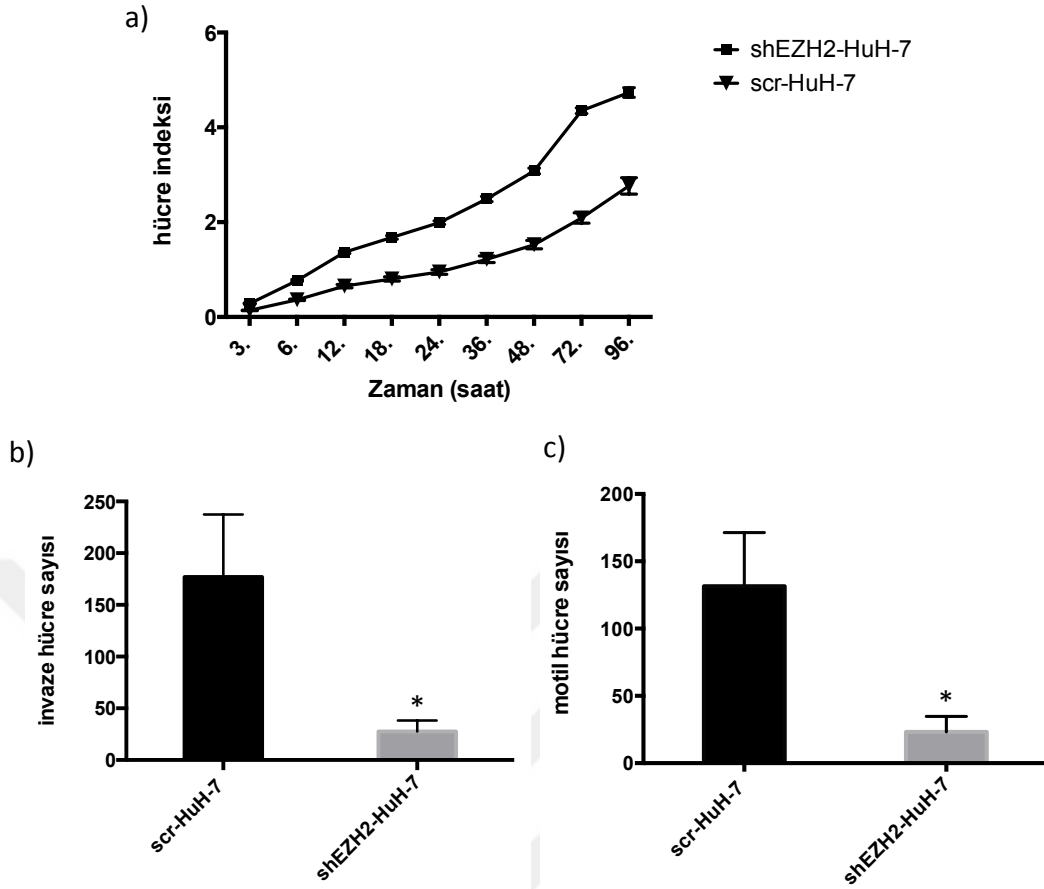


Şekil 4.3. shEZH2-HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin protein düzeyinde ve H3K27me3 histon modifikasyonu düzeyinde değişiminin western blot yöntemi ile gösterilmesi.

4.2 HuH-7 Hücrelerinde EZH2'nin Kalıcı Olarak Sessizleştirilmesinin Hücrenin Biyolojik Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi

EZH2'nin HuH-7 hücrelerinde kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücrenin biyolojik davranışlarına etkisini belirlemek amacı ile proliferasyon, hücre döngüsü, motilite ve invazyon deneyleri yapılmıştır. Proliferasyon deneyleri için hücreler 96 saat süresince gerçek zamanlı olarak *“xCELLigence-Roche Applied Science”* cihazında izlenmiştir. Buna göre, EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 hücrelerinin, scr-HuH-7 kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde daha hızlı proliferasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.a).

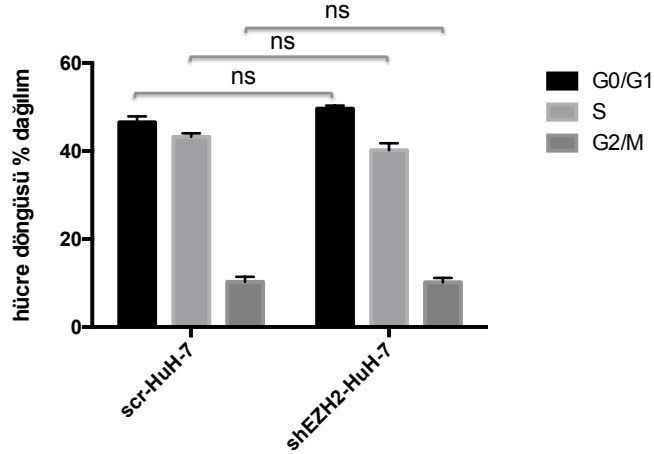
EZH2'nin motilite ve invazyon üzerine etkisinin belirlenmesi için hücreler ile hem “CIM-plate'ler” hem de “BD Biocoat control inserts 8.0 mikron hücre kültür kapları” kullanılarak iki farklı sistem ile deneyler kurulmuş ve her iki sistemde de aynı şekilde, EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 hücrelerinin, scr-HuH-7 kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde daha az sayıda motil ve daha az sayıda invaziv olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4 b ve c).



Şekil 4.4. HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücrenin biyolojik davranışlarına etkisi.

a) hücre proliferasyonuna, b) hücre invazyonuna, c) hücre motilitesine etkisi. Proliferasyonu değerlendirmek için 96 saatlik "cell indeks" hesaplanmıştır. (* simgesi $p < 0.05$ ifade etmektedir, $n:4$, Mann Whitney test).

Ardından, EZH2'nin hücre döngüsü üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Buna göre, EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 ile scr-HuH-7 kontrol hücreleri arasında fark gözlenmemiş ve EZH2'nin hücre döngüsü üzerine etkisi olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).

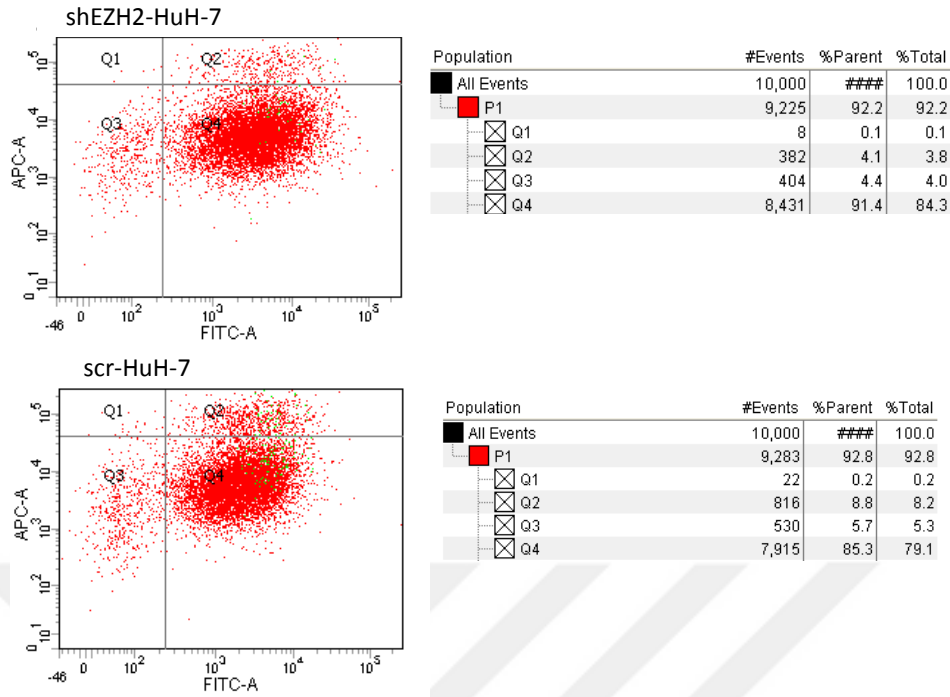


Şekil 4.5. EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücre döngüsü üzerine etkisinin belirlenmesi (ns: $p>0,05$ ifade etmektedir, n:3, Tukeys' Multiple Comparison test)

4.3 Kalıcı Olarak EZH2 Geni Sessizleştirilen HuH-7 Hücrelerinden Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH)'lerin ayırılması

4.3.1 scr-HuH-7 ve shEH2-HuH-7 Hücre Populasyonu İçerisinde EpCAM Eksprese Eden HpKKH Oranının Belirlenmesi

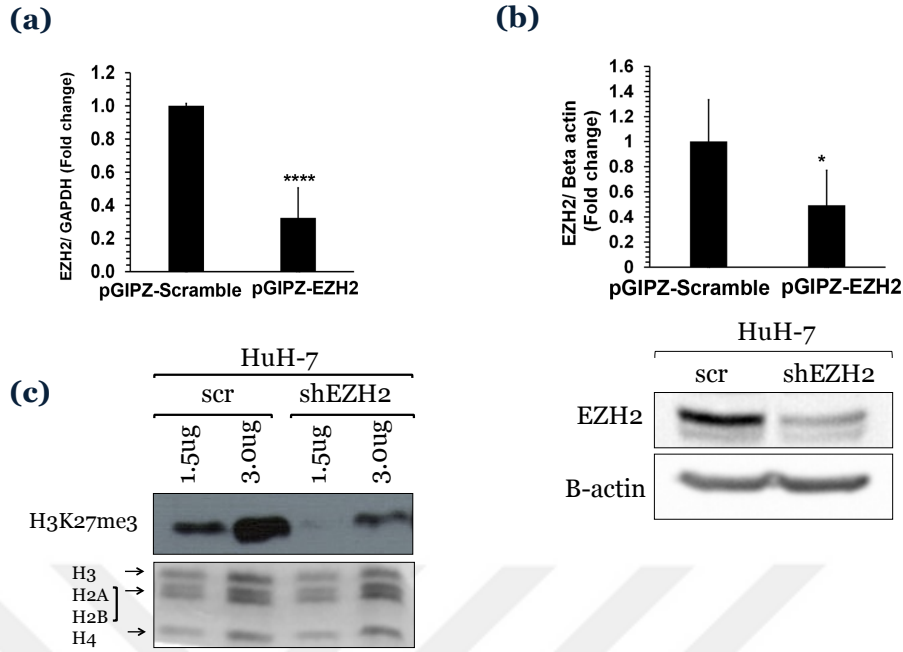
Öncelikle, scr-HuH7 ve shEH2-HuH-7 hücrelerinde, tümör başlatma kapasitesine sahip olduğu bilinen EpCAM+ hücrelerin miktarı flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre, EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 hücreleri içerisindeki EpCAM+ hücre populasyonunun, scr-HuH-7 kontrol hücrelerine göre daha az olduğu; scr-HuH-7 kontrol hücre grubunun 8.8% EpCAM+ hücre populasyonu içerirken, shEZH2-HuH-7 hücre grubunun 4.1% EpCAM+ hücre populasyonu içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu da bize EZH2'nin, kök hücre fenotipinin regülasyonunda rolü olabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.6. scr-HuH-7 kontrol hücre grubu ile shEZH2-HuH-7 hücre grubunda EpCAM+ hücre popülasyonunun flow sitometri yöntemi ile belirlenmesi.

4.3.2 scr-HuH-7 ve shEZH2-HuH-7 Hücrelerinden EpCAM+ Popülasyonun Ayrılması

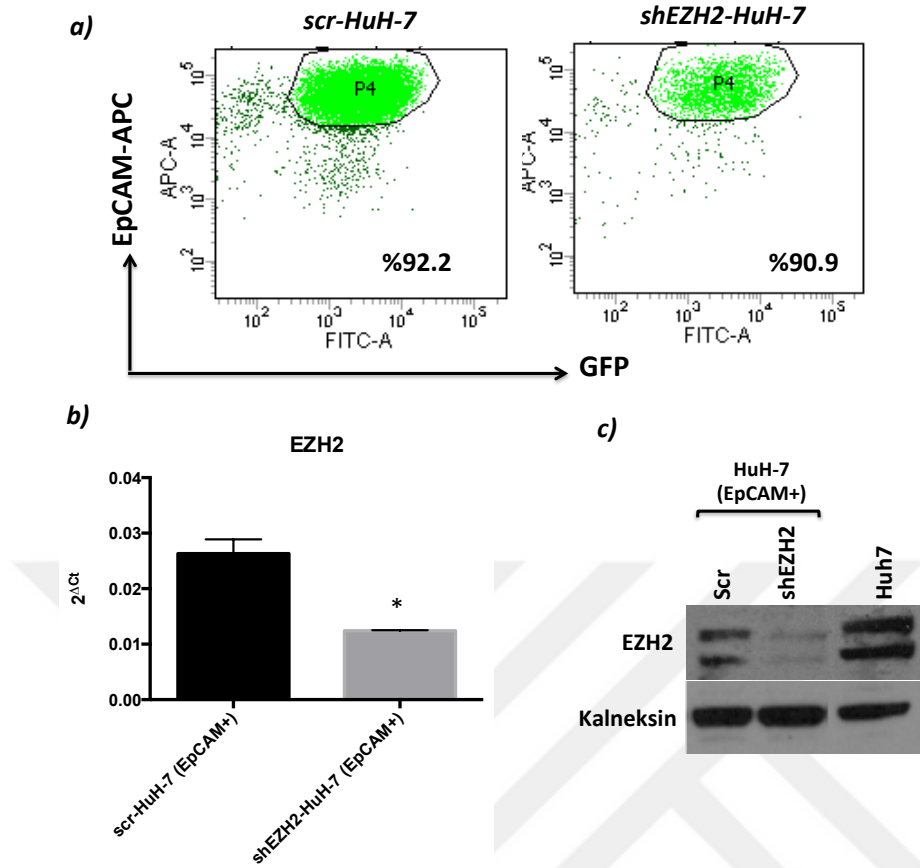
EZH2 geni kalıcı olarak sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 hücreleri ile scr-HuH-7 kontrol hücreleri içerisindeki EpCAM+ hücre popülasyonunun, yani HpKKH'lerin, FACS (Flourescence-Activated Cell Sorting) yöntemi ile ayrılması amacıyla öncelikle daha önceden çoğaltılıp dondurulan shEZH2-HuH-7 ve scr-HuH-7 kontrol hücreleri tekrar çoğaltılmıştır. Western blot ve gerçek zamanlı qPCR ile hücrelerdeki EZH2 ekspresyonundaki azalma, RNA ve protein düzeyinde kontrol edilmiş ve bu kalıcı sessizleştirmenin sonucu olarak da EZH2 tarafından katalizlenen H3K27me3 histon modifikasyon düzeyinin de kontrole göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. scr-HuH-7 ve shEZH2-HuH-7 hücrelerinde EZH2 miktarının kontrolü.

EZH2 miktarının; (a) RNA düzeyinde gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) ile, (b) protein düzeyinde western blot yöntemi ile, (c) H3K27me3 modifikasyon düzeyinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. (* simgesi $p < 0.05$ ifade etmektedir, $n:3$, Mann-Whitney test)

Bu hücrelerden, tümör başlatma kapasitesine sahip yani EpCAM+ olanlar ile lentiviral plasmid vektöründe GFP geni promotor bölgesi de içeren shRNA-EZH2 veya shRNA-scr plasmidi ile tansfekte olan yani GFP+ olan hücreler FACS yöntemi ile ayrılmaları; shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücreler ile scr-HuH-7(EpCAM+) hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerde EZH2 miktarı, RNA ve protein düzeyinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.8). Buna göre, ayrılmaları scr-HuH-7 hücrelerin 92.2% oranında, shEZH2-HuH-7 hücrelerin ise 90.9% oranında EpCAM+ ve GFP+ oldukları belirlenmiştir. Bu ayrılmaları hücrelerde gerçekleştirilen western blot ve gerçek zamanlı qPCR deneyleri sonucunda da EZH2 miktarında kontrole göre anlamlı düzeyde azalma belirlenmiştir (Şekil4.8).

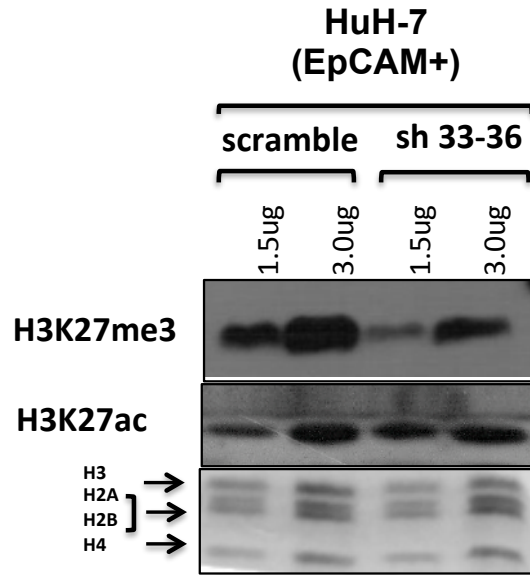


Şekil 4.8. FACS ile ayrımlanan *scr-HuH-7*(EpCAM+) ve *shEZH2-HuH-7* (EpCAM+) hücrelerde EpCAM oranının ve EZH2 miktarının belirlenmesi.

a) FACS ile ayrımlanan, *scr-HuH-7*(EpCAM+) ve *shEZH2-HuH-7*(EpCAM+) hücrelerde EpCAM+ hücre oranı. EZH2 miktarı; b) gerçek zamanlı qPCR ve c) WB yöntemi ile belirlenmiştir.

4.3.3 *scr-HuH-7*(EpCAM+) ve *shEZH2-HuH-7*(EpCAM+) Hücrelerinde H3K27Me3 ve H3K27Ac Modifikasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Ayrımlanan *scr-HuH-7*(EpCAM+) ve *shEZH2-HuH-7*(EpCAM+) hücrelerinden histon izolasyonu yapılarak, H3K27me3 ve H3K27ac modifikasyonlarındaki değişim western blot yöntemi ile belirlenmiştir. EZH2 susturulmasına paralel olarak enzimin katalizlediği H3K27me3 düzeyi de azalırken, H3K27ac modifikasyonunun miktarının arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.9).

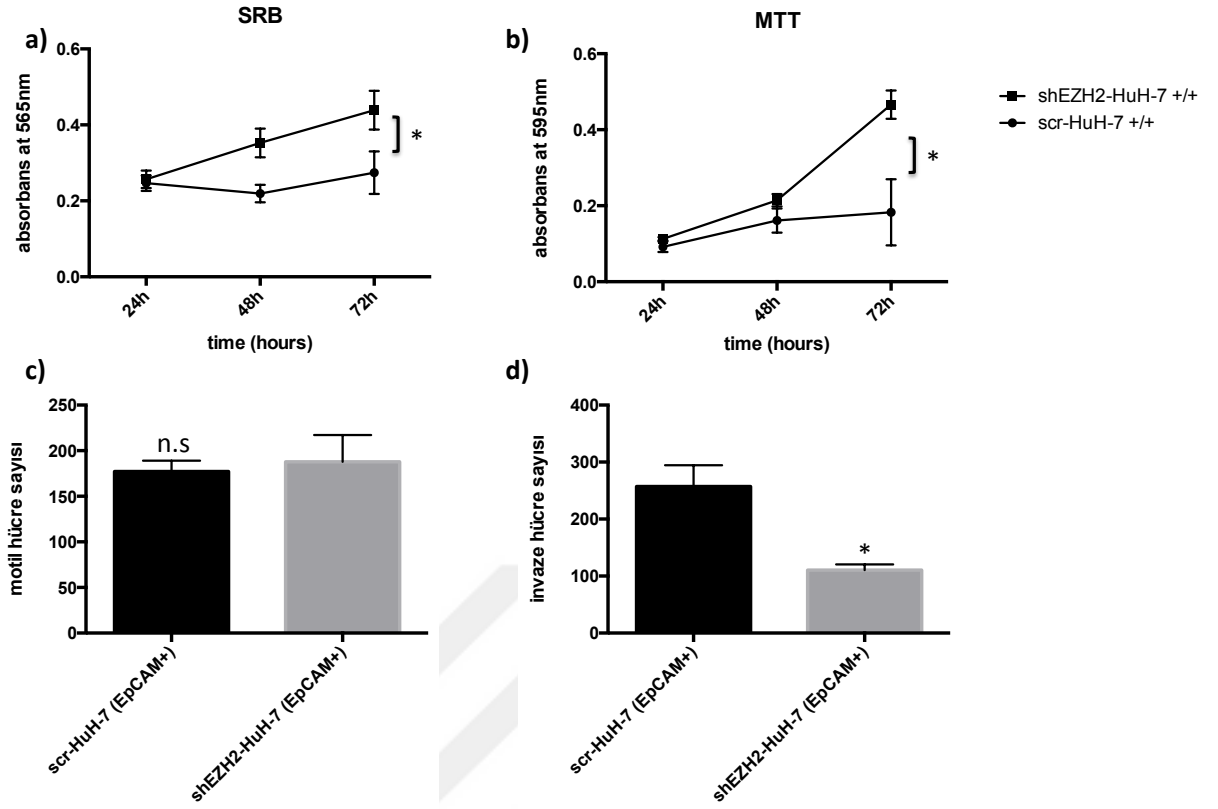


Şekil 4.9. scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerde H3K27me3 ve H3K27ac histon modifikasyon düzeylerindeki değişimin western blot yöntemi ile gösterilmesi.

4.4 EZH2'nin Kalıcı Olarak Sessizleştirilmesinin Hücrenin Biyolojik Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi

EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin ayrımlanan HuH-7 (EpCAM+) hücre popülasyonundaki etkisini belirlemek amacıyla proliferasyon, motilite ve invazyon deneyleri yapılmıştır. Proliferasyon deneyleri SRB ve MTT olmak üzere iki yöntemle değerlendirilmiştir. Buna göre, EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 (EpCAM+) hücrelerinin, scr-HuH-7 (EpCAM+) kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde daha hızlı proliferasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10 a ve b).

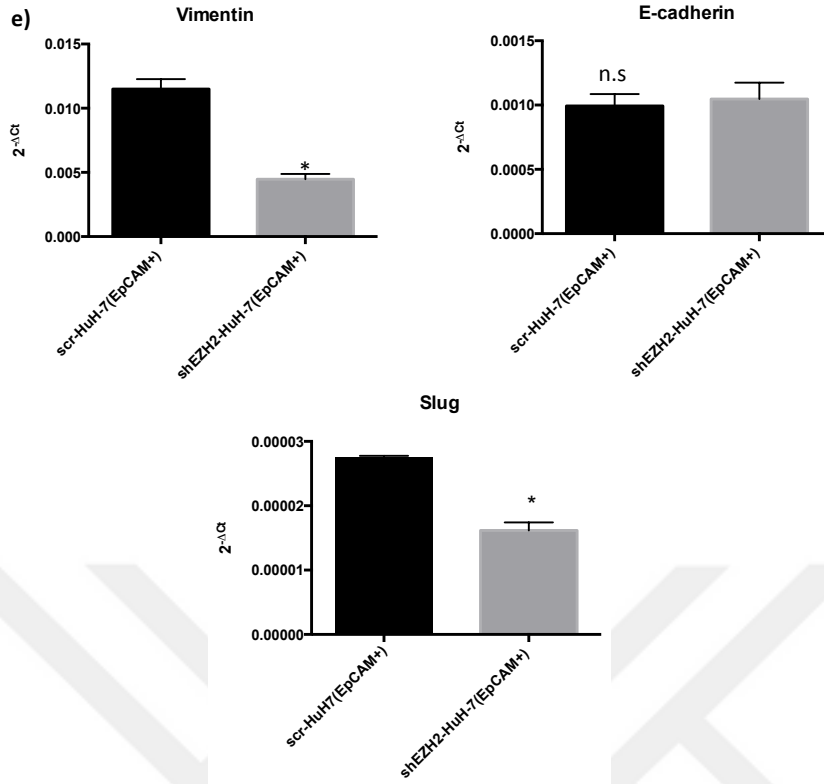
EZH2'nin motilite ve invazyon üzerine etkisinin belirlenmesi için hücreler "BD Biocoat control inserts 8.0 mikron" hücre kültür kapları kullanılarak deneyler kurulmuş ve EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerinin, scr-HuH-7 kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde daha az sayıda invaziv olduğu belirlenken, scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücreleri arasında motiliteleri açısından anlamlı fark yoktur (4.10 c ve d).



Şekil 4.10. HuH-7 hücrelerinde EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesinin hücrenin biyolojik davranışlarına etkisi.

a) SRB yöntemi ve b) MTT yöntemi ile hücre proliferasyonuna etkisi, c) motil hücre sayısı, d) invaziv hücre sayısına etkisi (* simgesi $p < 0.05$ ns: $p > 0,05$ ifade etmektedir. n:4 Mann Whitney test)

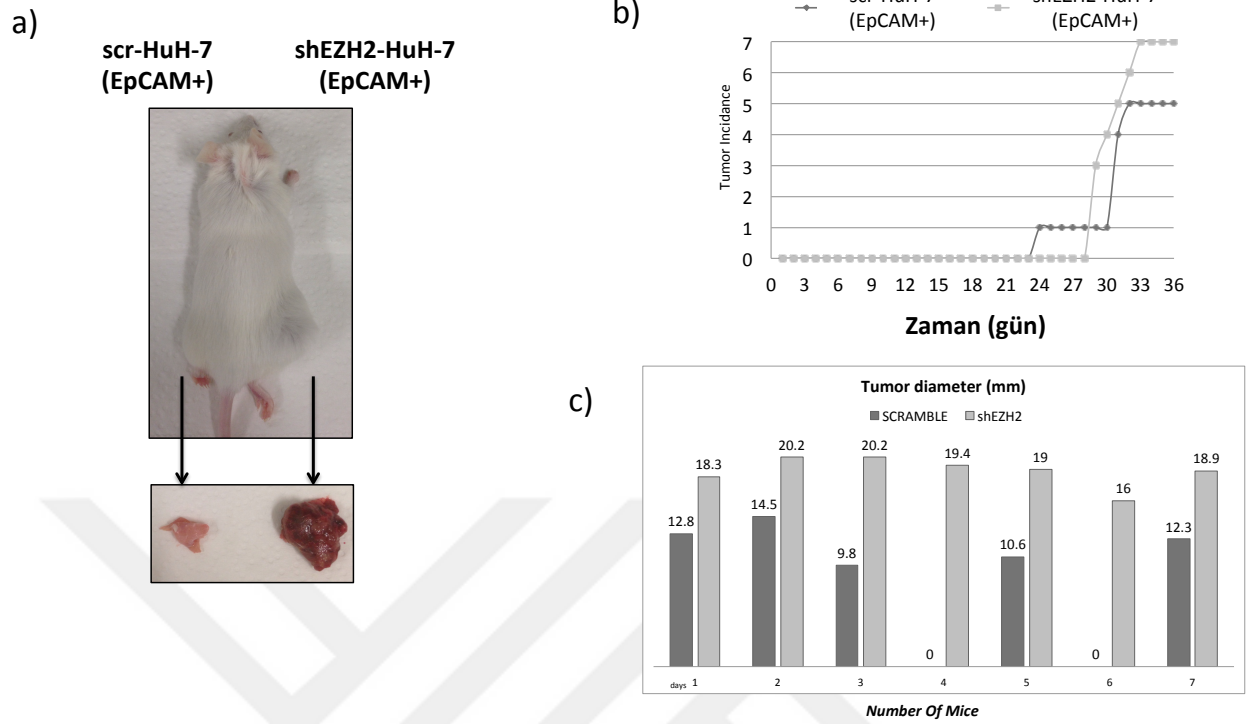
E-kaderin en iyi tanımlanan epitelyal hücre belirteci, Vimentin ise en iyi tanımlanan mezenşimal hücre belirtecidir. Slug ise EMT sürecini epitelyal proteinleri baskılayarak düzenleyen bir transkripsiyon faktördür. EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 (EpCAM+) hücrelerinin invazyonundaki değişiminin moleküler düzeyde incelenmesi amacıyla bu iki belirteç ile Slug ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Buna göre invazyondaki azalma ile uyumlu bir şekilde Vimentin ile Slug miktarı azalırken E-kaderinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (şekil 4.11).



Şekil 4.11. Vimentin, Slug ve E-kaderin düzeyinin gerçek zamanlı qPCR ile gösterilmesi (* simgesi $p < 0.05$ ifade etmektedir, $n:3$, Mann-Whitney test).

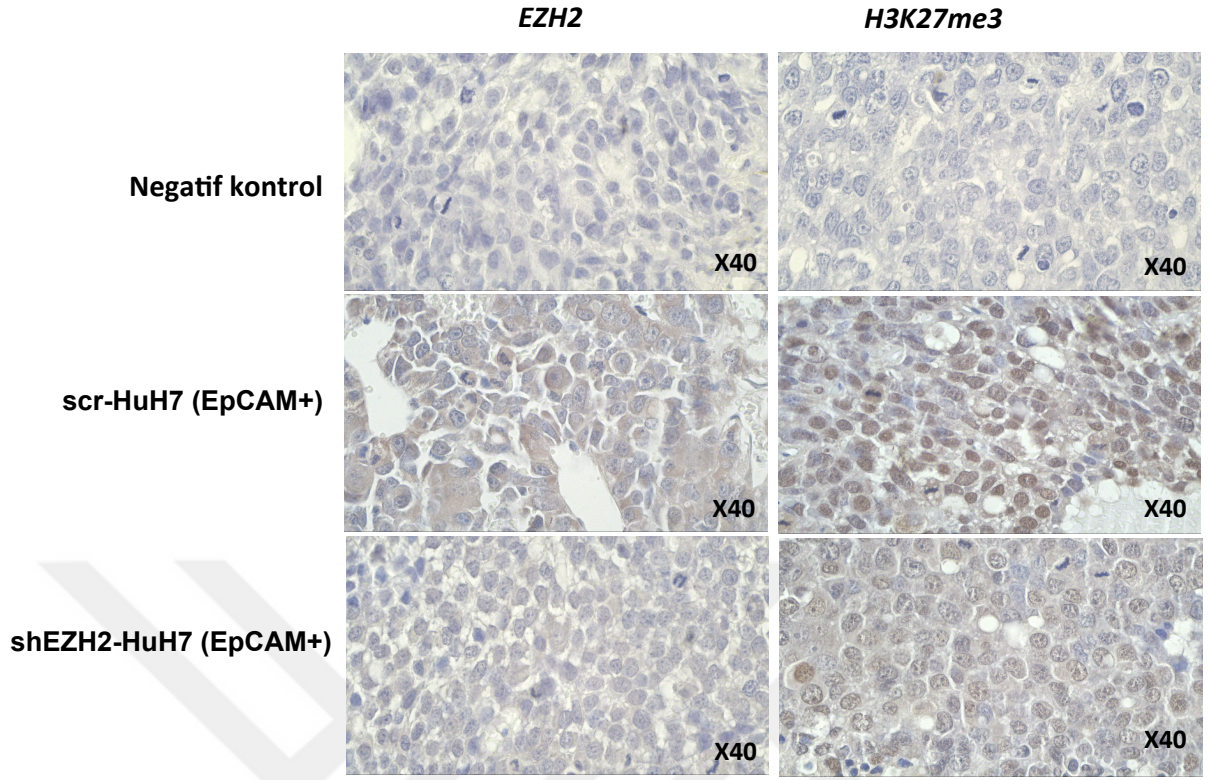
4.5 shEZH2-HuH-7(EpCAM+) Hücrelerinin in-vivo Tümör Başlatma Kapasitelerinin Belirlenmesi

shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerinin in-vivo tümör başlatma kapasitelerinin belirlenmesi için ayrımlanan scr-HuH-7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücreleri $50 \times 10^3 / 500 \mu\text{l}$ (Matrigel:DMEM, 1:1) olacak şekilde “NOD/SCID CB17-Prkdcscid/NcrCL” farelerin sırtına subkutan enjekte edilmiştir. Yaklaşık 40 gün boyunca takip edilen hayvanlarda tümör başlatma açısından fark gözlemlenmemiş fakat EZH2 kalıcı olarak susturulan shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerin *in vitro* deneyler ile paralel olarak daha büyük çapta tümör oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerinin in-vivo tümör başlatma kapasitelerinin belirlenmesi.

Deney sonucunda fare tümör dokularından alınan kesitler anti-EZH2 ve anti-H3K27me3 antikorları ile immunohistokimyasal yöntemle boyanmış ve tümör boyutunun daha büyük olduğu shEZH2-HuH-7(EpCAM+) enjekte edilen doku kesitlerinde EZH2 ve H3K27me3 seviyesinin daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



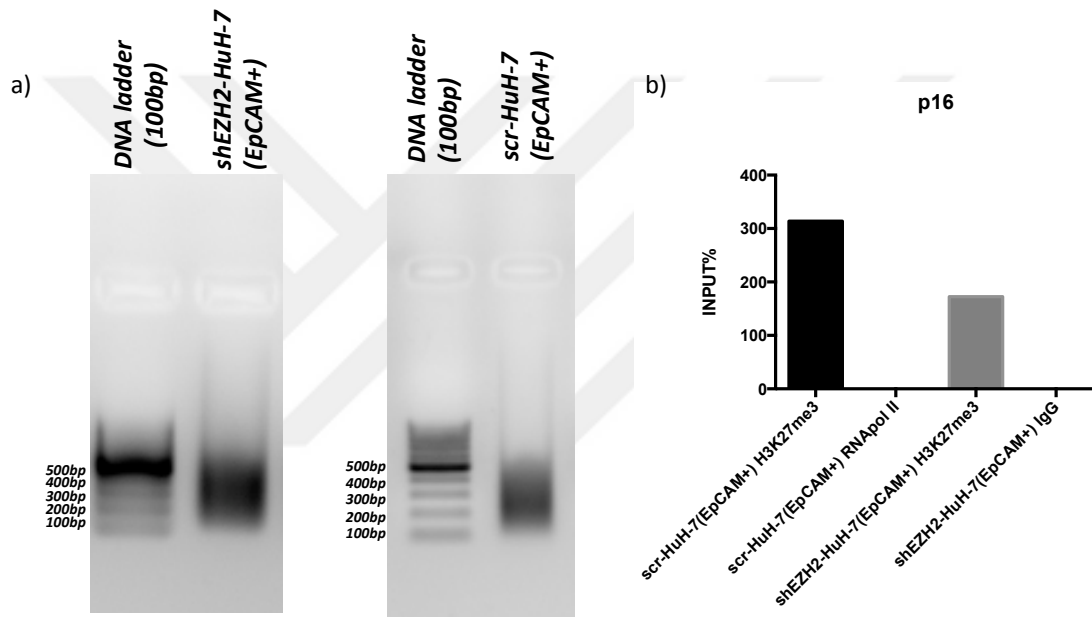
Şekil 4.13. Xenograft fare tümör dokularından alınan kesitlerde EZH2 ve H3K27me3 immunohistokimyasal boyama yöntemi ile EZH2 ve H3K27me3 düzeylerinin gösterilmesi.

4.6 Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH)'lerde EZH2 Aracılıklı Epigenetik Düzenlemede Rolü Olan Genlerin Araştırılması

4.6.1 H3K27me3 Kromatin İmmünopresipitasyonu (H3K27me3-ChIP)

HpHKK'lerde, EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile regüle edilen gen bölgelerinin ChIP-seq yöntemi ile belirlenmesi amacıyla öncelikle scr-HuH7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH7(EpCAM+) hücreleri ChIP deneyi için formaldehit ile fikse edilmiş ve DNA fragmanları elde etmek amacıyla sonike edilmiştir. Saflaştırılan DNA fragmanlarının büyükleri, ChIP deneyine en uygun şekilde olmak üzere, 200-500 bp olarak tespit edilmiştir (4.14 a).

H3K27me3 ChIP-grade antikor kullanılarak ChIP deneyleri yapılmıştır. Ardından, H3K27me3 histon modifikasyonu ile regüle edildiği bilinen p16 geni promotor bölgesine özel primerler dizayn edilerek bu gen bölgesindeki H3K27me3 regülasyon düzeyi kontrol edilmiştir. Sonuçta EZH2 sessizleştirilen shEZH2-HuH7(EpCAM+) hücrelerin p16 promotor bölgelerindeki H3K27me3 düzeyi scr-HuH7(EpCAM+) kontrol hücrelerine göre azalmıştır (Şekil 4.14 b). Böylece doğrulanan örnekler 2 biyolojik tekrar olarak sekanslanması için EMBL-GeneCore'a gönderilmiştir.



Şekil 4.14. H3K27me3-ChIPseq örneklerinin validasyonu.

a) H3K27me3-ChIP deneyi için saflaştırılan DNA fragmanları agaroz jel görüntüsü, b) H3K27me3-ChIP sonrası shEZH2-HuH7 (EpCAM+) hücreleri ile scr-HuH7(EpCAM+) kontrol hücrelerinin p16 promotor bölgelerindeki H3K27me3 düzeyindeki değişiminin gerçek zamanlı qPCR ile gösterilmesi.

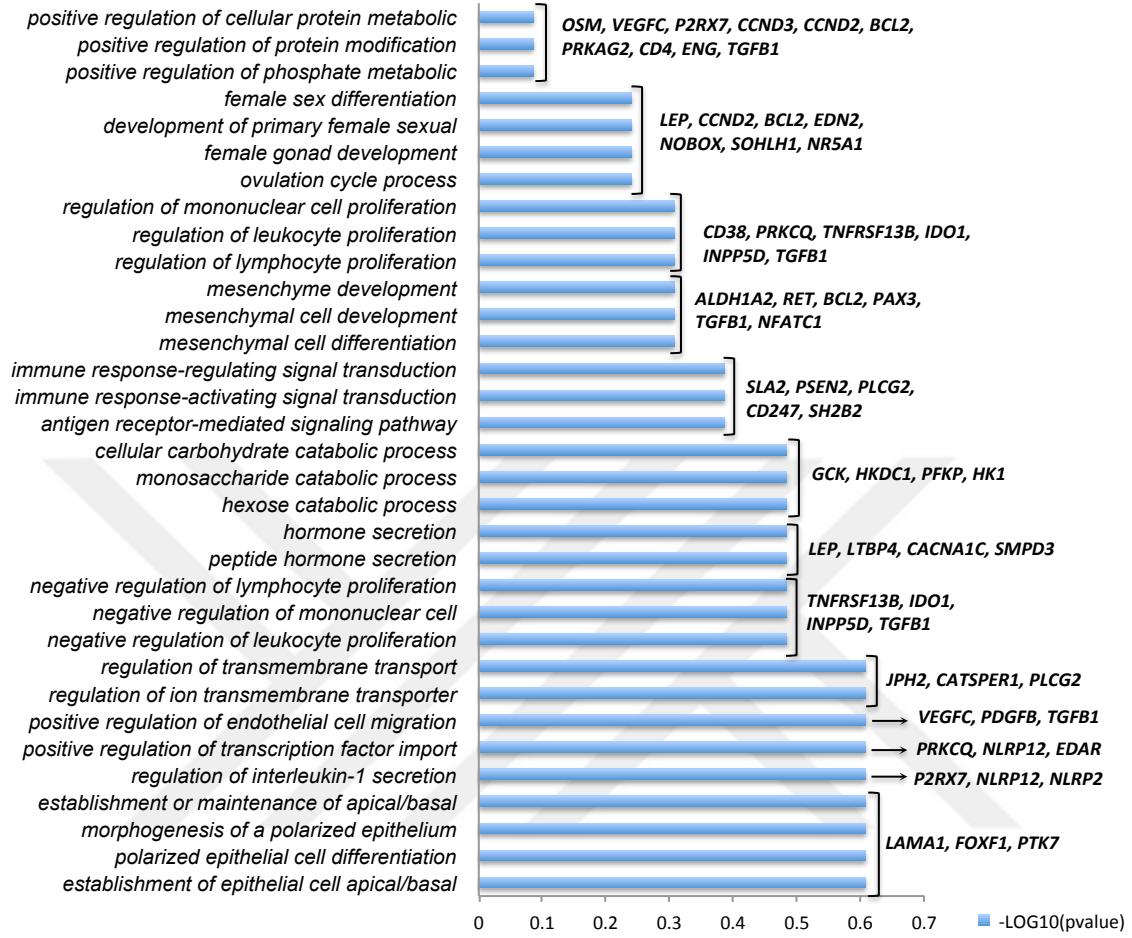
4.6.2 H3K27me3-ChIP sekans analizi (H3K27me3-ChIPseq)

“EMBL-GeneCore/Heidelberg” merkezi, “Next Generation Sequencing” biriminin parametreleri doğrultusunda hazırlanan örneklerden Illumina Hiseq2000 platformu kullanılarak elde edilen sonuçlar, “SICER Chip-Seq” analiz programı ile “Hg19” insan referans genomu kullanılarak analizlenmiştir.

Kontrol Input dosyalarıyla beraber shRNA yoluyla EZH2 sessizleştirilmiş veya sessizleştirilmemiş (scramble) örneklerle ait biyolojik replikalarla birlikte toplam 8 adet örnek (Tablo 3.6.5), hg19 insan referans genomuna hizalanmış BAM dosyaları şeklinde Galaxy NGS veri analizi platformuna yüklenmiş. BAM dosyaları analiz için uyumlu BED formatına dönüştürüldükten sonra SICER (PMID: 19505939) adlı histon modifikasyon ChIP-Seq analiz programı kullanılarak, her bir örnekte bulunan H3K27me3 modifikasyon bölgeleri, FDR <0,01 istatistiksel doğrulukta belirlenmiştir. Daha sonra scr-HuH7(EpCAM+) ve shEZH2-HuH7(EpCAM+) biyolojik replikalarında ortak olarak histon modifikasyonu olan genom bölgeleri belirlendi. Sonraki aşamada scr-HuH7(EpCAM+)'da bulunan ancak shEZH2-HuH7(EpCAM+) grubunda bulunmayan histon modifikasyon genom koordinatları ayrıştırıldı. Daha sonra Cisgenome (PMID:18978777) programı genom anotasyon modülü kullanılarak, gen promotor bölgelerinde (TSS +/- 2kb) veya genin promotor dahil diğer bölgelerinde (TSS +2kb ve TES -2kb arası) bulunan modifikasyonlar ve bu modifikasyonların hangi genin yakınında oldukları belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda; TSS (Transcription Start Site) +2kb ve TES (Transcription End Site) -2kb arası olan 1231 genin, TSS +/- 2kb olan 258 genin regülasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen gen seti içerisinde, elde ettiğimiz *in vitro* ve *in vivo* veriler doğrultusunda, kök hücre özelliklerinin sürdürülmesinden sorumlu olan ve hücrenin proliferasyon, motilite ve invazyon davranış değişikliklerinde etkisi olabilecek genleri ve bu genlerin bu davranış değişikliklerinden sorumlu olabilecekleri yolları belirlemek amacıyla PANTHER ve DAVID veritabanlarından yararlanılmıştır.

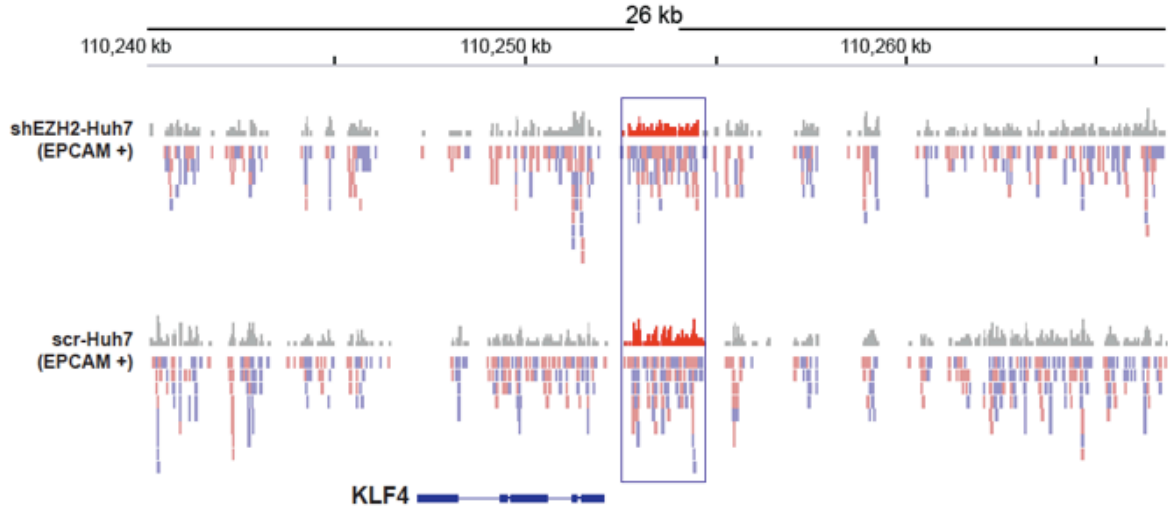
EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile düzenlenen biyolojik prosesler ve ilişkili gen grupları



Şekil 4.15. ChIPseq-H3K27me3 biyoinformatik analizi ve DAVID programı kullanılarak elde edilen gen grupları ve biyolojik işlevleri.

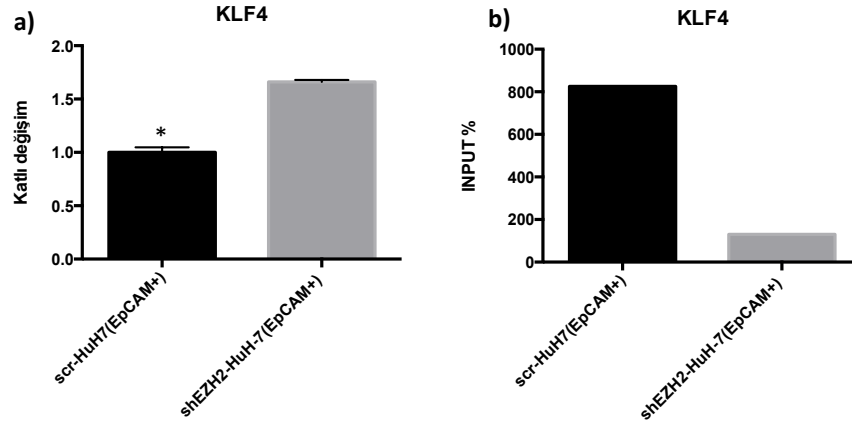
HuH-7 hücrelerinden izole edilerek elde edilen HpKKH modelinde, EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile düzenlenen genler DAVID veritabanı kullanılarak yapılan analizler sonucu istatistiksel olarak anlamlı şekilde çeşitli yollarla ilişkilendirilmiştir.

Öncelikli olarak, KLF4, H3K27me3 hedefi olarak belirlenmiştir. iGV (Integrative Genomics Viewer) programı kullanılarak KLF4 geninin H3K27me3 ile ilişkili promotor bölgesinde meydana gelen sinyal değişimi gösterilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. shEZH2-HuH-7(EpCAM+) hücrelerde KLF4 geninin H3K27me3 ile ilişkili promotor bölgesinde meydana gelen sinyal değişiminin iGV programı ile belirlenmesi.

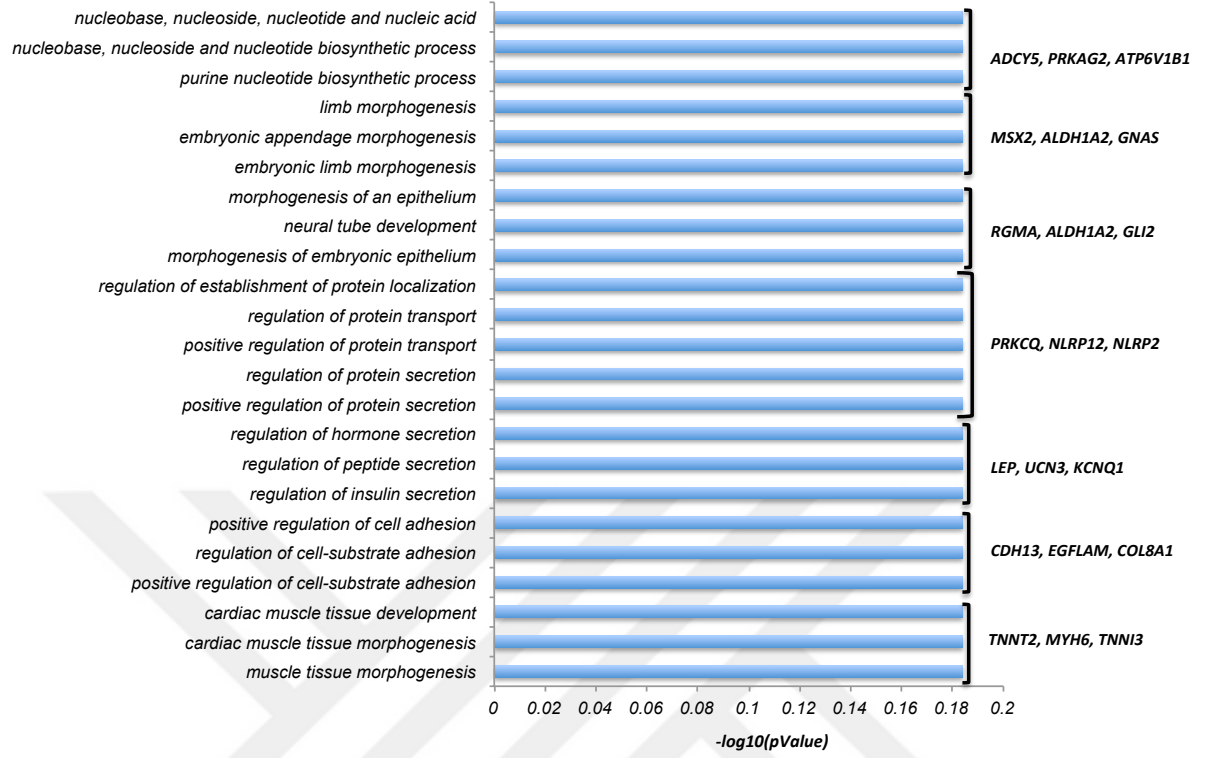
KLF4 geninin H3K27me3 ile ilişkili promotor bölgesinde meydana gelen sinyal değişiminin validasyonu amacıyla KLF4 geni promotor bölgesinden primer dizayn edilmiş ve H3K27me3-ChIPseq-qPCR yapılmıştır (Şekil 4.17b). EZH2 sessizleştirilen koşulda gözlemlendiği üzere sinyaldeki azalma ile doğru orantılı olarak, KLF4 geni promotor bölgesindeki H3K27me3 düzeyi de azalmıştır. Bu verinin KLF4 gen ekspresyonu düzeyine etkisinin belirlenmesi için de gerçek zamanlı qPCR yapılmıştır (Şekil 4.17a). KLF4 gen ekspresyonu EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonunun azalması nedeni ile shEZH2-Huh-7 (EpCAM+) hücrelerde anlamlı seviyede artmıştır.



Şekil 4.17. KLF4'un H3K27me3 ile regülasyonunun gerçek zamanlı qPCR ile gösterilmesi. a)KLF4 gen ekspresyonun b)KLF4'ün promotor bölgesindeki H3K27me3 regülasyonunun gerçek zamanlı qPCR yöntemi ile belirlenmesi (* simgesi $p < 0.05$ ifade etmektedir, $n:3$, Mann-Whitney test).

Song ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 27 adet HCC ve 20 adet komşu normal dokunun CpG bölgeleri analiz edildiğinde DNA metilasyon kalıbının 13% oranında değiştiği ve bu değişimin 97%'sinde hipometilasyon, 3%'ünde ise hipermetilasyon belirlenmiştir (Song, Tiirikainen et al. 2013). Hipermetile bölgelerin ise 37%'sinin promotor bölgede olduğu gösterilmiştir. Bu promotor bölgeleri ile çalışmamızda ChIPseq sonucunda elde ettiğimiz H3K27me3 hedefi olan promotor bölgeleri karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz gen grupları Şekil 4.18'da gösterilmiştir.

**HCC'de hipermetile promotor bölgeleri ile
H3K27me3 hedefi olan ortak genler**



Şekil 4.18 HCC hastalarında hipermetile olarak belirlenen bölgeler ile EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile regüle edilen ortak bölgelerin DAVID programı kullanılarak elde edilen gen grupları ve işlev yaptıkları yollar.

5. TARTIŞMA

HCC, heterojen yapısı, kötü prognozu, metastatik doğası ve ilaç direnci ile karakteristik, agresif seyreden, ölüm oranı oldukça yüksek ve tedavide genellikle cerrahinin tercih edildiği bir kanser türüdür. Hepatokarsinogenez sürecinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu birçok sinyal yolağı regülasyonu ve dolayısıyla hücrenin büyüme, sağkalım, proliferasyon, diferansiyasyon, hücre ölümü gibi davranışları değişmektedir.

Tümörün içinde, tümörü oluşturan kanser hücrelerinin fenotipik olarak farklı yani heterojen yapıda olmasına neden olan ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip hücreler “*kanser kök hücreler*” olarak tanımlanmış olup, HCC’de dahil birçok kanser tipinde bu hücre gruplarının varlığı gösterilmiştir (Romano, De Francesco et al. 2015). Fare xenograft modellerinde çok az sayı ile tümörü başlatabilen bu hücrelerin, kötü prognozu ve metastazında rolü olduğu bilinmektedir. HCC insan dokuları ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin tanımlanması için, CD133, CD90, CD44, OV6 ve EpCAM gibi çeşitli yüzey biyobelirteçleri kullanılmıştır (Romano, De Francesco et al. 2015) (Cheng, Li et al. 2016). Kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu açısından heterojen hücre gruplarının farklı biyolojik davranışları vardır. Bu belirteçlerden EpCAM, embriyonik karaciğer, safra kanalı epitelyumu ile sirotik karaciğerde çoğalan safra kanalı hücrelerinde eksprese edilirken, olgun hepatositlerde bulunmamaktadır. Ayrıca EpCAM, kanser hücrelerinin kendi kendini yenilemesinden sorumlu olan Wnt/B-katenin sinyal yolağının da direk hedefidir (Yamashita, Budhu et al. 2007).

Grubumuzca yapılan bir çalışmada, HCC hücre hattı HuH-7 içerisinde bazal koşullarda yaklaşık %10’luk popülasyonu oluşturan EpCAM+/CD133+ hücrelerin, serum içeren kültür ortamında EpCAM-/CD133- hücrelere göre, daha yavaş bölündükleri, buna karşın sorafenibe daha dirençli oldukları ve hepatik kök hücre benzeri gen ekspresyon imzası taşıdıkları gösterilmiştir. Yamashita ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, insan HCC dokusundan ve hücre hatlarından ayrımlanan EpCAM+/CD133+ hücre grubunun “nude” farelerde çok düşük sayıda bile tümörü başlatabildikleri gösterilmiştir (Yamashita, Ji et al. 2009). Yine Thorgerreson ve ekibinin öncülüğünü yaptığı, son yıllarda kabul gören, moleküler gen imzası temelli

yeni HCC sınıflamasında, EpCAM pozitif tümörlerin hepatobiliar progenitör belirtici olan CK19 eksprese ettikleri, kanser kök hücre ve kolangioma benzeri hücre fenotipe sahip oldukları, yüksek rekürens ve daha agresif tümör grupları oluşturdukları gösterilmiştir (Goossens, Sun et al. 2015, Tachi, Shiraishi et al. 2015).

Embriyonik dönemde PcG proteinleri erken diferansiyasyon genlerini baskılayarak embriyonik kök hücrelerin (ESC) pluripotent hallerinin sürdürülmesini sağlarlar. Hücre farklılaşmaya başladığında EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu düzeyi azalır ve erken diferansiyasyon genleri reaktif olur, fakat bu sırada terminal diferansiyasyon genleri hala baskılanmaktadır (Chou, Chiu et al. 2015). Terminal diferansiyasyon sürecine geçildiğinde bu PcG proteinleri seviyesi iyice azalarak hücreler erişkin hallerine ulaşırlar. EZH2'nin multipotensiyi sürdürme yeteneği kas öncül hücresi, sinir kök hücresi, kan kök hücresi gibi birçok farklı erişkin kök hücrede gösterilmiştir (Chou, Chiu et al. 2015). EZH2, karaciğer kanserinin de aralarında olduğu birçok kanser türünde aşırı eksprese olmaktadır ve bu durum kanser hücrelerinin çoğalması ve sağkalımı açısından kritik öneme sahiptir (Cheng, Lau et al. 2011). HCC'nin de aralarında olduğu bu kanser türlerinin çoğunda EZH2 ekspresyonu aşırı hücre çoğalması, agresif fenotip ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda, EZH2'nin kalıcı olarak sessizleştirilmesi ile HuH-7 hücrelerinin proliferasyonu artmış, fakat motilite ve invazyon yeteneği azalmıştır, hücre döngüsü analizlerinde ise herhangi bir fark gözlenmemiştir.

EZH2'yi kalıcı olarak sessizleştirdiğimiz hücre modeli shEZH2-HuH-7 hücrelerinden FACS yöntemi ile ayırladığımız EpCAM+ hepatik kanser kök hücre grubunun da in vitro proliferasyonu parental grup ile aynı şekilde artmış, motilite yeteneği değişmemiş fakat invazyon yetenekleri azalmıştır. EpCAM+ HCC'lerde, bu hücrelerin portal vene invazyonu ve geriye kalan karaciğere mikro boyutta yayılımı yoluyla, rezeksiyon sonrası erken relaplardan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Yamashita, Ji et al. 2009). Bu da bize EpCAM+ HuH-7 hücrelerde invazyon yeteneğinin EZH2 ile düzenleniyor olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca EZH2 ekspresyonunun regülasyonu da hücre çoğalması, tümörögenез ve kök hücre özelliklerinin sürdürülebilirliği açısından önemlidir. Chiba T. ve arkadaşları, EZH2 ekspresyonunun yüksek olduğu HuH-1 ve HuH-7 hücre hatları ile

yaptıkları çalışmalarında, bizim çalışmalarımızda da deney modelimiz olan HCC hücre hattı HuH-7’de, EZH2 geninin sessizleştirilmesinin EpCAM+ hücre oranını azalttığını göstermişlerdir (Chiba, Suzuki et al. 2012). Çalışmamızda EZH2’nin gen düzeyinde sessizleştirilmesinin aynı sonucu verdiği gösterilmiştir. Oluşturulan “Xenograft” modelde EZH2 sessizleştirilmiş HuH-7 hücrelerinden ayrımlanan EpCAM+ hücreleri, scr kontrole göre daha büyük çapta tümör oluşturmuştur. Oluşan tümörlerde, EZH2’nin ve katalizlediği modifikasyon olan H3K27me3 düzeyinin sessizleştirmeye paralel olarak azaldığı gösterilmiştir. Aynı grup hücrelerle yapılan in vitro proliferasyon deneylerinde belirlenen, EZH2 susturulmuş grubunda hücre sayısındaki anlamlı artış, hayvan deneylerindeki tümör çapındaki büyüklüğü açıklamaktadır. Yine, hem deneylerimizde hem de literatürde gösterildiği gibi, EZH2’nin EpCAM+ hücre sayısını kontrol ettiği düşünülürse, EZH2 susturulan grupta scramble kontrole göre daha az sayıda EpCAM+ buna karşın daha çok sayıda EpCAM- hücre olduğu ve her hücre bölünmesinde bu EpCAM- hücre sayısının logaritmik olarak anlamlı artışı ile tümör çapındaki anlamlı büyüklüğü açıklamak mümkündür. Buna ek olarak, scramble kontrolde oluşan küçük çaplı tümörlerde daha fazla sayıda EpCAM+ hücre olması ve buna bağlı olarak EZH2 susturulmuş tümöre göre kemoterapiye daha fazla dirençli olmaları beklenmektedir. İleride yapılacak deneylerde bunun aydınlatılması, kemoterapinin daha başarılı olması ve relapsların azalması için, cisplatin gibi sistemik yaklaşımlara ek olarak EpCAM+ hücrelerinde hedeflenmesini içeren kombine tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasını sağlayacaktır.

HpKKH deney modelimizde EZH2 tarafından katalizlenen H3K27me3 modifikasyonunun hangi genleri transkripsiyonel olarak kontrol ettiğini belirlemek amacıyla H3K27me3-ChIPseq deneyi yapılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda ilginç olarak, özellikle kök hücrelerde pluripotensinin korunmasından sorumlu bir transkripsiyon faktör olan KLF4’ün EZH2 hedefi olduğu belirlenmiş ve gerçek zamanlı nicel PCR ile hem promotor bölgedeki H3K27me3 regülasyonunun azaldığı ve hem de buna paralel olarak KLF4 ekspresyon düzeyindeki artış belirlenmiştir. Daha önce tanımlanmamış bir mekanizma olarak HpKKH’lerde EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu ile KLF4 regülasyonunun HCC’de tümörün invaziv karakter kazanma ve metastaz yapma yeteneği ile ilişkili bir mekanizmayı düzenliyor olabileceği gösterilmiştir.

KLF4, hem tümörögenez hem de gelişim sürecinde epitelyal hücrelerin çoğalması ve diferansiyasyonundan sorumlu bir transkripsiyon faktördür. Pluripotensi transkripsiyon faktörü olarak da tanımlanan KLF4 ekspresyonunun primer HCC'lerde azaldığı ya da tamamen kaybı gözlenmiştir. Bu azalma kötü prognoz ile ilişkilidir. KLF4'ün tümör baskılayıcı gen gibi davrandığını ve bunu metastazı baskılama yolu ile yaptığını gösteren çeşitli HCC çalışmaları da mevcuttur (Lin, Chu et al. 2012) (Lin, Chu et al. 2016). Chu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, KLF4'ün ektopik ekspresyonunun fare HCC hücrelerinin morfolojilerini daha epitelyal benzeri olarak düzenlediği gösterilmiş ve KLF4 ekspresyonu baskılandığında ise migrasyonun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada HCC dokularının 50%'sinde KLF4'ün mRNA düzeyinde az olduğu ve SLUG ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu gösterilmiş, yapılan ileri analizlerde KLF4'un bir EMT ilişkili TF olan Slug promotoru ile ilişkili olduğu ve ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Lin, Chu et al. 2012). Bizim çalışmamızda da EZH2 sessizleştirilen HuH-7 EpCAM+ hücrelerde KLF4 ekspresyonu artmış, SLUG ekspresyonu azalmış ve invaziv hücre sayısı azalmıştır ve bu literatürde HCC ile ilgili olarak ilk defa gösterilmiştir.

Metastaz sürecinin mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da epitelyal-mezenşimal (EMT) dönüşüm bu süreçte öncü bir rol oynamaktadır. Bu EMT dönüşümünden KKH'leri sorumlu tutulmaktadır (Marquardt, Factor et al. 2010). Tümörün yakın veya uzak metastaz yapabilme yeteneği kanser nedeni ile ölümlerin başlıca nedenidir. Bazı tümörler kısmi EMT özellikleri gösterirler. Yani, mezenşimal belirteçleri eksprese etmeye başlamışlardır fakat aynı zamanda epitelyal karakteri de korumaktadırlar (Tam and Weinberg 2013). E-kaderin en iyi tanımlanan epitelyal hücre belirteci, Vimentin ise en iyi tanımlanan mezenşimal hücre belirtecidir. Slug ise EMT sürecini epitelyal proteinleri baskılayarak düzenleyen bir transkripsiyon faktördür. Çalışmamızda EZH2 geni sessizleştirilmiş shEZH2-HuH-7 (EpCAM+) hücrelerinin invazyonundaki azalma ve SLUG gen ekspresyonunun azalması ile uyumlu bir şekilde Vimentin miktarı da azalırken E-kaderinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Bu da bize HpKKH'lerin kısmi EMT sürecinin KLF4'ün EZH2 aracılığıyla H3K27me3 modifikasyonu ile regülasyonu ile düzenlendiğini göstermektedir.

EpCAM+ hücrelerde EZH2 sessizleştirilmesi sonucu motil hücre sayısı değişmezken invazif hücre sayısındaki azalma EZH2'nin hücre motilitesini, deney modelimizde kullandığımız boyden chamberda oluşan tekli geçiştiren farklı bir mekanizma ile düzenliyor olabileceğini düşündürmüştür. Hücrelerin hücre-hücre bağlantılarını kaybetmesi sonucu tek başına migrasyon yeteneği kazanmasından farklı olarak, birçok hücrenin, hücre-hücre bağlantılarını koruyarak, aktin dinamikleri ve hücre içi sinyal iletimini koordine ederek birarada yer değiştirme yada başka bir deyişle toplu motiliteleri farklı çalışmalarda ve modellerde tanımlanmıştı (Hager, Alexander et al. 2013). Çalışmamızda kullandığımız 8.0 mikron çaplı motilite deney sistemleri hücrelerin birlikte göçünü gözlemlemek için sınırlı kalmaktadır. Yara onarımı deney sistemi ile hücre motilitesinin değerlendirilmesi EZH2'nin EpCAM+ hücrelerde motiliteyi nasıl düzenlediğini daha net aydınlatacaktır.

DNA hipermetilasyonu ile epigenetik susturma kanserlerde oldukça sık gözlemlenmekle beraber özellikle TSG bölgelerinin baskılanması nedeniyle kanseri tetiklediği bilinmektedir. ESC'lerde PcG hedef genlerinin yaşlı somatik hücrelerde hipermetile olduğu ve ESC'lerde PcG hedefi olduğu belirlenen genlerin kanserlerde PcG hedefi olmayanlara kıyasla 12 kat daha fazla hipermetile olduğu gösterilmiştir (Sauvageau and Sauvageau 2010). Kolon ve prostat kanserleri ile yapılan bir çalışmada hipermetile gen bölgelerinin 50%'sinin de novo metilasyonu için önceden EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonu içerdiği gösterilmiştir. Kanser sürecinde PcG proteinleri ile DNA metilasyonu ilişkisi EZH2'nin DNMT1/2 ve 3 ile direk etkileştiğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir. Bu etkileşim EZH2 tarafından baskılanan gen bölgesinin daha sonraki DNMT'lar tarafından metillenme basamağı için gerekmektedir (Sauvageau and Sauvageau 2010). Song ve arkadaşları, 27 adet HCC ve 20 adet komşu normal dokunun CpG bölgelerini analiz etmiş ve DNA metilasyon kalıbının 13% oranında değiştiğini, bu değişimin 97%'sinde hipometilasyon, 3%'ünde ise hipermetilasyon olduğunu belirlemişlerdir (Song, Tiirikainen et al. 2013). Hipermetile bölgelerin ise 37%'sinin promotor bölgede olduğu gösterilmiştir. Biz de bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada elde edilen gen seti ile çalışmamızda ChIPseq sonucunda elde ettiğimiz H3K27me3 hedefi olan promotor bölgeleri karşılaştırdığımızda 98 tanesinin ortak olduğunu gözlemledik. DAVID analiz programı ile bu genlerin hangi biyolojik olaylarda birlikte çalıştıklarını belirledik. Buna

göre HCC'lerde hipermetile olan ve EZH2 aracılıklı H3K27me3 hedefi olan genler ağırlıklı olarak; peptid, hormon ve insulin salınımının regülasyonunda, hücre-substrat, hücre-hücre adezyonunun regülasyonunda, proteinlerin taşınması ve lokalizasyonunun regülasyonunda, embriyonik epitelyumun ve epitelyumun morfogenezinde, nükleik asit biyosentetik sürecinde görev alan gen gruplarını içermektedir.

Son yıllarda lösemi gibi sadece birkaç kanser türünde klinik olarak uygulanabilen “diferansiyasyon tedavisi” malign kanser hücrelerini benign fenotipe çevirmekle kalmayıp, KKH'leri farklılaşmalarını sağlayarak kendi kendilerini yenileme yeteneklerinin de baskılanmasını sağlamaktadır. Bu tedavi yaklaşımı HpKKH'lerde de denenmiştir. Zhang ve arkadaşları lösemide kullanılan all-trans retinoik asit (ATRA)'in, EpCAM+ HCC hücrelerinin, KKH belirteçlerinin azalması ve karaciğer spesifik gen ekspresyonunu indüklenmesi yoluyla hücrelerin diferansiyasyonunu sağladığını göstermişlerdir. ATRA ve cis-platin birlikte uygulamalarının, sadece cis-platin uygulanan tedavilere göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Zhang, Guan et al. 2013). Oncostatin M (OSM), STAT3 aktivasyonu ile hepatoblastların hepatosite farklılaşmasını indüklemektedir. Yamashita ve grubu yaptıkları çalışmada, OSM uygulanan EpCAM+ HpKKH'lerin, OSMR sinyal yolağının aktivasyonu ile hepatositik diferansiyasyona yönlendiklerini göstermiştir (Cheng, Li et al. 2016). OSM ve 5-FU birarada kullanılarak hem HpKKH'lerin hem de KKH olmayan hepatoma hücrelerinin hedef alınarak HCC'nin daha etkin şekilde elimine edildiğini göstermişlerdir (Yamashita, Honda et al. 2010, Cheng, Li et al. 2016). EZH2 aracılıklı H3K27me3 hedefi olan hepatosit spesifik TF'ler belirlenmesi ve EZH2 sessizleştirilmesine paralel şekilde bu TF'lerin ekspresyonlarının artması ile birlikte kemoterapi, radyoterapi gibi tedavilerin birarada uygulanmasının tedaviyi daha etkin hale getirebileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda biyoinformatik analizlerini gerçekleştirdiğimiz, epigenetik olarak regüle edilen bu gen veya gen setlerinin ileride HCC tedavisinde hedeflenebilecek molekül ve/veya mekanizmalar olarak ve diferansiyasyon tedavisi gibi yaklaşımlarda konvansiyonel tedaviyi destekleyici olarak kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proje kapsamında;

1- EZH2, lentiviral shRNA yöntemi ile HuH-7 hücre hattında kalıcı olarak susturulduktan sonra, proliferasyon, motilite, invazyon ve hücre döngüsü gibi süreçlere etkisini belirlemek amacıyla in vitro ve in vivo biyolojik davranış deneyleri yapılmıştır. EZH2'nin HuH-7 hücrelerinde sessizleştirilmesinin hücre döngüsü üzerine herhangi bir etkisi olmazken, hücre proliferasyonunu artırmakta, motilite ve invazyonu azaltmaktadır.

2- EZH2 sessizleştirdiğimiz hücre grubu içinden FACS yöntemi ile ayırdığımız, tümör başlatma kapasitesine sahip olan EpCAM+ HuH-7 hücreleri ile yapılan deneylerde proliferasyon artarken, tekli hücre motilitesinde anlamlı değişiklik olmamakla beraber invazyon azalmaktadır. Atasal hücrelerle EpCAM+ hücreler arasındaki EZH2 susturulmasının motilite üzerine etkilerinin farklı olması, EpCAM+ hücrelerin sıkı hücre hücre bağlantılarını bozmadan toplu göç etme yeteneklerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu sıkı hücre bağlantıları ve toplu epitel benzeri gruplanmaları çoğalmaları esnasında da gözlenlenmektedir.

3- HpKKH'lerde EZH2 aracılıklı H3K27me3 modifikasyonuna bağlı olarak transkripsiyonları kontrol edilen yaklaşık 1000 kadar gen belirlenmiştir. Bu genlerin hücre çoğalması, farklılaşması, ve benzeri biyolojik süreçlerde rol aldığı in siliko analizlerle gösterilmiştir.

4- *In siliko* analiz sonucunda elde edilen gen havuzundan seçilen KLF4 gen ekspresyonunun HpKKH'lerde H3K27me3 aracılığıyla regülasyonu ilk kez bu projede gösterilmiştir.

Bu proje kapsamında belirlenen mekanizmaların ileride HCC tedavisinde hedeflenebilecek molekül ve/veya mekanizmalar olarak kullanılabilme potansiyelleri yüksektir.

Kanser kök hücrelerin özellikle ilaç direnci ve immune sistemden kaçma mekanizmalarını aydınlatmak üzere, yeni hedef genlerin seçilebileceği yeni projelere temel oluşturabilecek veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızın devamında;

1- EZH2 sessizleştirilen HuH-7(EPCAM+) hücrelerde RNAseq veya RNA array yapılması ardından H3K27me3-ChIPseq verileri ile karşılaştırılması planlanmaktadır. Böylelikle, H3K27Me3 ye bağlanan ve bu bağlantının transkripsiyonunu RNA düzeyinde azalttığı tüm genlerin aynı anda belirlenmesi mümkün olacaktır.

2- EZH2'nin, EpCAM+ HpKKH'lerde toplu hücre migrasyonuna etkisi yara iyileşmesi çizik deneyleri ile belirlenmelidir.

3- EZH2 susturulmuş HpKKH grubu ve kontrolü ile oluşturulan "xenograft" hayvanlarda cisplatin ile uygulanacak sistemik tedavi etkisinin belirlenmesi, kombine tedavi yaklaşımları önerilmesine olanak sağlayacaktır.

3- EZH2 susturulmasının EMT/MET düzenlenmesine etkisinin belirlenmesi amacıyla, E-cadherin hücre içi lokalizasyon değişimleri ve diğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonel değişimleri analiz edilecektir.

7. KAYNAKLAR

Balch, C., K. P. Nephew, T. H. Huang and S. A. Bapat (2007). "Epigenetic "bivalently marked" process of cancer stem cell-driven tumorigenesis." Bioessays **29**(9): 842-845.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

Cheng, A. S., S. S. Lau, Y. Chen, Y. Kondo, M. S. Li, H. Feng, A. K. Ching, K. F. Cheung, H. K. Wong, J. H. Tong, H. Jin, K. W. Choy, J. Yu, K. F. To, N. Wong, T. H. Huang and J. J. Sung (2011). "EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes beta-catenin-dependent hepatocarcinogenesis." Cancer Res **71**(11): 4028-4039.

Cheng, Z., X. Li and J. Ding (2016). "Characteristics of liver cancer stem cells and clinical correlations." Cancer Lett **379**(2): 230-238.

Chiba, T., E. Suzuki, M. Negishi, A. Saraya, S. Miyagi, T. Konuma, S. Tanaka, M. Tada, F. Kanai, F. Imazeki, A. Iwama and O. Yokosuka (2012). "3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells." Int J Cancer **130**(11): 2557-2567.

Chiotaki, R., H. Polioudaki and P. A. Theodoropoulos (2016). "Stem cell technology in breast cancer: current status and potential applications." Stem Cells Cloning **9**: 17-29.

Choi, S. S. and A. M. Diehl (2009). "Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver." Hepatology **50**(6): 2007-2013.

Chou, R. H., L. Chiu, Y. L. Yu and W. C. Shyu (2015). "The potential roles of EZH2 in regenerative medicine." Cell Transplant **24**(3): 313-317.

Copur, M. S. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **359**(23): 2498; author reply 2498-2499.

Dhanasekaran, R., S. Bando and L. R. Roberts (2016). "Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances." F1000Res **5**.

Diepenbruck, M. and G. Christofori (2016). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?" Curr Opin Cell Biol **43**: 7-13.

Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." Hum Mol Genet **16 Spec No 1**: R50-59.

Farazi, P. A. and R. A. DePinho (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." Nat Rev Cancer **6**(9): 674-687.

Felipe Lima, J., S. Nofech-Mozes, J. Bayani and J. M. Bartlett (2016). "EMT in Breast Carcinoma-A Review." J Clin Med **5**(7).

Fujii, S. and A. Ochiai (2008). "Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells." Cancer Sci **99**(4): 738-746.

Glinsky, G. V. (2008). ""Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management." J Clin Oncol **26**(17): 2846-2853.

Goossens, N., X. Sun and Y. Hoshida (2015). "Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications." Hepat Oncol **2**(4): 371-379.

Gregory, P. A., A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall and G. J. Goodall (2008). "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1." Nat Cell Biol **10**(5): 593-601.

Hager, A., S. Alexander and P. Friedl (2013). "Cancer invasion and resistance." EJC Suppl **11**(2): 291-293.

Hardavella, G., R. George and T. Sethi (2016). "Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype." Transl Lung Cancer Res **5**(3): 272-279.

Khan, F. S., I. Ali, U. K. Afridi, M. Ishtiaq and R. Mehmood (2016). "Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics." Hepatol Int.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.

Lee, S., H. J. Lee, J. H. Kim, H. S. Lee, J. J. Jang and G. H. Kang (2003). "Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis." Am J Pathol **163**(4): 1371-1378.

Lin, Z. S., H. C. Chu, Y. C. Yen, B. C. Lewis and Y. W. Chen (2012). "Kruppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression." PLoS One **7**(8): e43593.

Lin, Z. S., H. C. Chu, Y. C. Yen, B. C. Lewis and Y. W. Chen (2016). "Correction: Kruppel-like Factor 4, a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells Reverts Epithelial Mesenchymal Transition by Suppressing Slug Expression." PLoS One **11**(4): e0154168.

Marquardt, J. U., V. M. Factor and S. S. Thorgeirsson (2010). "Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications." J

Hepatol **53**(3): 568-577.

Ortensi, B., M. Setti, D. Osti and G. Pelicci (2013). "Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness." Stem Cell Res Ther **4**(1): 18.

Packer, J. R. and N. J. Maitland (2016). "The molecular and cellular origin of human prostate cancer." Biochim Biophys Acta **1863**(6 Pt A): 1238-1260.

Parmiani, G. (2016). "Melanoma Cancer Stem Cells: Markers and Functions." Cancers (Basel) **8**(3).

Pearson, A. T., T. L. Jackson and J. E. Nor (2016). "Modeling head and neck cancer stem cell-mediated tumorigenesis." Cell Mol Life Sci **73**(17): 3279-3289.

Romano, M., F. De Francesco, G. Pirozzi, E. Gringeri, R. Boetto, M. Di Domenico, B. Zavan, G. A. Ferraro and U. Cillo (2015). "Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma." Oncoscience **2**(5): 443-456.

Roskams, T. (2006). "Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma." Oncogene **25**(27): 3818-3822.

Sancho, P., S. Alcala, V. Usachov, P. C. Hermann and B. Sainz, Jr. (2016). "The ever-changing landscape of pancreatic cancer stem cells." Pancreatology **16**(4): 489-496.

Sauvageau, M. and G. Sauvageau (2010). "Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer." Cell Stem Cell **7**(3): 299-313.

Sherman, M. (2005). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening." Semin Liver Dis **25**(2): 143-154.

Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka and D. Reinberg (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." Trends Genet **19**(11): 629-639.

Song, M. A., M. Tiirikainen, S. Kwee, G. Okimoto, H. Yu and L. L. Wong (2013). "Elucidating the landscape of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma." PLoS One **8**(2): e55761.

Tachi, K., A. Shiraishi, H. Bando, T. Yamashita, I. Tsuboi, T. Kato, H. Hara and O. Ohneda (2015). "FOXA1 expression affects to the proliferation activity of luminal breast cancer stem cell populations." Cancer Sci.

Tam, W. L. and R. A. Weinberg (2013). "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer." Nat Med **19**(11): 1438-1449.

Thorgeirsson, S. S. and J. W. Grisham (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." Nat Genet **31**(4): 339-346.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **65**(2): 87-108.

Turner, R., O. Lozoya, Y. Wang, V. Cardinale, E. Gaudio, G. Alpini, G. Mendel, E. Wauthier, C. Barbier, D. Alvaro and L. M. Reid (2011). "Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology." Hepatology **53**(3): 1035-1045.

Valk-Lingbeek, M. E., S. W. Bruggeman and M. van Lohuizen (2004). "Stem cells and cancer; the polycomb connection." Cell **118**(4): 409-418.

Wong, C. M., J. M. Lee, Y. P. Ching, D. Y. Jin and I. O. Ng (2003). "Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **63**(22): 7646-7651.

Wong, I. H., Y. M. Lo, J. Zhang, C. T. Liew, M. H. Ng, N. Wong, P. B. Lai, W. Y. Lau, N. M. Hjelm and P. J. Johnson (1999). "Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients." Cancer Res **59**(1): 71-73.

Yamaguchi, H. and M. C. Hung (2014). "Regulation and Role of EZH2 in Cancer." Cancer Res Treat **46**(3): 209-222.

Yamashita, T., A. Budhu, M. Forgues and X. W. Wang (2007). "Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **67**(22): 10831-10839.

Yamashita, T., M. Honda, K. Nio, Y. Nakamoto, T. Yamashita, H. Takamura, T. Tani, Y. Zen and S. Kaneko (2010). "Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation." Cancer Res **70**(11): 4687-4697.

Yamashita, T., J. Ji, A. Budhu, M. Forgues, W. Yang, H. Y. Wang, H. Jia, Q. Ye, L. X. Qin, E. Wauthier, L. M. Reid, H. Minato, M. Honda, S. Kaneko, Z. Y. Tang and X. W. Wang (2009). "EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features." Gastroenterology **136**(3): 1012-1024.

Yamashita, T. and X. W. Wang (2013). "Cancer stem cells in the development of liver cancer." J Clin Invest **123**(5): 1911-1918.

Zeuner, A., M. Todaro, G. Stassi and R. De Maria (2014). "Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic." Cell Stem Cell **15**(6): 692-705.

Zhang, Y., D. X. Guan, J. Shi, H. Gao, J. J. Li, J. S. Zhao, L. Qiu, J. Liu, N. Li, W. X. Guo, J. Xue, F. G. Zhou, M. C. Wu, H. Y. Wang, D. Xie and S. Q. Cheng (2013). "All-trans retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer." J Hepatol **59**(6): 1255-1263.

8.EKLER

8.1 Etik Kurul 1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUNUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	519 -GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Karaciğer Kanseri Kök Hücrelerinin Oluşturduğu Tümörögenezde,KLF4,Oct3/4,... Gibi Pluripotensi Genlerinin Yeniden Programlanması, Hipoksik Mikroçevre Ve EZH2'nin Olası Rollerinin Tanımlanması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Esra ERDAL Tıbbi Biyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/06-20	Tarih: 23.02.2012			
	Doç.Dr.Esra ERDAL'ın sorumlusu olduğu "Karaciğer Kanseri Kök Hücrelerinin Oluşturduğu Tümörögenizde,KLF4,Oct3/4,... Gibi Pluripotensi Genlerinin Yeniden Programlanması, Hipoksik Mikroçevre Ve EZH2'nin Olası Rollerinin Tanımlanması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr..Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

8.2 Etik Kurul 2

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2790-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	EZH2 Aracılıklı H3K27me3 Modifikasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Gelişimindeki Rolü
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Esra ERDAL Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/18-14	Tarih:30.06.2016
	Prof.Dr.Esra ERDAL'ın sorumlusu olduğu "EZH2 Aracılıklı H3K27me3 Modifikasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Gelişimindeki Rolü" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.3 Etik Kurul 3



Boğaziçi Üniversitesi
Kurumsal Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurulu

Sayın Prof.Dr. Şerife Esra Erdal

03.03.2015

Yürütücülüğünü üstlendiğiniz "Karaciğer kanser kök hücrelerinin oluşturduğu tümörögenizde, KLF4, Oct3/4, gibi pluripotensi genlerinin yeniden programlanması, hipoksik mikroçevre ve EZH2'nin olası rollerinin tanımlanması" (Tübitak-112T173) 12.01.2015 kodlu başvurunuz, Boğaziçi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03.03.2015 tarihli toplantısında görüşülerek onaylanmıştır.

Saygılarımızla,

BÜHADYEK Üyeleri:


Prof. Dr. Mehmet Kaya
(İstanbul Üniv., Tıp Fak. Fizyoloji ABD)


Prof. Dr. A. Nazlı Başak
(Boğaziçi Üniv., Mol.Bio. ve Gen.Böl.)


Doç. Dr. Burak Güçlü
(Boğaziçi Üniv., Biyomedikal Müh Ens.)


Mete Demircan

Veteriner Hekim Arzu Temizyürek
(Boğaziçi Üniv., Vivarium)
(Proje Ekibinde yer almaktadır)


Yrd.Doç.Dr. Elif Duman
(Boğaziçi Üniv., Psikoloji Böl.)

ÖZGEÇMİŞ

SANEM TERCAN AVCI

TC Kimlik No / Pasaport No:	24292823642
Doğum Yılı:	1981
Yaşama Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Kampüsü İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG-izmir) İnciraltı/İZMİR 35340 İzmir/Türkiye
Telefon:	
e-posta:	sanemtercan@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	TIBBİ BİYOLOJİ (GENETİK)	Yüksek Lisans	2010
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Lisans	2004

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP BİLİMLERİ		2004-2008

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Kanser Moleküler Biyolojisi , Sağlık Bilimleri , Tıbbi Biyoloji , Moleküler Biyokimya
Hepatosellüler karsinoma, histon modifikasyonları, hücre proliferasyonu

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
In-Vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi		360000	01.10.2015-01.10.2017	Bursiyer	Ulusal
(R)-Klavuzon Z'nin karaciğer kanser hücreleri ve karaciğer kanser kök hücreleri üzerindeki antikanser	TÜBİTAK Başkanlık	30000	01.11.2014-01.01.2015	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

Özelliklerinin incelenmesi					
Adiposit Kökenli Erişkin Kök Hücre Ekilmiş Kollagen-Elastin Matrisi Yardımı İle Kondroid Doku Elde Edilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	50000	11.06.2013-11.12.2014	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Karaciğer Kanseri Kök Hücrelerinin Oluşturduğu Tümörögenizde, KLF4, Oct3/4, ... gibi Pluripotensi Genlerinin Yeniden Programlanması, Hipoksik Mikroçevre ve EZH2' nin Olası Rollerinin Tanımlanması		360000	01.11.2012-01.01.2016	Bursiyer	Ulusal
Histon modifikasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine etkileri	Dokuz Eylül Üniversitesi	35000	04.11.2009-04.11.2011	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Trpc Gen Ailesinin Karsinogenezdeki İşlevsel Ekspresyon Kalıbının Post-Transkripsiyonel Gen Susturma ile Araştırılması		360000	01.06.2008-01.06.2011	Bursiyer	Ulusal
İnsan Kolon Kanseri SW480 Hücre Hattında 5-Fu, Oksaliplatin, Irinotekan ve Raltitrekse ve Çeşitli Kombinasyonlarının Kemosenesivitesinin Değerlendirilmesi		19513.52	01.06.2006-01.06.2007	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Değerlendirme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet /sorumluluk /olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Uzman araştırma yarışması Deneysel dal Birincilik Ödülü	Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği	2014
En iyi poster ödülü	Hadassah Medical Center	2014

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler**

Gunes, Aysim; Iscan, Evin; Topel, Hande; Avci, Sanem Tercan; Gumustekin, Mukaddes; Erdal, Esra; Atabey, Nese, Heparin treatment increases thioredoxin interacting protein expression in hepatocellular carcinoma cells, 2015, INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

Zeynep Firtina Kamagonlar, Doğukan Koç, Eren Şahin, Sanem Tercan Avci, Mustafa Yılmaz, Neşe Atabey, Esra Erdal, Effect of adipocyte-secreted factors on EpCAM+/CD133+ hepatic stem cell population., 2016, Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

A novel mechanism for the regulation of H3K27me3 modification in the Hepatocellular Carcinoma cellline, Huh-7, EMBO Conference: Chromatin and Epigenetics, 2015

KLF4 Induces Stemness in HuH7 Hepatocellular Carcinoma Cell Line, 1st World Conference on Targeting Liver Diseases, 2014

Effects of Lithium-Induced Cell Cycle Arrest On The Histone 3 Lysine 27 Methylation in HuH 7, Hepatocellular Carcinoma Cell Line, Cell signal-omics Integrated cellular pathology - Systems biology of human diseases, 2011

İnsan Kolon Kanseri SW480 Hücre Hatında 5-Flurourasil, Oksaliptatin, İrinotekan ve Raltitrekse ve Çeşitli Kombinasyonlarının Kemosensitivitelerinin Belirlenmesi, II. Multidisipliner Kanseri Araştırmaları Sempozyumu , 2008

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :18/05/2016